

Käesolev tekst on üksnes dokumenteerimisvahend ning sel ei ole mingit õiguslikku mõju. Liidu institutsioonid ei vastuta selle teksti sisu eest. Asjakohaste õigusaktide autentsed versioonid, sealhulgas nende preambulid, on avaldatud Euroopa Liidu Teatajas ning on kättesaadavad EUR-Lexi veebisaidil. Need ametlikud tekstid on vahetult kättesaadavad käesolevasse dokumenti lisatud linkide kaudu

► B **KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 152/2009,**
27. jaanuar 2009,
milles sätestatakse proovivõtu- ja analüüsimeetodid sööda ametlikuks kontrolliks
(EMPs kohaldatav tekst)
(ELT L 54, 26.2.2009, lk 1)

Muudetud:

		Euroopa Liidu Teataja		
		nr	lehekülg	kuupäev
► <u>M1</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 278/2012, 28. märts 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 51/2013, 16. jaanuar 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 691/2013, 19. juuli 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 709/2014, 20. juuni 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Komisjoni määrus (EL) 2017/645, 5. aprill 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Komisjoni määrus (EL) 2017/771, 3. mai 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Komisjoni rakendusmäärus (EL) 2020/1560, 26. oktoober 2020	L 357	17	27.10.2020

▼B**KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 152/2009,****27. jaanuar 2009,****milles sätestatakse proovivõtu- ja analüüsimeetodid sööda ametlikuks kontrolliks****(EMPs kohaldatav tekst)****▼M3***Artikkel 1*

Proovide võtmine sööda ametlikuks kontrollimiseks, eriti sööda koostisosade määramiseks, sealhulgas geneetiliselt muundatud organisme (GMO) sisaldavate või neist toodetud koostisosade, Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruses (EÜ) nr 1831/2003 ⁽¹⁾ määratletud söödalisandite ning Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivis 2002/32/EÜ ⁽²⁾ määratletud soovimatute ainete määramiseks tuleb teha I lisas sätestatud meetoditega.

I lisas sätestatud proovivõtumeetodit kasutatakse sööda kontrollimiseks, et määrata Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruses (EÜ) nr 396/2005 ⁽³⁾ määratletud pestitsiidijääke ning kontrollida sööda vastavust määrusele (EL) nr 619/2011.

▼B*Artikkel 2*

Proovide analüüsiks ettevalmistamine ja tulemuste esitamine toimub kooskõlas II lisas sätestatud meetoditega.

Artikkel 3

Analüüse sööda ametlikuks kontrolliks tehakse vastavalt III lisas (Analüüsimeetodid söödatooraine ja segajõusööda koostise kontrollimiseks), IV lisas (Analüüsimeetodid lubatud söödalisandite taseme kontrollimiseks söödas), V lisas (Analüüsimeetodid soovimatute ainete sisalduse kontrollimiseks söödas) ja VI lisas (Analüüsimeetodid loomse päritoluga komponentide määramiseks sööda ametlikul kontrollimisel) sätestatud meetoditele.

Artikkel 4

Kodulindude segasööda energiasisaldus arvutatakse vastavalt VII lisale.

Artikkel 5

Analüüsimeetodeid selliste VIII lisas sätestatud lisandite ebaseadusliku sisalduse kontrollimiseks, mida ei ole enam lubatud söödas kasutada, kasutatakse kinnituse saamiseks.

⁽¹⁾ ELT L 268, 18.10.2003, lk 29.

⁽²⁾ EÜT L 140, 30.5.2002, lk 10.

⁽³⁾ EÜT L 70, 16.03.2005, lk 1.

▼B

Artikkel 6

Direktiivid 71/250/EMÜ, 71/393/EMÜ, 72/199/EMÜ, 73/46/EMÜ, 76/371/EMÜ, 76/372/EMÜ, 78/633/EMÜ, 81/715/EMÜ, 84/425/EMÜ, 86/174/EMÜ, 93/70/EMÜ, 93/117/EÜ, 98/64/EÜ, 1999/27/EÜ, 1999/76/EÜ, 2000/45/EÜ, 2002/70/EÜ ja 2003/126/EÜ tunnistatakse kehtetuks.

Viiteid kehtetuks tunnistatud direktiividele käsitatakse viidetena käesolevale määrusele ja loetakse vastavalt XI lisa vastavustabelitele.

Artikkel 7

Käesolev määrus jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolevat määrust kohaldatakse alates 26. augustist 2009.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

▼ **M3***I LISA***PROOVIVÕTUMEETODID****1. EESMÄRK JA REGULEERIMISALA**

Sööda ametlikuks kontrolliks ettenähtud proovid võetakse allpool kirjeldatud meetodite kohaselt. Sellisel saadud proove käsitletakse proovipartii esindusliku proovina.

Esindusliku proovi võtmise eesmärk saada partiist väike osa nii, et iga selle osa konkreetne näitaja kujutaks endast partii näitajate keskmist väärtust. Partii eri kohtadest võetakse korduvalt üksikproove. Üksikproovide kokkusegamisega saadakse koondproov, millest võetakse esindusliku jagamise teel esinduslikud lõpp-proovid.

Kui vaatlusel ilmneb, et osa samast söödapartiist on erineva kvaliteediga, eraldatakse sellised osad ja neid käsitletakse kui alampartiisid. Kui söödapartiid ei ole võimalik jagada alampartiideks, tuleb seda käsitada ühe partiina, kuid selle kohta tuleb teha märkus proovivõtuaruandesse.

Kui tehakse kindlaks, et käesoleva määruse sätete kohaselt võetud söödaproov ei vasta ELi nõuetele ja kui tegemist on sama tooteklassi või -liigi söödapartii osaga, siis tuleb eeldada, et kogu selle partii sööt ei vasta nõuetele, välja arvatud juhul, kui üksikasjaliku hindamise käigus selgub, et puuduvad tõendid selle kohta, et ülejäänud osa partiist ei vasta ELi nõuetele.

2. MÕISTED

— Partii: identifitseeritav söödakogus, millel on ühised tunnused näiteks päritolu, sort, pakendi tüüp, pakendaja, kaubasaatja või märgistus; tootmisprotsessi kontekstis on partii toodanguühik, mida toodetakse samas ettevõttes ühesuguseid tootmisparameetreid järgides, või mitu sellist ühikut, kui need on toodetud järjest ja koos ladustatud.

— Proovipartii: partii või identifitseeritav osa partiist või alampartiist.

— Pitseeritud proov: proov, mis on pitseeritud niimoodi, et on välis-
tatud juurdepääs proovile ilma pitselit purustamata või eemaldamata.

— Üksikproov: proovipartii ühest punktist võetud kogus.

— Koondproov: ühe ja sama proovipartii üksikproovidest kogutud proov.

— Vähendatud proov: koondproovi osa, mis on saadud koondproovi esindusliku vähendamise teel.

— Lõpp-proov: vähendatud proovi või homogeenitud koondproovi osa.

— Laboratoorne proov: laboratooriumis kasutamiseks ettenähtud proov (mis on toimetatud laboratooriumi), mis võib olla lõpp-proov, vähendatud proov või koondproov.

▼ **M3**

3. ÜLDSÄTTED

- Proovivõtupersonal: proove peavad võtma isikud, keda on selleks volitanud pädev asutus.
- Proov tuleb pitseerida niimoodi, et oleks välistatud juurdepääs proovile ilma pitselit purustamata või eemaldamata. Pitsel peab olema selgelt identifitseeritav ja hästi nähtav. Teine võimalus on, et pitsel pannakse sellisesse anumasse või mahutisse, mille saab sulgeda nii, et seda ei ole võimalik purustamata avada, ja millega välditakse mahuti/anuma korduvat kasutamist.
- Proovi tunnusandmed: proov tuleb kustumatult märgistada ja niimoodi identifitseerida, et see oleks selgelt seostatav proovivõtuaruandega.
- Igast koondproovist tuleb võtta vähemalt kaks lõpp-proovi: vähemalt üks proov kontrollimiseks (täitemenetluseks) ja üks söödakäitlejale (apellatsiooniks). Ühe lõpp-proovi võib võtta võrdlusprooviks. Kui kogu koondproov homogeenitakse, võetakse lõpp-proovid homogeenitud koondproovist, välja arvatud juhul, kui see on vastuolus liikmesriikides söödakäitleja õiguste kohta kehtivate eeskirjadega.

4. SEADMED

- 4.1. Proovivõtuseadmed peavad olema materjalist, mis ei saasta tooteid, millest proove võetakse. Korduvaks kasutamiseks ettenähtud seadmed peavad olema kergesti puhastatavad, et hoida ära ristasaastumist.

4.2. **Soovitavad seadmed proovide võtmiseks tahkest söödast**4.2.1. *Käsitsi proovivõtmine*

4.2.1.1. Lamedapõhjaline püstiste servadega kühvel.

- 4.2.1.2. Proovivõtupuur pika ava või lahtritega. Proovivõtupuuri mõõtmed peavad vastama proovipartii näitajatele (mahuti sügavus, koti mõõtmed jms) ja söödaosakeste suurusele.

Kui proovivõtupuur on mitme avaga, et proovi saaks võtta mitmest kohast puurimise teekonnal, peavad avad olema lahtrite kaupa või astmeliste vaheseintega eraldatud.

4.2.2. *Mehaaniline proovivõtmine*

Laaditavast söödast proovide võtmiseks võib kasutada asjakohaseid mehaanilisi proovivõtuseadmeid. Asjakohane tähendab seda, et proove võetakse kogu söödavoo läbilõikest.

Suure kiirusega liikuvast söödast võib proove võtta automaatse seadmega.

4.2.3. *Jagaja*

Esinduslikult vähendatud proovide valmistamiseks tuleks võimaluse ja vajaduse korral kasutada seadet, millega jagatakse proov ligikaudu võrdseteks osadeks.

▼ **M3**

5. ÜKSIKPROOVIDE ARVU NÕUDED

— Punktides 5.1 ja 5.2 üksikproovide arvu kohta kehtestatud nõudeid kohaldatakse selliste kuni 500-tonniste proovipartiide suhtes, millest on võimalik võtta esinduslikke proove. Kirjeldatud proovivõtumenetlus kehtib ka osutatud suurimast proovipartiist suuremate koguste puhul, kui ei järgita järgmises tabelis esitatud suurimat üksikproovide arvu, vaid üksikproovide arv määratakse ruutjuurevalemiga, mis on esitatud menetluse kirjelduse asjaomases kohas (vt punkti 5.3), ning vähima koondproovi suurust suurendatakse võrdeliselt. See ei takista suurte partiide jagamist väiksemateks alampartiideks, nii et igast alampartiist võetakse proove punktides 5.1 ja 5.2 kirjeldatud menetluse kohaselt.

— Proovipartii suurus peab olema selline, et proove oleks võimalik võtta kõikidest proovipartii osadest.

— Väga suurte partiide ja alampartiide korral (> 500 tonni) ja partiide korral, mida transporditakse või ladustatakse nii, et proove ei ole võimalik võtta käesoleva peatüki punktides 5.1 ja 5.2 kirjeldatud viisil, tuleb proove võtta punktis 5.3 kirjeldatud viisil.

— Kui söödakäitleja peab kehtivate õigusaktide kohaselt täitma käesoleva määruse nõudeid seoses kohustusliku seirega, võib ta kalduda kõrvale käesolevas peatükis esitatud koguselistest nõuetest, et võtta arvesse tegevuse iseloomulikke näitajaid, tingimusel et söödakäitleja on pädevale asutusele rahuldavalt tõendanud, et kõnealune proovivõtumenetlus on sama esinduslik, ja kui ta on saanud pädevalt asutuselt sellekohase loa.

— Kui koguselisi nõudeid silmas pidades ei ole võimalik kasutada kirjeldatud proovivõtumeetodit, kuna partii kahjustamise tõttu kaasneksid sellega vastuvõetamatud kaubanduslikud tagajärjed (seoses pakkimisviisiga, veovahendiga, ladustamisviisiga vms), võib erandjuhul kohaldada teistsugust proovivõtumeetodit, kui see on sama esinduslik ning kui kogu menetlust täpselt kirjeldatakse ja dokumenteeritakse.

5.1. **Söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimiseks võetavate üksikproovide arvu nõuded**5.1.1. *Lahtine tahke sööt*

Proovipartii suurus	Vähim üksikproovide arv
≤ 2,5 tonni	7
> 2,5 tonni	$\sqrt{20}$ korda proovipartii suurus tonnides (*), kuid kuni 40 üksikproovi

(*) Kui saadud arv on murdarv, ümardatakse see järgmise täisarvuni.

▼ **M3**5.1.2. *Lahtine vedel sööt*

Proovipartii suurus	Vähim üksikproovide arv
≤ 2,5 tonni või ≤ 2 500 liitrit	4 (*)
> 2,5 tonni või > 2 500 liitrit	7 (*)

(*) Kui vedelikku ei saa homogeenida, tuleb võtta rohkem üksikproove.

5.1.3. *Pakendatud sööt*

Sööt (tahke ja vedel) võib olla pakendatud kottidesse, kanistritesse, mahutitesse jne, millele tabelis viidatakse kui pakkeühikutele. Suurtest pakkeühikutest (≥ 500 kg või liitrit) tuleb võtta proove lahtise sööda kohta kehtivate sätete kohaselt (vt punktid 5.1.1. ja 5.1.2.)

