

FJÓRÐA TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR

frá 5. desember 1972

um greiningaraðferðir bandalagsins vegna opinbers eftirlits með fóðri

(73/46/EBE)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Efnahagsbandalags Evrópu,
með hliðsjón af tilskipun ráðsins frá 20. júlí 1970 ⁽¹⁾ um að
taka upp í bandalaginu aðferðir við sýnatöku og greiningu
vegna opinbers eftirlits með fóðri, eins og henni var breytt
með tilskipun 72/275/EBE ⁽²⁾ frá 20. júlí 1972, einkum 2.
gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

Í fyrrnefndri tilskipun er krafist opinbers eftirlits með fóðri
þar sem bandalagsaðferðum við sýnatöku og greiningu er
beitt í því augnamiði að ganga úr skugga um að kröfum
samkvæmt ákvæðum laga og stjórnsýslufyrirmæla um gæði
og samsetningu fóðurs sé hlítt.

Í tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 71/250/EBE frá
15. júní 1971 ⁽³⁾, 71/393/EBE frá 18. nóvember 1971 ⁽⁴⁾ og
72/199/EBE frá 27. apríl 1972 ⁽⁵⁾ hafa nokkrar bandalags-
greiningaraðferðir þegar verið ákveðnar. Ráðlegt er vegna
framfara sem síðar hafa orðið að samþykkja fjórðu röð að-
ferða.

Ráðstafanir þær sem kveðið er á um í þessari tilskipun eru
í samræmi við álit fastanefndar um fóður.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Aðildarríkin skulu krefjast þess að greiningar vegna op-
inbers eftirlits með fóðri að því er lýtur að rakainnihaldi
fituefna og olía úr dýra- og jurtaríkinu og magníum- og

hrátrefjainnihaldi í fóðri séu framkvæmdar samkvæmt þeim
aðferðum sem lýst er í viðaukanum við þessa tilskipun.

Almenn ákvæði í I. hluta (Inngangur) viðaukans við fyrstu
tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 71/250/EBE frá 15. júní
1971 skulu gilda um þær aðferðir sem lýst er í I. viðauka
við þessa tilskipun.

2. gr.

Aðildarríkin skulu krefjast þess að greiningar vegna op-
inbers eftirlits með fóðri að því er lýtur að retínól- (A-
vítamín), þíamín- (aneurín, vítamín B₁), askorbín- og tví-
vetnisaskorbínsýrynnihaldi (C-vítamín) séu framkvæmdar
í samræmi við aðferðir sem lýst er í II. viðauka við þessa
tilskipun.

Almenn ákvæði í I. hluta (Inngangur) viðaukans við fyrstu
tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 71/250/EBE frá 15. júní
1971, að hlutanum um undirbúning sýnisins undanskildum,
skulu gilda um þær aðferðir sem lýst er í II. viðauka við
þessa tilskipun.

3. gr.

Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en
1. janúar 1974. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórn-
inni þegar í stað.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 5. desember 1972.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

S. L. MANSHOLT

forseti.

⁽¹⁾ Stjttíð. EB nr. L 170, 3. 8. 1970, bls. 2.

⁽²⁾ Stjttíð. EB nr. L 171, 29. 7. 1972, bls. 39.

⁽³⁾ Stjttíð. EB nr. L 155, 12. 7. 1971, bls. 13.

⁽⁴⁾ Stjttíð. EB nr. L 279, 20. 12. 1971, bls. 7.

⁽⁵⁾ Stjttíð. EB nr. L 123, 29. 5. 1972, bls. 6.

I. VIDAUKI

1. ÁKVÖRÐUN RAKA Í FITUEFNUM OG OLÍUM ÚR DÝRA- OG JURTARÍKINU

1. Tilgangur og umfang

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða vatnsinnihald og magn rokkgjarnra efna í fituefnum og olíum úr dýra- og jurtaríkinu.

2. Meginregla

Sýnið er þurrkað við 103 °C uns stöðugri þyngd er náð. Massatap er ákvarðað með vigtun.

3. Búnaður

3.1. Flatbotna flát úr tæringarþolnu efni, 8 – 9 cm í þvermál og um það bil 3 cm á hæð.

3.2. Kvikasilfurshitamælir með styrktri kúlu og útvíkkun í efri enda og kvarðaskiptingu frá um það bil 80 °C til að minnsta kosti 110 °C, lengd: um það bil 10 cm.

3.3. Sandbað eða rafmagnshitaplata.

3.4. Þurrkari sem inniheldur virkt þerriefni.

3.5. Fínvog.

4. Vinnuaðferð

Um það bil 20 g af jafnblönduðu sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni í þurra og vegna flátið (3.1) þar sem mælinum (3.2) er komið fyrir. Flátið er hitað í sandbaðinu eða á hitaplötunni (3.3) um leið og hrært er af og til í með hitamælinum þannig að hitinn verði 90 °C á um það bil 7 mínútum.

Hitinn er lækkaður um leið og gát er höfð á hversu títt loftbólur rísa frá botni flátsins. Hitinn skal ekki fara yfir 105 °C. Hrært er áfram og botninn skrapaður uns loftbólur hætta að myndast.

Til að tryggja að öllum raka sé eytt er hitað nokkrum sinnum á ný í 103 °C ± 2 °C og kælt niður í 93 °C milli þess að hitað er. Þá er flátið kælt niður að stofuhita í þurrkaranum (3.4) og vegið. Þessi aðgerð er endurtekin uns massatap milli tveggja vigtana í röð er 2 mg eða minna.

Ath. Massaukning sýnisins eftir endurtekna hitun bendir til oxunar fitunnar. Sé um slíkt að ræða er niðurstaðan reiknuð út með hliðsjón af því þegar vigtað er rétt áður en massaukning átti sér stað.

5. Útreikningur niðurstaðna

Rakainnihald sem hundraðshluti af sýninu fæst með eftirfarandi formúlu:

$$(M_1 - M_2) \cdot \frac{100}{M_0}$$

þar sem:

M_0 = massi prófsýnisins í grömmum;

M_1 = massi flátsins í grömmum, með innihaldi hans fyrir hitun;

M_2 = massi flátsins í grömmum, með innihaldi hans eftir hitun;

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

Endurtekningarræfni

Mismunur rakainnihalds milli niðurstaðna tveggja hliðstæðra ákvarðana á sama sýninu skal vera mest 0,05% miðað við algildi.

