

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 2000/45/EB

2002/EES/31/08

frá 6. júlí 2000

um greiningaraðferðir til að ákvarða A-vítamín, E-vítamín og tryptófan í fóðri(*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 70/373/EBE frá 20. júlí 1970 um að taka upp í bandalaginu aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fóðri ⁽¹⁾, eins og henni var síðast breytt með lögunum um aðild Austurríkis, Finnlands og Svíþjóðar ⁽²⁾, einkum 2. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í tilskipun 70/373/EBE er mælt fyrir um að við opinbert eftirlit með fóðri, í því skyni að kanna hvort kröfum laga og stjórnsýslufyrirmæla sem fjalla um eiginleika þess og samsetningu sé fullnægt, skuli beita bandalagsaðferðum við sýnatöku og greiningu.
- 2) Í tilskipun ráðsins 70/524/EBE frá 23. nóvember 1970 um aukefni í fóðri ⁽³⁾, eins og henni var síðast breytt með reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 2439/1999 frá 17. nóvember 1999 ⁽⁴⁾, er mælt fyrir um að innihald A- og E-vítamíns skuli tilgreint á merkimiða ef þessum efnunum er bætt í forblöndur og fóður.
- 3) Í tilskipun ráðsins 79/373/EBE frá 2. apríl 1979 um markaðssetningu blandaðs fóðurs ⁽⁵⁾, eins og henni var síðast breytt með tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 2000/16/EB ⁽⁶⁾ og tilskipun ráðsins 93/74/EBE frá 13. september 1993 um fóður sem er miðað við sérstök næringarmarkmið ⁽⁷⁾, eins og henni var síðast breytt með tilskipun 96/25/EB ⁽⁸⁾, er mælt fyrir um að amínósýrur skuli tilgreindar á merkimiða fóðursins.
- 4) Ákvarða ber greiningaraðferðir bandalagsins til þess að hafa eftirlit með þessum efnunum.
- 5) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari tilskipun, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um fóður.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Aðildarríkin skulu kveða á um að greiningar vegna opinbers eftirlits með innihaldi A-vítamíns, E-vítamíns og tryptófans í fóðri og forblöndum, fari fram samkvæmt þeim aðferðum sem mælt er fyrir um í viðaukanum við þessa tilskipun.

2. gr.

Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að ákvæðum þessarar tilskipunar eigi síðar en 31. ágúst 2000. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni þegar í stað.

Þau skulu beita þessum ráðstöfunum frá 1. september 2000.

Þegar aðildarríkin samþykkja þessar ráðstafanir skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þær eru birtar opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

3. gr.

Tilskipun þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna*.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 6. júlí 2000.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

David BYRNE

framkvæmdastjóri.

(*) Þessi EB-gerð, sem birtist í Stjtíð. EB L 174, 13.7.2000, bls. 32, var nefnd í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 132/2001 frá 9. nóvember 2001 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn. Sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópubandalaganna nr. 6, 24.1.2002, bls. 14.

⁽¹⁾ Stjtíð. EB L 170, 3.8.1970, bls. 2.

⁽²⁾ Stjtíð. EB C 241, 29.8.1994, bls. 1.

⁽³⁾ Stjtíð. EB L 270, 14.12.1970, bls. 1.

⁽⁴⁾ Stjtíð. EB L 297, 18.11.1999, bls. 8.

⁽⁵⁾ Stjtíð. EB L 86, 6.4.1979, bls. 30.

⁽⁶⁾ Stjtíð. EB L 105, 3.5.2000, bls. 36.

⁽⁷⁾ Stjtíð. EB L 237, 22.9.1993, bls. 23.

⁽⁸⁾ Stjtíð. EB L 125, 23.5.1996, bls. 35.

VIÐAUKI

A-HLUTI

ÁKVÖRDUN A-VÍTAMÍNS

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða A-vítamín (retínól) í fóðri og forblöndum. Með A-vítamíni er átt við *al-trans*-retínýl-alkóhól og *sis*-myndbrigði þess sem ákvörðuð eru með þessari aðferð. Innihald A-vítamíns er gefið upp í alþjóðlegum einingum (IU) á kílógramm. Ein alþjóðleg eining samsvarar 0,300 µg virkni *al-trans*-A-vítamín-alkóhóls eða 0,344 µg *al-trans*-A-vítamín-asetats eða 0,550 µg *al-trans*-A-vítamín-palmítats.

Ákvörðunarmörk eru 2000 IU A-vítamín/kg.

2. Meginregla

Sýnið er vatnsrofið með etanól- og kalíumhýdroxíðlausn og A-vítamínið er dregið út með hreinsuðu bensíni (petróleumetra). Leysirinn er fjarlægður með uppgufun og leifin er leyst upp í metanóli og, ef nauðsyn ber til, þynnt út í þann styrk sem krafist er. Innihald A-vítamíns er ákvarðað með hágæðavökvaskiljun með umbreyttum (vatnsfælnum) fastfasa (RP-HPLC) og ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós eða flúrskinsnema. Færibreyturnar fyrir vökvaskiljunina eru valdar þannig að *al-trans*-A-vítamín-alkóhól og *sis*-myndbrigði þess skiljist ekki að.

3. Prófunarefni

3.1. Etanól, = 96%

3.2. Hreinsað bensín, suðumark 40 til 60 °C

3.3. Metanól

3.4. Kalíumhýdroxíðlausn, = 50 g/100 ml

3.5. Natríumaskorbatlausn, = 10 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, = 120 g/l (þar sem $x = 9$) (sjá athugasemdir í lið 7.8)

3.7. Fenólfaltalínlausn, = 2 g/100 ml í etanóli (3.1)

3.8. 2-própanól

3.9. Ferðafasi fyrir hágæðavökvaskiljun: blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. $980 + 20 (v + v)$. Nákvæmt hlutfall ákvarðast af eiginleikum súlnnar sem notuð er.

3.10. Köfnunarefni, súrefnisfrítt

3.11. *Al-trans*-A-vítamín-asetat, sérstaklega hreint, með vottaða virkni, t.d. $2,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$

3.11.1. Stofnlausn *al-trans*-A-vítamín-asetats: 50 mg af A-vítamín-asetati (3.11) eru vigtuð með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í 2-própanóli (3.8) og fyllt upp að kvarðamerkinu með sama leysi. Nafnstyrkur þessarar lausnar er 1400 IU af A-vítamíni á ml. Nákvæmt innihald verður að ákvarða samkvæmt lið 5.6.3.1.

3.12. *Al-trans*-A-vítamín-palmítat, sérstaklega hreint, með vottaða virkni, t.d. $1,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$

3.12.1. Stofnlausn *al-trans*-A-vítamín-palmítats: 80 mg af A-vítamín-palmítati (3.12) eru vigtuð með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í 2-própanóli (3.8) og fyllt upp að kvarðamerkinu með sama leysi. Nafnstyrkur þessarar lausnar er 1400 IU af A-vítamíni á ml. Nákvæmt innihald verður að ákvarða samkvæmt lið 5.6.3.2.