Proovipartii suurus	Vähim pakkeühikute arv, millest tuleb võtta (vähemalt) üks üksikproov (*)
1–20 pakkeühikut	1 pakkeühik (**)
21–150 pakkeühikut	3 pakkeühikut (**)
151–400 pakkeühikut	5 pakkeühikut (**)
> 400 pakkeühikut	¼ korda √ proovipartii moodustavate pakkeühikute arv (***), kuid kuni 40 pakkeühikut

(*) Kui pakkeühiku avamine võib analüüsi tulemust mõjutada (nt riknevad vedelad söödad), loetakse avamata ühik üheks üksikprooviks.

(**) Kui pakkeühiku netomass on kuni 1 kg või 1 liiter, loetakse üksikprooviks ühe originaalühiku sisu.

(***) Kui saadud arv on murdarv, ümardatakse see täisarvuni.

5.1.4. *Söödabriketid ja lakukivid*

Proov võetakse vähemalt ühest briketist või kivist 25 pakkeühikust koosneva proovipartii kohta, kuid mitte rohkem kui neljast briketist või kivist.

Kui iga briketi või lakukivi kaal on kuni 1 kg, loetakse üksikprooviks ühe kivi või briketi sisu.

5.1.5. *Koresööt*

Proovipartii suurus	Vähim üksikproovide arv (*)
≤ 5 tonni	5
> 5 tonni	√ 5 korda proovipartii mass tonnides (**), kuid kuni 40 üksikproovi

(*) Märgitakse, et teatavatel juhtudel (nt silo korral) ei ole võimalik võtta nõutavat arvu üksikproove, ilma et sellega ei tekitataks partiile vastuvõetamatut kahju. Sel juhul võib kasutada muud proovivõtumeetodit ning proovivõtuhised sellisteks juhtudeks töötatakse välja enne käesoleva määrase jõustumist.

(**) Kui saadud arv on murdarv, ümardatakse see täisarvuni.

▼ **M3****5.2. Üksikproovide arvu nõuded juhul, kui kontrollitavad koostisosad või ained on söödas tõenäoliselt ebaühtlaselt jaotunud**

Kõnealused üksikproovide proovide arvu nõuded kehtivad järgmistel kontrollijuhtudel:

- aflatoksiinide, hariliku tungaltera ning muude mükotoksiinide ja ohtlike botaaniliste lisandite sisaldus söödamaterjalis;
- ristsaastumine, mille on põhjustanud koostisosa, sealhulgas geneetiliselt muundatud materjal, või aine, mis eeldatavasti võib olla söödas ebaühtlaselt jaotunud.

Kui kontrollival asutusel on tugev kahtlus, et selline ebaühtlane jaotumine esineb segasööda koostisosa või aine ristsaastumise korral, võib võtta proove järgmises tabelis esitatud arvul.

Proovipartii suurus	Vähim üksikproovide arv
< 80 tonni	Vt arvilised nõuded punktis 5.1. Üksikproovide arv tuleb korrutada 2,5-ga.
≥ 80 tonni	100

5.3. Proovide arvu nõuded väga suurte partiide üksikproovide korral

Väga suurte proovipartiide korral (proovipartii > 500 tonni) on võetavate üksikproovide arv 40 üksikproovi + $\sqrt{\text{tonnide arv}}$, kui ained või tooted on ühtlaselt jaotunud kogu söödas, või 100 üksikproovi + $\sqrt{\text{tonnide arv}}$, kui koostisosad või ained on ebaühtlaselt jaotunud kogu söödamaterjalis.

6. KOONDPROOVI KOGUSELISED NÕUDED

Nõutav on üks koondproov proovipartii kohta.

	Sööda liik	Koondproovi vähim kogus (*) (**)
6.1.	Lahtine sööt	4 kg;
6.2.	Pakendatud sööt:	4 kg (***)

▼ M3

Nõutav on üks koondproov proovipartii kohta.

	Sööda liik	Koondproovi vähim kogus (*) (**)
6.3.	Vedel või poolvedel sööt:	4 liitrit
6.4.	Söödabriketid või lakukivid:	
6.4.1.	igäüks kaaluga üle 1 kg	4 kg
6.4.2.	igäüks kaaluga kuni 1 kg	Nelja originaalbriketi või -kivi kaal
6.5.	Koresööt/kuivsööt	4 kg (****)

(*) Kui sööt, millest võetakse proove, on väga väärtuslik, võib võtta väiksema arvu koondproove, tingimusel, et see on proovivõttuaruandes kirjeldatud ja dokumenteeritud.

(**) Vastavalt komisjoni 24. juuni 2011. aasta määrusele (EL) nr 619/2011, milles sätestatakse proovivõtu- ja analüüsimeetodid sööda ametlikuks kontrolliks sätetele seoses sellise geneetiliselt muundatud materjali olemasoluga, mille loa taotlemine on menetlemisel või mille luba on aegunud (ELT L 166, 25.6.2011, lk 9), peab geneetiliselt muundatud materjali leidumise kontrollimise koondproovis sisalduma vähemalt 35 000 seemet/tera. Seega peab maisi puhul olema koondproov vähemalt 10,5 kg ja sojaõa puhul 7 kg. Teiste seemnete ja terade puhul, nagu oder, hirss, kaer, riis, nisu ja raps, on koondproov 4 kg ja sisaldab rohkem kui 35 000 seemet.

(***) Pakendatud sööda puhul, sõltuvalt pakkeühikute suurusest, ei tarvitse olla võimalik saada 4 kg suurust koondproovi.

(****) Kerge koresööda (nt hein, põhk) puhul ei tohi koondproov olla väiksem kui 1 kg.

7. LÕPP-PROOVI KOGUSELISED NÕUDED

Lõpp-proovid

Analüüsida tuleb vähemalt üht lõpp-proovi. Analüüsitava lõpp-proovis sisalduv kogus ei tohi olla väiksem järgmistest näitajatest:

Tahke sööt	500 g (*) (**) (***)
Vedel või poolvedel sööt	500 ml (*)

(*) Vastavalt määrusele (EL) nr 619/2011 peab geneetiliselt muundatud materjali olemasolu kontrollimiseks võetav lõpp-proov sisaldama vähemalt 10 000 seemet/tera. Seega peab maisi puhul olema lõpp-proov vähemalt 3 000 g ja sojaõa puhul 2 000 g. Teiste seemnete ja terade puhul, nagu oder, hirss, kaer, riis, nisu ja raps, sisaldab 500 g lõpp-proov rohkem kui 10 000 seemet.

(**) Kui koondproov on märksa väiksem kui 4 kg või liitrit (vt punkti 6 allmärkus), võib võtta ka väiksema lõpp-proovi, tingimusel, et seda kirjeldatakse ja see dokumenteeritakse proovivõttuaruandes.

(***) Pestitsiidijääkide määramiseks kaunviljas, teraviljas ja päkliklipu viljades peab lõpp-proovi miinimumkogus olema komisjoni direktiivi 2002/63/EÜ (ELT L 187, 16.7.2002, lk 30) sätete kohaselt 1 kg.

▼ **M3**

8. PROOVIVÕTUMEETOD VÄGA SUURTE PARTIIDE JAOKS JA SELLISTE PARTIIDE JAOKS, MIDA LADUSTATAKSE VÕI TRANSPORTITAKSE NII, ET KOGU PARTII ULATUSES EI OLE VÕIMALIK PROOVE VÕTTA

8.1. **Üldpõhimõtted**

Kui partii ladustamine või transportimine ei võimalda võtta üksikproove kogu partiist, tuleks eelistatult võtta sellisest partiist proove laadimise ajal.

Suurtesse sööda hoidmiseks ettenähtud ladudesse tuleks soovitada söödakäitlejatel paigaldada (automaatsed) proovivõtuseadmed, millega on võimalik võtta proove kogu ladustatud partiist.

Kui proove võetakse 8. peatükis sätestatud viisil, tuleb söödakäitlejat või tema esindajat teavitada proovivõtumenetlusest. Kui söödakäitleja või tema esindaja seab kahtluse alla kõnealuse proovivõtumeetodi, peab söödakäitleja või tema esindaja lubama pädeval asutusel võtta proove kogu partiist ja katma kulud.

8.2. **Laevaga transporditavad suured partiid**8.2.1. *Laevaga transporditavast partiist liikuvast tootest proovide võtmine*

Suurtest partiidest, mida transporditakse laevaga, võetakse eelistatult proove laadimise ajal (kui toode on liikuv).

Proove võetakse igast lastiruumiosast (osast, mida on võimalik füüsiliselt eraldada) Kuna lastiruumi osi tühjendatakse eraldi, kaob lattu laadimise käigus osade füüsiline eraldatus. Proove võib võtta kas algse füüsilise eraldatuse olukorras või pärast lattu viimist.

Laeva lossimine võib kesta mitu päeva. Proove tuleks tavaliselt võtta korrapäraste ajavahemike järel kogu lossimise ajal. Alati ei ole aga mõistlik ega asjakohane, et ametlik inspektor on proovivõtuks kohal kogu lossimise ajal. Seepärast on lubatud proove võtta kogu partii ühest osast (proovipartiist). Üksikproovide arv määratakse vastavalt proovipartii suurusele.

Kui proovid võetakse söödast, mis on sama klassi või sama kirjeldusega söödapartii osa ja kui on kindlaks tehtud, et kõnealune alampartii ei vasta ELi nõuetele, tuleb eeldada, et kogu selle partii sööt on ühesugune, välja arvatud juhul, kui üksikasjaliku hindamise käigus selgub, et puuduvad tõendid selle kohta, et ülejäänud osa partiist ei vasta ELi nõuetele.

Ka siis, kui ametlikud proovid võetakse automaatselt, on inspektori kohalolek vajalik. Kui proovid võetakse automaatselt ja vastavalt eelnevalt kindlaks määratud näitajatele, mida ei saa muuta proovide võtmise ajal, ning kui üksikproovid kogutakse pitseeritavasse anumasse, nii et sedasi hoitakse ära igasugused pettused, peab inspektor olema kohal ainult proovivõtu alguses, iga kord, kui proovianumat vahetatakse, ja proovivõtu lõpus.

▼ **M3**8.2.2. *Laevaga transporditavast partiist liikumatust tootest proovide võtmine*

Kui proove võetakse liikumatust tootest, tuleb kasutada sama menetlust, mis on ette nähtud ülalt ligipäasetavatest ladudest (sööda tornhoidlatest) proovide võtmiseks (vt punkti 8.4.1).

Proove tuleb võtta partii (lastiruumi) ligipäasetavast osast (ülalt). Üksikproovide arv määratakse vastavalt proovipartii suurusele. Kui proovid võetakse söödast, mis on sama klassi või sama kirjeldusega söödapartii osa ja kui on kindlaks tehtud, et kõnealune alampartii ei vasta ELi nõuetele, tuleb eeldada, et kogu partii sööt on ühesugune, välja arvatud juhul, kui üksikasjaliku hindamise käigus selgub, et puuduvad tõendid selle kohta, et ülejäänud osa partiist ei vasta ELi nõuetele.

8.3. **Proovide võtmine laos hoitavast suurest partiist**

Proove tuleb võtta partii ligipäasetavast osast. Üksikproovide arv määratakse vastavalt proovipartii suurusele. Kui proovid võetakse söödast, mis on sama klassi või sama kirjeldusega söödapartii osa ja kui on kindlaks tehtud, et kõnealune alampartii ei vasta ELi nõuetele, tuleb eeldada, et kogu partii sööt on ühesugune, välja arvatud juhul, kui üksikasjaliku hindamise käigus selgub, et puuduvad tõendid selle kohta, et ülejäänud osa partiist ei vasta ELi nõuetele.

8.4. **Proovide võtmine hoidlatest (sööda tornhoidlatest)**8.4.1. *Proovide võtmine ülalt (kergesti) ligipäasetavatest mahutitest*

Proove tuleb võtta partii ligipäasetavast osast. Üksikproovide arv määratakse vastavalt proovipartii suurusele. Kui proovid võetakse söödast, mis on sama klassi või sama kirjeldusega söödapartii osa ja kui on kindlaks tehtud, et kõnealune alampartii ei vasta ELi nõuetele, tuleb eeldada, et kogu partii sööt on ühesugune, välja arvatud juhul, kui üksikasjaliku hindamise käigus selgub, et puuduvad tõendid selle kohta, et ülejäänud osa partiist ei vasta ELi nõuetele.

8.4.2. *Proovide võtmine hoidlatest, millele puudub juurdepääs ülalt (suletud mahutid)*8.4.2.1. *Hoidlad, millele puudub juurdepääs ülalt (suletud mahutid), mahuga > 100 tonni*

Sellistest mahutitest ei ole võimalik paigalseisvast söödast proove võtta. Kui on vaja proove võtta mahutis olevast söödast, mida ei saa liigutada, tuleb käitlejaga kokku leppida, et ta teatab, kui mahutist hakatakse sööta välja laadima, et siis söödast proove võtta.

8.4.2.2. *Hoidlad, millele puudub juurdepääs ülalt (suletud mahutid), mahuga < 100 tonni*

Proovivõtuks tuleb anumasse võtta 50–100 kg toodet ja proove tuleb võtta sellest kogusest. Koondproovi suurus sõltub kogu partii suurusest ning üksikproovide arv sõltub proovivõtuks anumasse võetud toote kogusest. Kui proovid võetakse söödast, mis on sama klassi või sama kirjeldusega söödapartii osa ja kui on kindlaks tehtud, et kõnealune alampartii ei vasta ELi nõuetele, tuleb eeldada, et kogu partii sööt on ühesugune, välja arvatud juhul, kui üksikasjaliku hindamise käigus selgub, et puuduvad tõendid selle kohta, et ülejäänud osa partiist ei vasta ELi nõuetele.