2. ÁKVÖRDUN MAGNÍUMS

— með atómgleypnimælingu —

1. Tilgangur og umfang

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magníummagn í föðri. Hún hentar sérstaklega til að ákvarða magníummagn undir 5%.

2. Meginregla

Sýnið er brennt til ösku og leyst upp í þynntri saltsýru. Innihaldi það engin lífræn efni er það leyst beint upp í þynntri saltsýru. Lausnin er þynnt og magníummagnið ákvarðað með atómgleypnimælingu við 285,2 nm með samanburði við staðallausn.

3. Hvarfefni

3.1. Saltsýra, a.p., d: 1.16.

3.2. Óblönduð saltsýra, a.p., d: 1.19.

3.3. Magníumborði eða -vír eða magníumsúlfatheptahýdrat, þurrkað við stofuhita.

3.4. Strontíumsaltlausn (klóríð eða nítrat) með 2,5% strontíum (w/v) (= 76,08gSrCl₂ · 6H₂Oa.p.) eða (60,38gSr(NO₃)₂a.p.).

3.5. Staðalmagníumlausn: 1 g af magníum (3.3), sem áður hefur verið algerlega svipt oxíðhimnu sinni, er vegið með 1 mg nákvæmni eða samsvarandi magníumsúlfatheptahýdratmagn (3.3) (10,143 g). Efnið er sett í 1 000 ml mælikolbu, 80 ml af saltsýru (3.1) bætt við, það látið leysast upp og vatni hellt að 1 000 ml markinu. 1 ml af þessari lausn inniheldur 1 000 mg af magníum.

4. Búnaður

4.1. Öskubrennsludeiglu úr platínu, kísildíoxíði eða postulíni.

4.2. Hitastillanlegur rafmagnsmúffuofn.

4.3. Atómgleypnimælir.

5. Vinnuaðferð

5.1. *Tilreiðsla sýnisláusnarinnar*

5.1.1. *Fóður, einungis samsett úr steinefnum*

5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni í 500 ml mælikolbu ásamt 250 – 300 ml af vatni. 40 ml af saltsýru (3.1) er bætt við, hitað að suðumarki og vökvinn soðinn við vægan hita í 30 mínútur. Vökvinn er kældur, vatni hellt að markinu, blandað saman og síað gegnum þurran, samanbrotinn síupappír í þurrt bikarglas. Fyrstu 30 ml af síuvökvanum er hent. Sé kísildíoxíð til staðar eru 5 g af sýninu meðhöndluð með nægjanlegri saltsýru (3.2) (15 – 30 ml), sýnið er látið þorna við uppgufun yfir vatnsbaði og sett í hitaskáp í eina klukkustund við 105 °C. Haldið er áfram eins og fram kemur í 5.1.2, frá og með þriðja málslið.

5.1.2. *Fóður, að mestu samsett úr steinefnum*

5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni í deiglu og brennd við 550 °C í múffuofninum uns kolefnasnaud aska myndast. Sýnið er kælt. Nægjanlegu magni af saltsýru (3.2) (15 – 30 ml) er bætt við öskuna til að eyða kísildíoxíði, askan er þurrkuð með uppgufun yfir vatnsbaði og sett í hitaskáp í eina klukkustund við 105 °C. Leifarnar eru meðhöndlaðar með 10 ml af saltsýru (3.1) og hellt ásamt volgu vatni í 500 ml mælikolbu. Þá er kælt og vatni hellt upp að markinu. Blandað er saman og síað gegnum þurran, samanbrotinn síupappír í þurrt bikarglas. Fyrstu 30 ml af síuvökvanum er hent.

5.1.3. Fóður, að mestu samsett úr lífrænum efnum

5 g af sýninu eru vegin með 1 mg nákvæmni í deiglu og brennd við 550 °C í múffuofninum uns kolefnasnaud aska myndast. Askan er meðhöndluð með 5 ml af saltsýru (3.2), þurrkuð með uppgufun yfir vatnsbaði og sett í hitaskáp í eina klukkustund við 105 °C til að gera kísildíoxíðið óleysanlegt. Askan er meðhöndluð með 5 ml af saltsýru (3.1), henni hellt ásamt volgu vatni í 250 ml mæliskolbu og hitað að suðumarki. Þá er kælt og vatni hellt upp að markinu. Blandað er saman og síað gegnum þurran, samanbrotinn síupappír í þurrt bikarglas. Fyrstu 30 ml af síuvökvanum er hent.

5.2. Mælingar með atómgleyfni

Að minnsta kosti 5 tilvísunarlausnir með vaxandi styrkleika, sem samsvara hagstæðasta mælingabili litrófsmælisins, eru tilreiddar með því að þynna staðallausnina (3.5) með vatni. 10 ml af strontíumsaltlausn (3.4) er bætt við hverja lausn og vatni hellt upp að 100 ml. Einn deilanlegur hluti síuvökvens, sem fenginn er samkvæmt 5.1.1, 5.1.2 eða 5.1.3, er þynntur með vatni, þannig að magníum myndist í styrkleika sem er innan styrkleikamarka tilvísunarlausnanna. Saltsýrustyrkur þessarar lausnar skal ekki fara yfir 0,4 N. 10 ml af strontíumsaltlausn (3.4) er bætt við og vatni hellt að 100 ml. Ísog lausnarinnar sem ákvarða á er mælt og tilvísunarlausnanna við 285,2 nm.

6. Útreikningur niðurstaðna

Magníummagn lausnarinnar er reiknað út með samanburði við tilvísunarlausnirnar. Niðurstaðan er gefin til kynna sem hundraðshluti af sýninu.

Endurtekningarhæfni

Mismunur milli niðurstaðna tveggja hliðstæðra ákvarðana á sama sýninu skal vera mest 5% miðað við hlutfallslegt gildi.

3. ÁKVÖRÐUN HRÁTREFJA

1. Tilgangur og umfang

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magn fitusnauda, lífrænna efna í fóðri sem eru óleysanleg í sýru- og basalausnum og venjulega lýst sem hrátrefjum.

2. Meginregla

Sýnið, fituhreinsað ef nauðsyn krefur, er meðhöndlað með sjóðandi brennisteinssýrulausnum og kalíumhýdroxíði í ákveðnum styrkleikahlutföllum. Leifarnar eru síaðar frá með asbesti, þvegnar, þurrkaðar, vegnar og öskubrenndar við 900 °C. Þyngdartap eftir öskubrennluna samsvarar hrátrefjum í prófsýninu.