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

4. Búnaður

4.1. Hverfieimur undir lágbrýstingi (Vacuum rotary evaporator)

4.2. Glerbúnaður með brúnleitu gleri

- 4.2.1. Flöskur með flötum botni eða keilulaga flöskur, 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, 1000 ml skiltrekkir 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 gashleðsluleiðslu
- 4.4. Samanbrottinn síupappír til fasaskiljunar, þvermál 185 mm (t.d. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Hágæðavökvaskiljunarbúnaður með innsprautunarkerfi
- 4.5.1. Vökvaskiljunarsúla, 250 mm x 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 µm pökkunarefni eða sambærilegt (viðmiðunarforsenda afkasta: einungis einn toppur fyrir öll retínól-myndbrigði samkvæmt skilyrðum hágæðavökvaskiljunar)
- 4.5.2. Ísogsnemi fyrir útfjólublátt ljós eða flúrskinsnemi með stillanlegri bylgjulengd
- 4.6. Lítrófsmælir með 10 mm sýnahyllkjum 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 ætti að vera U-laga en útrennslið í hinum endanum þannig að hægt sé að flytja efra vökvalagið í sívalningnum yfir í skiltrekk.

5. Framkvæmd

Aths.: A-vítamín er næmt fyrir útfjólubláu ljósi og oxun. Öll framkvæmd skal fara fram án ljóss (með því að nota glerbúnað með brúnleitu gleri eða glerbúnað sem varinn er með álpappír) og súrefnis (með því að skola með köfnunarefni). Meðan á útdrættinum stendur ætti að setja köfnunarefni í stað loftsins fyrir ofan vökvann (komið er í veg fyrir af mikinn þrýsting með því að losa um tappann af og til).

5.1. Sýnið undirbúið

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

5.2. Sápun

Míðað við innihald A-vítamíns eru 2 til 25 g af sýninu vigtuð með 0,01 g nákvæmni í 500 ml flösku með flötum botni eða keilulösku (4.2.1). Meðan flöskunni er hringsnúið er 130 ml af etanóli (3.1), u.þ.b. 100 mg af BHT (3.13), 2 ml af natríumskorbatlausn (3.5) og 2 ml af natríumsúlfíðlausn (3.6) bætt við hverju á eftir öðru. Eimsvali (4.3) er tengdur við flöskuna og henni dýft í vatnsbað með segulhræribúnaði (4.7). Hitað að suðu og látið endursjóða í fimm mínútur. Síðan er 25 ml af kalíumhýdroxíðlausninni (3.4) bætt við í gegnum eimsvalann (4.3) og látið endursjóða 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 niður í stofuhita.

5.3. Útdráttur

Sápunarlausnin er flutt magnbundið með afhellingu í 1000 ml skiltrekk (4.2.3) eða í útdráttarbúnaðinn (4.8) með því að skola í heild með 250 ml af vatni. Sápunarfaskan er skoluð með 25 ml af etanóli (3.1) og síðan 100 ml af hreinsuðu bensíni (3.2) og skolunarlausnirnar eru fluttar í skiltrekkina eða í útdráttarbúnaðinn. Hlutfall vatns og etanóls í sameinuðum lausnunum ætti að vera um 2:1. Hrist kröftuglega í tvær mínútur og látið setjast til í tvær mínútur.

5.3.1. Útdráttur með skiltrekk (4.2.3)

Þegar löggin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er lagið með hreinsaða bensíninu flutt í aðra skiltrekk (4.2.3). Þessi útdráttur er endurtekinn tvisvar með 100 ml af hreinsuðu bensíni (3.2) og tvisvar með 50 ml af hreinsuðu bensíni (3.2).

Sameinuðu útdrættirnir eru þvegnir tvisvar í skiltrektinni með því að hringsnúa varlega (til að forðast að ýrulausnir myndist) með 100 ml skömmtum af vatni og síðan með því að hrista aftur með 100 ml skömmtum af vatni til viðbótar þar til vatnið helst litlaust þegar fenólftalínlausn (3.7) er bætt út í (venjulega er nóg að þvo fjórum sinnum). Þvegni údrátturinn er síaður með þurri, samanbrotinni síu til fasaskiljunar (4.4) til að fjarlægja allt vatn sem eftir verður í 500 ml mæliflösku (4.2.2). Skiltrekin og sían eru skoluð með 50 ml af hreinsuðu bensíni (3.2), fyllt upp að kvarðamerkinu með hreinsuðu bensíni (3.2) og blandað vel saman.

5.3.2. Údráttur með údráttarbúnaði (4.8)

Þegar löggin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er flaskan með karltenginu úr slípaða glerinu (4.8.2) sett í stað tappa glersívalningsins (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 hreinsaða bensínsins flutt í 1000 ml skiltrekt (4.2.3). Bætt er í glersívalninginn 100 ml af hreinsuðu bensíni (3.2), tappinn settur í og hrist vel. Löggin eru látin skiljast að og efra lagið er flutt í skiltrektina eins og áður. Údráttaraðferðin er endurtekin með 100 ml af hreinsuðu bensíni (3.2) til viðbótar og síðan tvisvar með 50 ml skömmtum af hreinsuðu bensíni (3.2) og lögnum af hreinsaða bensíninu er bætt við í skiltrektina.

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

5.4. Tilreiðsla sýnislausnarinnar fyrir hágæðavökvaskiljun

Deiliskammtur af lausn hreinsaða bensínsins (úr lið 5.3.1 eða 5.3.2) er fluttur með rennipípu í 250 ml perufflösku (4.2.4). Leysirinn er látinn gufa upp á hverfieiminum (4.1), þar til hann er nánast þurr, við lækkaðan þrýsting og baðhita sem fer ekki yfir 40 °C. Loftþrýstingi er komið aftur á með því að hleypa inn köfnunarefni (3.10) og flaskan er fjarlægð af hverfieiminum. Leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.10) og leifin er tafarlaust leyst upp í þekktu rúmmáli (10-100 ml) af metanóli (3.3) (styrkur A-vítamíns ætti að vera á bilinu 5 IU/ml til 30 IU/ml).

5.5. Ákvörðun með hágæðavökvaskiljun

Skiljun A-vítamíns fer fram með C₁₈-súlu í umbreyttum (vatnsfælnum) fasa (4.5.1) og styrkurinn er mældur með ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós (325 nm) eða flúrskinsnema (örvunarbylgjulengd: 325 nm, útgeislunarbylgjulengd: 475 nm) (4.5.2).

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

Skilyrði vegna hágæðavökvaskiljunar

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

Vökvaskiljunarsúla (4.5.1):	250 mm x 4 mm, C ₁₈ , 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt
Ferðafasi (3.9):	Blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (v + v)
Rennslis hraði:	1-2 ml/mín.
Nemi (4.5.2):	Ísogsnemi fyrir útfjólublátt ljós (325 nm) eða flúrskinsnemi (örvunarbylgjulengd: 325 nm/útgeislunarbylgjulengd: 475 nm)

5.6. Kvörðun

5.6.1. Tilreiðsla á staðalvinnulausnum

Fluttir eru 20 ml af stofnlausn A-vítamín-asetats (3.11.1) eða 20 ml af stofnlausn A-vítamín-palmítats (3.12.1) með rennipípu í 500 ml flösku með flötum botni eða keiluflösku (4.2.1) og síðan er vatnsrofið samkvæmt lið 5.2, en án þess að BHT sé bætt við. Því næst er dregið út með hreinsuðu bensíni (3.2) samkvæmt lið 5.3 og fyllt upp að 500 ml markinu með hreinsuðu bensíni (3.2). Á hverfieiminum (sjá lið 5.4) eru 100 ml af þessum údrætti látnir gufa upp þar til hann er nánast þurr. Leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.10) og leifin er leyst upp aftur í 10,0 ml af metanóli (3.3). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 560 IU af A-vítamíni á ml. Ákvarða skal nákvæmt innihald samkvæmt lið 5.6.3.3. Staðalvinnulausnin skal vera nýlögð við notkun.