▼ **M3**8.5. **Proovide võtmine suurtes suletud mahutites olevast lahtisest söödast**

Sellistest partiidest saab sageli proove võtta alles siis, kui toode on välja laaditud. Mõnikord ei ole võimalik toodet välja laadida impordi- või kontrollipunktis ja proove tuleb võtta väljalaadimiskohas.

9. PROOVIDE VÕTMISE, ETTEVALMISTAMISE JA PAKENDAMISE JUHISED

9.1. **Üldkirjeldus**

Proovid tuleb võtta ja ette valmistada liigse viivitusega ning võtta toote muutumise ja saastumise vältimiseks vajalikud ettevaatusabinõud. Töövahendid ja -pinnad ning proovide hoidmiseks ettenähtud anumad peavad olema puhtad ja kuivad.

9.2. **Üksikproovid**

Üksikproove võetakse pisteliselt kogu proovipartii ulatuses ja need peavad olema ligikaudu võrdse suurusega.

Üksikproov peab olema vähemalt 100 g või kerge koresööda puhul 25 g.

Kui punktis 8 sätestatud proovivõtmiseeskirjade kohaselt tuleb võtta vähem kui 40 üksikproovi, määratakse üksikproovi suurus vastavalt nõutava koondproovi suurusele (vt punkti 6).

Kui proove võetakse väikestest pakendatud sööda partiidest, mille puhul on vaja võtta väike arv üksikproove, peab üksikproov olema ühe originaalpakkeühiku sisu, kui pakkeühik ei ole suurem kui 1 kg või 1 l.

Kui söödapakendid on väikesed (nt < 250 g), sõltub üksikproovi suurus pakendi suurus.

9.2.1. *Lahtine sööt*

Vajaduse korral võib proove võtta partii liikumise (peale- või mahalaadimise) ajal.

9.2.2. *Pakendatud sööt*

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on 5. peatüki kohaselt vajalik arv pakendeid välja valitud, võetakse puuri või kühvli abil osa iga pakendi sisust. Vajaduse korral võetakse proovid pärast seda, kui pakendid on ükshaaval tühjendatud.

9.2.3. *Homogeenne või homogeentav vedel või poolvedel sööt*

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on punkti 5. peatüki kohaselt vajalik arv mahuteid välja valitud, homogeneeritakse vajaduse korral nende sisu ja võetakse vajalik kogus igast mahutist.

Üksikproove võib võtta mahutite tühendamise ajal.

▼ **M3**9.2.4. *Mittehomogeenitav vedel või poolvedel sööt*

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on 5. peatüki kohaselt vajalik arv mahuteid välja valitud, võetakse proovid eri tasemetelt.

Proove võib võtta ka mahutite tühjendamise ajal, kuid mitte esimestest kihtidest.

Mõlemal juhul peab võetav kogus olema vähemalt 10 liitrit.

9.2.5. *Söödabriketid ja lakukivid*

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on 5. peatüki kohaselt vajalik arv brikette või kive välja valitud, võetakse osa igast briketist või kivist. Kui on kahtlusi, et kivi või brikett ei ole ühtlase koostisega, võetakse prooviks kogu brikett või kivi.

Kui iga briketi või lakukivi kaal on kuni 1 kg, loetakse üksikprooviks ühe kivi või briketi sisu.

9.3. **Koondproovide ettevalmistamine**

Ühtne koondproov saadakse üksikproovide kokkusegamise abil.

9.4. **Lõpp-proovide ettevalmistamine**

Koondproovi materjal segatakse hoolega ⁽¹⁾.

— Iga proov pannakse sobivasse mahutisse/anumasse. Tuleb võtta kõik vajalikud ettevaatusabinõud, et vältida muutusi proovi koostises, saastumist või võltsimist, mis võivad tekkida transportimise või ladustamise ajal.

— Kui kontrollitakse sööta, milles koostisosad või ained on ühtlaselt jaotunud, võib koguda esindusliku vähendatud koondproovi, mille suurus on vähemalt 2,0 kg või 2,0 l (vähendatud proov), ⁽²⁾ kasutades eelistatult mehaanilist või automaatset jagajat. Et kontrollida pestitsiidide jääke kaunviljades, teravilja terades ja pähklipuu viljades, peab vähendatud proovi suurus olema vähemalt 3 kg. Kui sööda olemus ei võimalda kasutada jagajat või kui jagajat ei ole, tuleb proovi vähendada kvarteerimismeetodil. Vähendatud proovidest valmistatakse enam-vähem ühesuurused ja 7. peatüki koguseliste nõuetele vastavad lõpp-proovid (kontrollproov, apellatsiooniproov ja võrdlusproov). Kui kontrollitakse koostisosi, sealhulgas geneetiliselt muundatud materjali, või aineid, mis võivad tõenäoliselt olla ebaühtlaselt jaotunud söödamaterjalis, peab koondproov olema:

— täiesti homogeenitud ja seejärel lõpp-proovideks jagatud või

— vähendatud suuruseni vähemalt 2 kg või 2 l ⁽³⁾ mehaanilise või automaatse jagajaga; kui sööda olemuse tõttu ei ole võimalik jagajat kasutada, võib proovi vähendada ka kvarteerimismeetodil. Et kindlaks teha geneetiliselt muundatud materjali olemasolu vastavalt määrusele (EL) nr 619/2011, peab vähendatud proovis olema vähemalt 35 000 seemet/terist, et sellest saaks vähemalt 10 000 seemet sisaldava kontrollproovi, apellatsiooniproovi ja võrdlusproovi (vt 6. peatüki allmärkus ^(**) ja 7. peatüki allmärkus ^(*)).

⁽¹⁾ Kõik tükid purustatakse (vajaduse korral võetakse need proovist välja ja pannakse pärast purustamist tagasi).

⁽²⁾ Välja arvatud kerge kuiv- ja koresööt.

⁽³⁾ Välja arvatud kerge kuiv- ja koresööt.

▼ M3**9.5. Proovi pakendamine**

Mahutid ja pakendid peavad olema pitseeritud niimoodi, et ilma pitselit lõhkumata ei oleks võimalik neid avada. Pitsser peab hõlmama kogu märgist.

9.6. Proovide saatmine laboratooriumi

Proov koos analüüsiks vajaliku teabega tuleb viivitamata saata kindlaks-määratud laboratooriumi analüüsimiseks.

10. PROOVIVÕTUAUANNE

Iga proovivõtu kohta tuleb teha aruanne, mis võimaldab iga proovipartiid ja selle suurust üheselt kindlaks teha.

Aruandesse tuleb kanda ka kõik kõrvalekalded käesolevas määruuses sätestatud proovivõtumenetlusest.

Aruanne tuleb teha kättesaadavaks nii ametlikule kontrollilaboratooriumile kui ka söödakäitlejale ja/või söödakäitleja määratud laboratooriumile.

▼ **M3***II LISA***SÖÖDA ANALÜÜSIMEETODITE ÜLDSÄTTED****A. PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE ANALÜÜSIKS****1. Eesmärk**

Allpool kirjeldatud menetlused on ette nähtud kontrollilaboratooriumidesse saadetud proovide ettevalmistamiseks analüüsiks pärast proovi võtmist I lisa sätete kohaselt.

Laboratoorsed proovid tuleb ette valmistada nii, et analüüsimeetodites sätestatud viisil kaalutud kogused oleksid ühtlased ja esindaksid lõppproove.

2. Ettevaatusabinõud

Proovide ettevalmistamine sõltub kasutatavatest analüüsimeetoditest ning koostisosadest ja ainetest, mida on vaja uurida. Seepärast on väga oluline tagada, et proov valmistataks ette vastavalt kasutatavale analüüsimeetodile ning koostisosadele ja ainetele, mida on vaja uurida.

Kõik vajalikud toimingud tuleb teha nii, et vältida proovi saastumist ja selle koostise muutumist.

Jahvatada, segada ja sõeluda tuleb viivitamata, et proovi kokkupuude õhu ja valgusega oleks minimaalne. Kasutada ei tohi veskeid ega jahvatajaid, mis proovi märgatavalt kuumendavad.

Kuumuse suhtes eriti tundlikku sööta soovitatakse jahvatada käsitsi. Samuti tuleb tagada, et seadmed ise ei oleks saastumisallikaks.

Kui proovi ei ole võimalik ette valmistada nii, et selle niiskusesisalduses oluliselt ei muutu, määratakse niiskusesisaldus enne ja pärast ettevalmistamist III lisa A osas sätestatud meetodil.

3. Menetlus**3.1. Üldmenetlus**

Uuritav kogus võetakse lõpp-proovist. Jagamiseks ei soovitata koonusekujulist proovijagajat ega nn jagamisristi, s o neljaks jagamise (kvarteerimise) meetodit, sest sellega võib kaasnedä alamproovide jaotuses suur viga.

3.1.1. Sööt, mida saab kohe jahvatada

— Sõelutud lõpp-proov segatakse ja kogutakse sobivasse puhtasse ja kuiva õhukindlalt suletavasse nõusse. Täielikuks homogeneenimiseks tuleb proovi vahetult enne analüüsikoguse väljakaalumist veel kord segada (uuritav kaalutis).

3.1.2. Sööt, mida saab jahvatada pärast kuivatamist

— Kui analüüsimeetodites ei ole teisiti ette nähtud, tuleb lõpp-proovi kuivatada vastavalt III lisa A osas nimetatud niiskusemääramismetodi punktis 4.3 kirjeldatud eelkuivatamisele niiskusesisalduseni 8–12 %. Jätatakse punktis 3.1.1 kirjeldatud viisil.

▼ **M3**

3.1.3. Vedel või poolvedel sööt

- Lõpp-proov kogutakse sobivasse puhtasse ja kuiva õhukindlalt suletavasse nõusse. Täielikuks homogeneemiseks tuleb proovi vahetult enne analüüsikoguse väljakaalumist põhjalikult segada (uuritav kaalutis).

3.1.4. Muu sööt

- Selliseid lõpp-proove, mida ei saa ette valmistada mõnel eespool nimetatud viisil, tuleb töödelda mis tahes muul viisil, mis tagab, et analüüsiks kaalutud kogused (uuritav kaalutis) on homogeensed ja esindavad lõpp-proove.

3.2. *Erimenetlus uurimiseks vaatluse teel või mikroskoobiga või juhul, kui kogu koondproov on homogeenitud*

- Vaatluse teel (kui ei kasutata mikroskoopi) uuritakse kogu laboratoorset proovi.
- Mikroskoobiga uurimiseks võib laboratoorium vähendada koondproovi või vähendatud proovi. Lõpp-proovid apellatsiooniks ja vajaduse korral võrdluseks võetakse sama menetlusega kui lõpp-proov kontrollimiseks.
- Kui homogeneeritakse kogu koondproov, võetakse lõpp-proovid homogeenitud koondproovist.

4. **Proovide hoidmine**

Proove tuleb hoida temperatuuril, mis ei muuda nende koostist. Vitamiinide või eriti valgustundlike ainete analüüsiks ettenähtud proove tuleb hoida nii, et valgus proove ei kahjustaks.

B. SÄTTED ANALÜÜSIMEETODITES KASUTATAVATE REAKTIIVIDE JA SEADMETE KOHTA

1. Kui analüüsimeetodites ei ole teisiti sätestatud, peavad kõik analüütilised reaktiivid olema analüütilise puhtusega (a.p.). Mikroelementide määramisel tuleb reaktiivide puhtust kontrollida pimekatsega. Sõltuvalt saadud tulemustest võib olla vaja reaktiive täiendavalt puhastada.
2. Iga lahuste valmistamise, lahjendamise, loputamise või pesemise toiming, mida on analüüsimeetodites nimetatud ilma kasutatava lahusti või lahjendi laadile viitamata, eeldab vee kasutamist. Üldjuhul peab vesi olema demineraliseeritud või destilleeritud. Teatavatel juhtudel, millele analüüsimeetodites viidatakse, tuleb veega teha erilised puhastusprotseduurid.
3. Kontrollilaboratooriumides tavaliselt leiduvaid seadmeid silmas pidades viidatakse analüüsimeetodites ainult nendele instrumentidele ja vahenditele, mis on erilised või nõuavad erilist kasutamiskiisi. Seadmed peavad olema puhtad, eriti väga väikeste ainekoguste määramisel.

▼ **M3****C. ANALÜÜSIMETODITE KASUTAMINE JA TULEMUSTE ESITAMINE****1. Ekstraktsioonimenetlus**

Mitmete meetodite puhul on määratud eraldi ekstraktsioonimenetlus. Üldjuhul võib peale meetodis viidatud menetluse teisi ekstraktsioonimenetlusi kasutada juhul, kui on tõendatud, et kasutatav ekstraktsioonimenetlus on põhiline analüüsiks sama tõhus kui meetodis nimetatud menetlus.

2. Puhastusmenetlus

Mitme meetodi puhul on määratud eraldi puhastusmenetlus. Üldjuhul võib peale meetodis viidatud menetluse teisi puhastusmenetlusi kasutada juhul, kui on tõendatud, et kasutatav puhastusmenetlus annab uuritava aine analüüsimisel meetodis nimetatud menetlusega samaväärsed analüüsitulemused.

3. Määramiste arv

Kui soovimatute ainete analüüsimisel on esimese määramise tulemus oluliselt (> 50 %) väiksem kui kontrollitavas tootekirjelduses, ei ole vaja teha enam täiendavaid määramisi, juhul kui kasutatakse asjakohaseid kvaliteedimenetlusi. Muudel juhtudel on vajalik kordusanalüüs (teistkordne määramine), et välistada sisemise ristsaastumise ja juhusliku proovide segunemise võimalust. Mõõtemääramatust arvesse võttes kasutatakse nõuetele vastavuse hindamisel kahe analüüsi keskmist.