3. Hvarfefni

3.1. Brennisteinssýra, 0,26 N.

3.2. Meðhöndlað asbest: Gooch-deigluasbesti er blandað saman við þynnta saltsýru sem er fimmföld þyngd þess (1 hluti af saltsýru, d: 1,19 + 3 hlutar af vatni). Blandan er soðin í um það bil 45 mínútur, kæld og síuð gegnum Büchner-trekt. Leifarnar eru fyrst þvegnar með vatni uns saltsýra er horfin úr vatninu og síðan með aseton (3.6). Asbestið er þurrkað í þurrkofninum og öskubrennt í 2 klukkustundir við 900 °C. Það er kælt og geymt í lokaðri kolbu. Heimilt er að nota asbest sem þannig er meðhöndlað oftar en einu sinni. Það skal fullnægja forskriftunum í 5. lið varðandi núllprófið.

- 3.3. Froðueyðandi fleyti (t.d. kísill).
- 3.4. Kalíumhýdroxíðlausn, 0,23 N.
- 3.5. Saltsýra, 0,5 N.
- 3.6. Aseton.
- 3.7. Díetýleter.

4. Búnaður

- 4.1. Að minnsta kosti 600 ml bikarglös með mælistrikum við 200 milllítramarkið.
- 4.2. Postulínsplattar, um 80 mm í þvermál og um 4 mm þykkir, með um það bil 32 holum sem hver er um 4 mm í þvermál.
- 4.3. Um það bil 2 l sogflöskur með gúmmítappa með mælistrikum fyrir 800 milllítramarkið og glertrektum, 120 mm í þvermál.
- 4.4. Súplötur, um 40 mm í þvermál og um 4 mm þykkar með skálaga köntum fyrir trektarstrýtuna (4.3), með um það bil 16 holum sem hver er um 4 mm í þvermál og þaktar vírneti með um 1 mm möskvum. Plöturnar og vírnetið skulu þola sýrur og basa.
- 4.5. Öskubrennsludeigljur úr platínu og kísildíoxíði.
- 4.6. Hitastýrður rafmagnsmúffuofn.
- 4.7. Þurrkari.
- 4.8. Asbestsía: 2,0 g af asbesti (3.2) eru sett í sviflausn í 100 ml af vatni. Vökvinn er síaður í sogflösku yfir súplötu með vírneti (4.4) sem komið er fyrir í flöskutrektinni (4.3). Súvökvanum er safnað saman og hann síaður á ný gegnum sömu síuna. Súvökvanum er hent.

5. Vinnuaðferð

3 g af sýninu og 2 g af meðhöndluðu asbesti (3.2) eru vegin með 1 mg nákvæmni í bikarglas (4.1), 200 ml af brennisteinssýru (3.1) er bætt við ásamt nokkrum dropum af froðueyðandi fleyti (3.3). Hitað er hratt að suðumarki og látið sjóða í nákvæmlega 30 mínútur. Til að viðhalda stöðugu rúmmáli er kælibúnaður settur á bikarglasið, t.d. 500 ml kolba með kúlulaga botni með gegnumstreymi af köldu vatni. Suðu er hætt með því að bæta um 50 ml af köldu vatni við og síað án tafar með sögi gegnum asbestsú sem undirbúin er eins og fram kemur í 4.8.

Leifarnar eru þvegnar fimm sinnum með um það bil 100 ml skammti í senn af sjóðheitu vatni til að endanlegt rúmmál síuvökvens verði 800 ml. Leifarnar eru færðar magnbundið yfir í bikarglas (4.1) sem áður hefur verið útbúið með postulínsplatta (4.2) til að stýra suðunni. 200 ml af kalíumhýdroxíðlausn (3.4) er bætt við. Hitað er hratt að suðumarki og látið sjóða í nákvæmlega 30 mínútur. Um 50 ml af köldu vatni er bætt við og síað án tafar með sögi gegnum nýja asbestsú sem undirbúin er eins og fram kemur í 4.8. Leifarnar eru þvegnar með sjóðheitu vatni uns vatnið er hlutlaust (prófað með lakkmúspappír), síðan þrisvar sinnum með asetoni (3.6) (um 100 ml af asetoni alls).

Leifarnar eru færðar magnbundið yfir í öskubrennsludeiglu (4.5), þeim skipt upp ef nauðsyn krefur og þurrkaðar uns stöðugri þyngd er náð í þurrkskápnnum við 130 °C.

Leifarnar eru kældar í þurrkaranum (4.7) og vegnar í skyndi.

Deiglan er sett í múffuofninn (4.6) og öskubrennt í 30 mínútur við 900 °C. Kælt er í þurrkaranum (4.7) og vegið í skyndi.

Framkvæmt er núllpróf þar sem sömu aðferð er beitt á meðhöndlaða asbestið (3.2), en án sýnisins. Þyngdartap vegna öskubrennslu 6 g af asbesti skal ekki vera meira en 10 mg.

6. Útreikningur niðurstaðna

Hrátrefjainnihald sýnisins í hundradshlutum fæst með hlutfallinu:

$$\frac{(a - b) \cdot 100}{3}$$

þar sem:

a = þyngdartap eftir öskubrennslu við ákvörðunina;

b = þyngdartap eftir öskubrennslu við núllprófið.

Endurtekningarhæfni

Mismunur milli niðurstaðna tveggja hliðstæðra ákvarðana á sama sýninu skal vera mest:

0,3, miðað við algildi, fyrir hrátrefjainnihald undir 10%;

3%, miðað við breytilegt gildi, fyrir hrátrefjainnihald, jafnt og eða undir 10%.

7. Athugasemdir

7.1. Fituskerða skal fóður sem inniheldur yfir 10% af olíum og fituefnum fyrir ákvörðun með díetýleter (3.7). Prófsýnið (3 g, vegin með 1 mg nákvæmni) er í þessu skyni sett í asbestsú (4.8). Um 50 ml af díetýleter (3.7) er hellt þrisvar sinnum yfir og síðan varlega í hvert sinn með sögi. Fituskerta prófsýnið er fært ásamt asbestinu magnbundið yfir í bikarglas (4.1) og greiningunni haldið áfram eins og um getur í 5. lið.

7.2. Fóður sem inniheldur olíur og fituefni sem ekki er unnt að draga út beint skal fituskerða eins og um getur í 7.1 og enn aftur eftir að leifar hafa verið þvegnar að sýrumeðferð lokinni.