Fluttir eru 2,0 ml af þessari staðalvinnulausn með rennipípu í 20 ml mæliflösku, fyllt upp að kvarðamerkinu með metanóli (3.3) og blandað. Nafnstyrkur þessarar úþynntu staðalvinnulausnar er 56 IU af A-vítamíni á ml.

5.6.2. Tilreiðsla kvörðunarlausnanna og kvörðunargrafsins

Settir eru 1,0, 2,0, 5,0, og 10,0 ml af útpynnntu staðalvinnulausninni í röð 20 ml mæliflaskna, fyllt upp að kvarðamerkinu með metanóli (3.3) og blandað. Nafnstyrkir þessara lausna eru 2,8, 5,6, 14,0 og 28,0 IU af A-vítamíni á ml.

Hverri kvörðunarlausn er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-toppflatarmál) er ákvörðuð. Meðaltopphæð (-toppflatarmál) er notuð til að teikna kvörðunargraf að teknu tilliti til niðurstaðna sem fást með sannprófun með útfjólubláu ljósi (5.6.3.3).

5.6.3. Stöðlun staðallausnanna með útfjólubláu ljósi

5.6.3.1. Stofnlausn A-vítamín-asetats

Fluttir eru 2,0 ml af stofnlausn A-vítamín-asetats (3.11.1) með rennipípu í 50 ml mæliflösku (4.2.2) og fyllt upp að kvarðamerkinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 56 IU af A-vítamíni á ml. Fluttir eru 3,0 ml af þessari útpynnntu A-vítamín-asetatslausn með rennipípu í 25 ml mæliflösku og fyllt upp að kvarðamerkinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 6,72 IU af A-vítamíni á ml. Útfjólublátt litróf þessarar lausnar er borið saman við 2-própanól (3.8) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Hámark í eðlisgleyfni skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

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

$$\left(E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}\right) \text{ fyrir A-vítamín-asetat} = 1 \text{ 530 við } 326 \text{ nm í 2-própanóli}$$

5.6.3.2. Stofnlausn A-vítamín-palmítats

Fluttir eru 2,0 ml af stofnlausn A-vítamín-palmítats (3.12.1) með rennipípu í 50 ml mæliflösku (4.2.2) og fyllt upp að kvarðamerkinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 56 IU af A-vítamíni á ml. Fluttir eru 3,0 ml af þessari útpynnntu A-vítamín-palmítatslausn með rennipípu í 25 ml mæliflösku og fyllt upp að kvarðamerkinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 6,72 IU af A-vítamíni á ml. Útfjólublátt litróf þessarar lausnar er borið saman við 2-própanól (3.8) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Hámark í eðlisgleyfni skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

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

$$\left(E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}\right) \text{ fyrir A-vítamín-palmítat} = 957 \text{ við } 326 \text{ nm í 2-própanóli}$$

5.6.3.3. Staðalvinnulausn A-vítamíns

Fluttir eru 3,0 ml af óútpynntri staðalvinnulausn A-vítamíns, tilreidd samkvæmt lið 5.6.1, með rennipípu í 50 ml mæliflösku (4.2.2) og fyllt upp að kvarðamerkinu með 2-própanóli (3.8). Fluttir eru 5,0 ml af þessari lausn með rennipípu í 25 ml mæliflösku og fyllt upp að kvarðamerkinu með 2-própanóli (3.8). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 6,72 IU af A-vítamíni á ml. Útfjólublátt litróf þessarar lausnar er borið saman við 2-própanól (3.8) í litrófsmælinum (4.6) á bilinu 300 nm til 400 nm. Hámark í eðlisgleyfni skal vera á bilinu 325 nm til 327 nm.

Útreikningur á innihaldi A-vítamíns:

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

$$\left(E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}\right) \text{ fyrir A-vítamín-alkóhól} = 1 \text{ 821 við } 325 \text{ nm í 2-própanóli}$$

6. Útreikningur niðurstaðna

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

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

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

þar sem:

= A-vítamínstyrkur sýnislausnarinnar (5.4), gefinn upp í IU/ml

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

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

m = massi prófunarskammtsins, gefinn upp í g

7. Athugasemdir

- 7.1. Fyrir sýni, sem hafa líftinn A-vítamínstyrk, getur verið hentugt að sameina útdrætti hreinsaðs bensíns úr tveimur sápunarhleðslum (magn sem vigtað er: 25 g) í eina sýnislausn til ákvörðunar með hágæðavökvaskiljun.
- 7.2. Þyngd sýnisins, sem tekið er til greiningar, skal ekki innihalda meira en 2 g af fitu.
- 7.3. Ef fasaskiljun á sér ekki stað skal bæta við u. þ. b. 10 ml af etanóli (3.1) til að rjúfa ýrulausnina.
- 7.4. Lengja skal sápunartímann í 45-60 mínútur fyrir þorskalýsi og aðrar hreinar fitur.
- 7.5. Hægt er að nota hýdrókínón í stað BHT.
- 7.6. Skiljun retínól-myndbrigða er möguleg ef notuð er súla með óblönduðum fasa (normal phase-column).
- 7.7. Í stað natríumaskorbatslausnar er hægt að nota u. þ. b. 150 mg af askorbínsýru.
- 7.8. Í stað natríumsúlfíðlausnar er hægt að nota u. þ. b. 50 mg af EDTA.