Kui aine või koostisosa deklareeritud sisalduse kontrollimisel kinnitab esimese määramise tulemus deklareeritud sisaldust, st analüüsitulemus jääb deklareeritud sisalduse lubatud kõrvalekalde piiresse, ei ole vaja teha enam täiendavaid määramisi, juhul kui kasutatakse asjakohaseid kvaliteedimenetlusi. Muudel juhtudel on vajalik kordusanalüüs (teistkordne määramine), et välistada sisemise ristsaastumise ja juhusliku proovide segunemise võimalust. Mõõtemääramatust arvesse võttes kasutatakse nõuetele vastavuse hindamisel kahe analüüsi keskmist.

Teatavatel juhtudel on lubatud kõrvalekalde vahemik kindlaks määratud õigusaktis, näiteks Euroopa Parlamendi ja nõukogu 13. juuli 2009. aasta määruses (EÜ) nr 767/2009 sööda turuleviimise ja kasutamise kohta, millega muudetakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrust (EÜ) nr 1831/2003 ning tunnistatakse kehtetuks nõukogu direktiivid 79/373/EMÜ, 82/471/EMÜ, 83/228/EMÜ, 93/74/EMÜ, 93/113/EÜ ja 96/25/EÜ, komisjoni direktiiv 80/511/EMÜ ning komisjoni otsus 2004/217/EÜ ⁽¹⁾.

4. Kasutatavast analüüsimeetodist teatamine

Analüüsiaruandes peab olema nimetatud, millist analüüsimeetodit kasutatakse.

5. Aruandlus analüüsitulemuste kohta

Analüüsitulemused esitatakse analüüsimeetodis kehtestatud viisil sobiva arvu tüvenumbritega ja vajaduse korral parandatakse seda vastavalt lõppproovi niiskusesisaldusele enne ettevalmistamist.

⁽¹⁾ ELT L 229, 1.9.2009, lk 1.

▼M3**6. Mõõtemääramatus ja saagis soovimatute ainete analüüsil**

Silmas pidades Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivi 2002/32/EÜ tähenduses soovimatuid aineid, loetakse söödaks ettenähtud tooted kehtestatud piirnormile mittevastavaks, kui niiskusesisaldusele 12 % vastav analüüsitulemus ületab piirmäära, võttes arvesse laiendmääramatust ja saagise parandit. Vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud ja saagise parandiga parandatud sisaldust, millest on lahutatud laiendmääramatus. Seda menetlust võib kasutada vaid juhul, kui analüüsimeetod võimaldab hinnata mõõtemääramatust ja saagise parandit (nt ei ole see võimalik mikroskoopilise analüüsi puhul).

Analüüsitulemus esitatakse järgmiselt (kuivõrd kasutatud analüüsimeetod võimaldab hinnata mõõtemääramatust ja saagist):

- a) saagisega parandatult, saagis peab olema märgitud. Saagise parandit ei ole vaja, kui saagis on 90–110 %;
- b) kujul „ $x \pm U$ ”, kus x on analüüsitulemus ja U on laiendmääramatus, kui kasutatakse kattetegurit 2, millele vastab usaldusväarsuse tase 95 %.

Kui analüüsi tulemus on oluliselt (> 50 %) väiksem kui kontrollitava näitaja väärtus ja kui kasutatakse asjakohaseid kvaliteedimenetlusi ning analüüsi eesmärk on vaid kontrollida vastavust õigusnormidele, ei ole analüüsitulemuses vaja esitada saagise parandit ning saagise ja mõõtemääramatuse võib sel juhul ära jätta.



III LISA

SÖÖDATOORAINE JA SEGAJÕUSÖÖDA KOOSTISE KONTROLLIMISE ANALÜÜSIMETODID

A. NIISKUSESISALDUSE MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata sööda niiskusesisaldust. Lenduvaid aineid, näiteks orgaanilisi happeid sisaldava sööda puhul tuleb jälgida, et koos niiskusesisaldusega määrataks ka oluline osa lenduvatest ainetest.

See ei hõlma piimatoodete kui söödatooraine analüüsi, mineraalainete ja peamiselt mineraalainetest koosnevate segude analüüsi, loomsete ja taimsete rasvade ja õlide analüüsi ega õliseemnete ja õliviljade analüüsi.

2. Põhimõte

Proov kuivatatakse kindlaksmääratud tingimustel, mis varieeruvad sõltuvalt sööda laadist. Massikadu määratakse kaalumise teel. Suure niiskusesisaldusega tahket sööta tuleb eelnevalt kuivatada.

3. Seadmed

3.1. Niiskust mitteneelavast materjalist purusti, mis vastab punktides 4.1.1 ja 4.1.2 sätestatud nõuetele, mida on lihtne puhastada ning millega on võimalik kiiresti ja ühtlaselt purustada nii, et ei tekiks märgatavat kuumenemist ja et proov puutuks võimalikult vähe kokku väliskeskkonnaga (nt vasarpurustaja või vesijahutusega mikropurustaja, kokkupandav koonusveski, aeglustatud liikumisega purustaja või hammasratastega purustaja).

3.2. Analüütilised kaalud täpsusega 1 mg.

3.3. Õhukindlalt suletavad roostevabast metallist või klaasist kuivad anumad põhjaga, millele saab analüüsitava proovi laotada tihedusega 0,3 g/cm².

3.4. Reguleeritava temperatuuriga (± 2 °C) elektriline kuivatuskapp, mis on nõuetekohaselt ventileeritav ja võimaldab temperatuuri kiiresti reguleerida⁽¹⁾.

3.5. Reguleeritava temperatuuriga elektriline vaakumkuivatuskapp, mis on varustatud õlipumbaga ning kuhu saab juhtida kuuma ja kuiva õhku või kuhu pannakse kuivatusainet (nt kaltsiumoksiidi).

3.6. Eksikaator, millel on paks avadega metall- või portselanalus ning mis sisaldab tõhusat kuivatusainet.

4. Töö käik

NB! Käesolevas punktis kirjeldatud toimingud tuleb teha kohe pärast proovi sisaldavate pakendite avamist. Tuleb teha vähemalt kaks analüüsi.

⁽¹⁾ Teravilja, jahu, tangude ja manna kuivatamisel peab kuivatuskapi soojusmahutavus olema selline, et seatuna temperatuurile 131 °C saavutab kuivatuskapp pärast maksimaalse arvu uuritavate proovide üheaegselt kuivatuskappi kuivama panemist selle temperatuuri uuesti vähem kui 45 minuti jooksul. Ventilatsioon peab olema selline, et kui kuivatuskapis on kahe tunni jooksul kuivatatud nii suurel arvul pehme nisu proove, kui kapp neid mahutab, erinevad saadud tulemused neljatunnise kuivatamise tulemustest vähem kui 0,15 %.

▼B4.1. *Ettevalmistus*

4.1.1. Muu sööt kui punktides 4.1.2 ja 4.1.3 nimetatud sööt

Võetakse vähemalt 50 g proovi. Vajaduse korral proov purustatakse või tehakse tükkideks, et vältida niiskusesisalduse kõikumist (vt punkt 6).

4.1.2. Teravili ja tangud

Võetakse vähemalt 50 g proovi. Proov jahvatatakse osakesteks, millest vähemalt 50 % pudeneb läbi sõela, mille avade suurus on 0,5 mm, ja sõelale, mille ümmarguste avade suurus on 1 mm, ei jää rohkem kui 10 %.

4.1.3. Vedel või pastataoline sööt, peamiselt õlidest ja rasvadest koosnev sööt

Võetakse umbes 25 g proovi, kaalutakse see 10 mg täpsusega, lisatakse vajalik kogus 10 mg täpsusega kaalutud veevaba liiva ja segatakse kuni ühtlase toote saamiseni.

4.2. *Kuivatamine*

4.2.1. Muu sööt kui punktides 4.2.2 ja 4.2.3 nimetatud sööt

Kaanega anum (3.3) kaalutakse täpsusega 1 mg. Teadaoleva kaaluga anumasse pannakse umbes 5 g proovi, mis on kaalutud 1 mg täpsusega, ja laotatakse see ühtlaselt laiali. Kaaneta anum pannakse eelnevalt temperatuurini 103 °C kuumutatud kuivatuskappi. Anum asetatakse kuivatuskappi võimalikult kiiresti, et vältida kuivatuskapi jahtumist. Lastakse kuivada neli tundi, mida arvestatakse alates hetkest, mil kuivatuskapi temperatuur on jälle 103 °C. Kaas asetatakse tagasi anumale, anum võetakse kuivatuskapist välja, lastakse 30–45 minutit eksikaatoris (3.6) jahtuda ja kaalutakse 1 mg täpsusega.

Peamiselt õlidest ja rasvadest koosneva sööda puhul kuivatatakse proovi kuivatuskapis temperatuuril 130 °C täiendavalt 30 minutit. Kahe kaalumistulemuse erinevus ei tohi olla suurem kui 0,1 % niiskust.

4.2.2. Teravili, jahu, tangud ja manna

Kaanega anum (3.3) kaalutakse täpsusega 0,5 mg. Teadaoleva kaaluga anumasse pannakse umbes 5 g peenestatud proovi, mis on kaalutud 1 mg täpsusega, ja laotatakse see ühtlaselt laiali. Kaaneta anum pannakse eelnevalt temperatuurini 130 °C kuumutatud kuivatuskappi. Anum asetatakse kuivatuskappi võimalikult kiiresti, et vältida kuivatuskapi jahtumist. Lastakse kuivada kaks tundi, mida arvestatakse alates hetkest, mil kuivatuskapi temperatuur on jälle 130 °C. Kaas asetatakse tagasi anumale, anum võetakse kuivatuskapist välja, lastakse 30–45 minutit eksikaatoris (3.6) jahtuda ja kaalutakse 1 mg täpsusega.

4.2.3. Segajõusööt, mis sisaldab üle 4 % sahharoosi või laktoosi; söödatooraine, nt jaanikaunad, hüdrolüüsitud teraviljasaadused, linnaseseemned, kuivatatud peediliistakud, kalast ja suhkrust valmistatud lahustuvsööt; segajõusööt, mis sisaldab rohkem kui 25 % mineraalsooli, sh kristallisatsioonivesi.

Kaanega anum (3.3) kaalutakse täpsusega 0,5 mg. Teadaoleva kaaluga anumasse pannakse umbes 5 g proovi, mis on kaalutud 1 mg täpsusega, ja laotatakse see ühtlaselt laiali. Kaaneta anum pannakse eelnevalt temperatuurini 80–85 °C kuumutatud vaakumkuivatuskappi (3.5). Anum asetatakse kuivatuskappi võimalikult kiiresti, et vältida kuivatuskapi jahtumist.

Rõhk tõstetakse 100 torrini ja proovil lastakse sellise rõhu all kas kuuma ja kuiva õhu voolus või kuivatusaine juuresolekul (umbes 300 g 20 proovi kohta) umbes neli tundi kuivada. Kui kasutatakse kuivatusainet,

▼B

ühendatakse vaakumpump pärast ettenähtud rõhu saavutamist lahti. Kuivamisega arvestatakse alates hetkest, mil kuivatuskapi temperatuur on jälle 80–85 °C. Ettevaatlikult taastatakse kuivatuskapis atmosfääri-rõhk. Kuivatuskapp avatakse, kaas asetatakse kohe anumale, anum võetakse kapist välja, lastakse jahtuda eksikaatoris (3.6) 30–45 minutit ja kaalutakse 1 mg täpsusega. Kuivatatakse veel 30 minutit vaakumkuivatuskapis temperatuuril 80–85 °C ning kaalutakse uuesti. Kahe kaalumistulemuse erinevus ei tohi olla suurem kui 0,1 % niiskust.

4.3. *Eelkuivatamine*

4.3.1. Muu sööt kui punktis 4.3.2 nimetatud sööt

Tahket sööta, mille purustamist suur niiskusesisaldus raskendab, tuleb järgmisel viisil eelnevalt kuivatada:

50 g *purustamata* proovi (pressitud või aglomereeritud sööda võib vajaduse korral tükkideks teha) kaalutakse 10 mg täpsusega ja pannakse sobivasse anumasse (nt 20 cm × 12 cm alumiiniumplaat, millel on 0,5 cm serv). Lastakse kuivatuskapis temperatuuril 60–70 °C kuivada, kuni niiskusesisaldus on 8–12 %. Anum võetakse kuivatuskapist välja, lastakse laboratooriumis üks tund ilma kaaneta jahtuda ja kaalutakse 10 mg täpsusega. Purustatakse viivitamata punkti 4.1.1 kohaselt ja kuivatatakse punkti 4.2.1 või 4.2.3 kohaselt vastavalt sööda laadile.

4.3.2. *Teravili*

Terasid, mille niiskusesisaldus on üle 17 %, tuleb järgmisel viisil eelnevalt kuivatada:

50 g *jahvatamata* teri kaalutakse 10 mg täpsusega ja pannakse sobivasse anumasse (nt 20 cm × 12 cm alumiiniumplaat, millel on 0,5 cm serv). Lastakse 5–7 minutit kuivatuskapis temperatuuril 130 °C kuivada. Võetakse kuivatuskapist välja, lastakse laboratooriumis kaks tundi ilma kaaneta jahtuda ja kaalutakse 10 mg täpsusega. Jahvatatakse viivitamata punkti 4.1.2 kohaselt ja kuivatatakse punkti 4.2.2 kohaselt.

5. **Tulemuste arvutamine**

Niiskusesisaldus (X) arvutatakse protsendimäärana proovist järgmiste valemite abil.

5.1. *Kuivatamine ilma eelkuivatamiseta*

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

kus:

m = analüüsitava proovi esialgne mass grammides,

m₀ = kuiva analüüsitava proovi mass grammides.