Sýran er þvegin þrisvar sinnum af leifunum með asetoni (3.6) (100 ml alls), þá þrisvar sinnum með 50 ml af díetýleter (3.7). Leifarnar eru síðan fluttar magnbundið yfir í bikarglas (4.1) og greiningunni haldið áfram eins og um getur í annarri málsgrein 5. liðar (meðferð með kalíumhýdroxíðlausn).

7.3. Ef fóður er kalsíumauðugt (yfir 2% kalsíum) er prófsýnið (3 g vegin með 1 mg nákvæmni) sett í bikarglas (4.1) með 100 ml af 0,5 N saltsýru (3.5) og blandan látin standa á köldum stað í 5 mínútur. Síðan er án tafar og þvegið með köldu vatni. 2,0 g af asbesti, sérstaklega ætluð til suðu með brennisteinssýru eru notuð sem síuefni. Síst treglega er sviflausnin þynnt með asetoni (3.6). Síðan er haldið áfram eins og um getur í 5. lið.

II. VIÐAUKI

1. ÁKVÖRDUN RETÍNÓLS (A-vítamín)

1. Tilgangur og umfang

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða retínólmagn (A-vítamín) í óblönduðu og forblönduðu fóðri. Lægri mörk ákvörðunarinnar eru 10 000 IU/kg fyrir mjög dreifulitað fóður og 4 000 IU/kg fyrir annað fóður⁽¹⁾. Afurðunum er skipt í tvo flokka eftir áætluðu retínólinnihaldi:

Flokkur A: innihald minna en 200 000 IU/kg;

Flokkur B: innihald jafnt eða meira en 200 000 IU/kg.

2. Meginregla

Sýnið er vatnsrofið heitt með kalíumhýdroxíðlausn í etanólmiðli með þráavarnarefni eða í köfnunarefnisumhverfi. Blandan er dregin út með 1,2-díklóretan. Látið er gufa upp af útdrættinum uns hann er þurr og meðhöndlaður með léttum alkönunum. Lausnin er litskilin á álóxíðsúlu (litskiljun er einungis nauðsynleg fyrir

⁽¹⁾1 IU = 0,3 µg af retínóli.

sumar afurðir í flokki B). Fyrir afurðir í flokki A er retínól ákvarðað með litrófsmælingu við 610 nm eftir að litaður sameindakomplex hefur myndast samkvæmt Carr-Price-efnahvörfum; fyrir afurðir úr flokki B með litrófsmælingu með útfjöubláu ljósi við 325 nm.

3. Hvarfefni

a) notuð til að greina afurðir í flokki A og B

- 3.1. 96% etanól (v/v).
- 3.2. 10% natríumskorbatlausn (w/v), a. p. eða
- 3.3. Hreinsað köfnunarefni.
- 3.4. 50% kalíumhýdroxíðlausn (w/v), a. p.
- 3.5. Kalíumhýdroxíðlausn, 1 N, a. p.
- 3.6. Kalíumhýdroxíðlausn, 0,5 N, a. p.
- 3.7. 1,2-díklóretan, a. p.
- 3.8. Léttir alkanar, suðubíll: 30 – 50 °C. Ef nauðsyn ber er hreinsað á eftirfarandi hátt: 1 000 ml af léttum alkönnum eru hristir saman við 20 ml skammta af óblandaðri brennisteinssýru uns sýran helst litlaus. Sýran er fjarlægð og léttu alkanarnir eru þvegnir fyrst með 500 ml af vatni, þá tvisvar með 250 ml af 10% af natríumhýdroxíðlausn (w/v) og þrisvar með 500 ml af vatni. Vatnslagið er fjarlægt, léttu alkanarnir eru þurrkaðir í 1 klukkustund yfir virku kolefni og vatnsfirrtu natríumsúlfati, síað og eimað.
- 3.9. Áloxíð, staðlað samkvæmt aðferð Brockmanns: Efnið er brennt til ösku í 8 klukkustundir við 750 °C, kælt í þurrkara og geymt í brúnni glerflösku með tappa úr slípuðu gleri. Efnið er bleytt á eftirfarandi hátt, áður en það er notað í litskiljun: 10 g af áloxíði eru sett í brúna glerflösku ásamt 0,7 ml af vatni, flöskunni er lokað með tappa, hitað á ný í 5 mínútur í sjóðandi vatnsbaði um leið og hrist er. Flaskan er látin kólna. Virkni álsins sem þannig er undirbúið er sannreynd með því að greina þekkt magn af staðalretínóli (3.17) samkvæmt 5.3 og 5.4.
- 3.10. Basískt áloxíð, virkni 1 (Woelm, Merck eða álíka).
- 3.11. Hreinn díetýleter. Peroxíð og öll ummerki vatns eru fjarlægð með litskiljun yfir basískri áloxíðsúlu (3.10). (25 g af áloxíði fyrir 250 ml af díetýleter).
- 3.12. Lausnir úr léttum alkönnum (3.8), 4, 8, 12, 16 og 20% díetýleter (v/v) (3.11).
- 3.13. Natríumsúlfíðlausn, 0,5 sameinda-grömm í 70% glýseríni, tilreidd úr natríumsúlfíði, p.a.

b) einungis notuð til að greina afurðir í flokki A

- 3.14. Kristallandi bensen, a.p.
- 3.15. Klóróform, a.p. etanól, fosgen og ummerki um vatn eru fjarlægð með litskiljun yfir basískri áloxíðsúlu (3.10). (50 g af áloxíði fyrir 200 ml af díetýleter; ráðlegt er að litskilja aftur fyrstu 50 ml af síuvökvanum).
- 3.16. Carr-price-hvarfefni: Um 25 g af antímóntríklóríð, a.p. (geymt í þurrkara) eru hrist saman við 100 ml af klóróformi (3.15) uns lausnin er mettuð. Lítils háttar útfelling af antímóntríklóríði er engin hindrun. 2 ml af asetikanhýdríði, a.p. er bætt við. Lausnin er geymd í brúnni glerflösku með tappa úr slípuðu gleri í kælikáp. Lausnin varðveitist í nokkrar vikur.
- 3.17. Retínól — staðlað með litrófsmæli.

c) einungis notuð til að greina afurðir í flokki B

- 3.18. Ísóprópanól, til litskiljunar.

4. Búnaður

- 4.1. Vatnsbað.
- 4.2. Soguppgefunarbúnaður með kúlulaga kolbum fyrir mismunandi rúmmál.
- 4.3. Litskiljunarglós (lengd: 300 mm; innra þvermál: um 13 mm).
- 4.4. Litrófsmælir með 10 mm þykkum kúvettum (úr kísildífoxíði fyrir mælingar í útfjólubláu ljósi).
- 4.5. Útfjólubláir lampar, 365 nm.