8. Endurtekningarnákvæmni

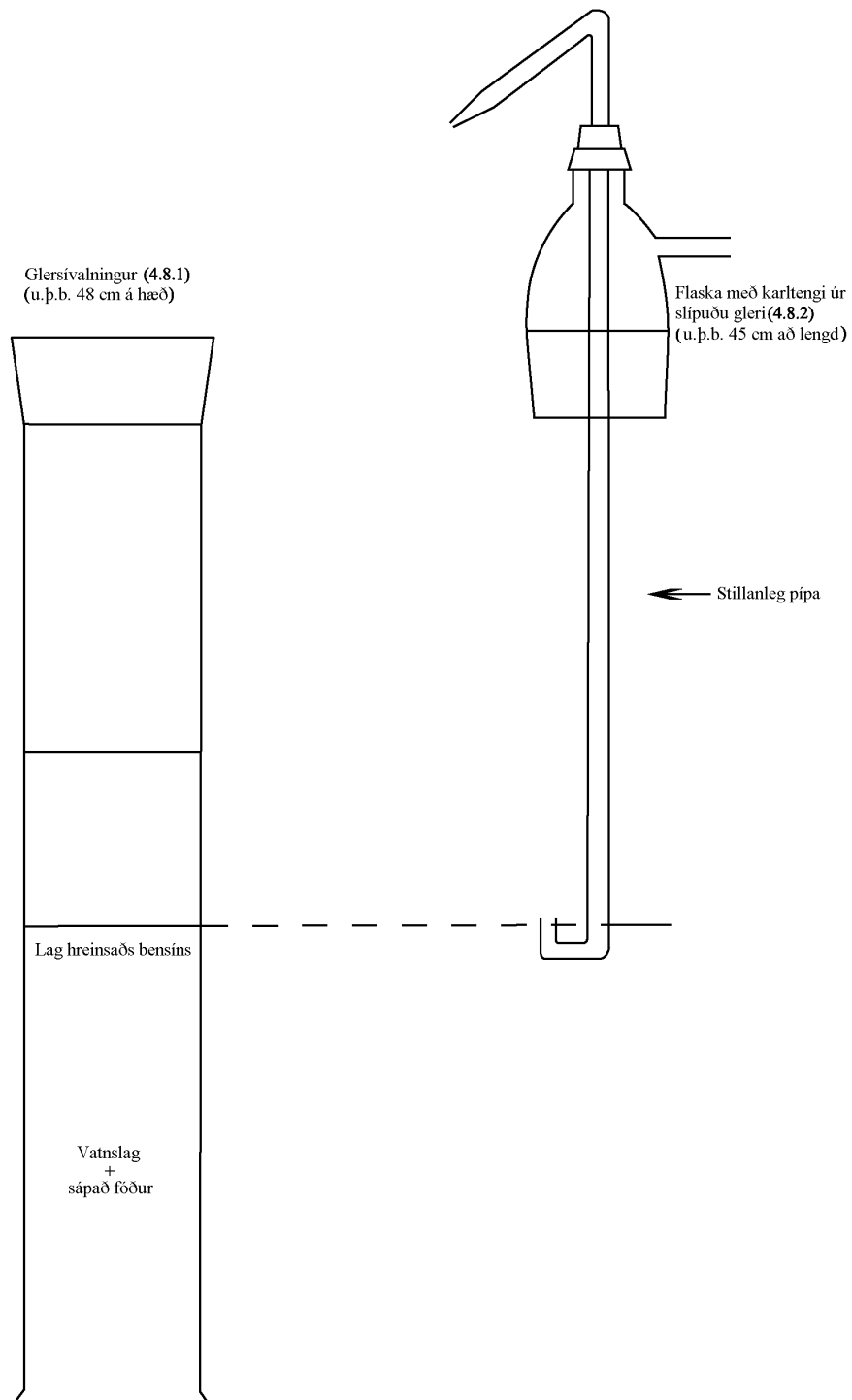
Mismunur niðurstaðna úr tveimur samhlíða ákvörðunum á sama sýninu skal ekki vera meiri en 15% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið.

9. Niðurstöður samanburðarrannsóknar ⁽¹⁾

	Forblanda	Forblöndufóður	Steinefnabykkni	Prótfínfóður	Mjólkurgrís
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
meðalgildi [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: fjöldi rannsóknarstofa
n: fjöldi einstakra gilda
 s_r : staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 s_R : staðalfrávik samanburðarnákvæmni
 r : endurtekningarnákvæmni
 R : samanburðarnákvæmni
 CV_r : frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni
 CV_R : frávíksstuðull samanburðarnákvæmni

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

Mynd 1: Útdráttarbúnaður (4.8)

B-HLUTI

ÁKVÖRÐUN E-VÍTAMÍNS

1. Tilgangur og gildissvið

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

Ákvörðunarmörk eru 2 mg E-vítamín/kg.

2. Meginregla

Sýnið er vatnsrofið með etanól- og kalíumhýdroxíðlausn og E-vítamínið er dregið út með hreinsuðu bensíni. 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 hágæðavökvaskiljun með umbreyttum (vatnsfælnum) fastfasa (RP-HPLC) og flúrskinsnema eða ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós.

3. Prófunarefni

3.1. Etanól, = 96%

3.2. Hreinsað bensín, suðumark 40 til 60 °C

3.3. Metanól

3.4. Kalíumhýdroxíðlausn, = 50 g/100 ml

3.5. Natríumaskorbatlausn, = 10 g/100 ml (sjá athugasemdir í lið 7.7)

3.6. Natríumsúlfið, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)

3.6.1. Natríumsúlfiðlausn, $c = 0,5 \text{ mól/l}$ í glýseróli, = 120 g/l (þar sem $x = 9$) (sjá athugasemdir í lið 7.8)

3.7. Fenólfalínlausn, = 2 g/100 ml í etanóli (3.1)

3.8. Ferðafasi fyrir hágæðavökvaskiljun: blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (v + v). Nákvæmt hlutfall ákvarðast af eiginleikum súlnnar sem notuð er.

3.9. Köfnunarefni, súrefnisfrítt

3.10. DL- -tókóferólasetat, sérstaklega hreint, með vottaða virkni

3.10.1. Stofnlausn DL- -tókóferólasetats: 100 mg af DL- -tókóferólasetati (3.10) eru vigtuð með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í etanóli (3.1) og fyllt upp að kvarðamerkinu með sama leysi. 1 ml af þessari lausn inniheldur 1 mg af DL- -tókóferólasetati. (Sannprófun með útfjólubláu ljósi, sjá lið 5.6.1.3; stöðgun, sjá athugasemdir í lið 7.4).

3.11. DL- -tókóferól, sérstaklega hreint, með vottaða virkni

3.11.1. Vigtuð eru 100 mg af DL- -tókóferóli (3.10) með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku. Leyst upp í etanóli (3.1) og fyllt upp að kvarðamerkinu með sama leysi. 1 ml af þessari lausn inniheldur 1 mg af DL- -tókóferóli. (Sannprófun með útfjólubláu ljósi, sjá lið 5.6.2.3; stöðgun, sjá athugasemdir í lið 7.4).

3.12. 2,6-dí-*tert*-bútyl-4-metýlfenól (BHT) (sjá athugasemdir í lið 7.5)

4. Búnaður

4.1. Hverfieimur undir lágbrýstingi (Vacuum rotary evaporator)

4.2. Glerbúnaður með brúnleitu gleri

4.2.1. Flöskur með flötum botni eða keilulaga flöskur, 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, 1000 ml skiltrekkir 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 gashleðsluleiðslu
- 4.4. Samanbrotinn síupappír til fasaskiljunar, þvermál 185 mm (t.d. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Hágæðavökvaskiljunarbúnaður með innsprautunarkerfi
- 4.5.1. Vökvaskiljunarsúla, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt.
- 4.5.2. Flúrskinsnemi eða ísogsnemi fyrir útfjólublátt ljós með stillanlegri 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 hálsi og tappa úr slípuðu gleri
 - 4.8.2. Flösku með kartengi úr slípuðu gleri sem er búin hliðararmi og stillanlegri pípu sem liggur í gegnum miðju flöskunnar. Neðri hluti stillanlegu pípunnar ætti að vera U-laga en útrennslið í hinum endanum þannig að hægt sé að flytja efra vökvalagið í sívalningnum yfir í skiltrekt.

5. Framkvæmd

Aths: E-vítamín er næmt fyrir útfjólubláu ljósi og oxun. Öll framkvæmd skal fara fram án ljóss (með því að nota glerbúnað með brúnleitu gleri eða glerbúnað sem varinn er með álpappír) og súrefnis (með því að skola með köfnunarefni). Meðan á útdrættinum stendur ætti að setja köfnunarefni í stað loftsins fyrir ofan vökvann (komið er í veg fyrir of mikinn þrýsting með því að losa um tappann af og til).