5.2. *Kuivatamine koos eelkuivatamisega*

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

kus:

m = analüüsitava proovi esialgne mass grammides,

m₁ = analüüsitava proovi mass grammides pärast eelkuivatamist,

m₂ = analüüsitava proovi mass grammides pärast purustamist või jahvatamist,

m₀ = kuiva analüüsitava proovi mass grammides.

▼B5.3. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi olla suurem kui 0,2 % niiskuse absoluutväärtusest.

6. **Tähelepanek**

Kui purustamine osutub vajalikuks ja kui sellega muutub toote niiskusesisaldus, tuleb sööda koostisosade analüüside tulemusi korrigeerida esialgsel kujul proovi niiskusesisalduse põhjal.

B. LOOMSETE JA TAIMSETE RASVADE JA ÕLIDE NIISKUSESISALDUSE MÄÄRAMINE

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata loomsete ja taimsete rasvade ja õlide veesisaldust ja lenduvate ainete sisaldust.

2. **Põhimõte**

Proov kuivatatakse temperatuuril 103 °C püsivast (massikadu kahe järjestikuse kaalumise vahel peab olema 1 mg või alla selle). Massikadu määratakse kaalumise teel.

3. **Seadmed**

3.1. Korrosioonikindlast materjalist lamedapõhjaline anum, mille diameeter on 8–9 cm ja kõrgus umbes 3 cm.

3.2. Tugevdatud kolviga termomeeter, mille ülasaosas on paisumistoru, mis on gradueeritud vahemikus umbes 80 °C kuni vähemalt 110 °C ja mis on umbes 10 cm pikkune.

3.3. Liivavann või elektriline kuumutusplaat.

3.4. Tõhusat kuivatusainet sisaldav eksikaator.

3.5. Analüütilised kaalud.

4. **Töö käik**

1 mg täpsusega kaalutud umbes 20 g homogeenitud proovi pannakse kuiva kaalutud anumasse (3.1), milles on termomeeter (3.2). Kuumutatakse liivavannil või kuumutusplaadil (3.3) termomeetriga pidevalt segades, nii et temperatuur tõuseb umbes 7 minutiga 90 °C-ni.

Kuumust vähendatakse, jälgides anuma põhjast kerkivate mullide sagedust. Temperatuur ei tohi tõusta üle 105 °C. Segamist jätkatakse anuma põhja kaapides, kuni mullide tekkimine lõpeb.

Niiskuse täielikuks kõrvaldamiseks kuumutatakse proovi mitu korda temperatuurini 103 ± 2 °C, jahutades kuumutamiste vahel proovi temperatuurini 93 °C. Lastakse jahtuda eksikaatoris (3.4) toatemperatuurini ja kaalutakse. Protseduuri korratakse, kuni massikadu kahel järjestikusel kaalumisel ei ole üle 2 mg.

NB! Proovi massi suurenemine pärast korduvat kuumutamist viitab rasva oksüdeerumisele, sel juhul arvutatakse tulemus enne massi suurenemist tehtud kaalumisel.

5. **Tulemuste arvutamine**

Niiskusesisaldus (X) arvutatakse protsendimäärana proovist järgmise valemi abil:

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

▼B

kus:

m = analüüsitava proovi mass grammides;

m_1 = anuma ja selle sisu mass grammides enne kuumutamist;

m_2 = anuma ja selle sisu mass grammides pärast kuumutamist.

Tulemused, mis on väiksemad kui 0,05 %, tuleb registreerida kujul „alla 0,05 %”.

Korratavus

Sama prooviga tehtud kahel paralleelsel määramisel saadud niiskusesisalduste erinevus ei tohi ületada absoluutväärtuses 0,05 %.

C. TOORVALGUSISALDUSE MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja rakendusala**

See meetod võimaldab määrata toorvalgusisaldust söödas lämmastikusiisalduse alusel, mis määratakse Kjeldahli meetodiga.

2. Põhimõte

Proov lagundatakse väävelhappega katalüsaatori manulusel. Happelahus leelistatakse naatriumhüdroksiidi lahusega. Ammoniaak destilleeritakse ja kogutakse mõõdetud väävelhappekogusesse, mille ülejääk tiitritakse naatriumhüdroksiidi standardlahusega.

Teise võimalusena destilleeritakse vabanenud ammoniaak boorhappe lahuse ülejääki, millele järgneb tiitrimine soolhappe või väävelhappe lahusega.

3. Reaktiivid

3.1. Kaaliumsulfaat.

3.2. Katalüsaator: vask(II)oksiid CuO või vask(II)sulfaatpentahüdraat CuSO₄ 5H₂O.

3.3. Granuleeritud tsink.

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

3.5. Väävelhape, standardne tiitrimislahus, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l.

3.6. Väävelhape, standardne tiitrimislahus, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l.

3.7. Väävelhape, standardne tiitrimislahus, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l.

3.8. Metüülpunane indikaator: 300 mg metüülpunast lahustatakse 100 ml etanoolis, $\sigma = 95\text{--}96$ % (v/v).

3.9. Naatriumhüdroksiidi lahus (võib kasutada tehnilise puhtusega reaktiivi) $\beta = 40$ g / 100 ml (m/v: 40 %).

3.10. Naatriumhüdroksiid, standardne tiitrimislahus, $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l.

3.11. Naatriumhüdroksiid, standardne tiitrimislahus, $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l.

3.12. Soolhappes pestud ja läbikuumutatud pimsskivigraanulid.

3.13. Atsetaniliid (sulamistemperatuur = 114 °C; N = 10,36 %).

3.14. Sahharoos (lämmastikuvaba).

3.15. Boorhape (H₃BO₃).

3.16. Metüülpunase indikaatorlahus: 100 mg metüülpunast lahustatakse 100 ml etanoolis või metanoolis.

▼B

- 3.17. Bromokresoolroheline lahus: 100 mg bromokresoolrohelist lahustatakse 100 ml etanoolis või metanoolis.
- 3.18. Boorhappe lahus (10 g/l kuni 40 g/l olenevalt kasutatavatest vahenditest).

Kui rakendatakse kolorimeetrilist lõpp-punkti leidmist, tuleb metüülpunase ja bromokresoolroheline indikaatorid lisada boorhappe lahustesse. Kui 1 liiter boorhappe lahust on ette valmistatud, tuleb enne vajaliku mahuni korrigeerimist lisada 7 ml metüülpunase indikaatorlahust (3.16) ja 10 ml bromokresoolroheline lahust (3.17).

Olenevalt sellest, millist vett kasutatakse, võib boorhappe lahuse pH-tase olla eri partiides erinev. Sageli on positiivse tulemuse saamiseks vaja korrigeerida väikse leelisekogusega.

MÄRKUS: umbes 3–4 ml NaOH (3.11) lisamine 1 liitrisse 10 g/l boorhappesse annab tavaliselt häid tulemusi. Lahust tuleb hoida toatemperatuuril ja kaitsta valguse ning ammoniaagiurude eest.

- 3.19. Soolhappe, standardne tiitrimislahus $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

MÄRKUS: kasutada võib ka teisi tiitrimislahuste (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11, ja 3.19) kontsentratsioone, kui arvutustes tehakse vastavad parandused. Kontsentratsioonid tuleb alati esitada nelja kümnendkoha täpsusega.

4. Seadmed

Seadmed, mis sobivad Kjeldahli meetodis ettenähtud lagundamise, destilleerimise ja tiitrimise läbiviimiseks.

5. Töö käik

5.1. Lagundamine

1 g proovi kaalutakse 0,001 g täpsusega ja pannakse see mineraliseerimisaparaadi kolbi. Lisatakse 15 g kaaliumsulfaati (3.1), sobiv kogus katalüsaatorit (3.2) (0,3–0,4 g vask(II)oksiidi või 0,9–1,2 g vask(II)sulfaadi pentahüdraati), 25 ml väävelhapet (3.4) ja vajadusel mõned pimsskivigraanulid (3.12) ning segatakse.

Kolbi kuumutatakse esialgu mõõdukalt, aeg-ajalt loksutades, kuni mass on söestunud ja vaht kadunud; seejärel kuumutatakse intensiivsemalt vedeliku püsiva keemiseni. Kuumutamine on küllaldane, kui keevhappe kondenseerub kolvi seinale. Tuleb vältida seinte liigset kuumutamist ja orgaanilise aine kleepumist seintele.

Kui lahus muutub selgeks ja heleroheliseks, jätkatakse keetmist veel kahe tunni jooksul, seejärel jahutatakse.

5.2. Destilleerimine

Lisatakse ettevaatlikult piisav kogus vett, et tagada sulfaatide täielik lahustumine. Lastakse jahtuda ja seejärel lisatakse vajadusel mõned graanulid tsinki (3.3). Edasi toimida vastavalt punktidele 5.2.1 või 5.2.2.

5.2.1. Destilleerimine väävelhappeks

Destilleerimisaparaadi kogumiskolbi pannakse täpselt mõõdetud 25 ml väävelhapet (3.5) või (3.7), sõltuvalt eeldatavast lämmastikusisaldusest. Lisatakse mõni tilk metüülpunast indikaatorit (3.8).

▼B

Mineraliseerimiskolb ühendatakse destilleerimisaparaadi jahutiga ja jahuti ots viiakse kogumiskolvis olevasse vedelikku vähemalt 1 cm sügavusele (vt tähelepanek 8.3). Mineraliseerimiskolbi valatakse aeglaselt 100 ml naatriumhüdroksiidi lahust (3.9), vältides ammoniaagi kadu (vt tähelepanek 8.1). Kolbi kuumutatakse, kuni ammoniaak on üle destilleeritud.

5.2.2. Destilleerimine boorhappeks

Kui destillaadi ammoniaagisisalduse tiitrimine toimub käsitsi, siis rakendatakse allpool nimetatud menetlust. Kui destilleerimisseade on täisautomaatne ning hõlmab ka destillaadi ammoniaagisisalduse tiitrimist, siis järgitakse tootja koostatud destilleerimisseadme kasutusjuhendit.

Kogumiskolb, mis sisaldab 25–30 ml boorhappe lahust (3.18), pannakse jahuti väljalaskeava alla selliselt, et sissevoolutoru jääb allapoole boorhappe lahuse ülejäägi pinda. Destilleerimisseade korrigeeritakse 50 ml naatriumhüdroksiidi lahuse (3.9) väljastamiseks. Destilleerimisseadet kasutatakse vastavalt tootja kasutusjuhendile ja destilleeritakse naatriumhüdroksiidi lahuse lisamisega vabanenud ammoniaak välja. Destillaat kogutakse boorhappe vastuvõtulahusesse. Destillaadi kogus (veeaurdestillatsiooni aeg) sõltub proovis sisalduva lämmastiku hulgest. Järgitakse tootja kasutusjuhendit.

MÄRKUS: poolautomaatses destilleerimisseadmes toimuvad naatriumhüdroksiidi ülejäägi lisamine ja veeaurdestillatsioon automaatselt.

5.3. Tiitrimine

Toimida vastavalt punktile 5.3.1 või 5.3.2.

5.3.1. Väävelhape

Väävelhappe ülejääk tiitritakse kogumiskolvis naatriumhüdroksiidi lahusega (3.10 või 3.11), sõltuvalt kasutatud väävelhappe kontsentratsioonist, kuni on saavutatud tiitrimise lõpp-punkt.

5.3.2. Boorhape

Kogumiskolvi sisu tiitritakse soolhappe standardse tiitrimislahusega (3.19) või väävelhappe standardse tiitrimislahusega (3.6), kasutades büretti, ning loetakse kokku kasutatud titrandi kogus.

Kui rakendatakse kolorimeetrilist lõpp-punkti leidmist, on lõpp-punkt saavutatud, kui ainesse ilmuvad esimesed roosa värvi jäljed. Büreti näitu hinnatakse 0,05 ml täpsusega. Lõpp-punkti nähtavust võib parandada valgustatud magnetseguri plaadi või valgusmõõuri abil.

Seda võib teha automaatselt, kasutades automaatselt tiitrivat veeaurdestillaatorit.

Eri destillaatori või destillaatori/titraatori kasutamisel järgitakse tootja kasutusjuhendeid.

MÄRKUS: kui kasutatakse automaatset tiitrimissüsteemi, algab tiitrimine vahetult pärast destilleerimise algust ja kasutatakse 1 % boorhappe lahust (3.18).

▼ B

Kui kasutatakse täisautomaatset destilleerimisseadet, võib ammoniaagi automaatset tiitrimist läbi viia ka lõpp-punkti määramisega, kasutades potentsiomeetrilist pH-süsteemi.

Sel juhul kasutatakse pH mõõtjaga automaatset titraatorit. PH-meeter tuleb korralikult kalibreerida vahemikus pH 4 kuni pH 7, järgides tavapäraselt laboratoorset pH kalibreerimise menetlust.

Tiitrimise pH lõpp-punkt saavutatakse pH 4,6 juures, mis on titreerimiskõvera kõige järsem punkt (murdepunkt).

5.4. *Pimekatse*

Et kontrollida, kas reaktiivid on lämmastikuvabad, viiakse läbi pimekatse (lagundamine, destilleerimine ja tiitrimine), kasutades proovi asemel 1 g sahharoosi (3.14).

6. **Tulemuste arvutamine**

Arvutused tehakse vastavalt punktidele 6.1 või 6.2.

6.1. *Tiitrimise arvutamine vastavalt punktidele 5.3.1*

Toorvalgu sisaldus, väljendatuna protsendina massist, arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

V_0 = pimekatses kasutatud NaOH (3.10 või 3.11) maht (ml),
 V_1 = proovi tiitrimisel kasutatud NaOH (3.10 või 3.11) maht (ml),
 c = naatriumhüdroksiidi (3.10 või 3.11) kontsentratsioon (mol/l),
 m = proovi mass (g).