5. Vinnuaðferð

Ath. Allar aðgerðir skal framkvæma þar sem beint ljós kemst ekki að, í búnaði úr brúnu gleri ef nauðsyn krefur.

5.1. Prófsýni

Prófsýni er tekið úr fínskipta sýninu, í hlutfalli við áætlað retfnólinnihald, það er:

0,1 – 1,0 g af óblönduðu efni (innihald yfir 20 000 IU/g);

3,0 – 5,0 g af forblönduðu efni (innihald milli 400 og 20 000 IU/g);

10 – 20 g af jarðefnablöndum;

30 g af afurðum í flokki A.

Prófsýnið er sett án tafar í 500 ml kolbu með tappa úr slípuðu gleri.

5.2. Vatnsrof og útdráttur⁽¹⁾

Eftirfarandi efnum er bætt við prófsýnið í þessari röð: 40 ml af etanóli (3.1), 2 ml af natríumskorbatlausn (3.2)⁽²⁾, 10 ml af kalíumhýdroxíðlausn (3.4) og 2 ml af natríumsúlfíðlausn (3.13).

Blandan er hituð í 30 mínútur við 70 – 80 °C undir endurstreymispétti og kæld undir rennandi vatni. 50 ml af etanóli (3.1) og 100 ml af 1,2-díklóretan (3.7) (sem tekið er með rennipípu) er bætt við. Blandan er rækilega hrist og ofanáfljótandi vökvanum hellt af í afhellingarflát. 150 ml af kalíumhýdroxíðlausn (3.5) er bætt í flátið sem hrist er í 10 sekúndur og látið standa uns lögín eru aðskilin. Díklóretanlaginu (lægra laginu) er safnað í afhellingarflát, 40 ml af kalíumhýdroxíðlausn (3.6) er bætt við, hrist í 10 sekúndur og látið standa uns lögín eru aðskilin. Díklóretanlaginu er safnað í afhellingarflát og það þvegið 6 – 8 sinnum með 40 ml skömmtum af vatni uns alkálí er horfið (fenólftalínpróf). Díklóretanlaginu er safnað saman og síðustu ummerki vatns fjarlægð með síupappírsmumum.

Látið er gufa upp af deilanlegum hluta af lausninni með loftsogi yfir vatnsbaði við 40 °C uns hann er þurr. Leifarnar eru meðhöndlaðar án tafar með 5 ml af léttum alkönnum (3.8).

Afurðir í flokki A, litskiljun er framkvæmd eins og um getur í 5.3.1.

Afurðir í flokki B, lausnin er sett í 50 ml mælikolbu, léttum alkönnum (3.8) er hellt að markinu, blandað saman og ljósþétni mæld eins og um getur í 5.4.2.

5.3. Litskiljun

5.3.1. Afurðir í flokki A

Litskiljunarglas (4.3) er fyllt upp að 200 mm með 10 g af áloxiði (3.9) sem áður hefur verið mettað með léttum alkönnum (3.8). Lausninni samkvæmt 5.2 er hellt í glasið og 20 ml af léttum alkönnum (3.8) bætt við án tafar. Skolað er hvað eftir annað með 10 ml skömmtum af lausnum úr léttum alkönnum sem innihalda 4, 8, 12, 16 og 20% af díetýleter (3.12) undir þrýstingi eða að hluta til með sögi með 2 – 3 dropa flæði á sekúndu.

⁽¹⁾Þegar um er að ræða fóður úr mjólk og afurðir sem eiga til að hlaupa í kekki eða þrútna er magn hvarfefna sem um getur í fyrstu og annari málsgrein í 5.2 tvöfaldað.

⁽²⁾EKKI er þörf á að bæta natríumskorbatí við þegar vatnsrof er framkvæmt í köfnunarefnisloftþjúpi.

Karótínið er skolað fyrst⁽¹⁾. Retínól er venjulega skolað með lausn úr léttum alkönnum sem inniheldur 20% díetýleter (3.12). Skoluninni er stjórnað með útfjólubláu ljósi (súlan verður fyrir skammvinnri geislun frá kvikasilfurslampa). Sjálflýsandi rendur retínóls skilja sig greinilega frá gulu xantófüllröndunum sem koma á eftir þeim. Þeim hluta afurðarinnar sem inniheldur retínólið er safnað í Erlemeyerkolbu.

5.3.2. Afurðir í flokki B

Einungis skal framkvæma litskiljun fullnægi ljóspéttmælingar samkvæmt 5.4.2 ekki kröfum í 5.4.2.

Reynist nauðsynlegt að framkvæma litskiljun er deilanlegur hluti lausnarinnar í léttum alkönnum samkvæmt 5.2 settur í litskiljunarsúluna sem inniheldur um 500 IU af retínóli og litskiljun framkvæmd eins og um er rætt í 5.3.1.

5.4. Ljóspéttmælingar

5.4.1. Afurðir í flokki A

Látíð er gufa upp af afurðinni sem inniheldur retínól samkvæmt 5.3.1 með sögi uns hún er þurr. Leifarnar eru meðhöndlaðar með 2 ml af bensen (3.14). 0,3 ml eru teknir af þessari lausn og 3 ml af Carr-Price-hvarfefni (3.16) bætt við. Blár litur kemur í ljós. Ljóspéttni er mæld með litrófsmæli við 610 nm nákvæmlega 30 sekúndum eftir að efnahvörf hófust. Retínólinnihald er ákvarðað með samanburði við staðalkúrfu samkvæmt bensenlausnum með vaxandi staðal-retínólinnihaldi sem meðhöndlaðar eru með Carr-Price-hvarfefni (2 – 16 IU staðal-retínól (3.17) fyrir 0,3 ml af bensen (3.14) + 3 ml af Carr-Price-hvarfefni (3.16)). Athuga ber staðalkúrfuna oft og reglulega með staðlaðri og nýlagaðri Carr-Price-hvarfefnalausn.