5.1. Sýnið undirbúið

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

5.2. Sápun

Miðað við innihald E-vítamíns eru 2 til 25 g af sýninu vigtuð með 0,01 g nákvæmni í 500 ml flösku með flötum botni eða keiluflösku (4.2.1). Meðan flöskunni er hringsnúð er 130 ml af etanóli (3.1), u. þ. b. 100 mg af BHT (3.12), 2 ml af natríumskorbatlausn (3.5) og 2 ml af natríumsúlfíðlausn (3.6) bætt við hverju á eftir öðru. Eimsvalinn (4.3) er tengdur við flöskuna og henni dýft í vatnsbað með segulhræribúnaði (4.7). Hitað að suðu og látið endursjóða í fimm mínútur. Bætt er við 25 ml af kalíumhýdroxíðlausninni (3.4) í gegnum eimsvalann (4.3), og látið endursjóða 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 niður í stofuhita.

5.3. Útdráttur

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

5.3.1. Útdráttur með skiltrekt (4.2.3)

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

Sameinuðu útdrættirnir eru þvegnir tvisvar í skiltrektinni með því að hringsnúa varlega (til að forðast að ýrulausnir myndist) með 100 ml skömmtum af vatni og síðan með því að hrista aftur með 100 ml skömmtum af vatni til viðbótar þar til vatnið helst litlaust þegar fenólftalínlausn (3.7) er bætt út í (venjulega er nóg að þvo fjórum sinnum). Þvegni údrátturinn er síaður með þurri, samanbrotinni síu til fasaskiljunar (4.4) til að fjarlægja allt vatn sem eftir verður í 500 ml mæliflösku (4.2.2). Skiltrekin og sían eru skoluð með 50 ml af hreinsuðu bensíni (3.2), fyllt upp að kvarðamerkinu með hreinsuðu bensíni (3.2) og blandað vel saman.

5.3.2. Útdráttur með útdrættarbúnaði (4.8)

Þegar lögin hafa verið aðskilin (sjá athugasemd í lið 7.3) er flaskan með karltenginu úr slípaða glerinu (4.8.2) sett í stað tappa glersívalningsins (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 hreinsaða bensínsins flutt í 1000 ml skiltrekt (4.2.3). Bætt er í glersívalninginn 100 ml af hreinsuðu bensíni (3.2), tappinn settur í og hrist vel. Lögin eru látin skiljast að og efra lagið er flutt í skiltrektina eins og áður. Útdrættaraðferðin er endurtekin með 100 ml af hreinsuðu bensíni (3.2) til viðbótar og síðan tvisvar með 50 ml skömmtum af hreinsuðu bensíni (3.2) og lögunum af hreinsaða bensíninu er bætt við í skiltrektina.

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

5.4. Tilreiðsla sýnislausnarinnar fyrir hágæðavökvaskiljun

Deiliskammtur af lausn hreinsaða bensínsins (úr 5.3.1 eða 5.3.2) er fluttur með rennipípu í 250 ml perufflösku (4.2.4). Leysirinn er látinn gufa upp á hverfieiminum (4.1), þar til hann er nánast þurr, við lækkaðan þrýsting og baðhita sem fer ekki yfir 40 °C. Loftþrýstingi er komið aftur á með því að hleypa inn köfnunarefni (3.9) og flaskan er fjarlægð af hverfieiminum. Leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.9) og leifin er tafarlaust leyst upp í þekktu rúmmáli (10-100 ml) af metanóli (3.3) (styrkur DL- -tókóferóls ætti að vera á bilinu 5 IU/ml til 30 IU/ml).

5.5. Ákvörðun með hágæðavökvaskiljun

Skiljun E-vítamíns fer fram með C₁₈-súlu í umbreyttum (vatnsfælnum) fasa (4.5.1) og styrkurinn er mældur með flúrskinsnema (örvunarbylgjulengd: 295 nm, útgeislunarbylgjulengd: 330 nm) eða ísogsnema fyrir útfjólublátt ljós (292 nm) (4.5.2).

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

Skilyrði vegna hágæðavökvaskiljunar

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

Vökvaskiljunarsúla (4.5.1):	250 mm x 4 mm, C ₁₈ , 5 eða 10 µm þökkunarefni eða sambærilegt
Ferðafasi (3.8):	Blanda metanóls (3.3) og vatns, t.d. 980 + 20 (v + v)
Rennslis hraði:	1-2 ml/mín.
Nemi (4.5.2):	Flúrskinsnemi (örvunarbylgjulengd: 295 nm/útgeislunarbylgjulengd: 330 nm) eða ísogsnemi fyrir útfjólublátt ljós (292 nm)

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

5.6.1. Staðallausn DL- -tókóferólasetats

5.6.1.1. Tilreiðsla á staðalvinnulausninni

Fluttur eru 25 ml af stofnlausn DL- -tókóferólasetats (3.10.1) með rennipípu í 500 ml flösku með flötum botni eða keilulflösku (4.2.1) og síðan er vatnsrofið samkvæmt lið 5.2. Því næst er dregið út með hreinsuðu bensíni (3.2) samkvæmt lið 5.3 og fyllt upp að 500 ml markinu með hreinsuðu bensíni. Á hverfieiminum (sjá lið 5.4) eru 25 ml af þessum útdrætti látnir gufa upp þar til hann er nánast þurr. Leysirinn, sem eftir verður, er fjarlægður með köfnunarefnisstreymi (3.9) og leifin er leyst upp aftur í 25,0 ml af metanóli (3.3). Nafnstyrkur þessarar lausnar er 45,5 µg af DL- -tókóferóli á ml sem samsvarar 50 µg af DL- -tókóferólasetati á ml. Staðalvinnulausnin skal vera nýlögð við notkun.

5.6.1.2. Tilreiðsla kvörðunarlausnanna og kvörðunargrafsins

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

Sprautað er inn 20 µl af hverri kvörðunarlausn nokkrum sinnum og meðaltopp hæð (-toppflatarmál) er ákvörðuð. Meðaltopp hæð (-toppflatarmál) er notuð til að teikna kvörðunargraf.

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

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

Hámarksgeypnin ætti að vera við 284 nm:

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

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

5.6.2. Staðallausn DL- -tókóferóls

5.6.2.1. Tilreiðsla staðalvinnulausnarinnar

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

5.6.2.2. Tilreiðsla kvörðunarlausnanna og kvörðunargrafsins

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

Sprautað er inn 20 µl af hverri kvörðunarlausn nokkrum sinnum og meðaltopp hæð (-toppflatarmál) er ákvörðuð. Meðaltopp hæð (-toppflatarmál) er notuð til að teikna kvörðunargraf.

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

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

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

Við þessa þynningu ætti að fást gildið 0,6 fyrir hámark í eðlisgeypni.