6.2. *Tiitrimise arvutamine vastavalt punktidele 5.3.2*6.2.1. *Tiitrimine soolhappega*

Toorvalgu sisaldus, väljendatuna protsendina massist, arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

m = kaalutise mass grammides,
 c = soolhappe (3.19) standardse tiitrimislahuse kontsentratsioon (mol/l),
 V_0 = pimekatses kasutatud soolhappe maht (ml),
 V_1 = kaalutises kasutatud soolhappe maht (ml).

6.2.2. *Tiitrimine väävelhappega*

Toorvalgu sisaldus, väljendatuna protsendina massist, arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

▼B

kus:

m = kaalutise mass grammides,

c = väävelhappe (3.6) standardse tiitrimislahuse kontsentratsioon (mol/l),

V_0 = pimekatses kasutatud väävelhappe (3.6) maht (ml),

V_1 = kaalutises kasutatud väävelhappe (3.6) maht (ml).

7. Meetodi kontrollimine

7.1. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— absoluutväärtusena väljendatult 0,2 %, kui toorvalgusisaldus on väiksem kui 20 %;

— 1,0 % suuremast väärtusest, kui toorvalgusisaldus on 20–40 %;

— absoluutväärtusena väljendatult 0,4 %, kui toorvalgusisaldus on suurem kui 40 %.

7.2. *Täpsus*

Analüüs (lagundamine, destilleerimine ja tiitrimine) viiakse läbi 1,5–2,0 g atsetaniliidiga (3.13) 1 g sahharoosi (3.14) manulusel; 1 g atsetaniliidi tarbib 14,80 ml väävelhapet (3.5). Saagis peab olema vähemalt 99 %.

8. Tähelepanekud

8.1. Seade võib olla manuaalset, poolautomaatset või automaatset tüüpi. Kui seade nõuab proovi ülekandmist lagundamise ja destilleerimise vahel, tuleb see ülekandmine teostada ilma kadudeta. Kui destillatsioonipaaraadi kolb ei ole varustatud tilklehtriga, lisatakse naatriumhüdroksiid vahetult enne kolvi ühendamist jahutiga, valades vedelikku aeglaselt mööda kolvi külge.

8.2. Kui proov lagundamisel tahkestub, alustatakse määramist uuesti, kasutades eespool näidatust suuremat kogust väävelhapet (3.4).

8.3. Väikese lämmastiksisaldusega toodete puhul võib kogumiskolbi viidava väävelhappe (3.7) mahtu vajadusel vähendada 10–15 ml-ni ja täiendada veega 25 ml-ni.

8.4. Tavapäraste analüüsise käigus võib toorvalgu määramiseks kasutada alternatiivseid analüüsimeetodeid, kuid standardmeetodiks on käesoleva lisa C osas kirjeldatud Kjeldahli meetod. Alternatiivmeetodi (nt DUMAS) abil saadud tulemuste samaväärsust standardmeetodiga võrreldes tuleb tõestada iga põhiaine kohta eraldi. Et alternatiivmeetodiga saadud tulemused võivad isegi pärast samaväärsuse kontrolli veidi erineda standardmeetodiga saadud tulemustest, tuleb analüüsiaruandes märkida, millist analüüsimeetodit on toorvalgu määramiseks kasutatud.

D. KARBAMIIDI MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata karbamiidi taset söödas.

▼ B**2. Põhimõte**

Proov suspendeeritakse vees selitava ainega. Suspensioon filtreeritakse. Filtraadi karbamiidisisaldus määratakse pärast 4-dimetüülaminobensaldehüüdi (4-DMAB) lisamist optilise tiheduse mõõtmise teel lainepikkusel 420 nm.

3. Reaktiivid

- 3.1. 4-dimetüülaminobensaldehüüdi lahus: 1,6 g 4-dimetüülaminobensaldehüüdi lahustatakse 100 ml 96 % etanoolis ja lisatakse 10 ml soolhapet ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). See reaktiiv säilib maksimaalselt kaks nädalat.
- 3.2. Carrezi lahus I: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ja 3 g jää-äädikat. Täidetakse veega 100 milliliitri.
- 3.3. Carrezi lahus II: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumferrotsüaniidi $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Täidetakse veega 100 milliliitri.
- 3.4. Karbamiidi mitte absorbeeriv aktiivsüsi (kontrollida).
- 3.5. Karbamiidi 0,1 % lahus (w/v).

4. Seadmed

- 4.1. Segisti (trummel): umbes 35–40 p/min.
- 4.2. Lihvkorgiga katseklaasid: 160 × 16 mm.
- 4.3. Spektrofotomeeter.

5. Töö käik**5.1. Proovi analüüs**

1 mg täpsusega kaalutud 2 g proovi pannakse 1 g aktiivsõega (3.4) 500 ml mõõtekolbi. Lisatakse 400 ml vett ja 5 ml Carrezi lahust I (3.2), segatakse umbes 30 sekundit ja lisatakse 5 ml Carrezi lahust II (3.3). Segatakse trumlis 30 minutit. Täidetakse veega kuni märgini, loksutatakse ja filtreeritakse.

Eemaldatakse 5 ml läbipaistvat värvitut filtraati, pannakse see lihvkorgiga katseklaasidesse, lisatakse 5 ml 4-DMAB lahust (3.1) ja segatakse. Katseklaasid asetatakse 20 °C (+/- 4 °C) veetemperatuuriga veevanni. Viieteistkümneminuti pärast mõõdetakse proovilahuse optiline tihedus spektrofotomeetriga lainepikkusel 420 nm. Võrreldakse reaktiivide kontroll-lahustega.

5.2. Kalibreerimiskõver

Võetakse 1, 2, 4, 5 ja 10 ml kogused karbamiidilahust (3.5), pannakse 100 ml mõõtekolbidesse ja täidetakse veega kuni märgini. Igast lahusest võetakse ära 5 ml, lisatakse 5 ml 4-DMAB lahust (3.1), homogeneeritakse ja mõõdetakse eespool kirjeldatud viisil optiline tihedus võrrelduna kontroll-lahusega, mis sisaldab 5 ml 4-DMAB lahust ja 5 ml karbamiidivaba vett. Koostatakse kalibreerimiskõver.

6. Tulemuste arvutamine

Proovis sisalduv karbamiidikogus määratakse kalibreerimiskõvera abil.

Tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. Tähelepanekud

- 7.1. Üle 3 % karbamiidisisalduse puhul vähendatakse proovi 1 grammini või lahjendatakse esialgset lahust, nii et 500 ml-s ei oleks karbamiidi üle 50 mg.

▼B

- 7.2. Väikese karbamiidisisalduse puhul võetakse suurem proov, tingimusel et filtraat jääb läbipaistvaks ja värvituks.
- 7.3. Kui proov sisaldab lihtsaid lämmastikuühendeid, nagu näiteks aminohappeid, tuleb optilist tihedust mõõta lainepikkusel 435 nm.

E. LENDUVATE LÄMMASTIKALUSTE MÄÄRAMINE**I. MIKRODIFUSIOON****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata ammoniaagina väljendatud lenduvate lämmastikaluste sisaldust söödas.

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse veega ning lahus selitatakse ja filtreeritakse. Lenduvad lämmastikalused vabastatakse kaaliumkarbonaadi lahust kasutades mikrodifusiooni abil, kogutakse boorhappe lahusesse ja tiitritakse väävelhappega.

3. Reaktiivid

- 3.1. Trikloroäädikhappe 20 % lahus (w/v).
- 3.2. Indikaator: 33 mg bromokresoolrohelist ja 65 mg metüülpunast lahustatakse 100 ml 95–96 % etanoolis (v/v).
- 3.3. Boorhappe lahus: üheliitrisel mõõtekolvis lahustatakse 200 ml 95–96 % etanoolis (v/v) ja 700 ml vees 10 g boorhapet. Lisatakse 10 ml indikaatorit (3.2). Segatakse ja vajaduse korral muudetakse lahuse värv helepunaseks, lisades naatriumhüdrosiidi lahust. 1 ml lahust seob kuni 300 µg NH₃.
- 3.4. Kaaliumkarbonaadi küllastunud lahus: 100 g kaaliumkarbonaati lahustatakse 100 ml keevas vees. Lastakse jahtuda, filtreeritakse.
- 3.5. Väävelhape, 0,01 mol/l

4. Seadmed

- 4.1. Segisti (trummel): umbes 35–40 p/min.
- 4.2. Klaasist või plastist Conway anumad (vt joonis).
- 4.3. 1/100 ml gradeeritud mikrobüretid.

5. Töö käik

10 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ja pannakse koos 100 ml veega 200 ml mõõtekolbi. Segatakse trumlis 30 minutit. Lisatakse 50 ml trikloroäädikhappe lahust (3.1), täidetakse kuni märgini veega, loksutatakse tugevalt ja filtreeritakse läbi kurdfiltrit.

Pipetti kasutades viiakse 1 ml boorhappe lahust (3.3) Conway anuma keskmisse ossa ja 1 ml filtraati anuma välimisse ossa. Kaetakse osaliselt rasvatatud kaanega. Välimisse osasse tilgutatakse kiiresti 1 ml kaaliumkarbonaadi küllastunud lahust (3.4) ja kaas suletakse õhukindlalt. Anumat pööratakse hoolikalt horisontaalsandis nii, et kaks reaktiivi segunevad. Lastakse haududa kas vähemalt neli tundi toatemperatuuril või üks tund temperatuuril 40 °C.

Mikrobüretti (4.3) kasutades tiitritakse lenduvad lämmastikalused boorhappe lahuses väävelhappe (3.5) abil.

Sama menetluse abil tehakse pimekatse, kuid ilma analüüsitava proovita.

▼B

6. Tulemuste arvutamine

1 ml H_2SO_4 0,01 mol/l vastab 0,34 mg ammoniaagile.

Tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

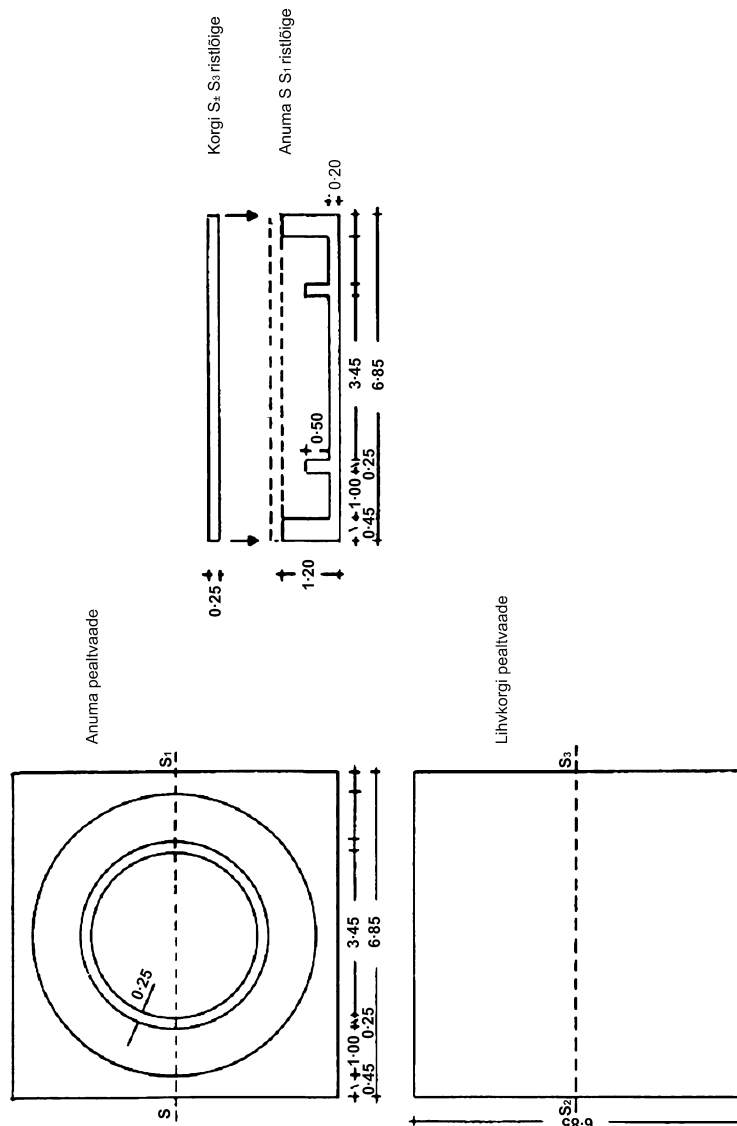
- suhtelise väärtusena väljendatult 10 % ammoniaagisisalduse puhul, mis on väiksem kui 1,0 %;
- absoluutväärtusena väljendatult 0,1 % ammoniaagisisalduse puhul, mis on vähemalt 1,0 %.

7. Tähelepanek

Kui proovi ammoniaagisisaldus on suurem kui 0,6 %, lahjendatakse esialgset lahust.

CONWAY CELL

Scale 1/1



▼ B**II. DESTILLEERIMINE****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata ammoniaagina väljendatud lenduvate lämmastikaluste sisaldust peaaegu karbamiidivabas kalajahus. Meetodit kohaldatakse üksnes juhul, kui ammoniaagisisaldus on väiksem kui 0,25 %.

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse veega ning lahus selitatakse ja filtreeritakse. Lenduvad lämmastikalused vabastatakse keemistemperatuuril magneesiumoksiidi lisamise teel ja kogutakse teatava koguse väävelhappega, mille ülejääk tiitritakse naatriumhüdroksiidi lahuse abil tagasi.