5.4.2. Afurðir í flokki B

Deilanlegur hluti lausnarinnar í léttum alkönnum samkvæmt 5.2 sem inniheldur um 200 IU af retínóli er tekinn. Látíð er gufa upp af efninu með sögi uns það er þurr og leifarnar meðhöndlaðar með 25 ml af ísóprópánóli (3.18). Ljóspéttni er mæld með litrófsmæli við 325, 310 og 334 nm. Hámarksísog er við 325 nm. Retínólinnihald lausnarinnar er reiknað út á eftirfarandi hátt:

$$E_{325} \cdot 18,30 = \text{IU retínól/ml}$$

Innbyrðis hlutfall milli ljóspéttni

$$E_{310} : E_{325} \text{ og } E_{334} : E_{325}$$

skal samt sem áður vera $6 : 7 = 0,857$.

Víki eitt þessara hlutfalla verulega frá þessu gildi ($< 0,830$ eða $> 0,880$) skal litskiljun framkvæmd samkvæmt aðferðinni í 5.3.2 á undan ljóspéttmælingunni. Ef ljóspéttmælingar framkvæmdar að litskiljun lokinni gefa til kynna að fyrrnefnd hlutföll víki enn verulega frá gildinu 0,857 ($< 0,830$ eða $> 0,880$) skal framkvæma ákvörðunina samkvæmt aðferðinni fyrir afurðir í flokki A.

6. Útreikningur niðurstaðna

Retínólinnihald sýnisins er reiknað út með tilliti til þyngdar prófsýnisins og þynninga meðan á greiningu stóð. Niðurstöður eru gefnar til kynna sem IU retínól fyrir kílógramm af fóðri eða kílógramm af óblönduðu og forblönduðu fóðri.

⁽¹⁾Heimilt er að ákvarða karótíninnihald með ljóspéttmælingu við 450 nm; $E_{\frac{1\%}{1\text{cm}}} = 2600$.

Endurtekningarhæfni

Mismunur milli niðurstaðna tveggja hliðstæðra ákvarðana á sama sýninu skal vera mest:

- 20%, miðað við breytilegt gildi, fyrir retínólinnihald undir 75 000 IU/kg;
- 15 000 IU fyrir innihald milli 75 000 og 150 000 IU/kg;
- 10%, miðað við breytilegt gildi, fyrir innihald milli 150 000 og 250 000 IU/kg;
- 25 000 IU fyrir innihald milli 25 000 og 500 000 IU/kg;
- 5%, miðað við breytilegt gildi, fyrir innihald yfir 500 000 IU/kg.

2. ÁKVÖRÐUN ÞÍAMÍN (VÍTAMÍN B₁, ANEURÍN)**1. Tilgangur og umfang**

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða þíamínmagn (aneurín, vítamín B₁) í óblönduðu og forblönduðu fóðri. Lægri mörk ákvörðunarinnar eru 5 ppm.

2. Meginregla

Lausnin er meðhöndluð heit með þynntri brennisteinssýru og vatnsrofin með ensímum. Lausnin sem fæst er látin oxast basískt. Þiókrómið sem myndast er dregið út með ísóbutanóli og ákvarðað með flúorgreiningu.

3. Hvarfefni

- 3.1. Staðalþíamínlausn í hlutfallinu 100 μ /ml: þynnt eru 112,3 mg af þíamínhýdróklóríði, sem áður hafa verið þurrkuð með sögu uns stöðugri þyngd er náð, í 1 000 ml af 0,2 N brennisteinssýru (3.2). Unnt er að geyma þessa lausn í einn mánuð á köldum, dimmum stað.
- 3.2. Brennisteinssýra, 0,2 N.
- 3.3. Hreint natríumbísúlfít.
- 3.4. 20% kalíumferrísýaníðlausn (w/v), a.p.
- 3.5. 25% kalíumhýdroxíðlausn (w/v), a.p.
- 3.6. Oxunarblanda: 2 ml af kalíumferrísýaníðlausn (3.4) er blandað saman við 48 ml af kalíumhýdroxíðlausn (3.5). Þessi blanda geymist lengst í 4 klukkustundir.
- 3.7. Ísóbutanól, a.p.
- 3.8. Natríumasetatlausn, 2,5 N.
- 3.9. Fjölen símfenablanda sem inniheldur próteasa, fosfatasa og amýlasa (t.d. klarasa).
- 3.10. 96% etanól (v/v).

4. Búnaður

- 4.1. Vatnsbað.
- 4.2. Skilvinda (3 500 snúningar á mínútu) með 30 – 50 ml glösum með tappa úr slípuðu gleri.
- 4.3. Flúorgreinir.

5. Vinnuaðferð**5.1. Vatnsrof með ensímum**

Sama magn af fínskiptu sýninu, sem inniheldur um 100 μ g af þíamín og 125 ml af brennisteinssýru (3.2), er sett í sitt hvora 250 ml kolbuna, A og B. 1,0 ml af staðallausn (3.1) (innri staðall) er einnig bætt í kolbu A einvörðungu.

Kolburnar eru vandlega hristar, settar í sjóðandi vatnsbað og hafðar þar í 15 mínútur, hrist er af og til. Kolburnar eru kældar í um 45 °C. 20 ml af natríumasetatlausn (3.8) og 0,5 g af fjölensímeftablöndu (3.9) er bætt við í hvora kolbu og látið standa í 20 mínútur við stofuhita. 20 ml af natríumasetatlausn (3.8) er bætt við, vatni hellt upp að markinu, jafnblandað og síað. Eftir að fyrstu 15 ml hefur verið hent er síuvökum A og B safnað. Eftirfarandi lausn er tilreidd:

5.1.1. Tilvísunarlausn T

5 ml af síuvökva A og um 10 mg af natríumbísúlfit (3.3) eru sett í skilvinduglas. Glasinu er dýft í sjóðandi vatnsbað í 15 mínútur og það látið kólna að stofuhita.

5.1.2. Lausnir A (innri staðall) og B (sýni)

5 ml af síuvökva A eru settir í skilvinduglas (4.2) og 5 ml af síuvökva B í annað skilvinduglas (4.2).

5.2. Oxun

5 ml af oxunarblöndu (3.6) er bætt í lausnir T, A og B og 10 ml af ísóbútanól (3.7) einni mínútu síðar. Tappi er settur í glösin og þau vandlega hrist í 5 sekúndur. Glösin eru látin standa í eina mínútu og síðan sett í skilvindu til að aðskilja lögin. 5 ml af ofanáfljótandi ísóbútanóllaginu eru fluttir úr hvoru glasi yfir í sitt hvora 25 ml mælikolbu, etanóli (3.10) hellt upp að markinu og jafnblandað (= útdrættir T, A og B).

5.3. Flúrljómunarmælingar

Mælt er á þeirri bylgjulengd sem flúorgreininirinn svarar flúrljómun þrókróms best. Geislað er við um 365 nm.