6. Útreikningur niðurstaðna

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

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

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

þar sem:

= E-vítamínstyrkur sýnislausnarinnar (5.4), gefinn upp í $\mu\text{g/ml}$

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

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

m = massi prófunarskammtsins, gefinn upp í g

7. Athugasemdir

- 7.1. Fyrir sýni, sem hafa lítinn E-vítamínstyrk, getur verið hentugt að sameina útdrætti hreinsaðs bensins úr tveimur sápunarhleðslum (magn sem vigtað er: 25 g) í eina sýnislausn til ákvörðunar með hágæðavökvaskiljun.
- 7.2. Þyngd sýnisins, sem tekið er til greiningar, skal ekki innihalda meira en 2 g af fitu.
- 7.3. Ef fasaskiljun á sér ekki stað skal bæta við u. þ. b. 10 ml af etanóli (3.1) til að rjúfa ýrulausnina.
- 7.4. Eftir litrófsmælingu DL- -tókóferólasetats eða DL- -tókóferóllausnarinnar samkvæmt lið 5.6.1.3 eða 5.6.2.3 er u. þ. b. 10 mg af BHT (3.12) bætt við lausnina (3.10.1 eða 3.10.2) og lausnin geymd í kælikáp (geymsluþol fjórar vikur hið mesta).
- 7.5. Hægt er að nota hýdrókínón í stað BHT.
- 7.6. Skiljun -, -, - og -tókóferóls er möguleg ef notuð er súla með óblönduðum fasa.
- 7.7. Í stað natríumaskorbatslausnar er hægt að nota u. þ. b. 150 mg af askorbínsýru.
- 7.8. Í stað natríumsúlfíðlausnar er hægt að nota u. þ. b. 50 mg af EDTA.

8. Endurtekingarnákvæmni

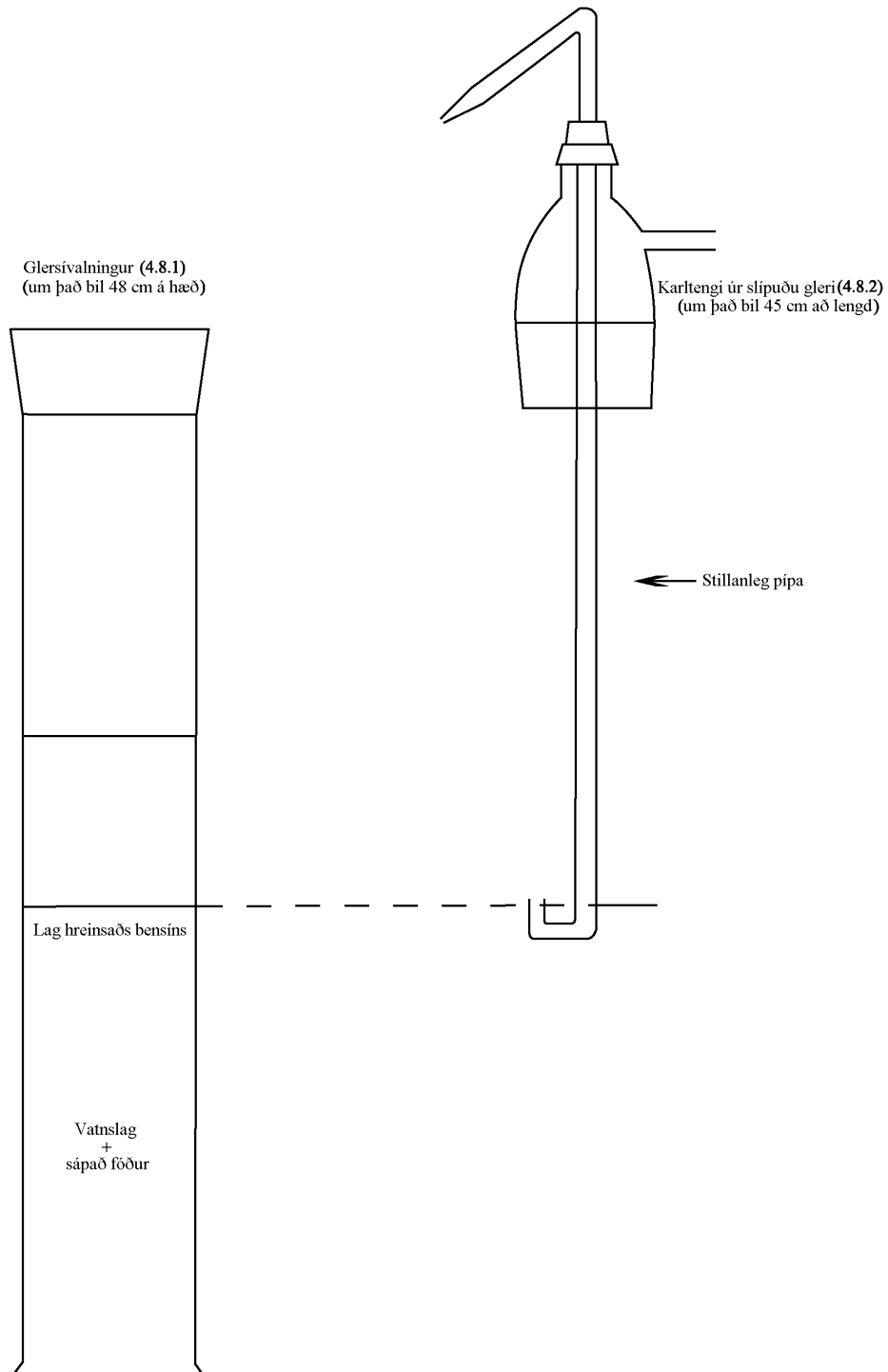
Mismunur niðurstaðna úr tveimur samhlíða ákvörðunum á sama sýninu skal ekki vera meiri en 15% af niðurstöðunni sem hefur hærra gildið.

9. Niðurstöður samanburðarrannsóknar ⁽¹⁾

	Forblanda	Forblöndufóður	Steinefnabykkni	Prótínfóður	Mjólkurgrís
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
meðalgildi [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: fjöldi rannsóknarstofa
n: fjöldi einstakra gilda
 s_r : staðalfrávik endurtekingarnákvæmni
 s_R : staðalfrávik samanburðarnákvæmni
r: endurtekingarnákvæmni
R: samanburðarnákvæmni
 CV_r : fráviksstuðull endurtekingarnákvæmni
 CV_R : fráviksstuðull samanburðarnákvæmni

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

Mynd 1: Útdráttarbúnaður (4.8)

C-HLUTI

ÁKVÖRÐUN TRYPTÓFANS

1. Tilgangur og gildissvið

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða heildarmagn og óbundið magn tryptófans í fóðri. Með aðferðinni er ekki hægt að greina á milli D- og L-forma.

2. Meginregla

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

Við ákvörðun á óbundnu magni tryptófans er sýnið dregið út við mild, súr skilyrði þar sem innri staðall er til staðar.

Tryptófanið og innri staðallinn í vatnsrofsefninu eða í útdrættinum eru ákvörðuð með hágæðavökvaskiljun og greiningu með flúrskini.

3. Prófunarefni

3.1. Nota skal tvíeimað vatn eða vatn af sambærilegum gæðum (eðlisleiðni < 10 µS/cm)

3.2. Staðalefni: tryptófan (hreinleiki/innihald = 99%), þurrkað við lofttæmi yfir fosfórpentoxíði

3.3. Innra staðalefni: -metýl-tryptófan (hreinleiki/innihald = 99%), þurrkað við lofttæmi yfir fosfórpentoxíði

3.4. Baríumhýdroxíð-okta-hýdrat (þess skal gætt að Ba(OH)₂·8 H₂O komist ekki í tæri við loft í of miklum mæli til þess að forðast myndun BaCO₃ sem gæti truflað ákvörðunina) (sjá athugasemd í lið 9.3)

3.5. Natriumhýdroxíð

3.6. Ortófosfórsýra, w = 85%

3.7. Saltsýra, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Metanól, af hreinleika sem krafist er í hágæðavökvaskiljun

3.9. Hreinsað bensín, suðumark 40 til 60 °C

3.10. Natriumhýdroxíðlausn, c = 1 mól/l:

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

3.11. Saltsýra, c = 6 mól/l:

Þynntir eru út 492 ml af HCl (3.7) upp að 1 lítra með vatni.