3. Reaktiivid

- 3.1. Trikloroäädikhappe 20 % lahus (w/v)
- 3.2. Magneesiumoksiid
- 3.3. Vahutamisvastane emulsioon (nt silikoon)
- 3.4. Väävelhape, 0,05 mol/l
- 3.5. Naatriumhüdroksiidi lahus, 0,1 mol/l
- 3.6. Metüülpunase 0,3 % lahus 95–96 % etanoolis (v/v)

4. Seadmed

- 4.1. Segisti (trummel): umbes 35–40 p/min
- 4.2. Kjeldahli destilleerimisaparaat

5. Töö käik

10 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ja pannakse koos 100 ml veega 200 ml mõõtekolbi. Segatakse trumlis 30 minutit. Lisatakse 50 ml trikloroäädikhappe lahust (3.1), täidetakse kuni märgini veega, loksutatakse tugevalt ja filtreeritakse läbi kurdfiltrit.

Vastavalt lenduvate lämmastikaluste eeldatavale sisaldusele võetakse vajalik kogus selget filtraati (tavaliselt 100 ml). Lahjendatakse 200 milliliitriini ning lisatakse 2 g magneesiumoksiidi (3.2) ja mõned tilgad vahutamisvastast emulsiooni (3.3). Lahus peaks olema lakmuspaberi abil määratuna aluseline, vastasel korral lisatakse veidi magneesiumoksiidi (3.2). Edasi toimitakse vastavalt toorvalgu sisalduse määramise analüüsi meetodi punktidele 5.2 ja 5.3 (käesoleva lisa C osa).

Sama menetluse abil tehakse *pimekatse*, kuid ilma analüüsitava proovita.

6. Tulemuste arvutamine

1 ml H₂SO₄ 0,05 mol/l vastab 1,7 mg ammoniaagile.

Tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi olla suurem kui 10 % ammoniaagi massist suhtelise väärtusena väljendatult.

F. AMINOHAPETE (VÄLJA ARVATUD TRIPTOFAANI) MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja rakendusala**

See meetod võimaldab aminohappeanalüsaatoriga määrata söödas vabu aminohappeid (sünteesilisi ja looduslikke) ning üldaminohappeid (peptiid-sidemetega ja vabu). Meetodit saab kasutada järgmiste aminohapete puhul:

▼ B

tsüst(e)iin, metioniin, lüsiin, treoniin,alaniin, arginiin, asparagiinhape, glutamiinhape, glütsiin, histidiin, isoleutsiin, leutsiin, fenüülalaniin, proliin, seriin, türosiin ja valiin.

Meetod ei erista aminohapete sooli ega aminohapete D- ja L-vorme. See ei sobi trüptofaani ega aminohapete hüdroksüanaloogide määramiseks.

2. Põhimõte**2.1. Vabad aminohapped**

Vabad aminohapped ekstraheeritakse lahjendatud soolhappega. Kaasa ekstraheerunud lämmastikku sisaldavad makromolekulid sadestatakse sulfosalitsüülhappega ning eemaldatakse filtreerides. Filtreeritud lahuse pH korrigeeritakse 2,20-le. Aminohapped eraldatakseioonvahetuskromatograafia teel ning määratakse fotomeetrilise määramise teel reaktsioonis ninhüdriniga lainepikkusel 570 nm.

2.2. Üldaminohapped

Valitav protseduur sõltub uuritavatest aminohapetest. Tsüst(e)iin ja metioniin tuleb enne hüdrolyüsi oksüdeerida vastavalt tsüsteinhappeks ja metioniinsulfooniks. Türosiin tuleb määrata oksüdeerimata proovide hüdrolyüsates. Kõiki teisi punktis 1 osutatud aminohappeid saab määrata kas oksüdeeritud või oksüdeerimata proovides.

Oksüdeerimine viiakse läbi persipelghappe ja fenooli seguga 0 °C juures. Ülemäärane oksüdatsioonireaktiiv lagundatakse naatriumdisulfitiga. Oksüdeeritud või oksüdeerimata proovi hüdrolyüsatakse soolhappega (3,20) 23 tundi. Hüdrolyüsadi pH korrigeeritakse 2,20-le. Aminohapped eraldatakseioonvahetuskromatograafia teel ning määratakse fotomeetrilisel reaktsioonis ninhüdriniga lainepikkusel 570 nm (proliini puhul 440 nm).

3. Reaktiivid

Tuleb kasutada bidestillereitud või samaväärse kvaliteediga vett (juhtivus < 10 µS).

3.1. Vesinikperoksiid, w (w/w) = 30 %

3.2. Äädikhape, w (w/w) = 98–100 %

3.3. Fenool

3.4. Naatriumdisulfit

3.5. Naatriumhüdroksiid

3.6. 5-sulfosalitsüülhappe dihüdraat

3.7. Soolhape (tihedus umbes 1,18 g/ml)

3.8. Trinaatriumsitraadi dihüdraat

3.9. 2,2'-tiodietanool (tiodiglükool)

3.10. Naatriumkloriid

3.11. Ninhüdrin

3.12. Petrooleeter, keemivahemik 40–60 °C

3.13. Norleutsiin või muu sisestandardina kasutamiseks sobiv ühend

▼B

- 3.14. Gaasiline lämmastik (< 10 ppm hapnikku)
- 3.15. 1-oktanool
- 3.16. Aminohapped:
- 3.16.1. Punktis 1 loetletud standardained. Kristallisatsioonivett mitte sisaldavad puhtad ühendid. Kuivatakse vaakumis P₂O₅ või H₂SO₄ kohal ühe nädala jooksul enne kasutamist.
- 3.16.2. Tsüsteiinhape
- 3.16.3. Metioniinsulfoon
- 3.17. Naatriumhüdroksiidi lahus, c = 7,5 mol/l:
300 g NaOH (3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.18. Naatriumhüdroksiidi lahus, c = 1 mol/l:
40 g NaOH (3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.19. Sipelghappe-fenoolilahus:
889 g sipelghapet (3.2) segatakse 111 g veega ja lisatakse 4,73 g fenooli (3.3).
- 3.20. Hüdrolüüsisegu, c = 6 mol HCl/l, mis sisaldab 1 g fenooli/l:
1 g fenooli (3.3) lisatakse 492 milliliitrile HCl-le (3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.21. Ekstraheerimissegu, c = 0,1 mol HCl/l, mis sisaldab 2 % tiodiglükooli. Võetakse 8,2 ml HCl (3.,7), lahjendatakse umbes 900 ml veega, lisatakse 20 ml tiodiglükooli (3.9) ja täidetakse veega 1 liitrini (3.7 ja 3.9 mitte segada otse omavahel).
- 3.22. 5-sulfosalitsüülhape, β = 6 %:
60 g 5-sulfosalitsüülhapet (3.6) lahustatakse vees ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.23. Oksüdatsioonisegu (persipelghape – fenool):
0,5 ml vesinikperoksiidi (3.1) segatakse 4,5 ml sipelghappe ja fenooli lahusega (3.19) väikses keeduklaasis. Inkubeeritakse 20–30 °C juures ühe tunni jooksul, et moodustuks persipelghape, seejärel jahutatakse jääveevanni kohal (15 min) enne proovile lisamist.
Ettevaatust: vältida kokkupuudet nahaga ja kanda kaitserõivaid.
- 3.24. Tsitraatpuhver, c = 0,2 mol Na⁺/l, pH 2,20:
19,61 g naatriumtsitraati (3.8), 5 ml tiodiglükooli (3.9), 1 g fenooli (3.3) ja 16,50 ml HCl (3.7) lahustatakse umbes 800 ml vees. pH korrigeeritakse 2,20-le. Täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.25. Elutsioonipuhvrid, mis on valmistatud vastavalt kasutatud analüsaatori tingimustele (4.9).
- 3.26. Ninhüdrüüni reaktiiv, mis on valmistatud vastavalt kasutatud analüsaatori tingimustele (4.9).
- 3.27. Aminohapete standardlahused. Neid lahuseid tuleks hoida temperatuuril alla 5 °C.

▼B

3.27.1. Aminohapete põhistandardlahus (3.16.1).

$c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ iga lahuse kohta soolhappes.

On võimalik osta.

3.27.2. Tsüsteiinohappe ja metioniinsulfooni põhistandardlahus, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$.

0,2115 g tsüsteiinohapet (3.16.2) ja 0,2265 g metioniinsulfooni (3.16.3) lahustatakse tsitraatpuhvris (3.24) üheliitrises mõõtekolbis ning täidetakse kolb tsitraatpuhvriga märgini. Säilitatakse temperatuuril alla 5°C mitte üle 12 kuu. Seda lahust ei kasutata, kui põhistandardlahus (3.27.1) sisaldab tsüsteiinohapet ja metioniinsulfooni.

3.27.3. Sisestandardi põhistandardlahus, nt norleutsiin, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

0,6560 g norleutsiini (3.13) lahustatakse tsitraatpuhvris (3.24) mõõtekolbis ning kolb täidetakse tsitraatpuhvriga 250 ml-ni. Säilitatakse temperatuuril alla 5°C mitte üle kuue kuu.

3.27.4. Standardaminohapete kalibreerimislahus, mis on mõeldud kasutamiseks hüdrolüsaatidega, tsüsteiinohappe ja metioniinsulfooni $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ ja teiste aminohapete $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$. 2,2 g naatriumkloriidi (3.10) lahustatakse 100 ml keeduklaasis 30 ml tsitraatpuhvriga (3.24). Lisatakse 4,00 ml aminohapete põhistandardlahust (3.27.1), 4,00 ml tsüsteiinohappe ja metioniinsulfooni põhistandardlahust (3.27.2) ja 0,50 ml sisestandardi põhistandardlahust (3.27.3), kui seda kasutatakse. Naatriumhüdrokksiidi (3.18) abil korrigeeritakse pH 2,20-le.

Kallatakse kvantitatiivselt 50 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse tsitraatpuhvriga (3.24) kuni märgini ja segatakse.

Säilitatakse temperatuuril alla 5°C mitte üle 3 kuu.

Vaata ka punkti 9.1 tähelepanekut.

3.27.5. Standardaminohapete kalibreerimislahus, mis on mõeldud kasutamiseks vastavalt punktile 5.3.3.1 valmistatud hüdrolüsaatidega ja ekstraktidega (5.2). Kalibreerimislahus valmistatakse vastavalt punktile 3.27.4, jättes välja naatriumkloriidi.

Säilitatakse temperatuuril alla 5°C mitte üle 3 kuu.

4. Seadmed

- 4.1. 100 või 250 ml ümarapõhjaline püstjahutiga varustatud kolb
- 4.2. 100 ml boorsilikaatklaasist pudel kummist/teflonist tihendiga keermestatud korgiga (nt Duran, Schott) kuivatuskapis kasutamiseks
- 4.3. Sundventilatsiooniga ja termoregulaatoriga kuivatuskapp, mille täpsus on parem kui $\pm 2^\circ\text{C}$
- 4.4. pH-meeter (kolme kümnendkoha täpsusega)
- 4.5. Membraanfilter (0,22 μm)
- 4.6. Tsentrifuug
- 4.7. Vaakumpöördaurusti
- 4.8. Mehaaniline loksuti või magnetsegur

▼B

- 4.9. Aminohappe analüsaator või HPLC-seadeioonvahetuskoloni, ninhüdrini kolonnijärgse derivatiseerimise seadme ja valgusmõõturiga.

Kolonn täidetakse sulfoneeritud polüstireenivaikudega, mis on võimelised eraldama aminohappeid üksteisest ja teistest ninhüdrinipositiivsetest materjalidest. Puhvri ja ninhüdrini jadas tekitatakse vool pumpadega, mille vooluühitus on $\pm 0,5$ % nii standardkalibreerimise kui proovi analüüsi ajal.

Mõnede aminohapete analüsaatoritega võib kasutada hüdrolüüsimenetlust, mille puhul on hüdrolüsaadi naatriumikontsentratsioon $c = 0,8$ mol/l ja mis sisaldab oksüdatsioonietapi kõiki sipelghappe jääke. Teised analüsaatorid ei võimalda teatavaid aminohappeid rahuldaval määral eraldada, kui hüdrolüsaat sisaldab liigselt sipelghapet ja/või kui naatriumioonide kontsentratsioon on kõrge. Sellisel juhul vähendatakse pärast hüdrolüüsi ja enne pH korrigeerimist happe mahtu aurustamisega kuni umbes 5 milliliitrit. Aurustamine peab toimuma vaakumingimustes temperatuuril kuni 40 °C.

5. **Töö käik**

5.1. *Proovi ettevalmistamine*

Proov jahvatatakse nii peeneks, et see läheks läbi 0,5-millimeetrise avadega sõela. Suure niiskusesisaldusega proovid tuleks enne jahvatamist kas kuivatada õhu käes temperatuuril kuni 50 °C või külmuivatada. Suure rasvasisaldusega proove tuleb enne jahvatamist ekstraheerida petrooleetriga (3.12).

5.2. *Vabade aminohapete määramine söödas ja eelsegudes*

Ettevalmistatud proovi (5.1) sobiv kogus (1–5 g) kaalutakse 0,2 mg täpsusega koonilisse kolbi ja lisatakse 100,0 ml ekstraheerimisegu (3.21). Segu raputatakse 60 min, kasutades mehaanilist loksutit või magnetsegurit (4.8). Settel lastakse settida ja 10,0 ml supernatanti viiakse pipetiga üle 100 ml keeduklaasi.