Tækið er stillt á núll með útdrætti T. Flúrljómunarmagn útdráttar A og B er mælt.

6. Útreikningur niðurstaðna

Þíaníninnihald sýnisins í mg/kg fæst með hlutfallinu:

$$\frac{d \cdot b}{(a - b)c}$$

þar sem :

a = flúrljómunarstyrkur útdráttar A (innri staðall);

b = flúrljómunarstyrkur útdráttar B (sýni);

c = þyng prófsýnisins í grömmum;

d = þíamínimagn í µg sem bætt er við prófsýnið (innri staðall).

Endurtekningarræfni

Mismunur milli niðurstaðna tveggja hliðstæðra ákvarðana á sama sýninu skal vera mest:

10%, miðað við breytilegt gildi, fyrir innihald undir 500 mg/kg, og

5%, miðað við breytilegt gildi, fyrir innihald sem er jafnt eða yfir 500 mg/kg.

3. ÁKVÖRÐUN ASKORBÍNSÝRU OG DEHÝDRÓASKORBÍNSÝRU (C-VÍTAMÍN)

1. Tilgangur og umfang

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða heildarmagn askorbín- og dehýdróaskorbínsýru (C-vítamín) í óblönduðu og forblönduðu föðri. Lægri mörk ákvörðunarinnar eru 5 ppm. Afurðir eru flokkaðar í tvennt eftir áætluðu C-vítamíninnihaldi:

Flokkur A: innihald undir 10 g/kg;

Flokkur B: innihald jafnt eða yfir 10 g/kg.

2. Meginregla

Sýnið er sett í sviflausn í þynntri metafosfórsýru og dregið út með klóróformi. Vatnslagið er meðhöndlað með 2,6-díklórphenól-indófenól til að askorbínsýran ummyndist í dehydróaskorbínsýru og síðan með 2,4-dínítrófenýlhýdrasín. Hýdrasón sem myndast er dregið út með blöndu af etýlasetat, ísediki og asetón. Lausnin er litskilin yfir kísilhlaupsúlu, látið gufa upp af afurðinni uns hún er þurr og leifarnar leystar upp í þynntri brennisteinssýru. Ljósþéttni lausnarinnar er mæld með litrófsmæli við 509 nm.

Þegar um er að ræða *afurðir í flokki A* er afurðin úr litskiljuninni yfir súlunni litskilin á ný yfir þunnu lagi til að einangra hýdrasón.

3. Hvarfefni

- 3.1. Staðallausn 0,05% L-askorbínsýru: 50 mg af L-askorbínsýru, a.p. eru þynnt í um 20 ml metafosfórsýrulausn (3.2) og vatni hellt upp að 100 ml. Lausnin er tilreidd rétt fyrir notkun.
- 3.2. 10% metafosfórsýrulausn (w/v): 200 g af metafosfórsýru, a.p. eru þynnt í vatni eftir að hafa verið mulin í mortéli og vatni hellt upp að 2 000 ml. Lausnin er geymd við 4 °C og helst þannig stöðug í eina viku.
- 3.3. Klóróform, a.p.
- 3.4. 0,5% 2,6-díklórphenól-indófenóllausn (w/v), a.p. Lausnin er tilreidd rétt fyrir notkun.
- 3.5. Síuefni (S. og S. nr. 121 eða jafngildi þess).
- 3.6. Súr lausn af 2% 2,4-dínítrófenýlhýdrasín (w/v): 2 g af 2,4-dínítrófenýlhýdrasín eru þynnt með 100 ml af þynntri brennisteinssýru (25 ml af brennisteinssýru, a.p., d: 1,84, þynnt með því að hella vatni upp að 100 ml). Þessi lausn geymist í eina viku á köldum stað.
- 3.7. Köfnunarefni eða
- 3.8. Koldíoxíð.
- 3.9. Blanda af etýlasetat, a.p./ísediki/aseton, a.p.: 96/2/2.
- 3.10. Blanda af díklórmetan, a.p./ísediki: 97/3.
- 3.11. Kísilhlaup, kornastærð: 0,05 – 0,2 mm.
- 3.12. Kísilhlaup H samkvæmt Stahl fyrir þunnlagslitskiljun.
- 3.13. Þynnt brennisteinssýra: 105 ml af vatni er hellt í 200 ml mælikolbu, brennisteinssýru, a.p. er hellt upp að markinu, d: 1,84.
- 3.14. Þynnir fyrir þunnlagslitskiljun: Blandað er saman 75 ml af díetýleter, a.p., 25 ml af etýlasetat, a.p. og 4,0 ml af 96% edíksýru, a.p. (w/v). Þynnirinn er endurnýjaður eftir 2 – 3 litskiljanir.

4. Búnaður

- 4.1. Vatnsbað með hitastilli sem stilltur er á 20 °C.
- 4.2. Skilvinda (3 500 snúningar á mínútu) með 40 – 50 ml glösum með tappa úr slípuðu gleri.
- 4.3. Snúningstæki fyrir uppgufun með sögi með 250 ml kolbum.
- 4.4. Litskiljunarglös úr gleri (lengd: 100 mm, innra þvermál: 20 mm) ásamt plötu úr hertu gleri (t.d. Allihn-glös).
- 4.5. Litrófsmælir eða litamælir með snum sem hafa 10 mm kúvettur.
- 4.6. Búnaður fyrir þunnlagslitskiljun með kísilhlaupsplötum (3.12) með 0,5 – 0,6 mm þykku lagi. (Tilbúnar plötur eru hentugar.) Plöturnar eru þurrkaðar í ofninum í 2 1/2 til 3 klukkustundir við 120 – 130 °C. Plöturnar eru kældar og hafðar í þurrkara í að minnsta kosti 24 klukkustundir fyrir notkun.
- 4.7. Þurrkofn, stilltur á 120 – 130 °C.

5. Vinnuaðferð

5.1. Útdráttur

Jafnstórir skammtar af finskipta sýninu sem inniheldur um 200 μg af C-vítamíni eru settir í sitt hvora 250 ml mælikolbuna, A og B (með tappa úr slípuðu gleri). 0,4 ml af staðallaun (3.1) eru settir í kolbu A einvörðungu og blandað saman með því að hrista varlega (innri staðall).