3.12. Saltsýra, c = 1 mól/l:

Þynntir eru út 82 ml af HCl (3.7) upp að 1 lítra með vatni.

3.13. Saltsýra, c = 0,1 mól/l:

Þynntir eru út 8,2 ml af HCl (3.7) upp að 1 lítra með vatni.

3.14. Ortófosfórsýra, c = 0,5 mól/l:

Þynntir eru út 34 ml af ortófosfórsýru (3.6) upp að 1 lítra með vatni (3.1).

- 3.15. Hrein tryptófanlausn (3.2), $c = 2,50 \mu\text{mól/ml}$:
Í 500 ml mæliflösku eru 0,2553 g af tryptófani (3.2) leyst upp í saltsýru (3.13) og fyllt upp að kvarðamerkinu með saltsýru (3.13). Geymist við -18°C í fjórar vikur hið mesta.
- 3.16. Hrein innri staðallausn, $2,50 \mu\text{mól/ml}$:
Í 500 ml mæliflösku eru 0,2728 g af -metýl-tryptófani (3.3) leyst upp í saltsýru (3.13) og fyllt upp að kvarðamerkinu með saltsýru (3.13). Geymist við -18°C í fjórar vikur hið mesta.
- 3.17. Staðalkvörðunarlausn tryptófans og innri staðals:
Teknir eru 2,00 ml af óblandaðri tryptófanlausn (3.15) og 2,00 ml af óblandaðri innri staðal(-metýl-tryptófan) lausn (3.16). Þynnt með vatni (3.1) og metanóli (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-tríklór-2-metýl-2-própanól
- 3.20. Etanólamín $> 98\%$
- 3.21. Lausn af 1 g af 1,1,1-tríklór-2-metýl-2-própanóli (3.19) í 100 ml af metanóli (3.8)
- 3.22. Ferðafasi fyrir hágæðavökvaskiljun: 3,00 g af ediksýru (3.18) + 900 ml af vatni (3.1) + 50,0 ml lausn (3.21) 1,1,1-tríklór-2-metýl-2-própanóls (3.19) í metanóli (3.8) (1 g/100 ml). Sýrustigið er stillt af við 5,00 með etanólamíni (3.20). Fyllt upp að 1000 ml með vatni (3.1).
4. **Búnaður**
- 4.1. Hágæðavökvaskiljunarbúnaður með flúrskinsnema
- 4.2. Vökvaskiljunarsúla, 125 mm x 4 mm, C_{18} , 3 μm þökkunarefni eða sambærilegt
- 4.3. Sýrustigsmælir
- 4.4. Pólýprópýlenflaska, sem tekur 125 ml, með víðum hálsi og skrúftappa.
- 4.5. Himnusía, 0,45 μm
- 4.6. Gufusæfir (Autoclave), $110 (\pm 2)^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) bör
- 4.7. Vélhristari eða segulhræribúnaður
- 4.8. Iðublöndunarbúnaður (Vortex mixer)
5. **Framkvæmd**
- 5.1. Tilreiðsla sýna
Sýnið er mulið þannig að það komist í 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 mulin. Fiturík sýni skal draga út með hreinsuðu bensíni (3.9) áður en þau eru mulin.
- 5.2. Ákvörðun á óbundnu magni tryptófans (útdrætti)
Hæfilegt magn (1-5 g) af sýninu, sem hefur verið tilreitt (5.1), er vigtað með 1 mg nákvæmni í keilufloösku. Bætt er við 100,0 ml af saltsýru, $c = 0,1 \text{ mól/l}$ (3.13) og 5,00 ml af óblandaðri innri staðallausn (3.16). Hrist eða blandað á vélhristarannum eða með segulhræribúnaðinum (4.7) í 60 mín. Botnfallið er látið setjast til og 10,0 ml af flotinu eru fluttir með rennipípu í bikarglas. Bætt er við 5 ml af ortófosfórsýru, $c = 0,5 \text{ mól/l}$ (3.14). Sýrustigið er stillt af við 3,0 með natríumhýdroxíði, $c = 1,0 \text{ mól/l}$ (3.10). Nægu metanóli (3.8) er bætt við þannig að styrkur metanóls í lokarúmmálinu verði á bilinu 10 til 30%. Þetta er flutt í mæliflösku sem hefur hæfilegt rúmmál og þynnt út með vatni í rúmmál sem nauðsynlegt er fyrir vökvaskiljunina (u. þ. b. sama rúmmál og staðalkvörðunarlausnin (3.17)).

Nokkrir ml af lausninni eru síðir í gegnum 0,45 µm himnusú (4.5) áður en þeim er sprautað á hágæðavökvaskiljunarsúluna. Að því loknu er vökvaskiljun framkvæmd samkvæmt lið 5.4.

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

5.3. Ákvörðun á heildarmagni tryptófans (vatnsrofsefni)

Vigtuð eru 0,1 til 1 g af sýninu sem hefur verið tilreitt (5.1), með 0,2 mg nákvæmni í pólýprópýlenflösku (4.4). Köfnunarefnisinnihald vigtaða sýnisskammsins ætti að vera um 10 mg. Bætt er við 8,4 g af baríumhýdroxíð-okta-hýdrati (3.4) og 10 ml af vatni. Blandað á iðu- (4.8) eða segulhræribúnaði (4.7). Teflonhúðaði segullinn er látinn vera í blöndunni. Hliðar ílátsins eru skolaðar niður með 4 ml af vatni. Skrúftappinn er settur á og flöskunni er lokað lauslega. Þetta er flutt í gufusæfi (4.6) með sjóðandi vatni og gufumeðhöndlað 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 óblönduðu innri staðal- (-metýl-tryptófan)-lausninni (3.16). Ílátin eru kæld á vatns-/ísbaði í 15 mínútur.

Síðan er 5 ml af ortófosfórsýru, c = 0,5 mól/l (3.14) bætt við. Ílátid er látið vera í kælibaðinu og gert hlutlaust með HCl, c = 6 mól/l (3.11) meðan hrært er í og sýrustigið er stillt af við 3,0 með HCl, c = 1 mól/l (3.12). Nægu metanóli er bætt við þannig að styrkur metanóls í lokarúmmálinu verði á bilinu 10 til 30%. Þetta er flutt í mæliflösku sem hefur hæfilegt rúmmál og þynnt út með vatni í það rúmmál sem skilgreint er fyrir vökvaskiljunina (til dæmis 100 ml). Viðbót af metanóli ætti ekki að valda útfellingu.

Nokkrir ml af lausninni eru síðir í gegnum 0,45 µm himnusú (4.5) áður en þeim er sprautað á hágæðavökvaskiljunarsúluna. Að því loknu er vökvaskiljun framkvæmd samkvæmt lið 5.4.