30 ml af klóróformi (3.3) og 25 ml af metafosfórsýrulaun (3.2) við 4 °C er bætt í sitt hvora kolbu sem hristar eru í skamma stund og látnar standa í 10 – 15 mínútur. 25 ml af vatni er bætt við, tappinn settur í kolburnar, hrist vandlega í 10 sekúndur og þær látnar standa í 10 – 15 mínútur í vatnsbaðinu (4.1). Kolburnar eru settar í skilvindu til að aðskilja vatnslagið frá klóróformlaginu. Aðgerðirnar fara fram samtímis á vatnslagi A (innri staðall) og B, eins og lýst er hér að aftan.

5.2. Oxun

40 ml af ofanáfljótandi vatnslausninni (lítillega gruggug) samkvæmt 5.1 eru færðir með rennipípu yfir í efnahvarfaglas með tappa úr slípuðu gleri, 0,5 – 1 ml af 2,6-díklórfeól-indófeólallaun (3.4) er bætt við og blandað saman. Rauður litur myndast sem ætti að haldast í 15 mínútur. Þá er um 300 mg af síuefni (3.5) bætt við, hrist og síað gegnum þurra, samanbrotna síu. Síuvökvinn þarf ekki nauðsynlega að vera tær.

5.3. Efnahvörf með 2,4-dínítrófenýlhýdrasín og hýdrasónútdrætti

10 ml af síuvökvanum samkvæmt 5.2 eru fluttir með rennipípu yfir í skilvinduglas (4.2), 2 ml af 2,4-dínítrófenýlhýdrasínlaun (3.6) er bætt við og blandað saman. Köfnunarefnis- (3.7) eða koldíoxíðstraumi (3.8) er snögglega hleypt inn í glasið, tappi er settur í glasið og því sökkt í um 15 klukkustundir (yfir nótt) í vatnsbaðið (4.1).

Bætt er við 3 ml af vatni, 20 ml af etýlasetat/ísedik/asetonblöndunni (3.9) og um 800 mg af síuefni (3.5). Tappinn er settur í glasið, það hrist vandlega í 30 sekúndur og sett í skilvindu. 15 ml af ofanáfljótandi laginu eru settir í uppgufunarkolbu og látið gufa upp undir minnkuðum þrýstingi í snúningsuppgufunarkolbunni (4.3) uns olíukenndar leifar myndast. Leifarnar eru leystar upp í 2 ml af etýlasetat/ísedik/asetonblöndunni (3.9) með því að hita hana á ný í 50 °C, blandan er kæld, 10 ml af díklórmetan/ísedik/asetonblöndunni (3.10) er bætt við og blandað saman.

5.4. Litskiljun yfir sílu

Litskiljunarglas (4.4) er fyllt að 30 mm með díklórmetan/ísedikblöndunni (3.10). 5 g af kísilhlaupi (3.11) eru sett í sviflausn (um leið og hrist er rækilega) í 30 ml af díklórmetan/ísediklausninni (3.10); sviflausninni er hellt í glasið. Lausnin er látin standa og síðan þétt með köfnunarefni (3.7) við lágan þrýsting. Lausninni sem varð til samkvæmt 5.3 er hellt í glasið, kolban er skoluð með smáskammti af díklórmetan/ísediklausn (3.10) og henni hellt yfir í glasið sem síðan er fyllt með blöndunni (3.10) og haldið er áfram að þvo síluna með sömu blöndu (3 – 4 hlutar um 5 ml hver) uns afurðin verður litlaus. Gula hluta síuvökvens er hent.

Rauðlita svæðið efst í sílunni er skolað með etýlasetat/ísedik/asetonblöndunni (3.9), afurðinni er safnað saman og hún þurrkuð með uppgufun.

5.4.1. Þegar um er að ræða afurðir í flokki A (C-vítamíninnihald undir 10 g/kg) eru leifarnar leystar upp í 2,0 ml af etýlasetat/ísedik/asetonblöndunni (3.9) og litskildar án tafar eins og um getur í 5.5.

5.4.2. Þegar um er að ræða afurðir í flokki B (C-vítamíninnihald jafnt og eða yfir 10 g/kg) eru olíukenndu leifarnar meðhöndlaðar með 4,0 ml af þynntri brennisteinssýru (3.13), hrist er rækilega til að leifarnar leysist alveg upp og ljósbéttni mæld eins og lýst er í 5.6.

5.5. Þunnlagslitskiljun

Eftirfarandi aðgerðir eru tvíteknar. 0,5 ml af lausninni sem fékkst samkvæmt 5.4.1 er komið fyrir á plötunni (4.6) í formi mjós striks. Framkallað er að minnsta kosti í 20 mínútur með þynninum (3.14) í mettuðu baði uns bleika hýdrasónsvæðið er bersýnilega aðskilið. Látið standa og þorna þar sem loft leikur um það. Bleika svæðið er afmarkað, skrapað af með spaða og duftið flutt magnbundið yfir í litskiljunarglas (4.4).

Skolað er hvað eftir annað, einu sinni með 2 ml, tvisvar með 1,5 ml af etýlasetat/ísedik/asetonblöndunni (3.9). Afurðinni er safnað í litla kolbu (síðasti skammturinn skal vera litlaus). Þurrkað er með uppgufun, olúkenndu leifarnar eru meðhöndlaðar með 4,0 ml af þynntri brennisteinssýru (3.13), hrist er rækilega til að leysa leifarnar alveg upp og ljóspéttni mæld.

5.6. Ljóspéttnimæling

Ljóspéttni er mæld með litrófsmæli við 509 nm 20 – 30 mínútur eftir að leifarnar eru leystar upp í brennisteinssýru. Mælt er með samanburði við þynntra brennisteinssýru (3.13).

5.7. Núllpróf

Núllpróf er framkvæmt með sömu aðferð en án sýnisins.

6. Útreikningur niðurstaðna

C-vítamíninnihald sýnisins í grömmum fyrir hvert kílógramm fæst með hlutfallinu:

$$\frac{(c - a) \cdot 2}{(b - c) \cdot 10d}$$

þar sem:

a = ljóspéttni í núllprófinu;

b = ljóspéttni innri staðallausnarinnar;

c = ljóspéttni sýnislausnarinnar;

d = þyngd prófsýnis í grömmum.

Endurtekningarræfni

Mismunur milli niðurstaðna tveggja hliðstæðra ákvarðana á sama sýninu skal vera mest:

10%, miðað við breytilegt gildi, fyrir C-vítamíninnihald undir 10 g/kg, og

5%, miðað við breytilegt gildi, fyrir innihald sem er jafnt eða yfir 10 g/kg.