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

5.4. Ákvörðun með hágæðavökvaskiljun

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

Vökvaskiljunarsúla (4.2):	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , 3 µm pökkunarefni eða sambærilegt pökkunarefni
Hitastig súlu:	stofuhiti
Ferðafasi (3.22):	3,00 g af ediksýru (3.18) + 900 ml af vatni (3.1) + 50,0 ml lausn (3.21) 1,1,1-tríklór-2-metýl-2-própanóls (3.19) í metanóli (3.8) (1 g/100 ml). Sýrustigið er stillt af við 5,00 með etanólamíni (3.20). Fyllt er upp að 1 000 ml með vatni (3.1)
Rennishraði:	1 ml/mín
Heildarkeyrslutími:	u. þ. b. 34 mín
Greiningarbylgjulengd:	örvunar: 280 nm, útgeislunar: 356 nm
Rúmmál innsprautunar	20 µl

6. Útreikningur niðurstaðna

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{g tryptófans í 100 g sýni}$$

- A = toppflatarmál innri staðals, staðalkvörðunarlausn (3.17)
- B = toppflatarmál tryptófans, útdráttar (5.2) eða vatnsrofsefnis (5.3)
- C = rúmmál óblönduðu tryptófanlausnarinnar (3.15), gefið upp í ml (2 ml) sem bætt var við kvörðunarlausnina (3.17)
- D = styrkur óblönduðu tryptófanlausnarinnar (3.15), gefinn upp í $\mu\text{mól/ml}$ (= 2,50) sem bætt var við kvörðunarlausnina (3.17)
- E = rúmmál óblönduðu innri staðallaussnarinnar (3.16), gefið upp í ml sem bætt var við þegar dregið var út (5.2) (= 5,00 ml) eða við vatnsrofsefnið (5.3) (= 2,00 ml)
- F = toppflatarmál innri staðals, útdráttar (5.2) eða vatnsrofsefnis (5.3)
- G = toppflatarmál tryptófans, staðalkvörðunarlausnar (3.17)
- H = rúmmál óblönduðu innri staðallaussnarinnar (3.16), gefið upp í ml (= 2,00 ml) sem bætt var við staðalkvörðunarlausnina (3.17)
- W = þyngd sýnisins, gefin upp í g (leiðrétt að upprunalegri þyngd ef það er þurrkað og/eða fitusneytt)
- MW = mólþungi tryptófans (= 204,23)

7. Endurtekningarnákvæmni

Mismunur niðurstaðna úr tveimur samhliða ákvörðunum á sama sýninu skal ekki vera meiri en 10% af niðurstöðunni sem hefur hæsta gildið.

8. Niðurstöður samanburðarrannsóknar

Gerð var samanburðarrannsókn á vegum bandalagsins (fjórði innri samanburður) þar sem þrjú sýni voru greind af allt að 12 rannsóknarstofum til að votta aðferðina fyrir vatnsrof. Hvert sýni var greint fimm sinnum. Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 1 Svínafóður	Sýni 2 Svínafóður sem L-tryptófani er bætt við	Sýni 3 Fóðurþykki fyrir svín
L	12	12	12
n	50	55	50
Meðalgildi [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
s_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L: fjöldi rannsóknarstofa sem skilar inn niðurstöðum
n: fjöldi einstakra niðurstaðna sem fást þar sem einfarar hafa verið útilokaðir (sanngreint með Cochran-Dixon-einfaraprófun)
 s_r : staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 s_R : staðalfrávik samanburðarnákvæmni
r: endurtekningarnákvæmni
R: samanburðarnákvæmni
 CV_r : fráviksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
 CV_R : fráviksstuðull samanburðarnákvæmni, %

Önnur samanburðarrannsókn var gerð á vegum bandalagsins (þriðji innri samanburður) þar sem tvö sýni voru greind af allt að 13 rannsóknarstofum til að votta aðferðina fyrir útdrátt á óbundnu tryptófani. Hvert sýni var greint fimm sinnum. Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

	Sýni 4 Blanda soja og hveitis	Sýni 5 Hveiti- og sojablanda (= sýni 4) með viðbættu tryptófani (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 einfarar hafa verið útlokaðir (sanngreint með Cochran-Dixon-einfaraprófun)
 s_r : staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 s_R : staðalfrávik samanburðarnákvæmni
 r : endurtekningarnákvæmni
 R : samanburðarnákvæmni
 CV_r : frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
 CV_R : frávíksstuðull samanburðarnákvæmni, %

Önnur innri samanburðarrannsókn var gerð á vegum bandalagsins þar sem fjögur sýni voru greind af allt að sjö rannsóknarstofum með það að markmiði að fá vottun fyrir vatnsrof tryptófans. Niðurstöðurnar koma fram hér á eftir. Hvert sýni var greint fimm sinnum.

	Sýni 1 Blandað svínafóður (CRM117)	Sýni 2 Fituskert fiskimjöl (CRM118)	Sýni 3 Sojamjöl (CRM119)	Sýni 4 Undanrennuft (CRM120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Meðalgildi [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
s_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L: fjöldi rannsóknarstofa sem skilar inn niðurstöðum
n: fjöldi einstakra niðurstaðna sem fást þar sem einfarar hafa verið útlokaðir (sanngreint með Cochran-Dixon-einfaraprófun)
 s_r : staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 s_R : staðalfrávik samanburðarnákvæmni
 r : endurtekningarnákvæmni
 R : samanburðarnákvæmni
 CV_r : frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
 CV_R : frávíksstuðull samanburðarnákvæmni, %

9. Athugasemdir

- 9.1. Eftirfarandi sérstök skilyrði við vökvaskiljun geta gefið betri skiljun á tryptófani og -metýl-tryptófani.

Skolun með föstum ferðafasa og stigulhreinun á súlu:

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

Hitastig súlu: 32 °C

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

B: metanól

Stigulferli (Gradient program):	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

Rennslis hraði: 1,2 ml/mín.

Heildarkeyrslutími: u. þ. b. 33 mínútur

- 9.2. Vökvaskiljunin er breytileg eftir tegund hágæðavökvaskiljunar og eftir því hvernig pökkunarefni er notað í súluna. Kerfið, sem valið er, skal geta gefið grunnlínuskiljun milli tryptófans og innri staðalsins. Enn fremur er mikilvægt að niðurbrotsefni sé vel aðskilin frá tryptófaninu og innri staðlinum. Keyra ætti 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 skolunartoppur truflað seinni skiljunarkeyrslur.

Innan þess sviðs, sem vökvaskiljunarkerfið spannar, ætti að fást línuleg svörun. Línulegu svörunina ætti að bera saman við stöðugan (venjulegan) styrk innri staðalsins og mismunandi styrk tryptófans. Mikilvægt er að stærð toppanna fyrir tryptófan og innri staðalinn sé innan línulegs sviðs hágæðavökvaskiljunar-/flúrskinskerfisins. Ef annað hvort toppur/toppar tryptófans og/eða innri staðalsins eru of litlir eða of stórir ætti að endurtaka greininguna með öðru sýni og/eða öðru lokarúmmáli.

- 9.3. Baríumhýdroxíð

Eftir því sem efnið er eldra reynist erfiðara að leysa upp baríumhýdroxíð. Þetta leiðir til þess að lausnin fyrir hágæðavökvaskiljunina verður ekki nær sem getur gefið lágur niðurstöður fyrir tryptófan.