Lisatakse loksutades 5,0 ml sulfosalitsüülhappe lahust (3.22) ning jätkatakse loksutamist 5 min vältel, kasutades magnetsegurit. Supernatant filtreeritakse või tsentrifuugitakse sademe eemaldamiseks. 10,0 ml saadud lahust pannakse 100 ml keeduklaasi ja korrigeeritakse pH-taset 2,20-ni, kasutades naatriumhüdroksiidi lahust (3.18), sobiv kogus valatakse tsitraatpuhvri (3.24) abil mõõtekolbi ja kolb täidetakse puhverlahusega (3.24) kuni märgini.

Kui kasutatakse sisestandardit, lisatakse 1,00 ml sisestandardit (3.27.3) igasse 100 ml valmis lahusesse ja täidetakse puhverlahusega (3.24) kuni märgini.

Jätkatakse kromatograafiaga vastavalt punktidele 5.4.

Kui ekstrakte ei analüüsita samal päeval, tuleb neid säilitada temperatuuril alla 5 °C.

5.3. *Üldaminohapete määramine*

5.3.1. *Oksüdeerimine*

0,2 mg täpsusega kaalutakse 0,1–1 g ettevalmistatud proovi (5.1):

— 100 ml ümarapõhjalisse kolbi (4.1) lahtise hüdrolüüsi (5.3.2.3) puhul või

▼B

- 250 ml ümarapõhjalisse kolbi (4.1), kui on nõutav madal naatriumikontsentratsioon (5.3.3.1), või
- 100 ml keermestatud korgiga pudelisse (4.2) (suletud hüdrolüüsi 5.3.2.4 puhul).

Kaalutud proovi lämmastikisisaldus peab olema umbes 10 mg ja niiskusesisaldus kuni 100 mg.

Kolb/pudel asetatakse jääveevanni ja jahutatakse kuni temperatuurini 0 °C, lisatakse 5 ml oksüdatsiooniegu (3.23) ning segatakse painutatud otsaga klaasspaatli abil. Spaatlit sisaldav kolb/pudel pitseeritakse õhukindla kilega, pitseeritud nõud sisaldav jääveevann asetatakse 16 tunniks külmikusse temperatuuril 0 °C. 16 tunni möödudes võetakse see külmikust välja ja ülemäärane oksüdatsioonireaktiiv lagundatakse, lisades 0,84 g naatriumdisulfitit (3.4).

Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.2.1.

5.3.2. Hüdrolüüs

5.3.2.1. Oksüdeeritud proovide hüdrolüüs

Vastavalt punktile 5.3.1 valmistatud oksüdeeritud proovile lisatakse 25 ml hüdrolüüsisegu (3.20), pestes hoolikalt maha anuma ja spaatli külge kleepunud proovijäägid.

Olenevalt sellest, millist hüdrolüüsimenetlust kasutatakse, jätkatakse vastavalt punktile 5.3.2.3 või 5.3.2.4.

5.3.2.2. Oksüdeerimata proovide hüdrolüüs

100 ml või 250 ml ümarapõhjalisse kolbi (4.1) või 100 ml keermestatud korgiga pudelisse (4.2) kaalutakse 0,2 mg täpsusega 0,1–1 g ettevalmistatud proovi (5.1). Kaalutud proovipartii lämmastikisisaldus peab olema umbes 10 mg. Lisatakse hoolikalt 25 ml hüdrolüüsisegu (3.20) ja segatakse prooviga. Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.2.3 või 5.3.2.4.

5.3.2.3. Lahtine hüdrolüüs

Kolbis olevale segule (mis on valmistatud vastavalt punktile 5.3.2.1 või 5.3.2.2) lisatakse 3 klaashelme ja keedetakse püstjahutiga kolvis 23 tundi pideval mullidega keemisel. Pärast hüdrolüüsi teostamist pestakse jahuti maha 5 ml tsitraatpuhvriga (3.24). Kolb võetakse lahti ja jahutatakse jäävannis.

Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.3.

5.3.2.4. Kinnine hüdrolüüs

Vastavalt punktile 5.3.2.1 või 5.3.2.2 valmistatud segu sisaldav pudel asetatakse kuivatuskappi (4.3) temperatuuril 110 °C. Et vältida rõhu suurenemist (gaasiliste ainete tekkimise tõttu) ja ära hoida plahvatust, asetatakse esimeseks tunniks surveanuma peale keermestatud kork. Surveanumat ei tohi korgiga sulgeda. Ühe tunni möödudes suletakse surveanum korgiga ja jäetakse 23 tunniks kuivatuskappi (4.3). Pärast hüdrolüüsi lõpuleviimist võetakse pudel kuivatuskapist välja, avatakse ettevaatlikult pudelikork ja asetatakse pudel jääveevanni. Jahutatakse.

Olenevalt sellest, millist pH korrigeerimise menetlust (5.3.3) kasutatakse, valatakse pudeli sisu kvantitatiivselt 250 ml keeduklaasi või 250 ml ümarapõhjalisse kolbi, kasutades tsitraatpuhvrit (3.24).

Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.3.

▼B

5.3.3. pH korrigeerimine

Olenevalt aminohappe analüsaatori (4.9) naatriumitaluvusest toimitakse pH korrigeerimisel vastavalt punktile 5.3.3.1 või 5.3.3.2.

5.3.3.1. *Kromatograafilised süsteemid (4.9), mille puhul on nõutav väike naatriumisisaldus*

Soovitav on kasutada sisestandardi põhistandardlahust (3.27.3), juhul kui kasutatakse aminohappe analüsaatorit, mille puhul on nõutav väike naatriumisisaldus (kui happe kogust tuleb vähendada).

Sellisel juhul lisatakse enne aurustamist hüdrolüsaadile 2,00 ml sisestandardi põhistandardlahust (3.27.3).

Vastavalt punktile 5.3.2.3 või 5.3.2.4 saadud hüdrolüsaadile lisatakse 2 tilka 1-oktaanooli (3.15).

Hüdrolüsaadi kogust vähendatakse vaakumpöördaurusti (4.7) abil 5–10 milliliitriini vaakumitingimustes temperatuuril 40 °C. Kui kogust vähendatakse kogemata vähem kui 5 milliliitriini, tuleb hüdrolüsaat välja praeida ja analüüsi tuleb uuesti alustada.

pH-taset korrigeeritakse 2,20-ni naatriumhüdroksiidi lahusega (3.18) ja jätkatakse vastavalt punktile 5.3.4.

5.3.3.2. *Kõik teised aminohappe analüsaatorid (4.9)*

Vastavalt punktile 5.3.2.3 või 5.3.2.4 saadud hüdrolüsaadid neutraliseeritakse osaliselt, lisades hoolikalt loksutades 17 ml naatriumhüdroksiidi lahust (3.17), jälgides, et temperatuur püsiks allpool 40 °C.

pH korrigeeritakse 2,20-ni toatemperatuuril, kasutades naatriumhüdroksiidi lahust (3.17) ja lõpuks naatriumhüdroksiidi lahust (3.18). Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.4.

5.3.4. Proovilahus kromatograafia jaoks

Korrigeeritud pH-tasemega hüdrolüsaat (5.3.3.1 või 5.3.3.2) kallatakse kvantitatiivselt koos tsitraatpuhvriga (3.24) 200 ml mõõtekolbi ja täidetakse puhvriga (3.24) märgini.

Kui sisestandardit ei ole veel kasutatud, lisatakse 2,00 ml sisestandardit (3.27.3) ja täidetakse tsitraatpuhvriga (3.24) märgini. Segatakse hoolikalt.

Seejärel alustatakse kromatograafiat (5.4).

Kui proovilahuseid ei analüüsita samal päeval, tuleb neid säilitada temperatuuril alla 5 °C.

5.4. *Kromatograafia*

Enne kromatograafiat viiakse ekstrakt (5.2) või hüdrolüsaat (5.3.4) toatemperatuurile. Segu loksutatakse ja filtreeritakse sobiv kogus läbi 0,22 µm membraanfiltrit (4.5). Saadud selge lahusega tehakseioonvahtuskromatograafia, kasutades aminohappe analüsaatorit (4.9).

Sissesüstimist võib teostada käsitsi või automaatselt. On oluline, et standardite ja proovide analüüsiks lisataks kolonni sama kogus lahust ± 0,5 %, välja arvatud sisestandardi kasutamisel, ning et naatriumi ja aminohapete vahukord standard- ja proovilahustes oleks võimalikult sarnane.

▼B

Üldiselt sõltub kalibreerimiskatsete sagedus ninhüdrüini reaktiivi stabiilsusest ja analüütilisest süsteemist. Standard või proov lahjendatakse tsitraapuhvriga (3.24), et saavutada standardi piigipindalaks 30–200 % proovi aminohappe piigipindalast.

Aminohapete kromatograafia varieerub kergelt vastavalt sellele, millist tüüpi analüsaatorit ja millist vaiku kasutatakse. Valitud süsteem peab suutma eraldada aminohapped üksteisest ja ninhüdrüinipositiivsetest materjalidest. Kasutatavate kontsentratsioonide vahemikus peavad kromatograafilise süsteemiga saadavad tulemused sõltuma lineaarselt kolonni lisatud aminohapete muutustest.

Kromatograafia etapil kehtivad (määratavate aminohapete) ekvimolaarlahuse analüüsimisel allpool esitatud miinimumtaseme ja piigi kõrguse vahekorrad. Ekvimolaarlahus peab sisaldama vähemalt 30 % iga aminohappe maksimumkogusest, mida on võimalik täpselt mõõta aminohappe analüüsisüsteemi (4.9) abil.

Treoniini-seriini eraldamiseks ei tohi kahest kattuvast aminohappest madalama aminohappe miinimumtaseme ja piigi kõrguse vahekorrad kromatogrammil ületada suhet 2:10. (Kui määratakse vaid tsüst(e)iini, metioniini, treoniini ja lüsiini, kahjustab nende määramist ebapiisav eraldamine külgnevatest piikidest.). Kõigi teiste aminohapete puhul peab eraldatus olema parem kui suhe 1:10.

Süsteem peab tagama lüsiini eraldamise „lüsiini artefaktidest“ ja ornitiinist.

6. Tulemuste arvutamine

Proovi ja standardi piikide pindala mõõdetakse iga üksiku aminohappe kohta ning arvutatakse kogus (X) ühes grammis aminohappes proovi kilo kohta.

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

Kui kasutatakse sisestandardit, korrutatakse tulemus liikmega $\frac{D}{C}$

A = piigipindala, hüdrolüsaat või ekstrakt

B = piigipindala, kalibreerimisstandardlahus

C = piigipindala, sisestandard hüdrolüsaadis või ekstraktis

D = piigipindala, sisestandard, kalibreerimisstandardlahus

M = määratava aminohappe molaarmass

c = standardi kontsentratsioon $\mu\text{mol/ml}$

m = proovi mass grammides (korregeeritud esialgsele massile, kui proovi on kuivatatud ja/või rasvatustatud)

V = hüdrolüsaat (5.3.4) kokku milliliitrites või ekstrakti (6.1) lahjenduse koguruumala milliliitrites

Tsüstiin ja tsüsteiin määratakse mõlemad tsüsteiinina oksüdeeritud proovide hüdrolüsaatides, kuid arvutatakse tsüstiiniks ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol), kasutades M väärtust 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Metioniin määratakse metioniinsulfoonina oksüdeeritud proovi hüdrolüsaatides, kuid arvutatakse metioniinina, kasutades metioniini M väärtust: 149,21 g/mol.

▼B

Lisatud vaba metioniin määratakse pärast ekstraheerimist metioniinina, arvutamisel kasutatakse sama M väärtust.

- 6.1. Ekstraktide lahjenduse koguruumala (F) vabade aminohapete (5.2) määramiseks arvutatakse järgmiselt:

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

V = lõppekstrakti ruumala

7. **Meetodi hindamine**

Meetodit on katsetatud rahvusvahelises võrdluskatses 1990. aastal, kasutades nelja erinevat sööta (sigade segasööt, broilerite segasööt, valgukontsentraat, eelsegu). Tulemuste keskväärtused ja standardhälbed pärast võõrväärtuste elimineerimist on esitatud käesoleva punkti tabelis.

Keskväärtused g/kg

Etalonaine	Aminohape			
	Treoniin	Tsüst(e)iin	Metioniin	Lüsiin
Sigade segasööt	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 N = 17	9,55 n = 13
Broilerite segasööt	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 N = 18	13,93 n = 16
Valgukontsentraat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 N = 17	47,74 n = 15
Eelsegu	58,42 n = 16	—	90,21 N = 16	98,03 n = 16

n = osalenud laborite arv

7.1. *Korratavus*

Eespool nimetatud võrdluskatse korratavus on väljendatud laborisisese standardhälvena ja esitatud järgmistes tabelites.

Laborisesed standardhälbed (S_r) g/kg

Etalonaine	Aminohape			
	Treoniin	Tsüst(e)iin	Metioniin	Lüsiin
Sigade segasööt	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Broilerite segasööt	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Valgukontsentraat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Eelsegu	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = osalenud laborite arv

▼B

Laborisese standardhälbe (S_r) variatsioonikordaja (%)

Etalonaine	Aminohape			
	Treoniin	Tsüst(e)iin	Metioniin	Lüsiin
Sigade segasööt	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Broilerite segasööt	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Valgukontsentraat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Eelsegu	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = osalenud laborite arv

7.2. *Reprodutseeritavus*

Eespool nimetatud võrdluskatse laboritevahelise standardhälbe tulemused on esitatud järgmises tabelis:

Laboritevaheline standardhälve (S_R) g/kg

Etalonaine	Aminohape			
	Treoniin	Tsüst(e)iin	Metioniin	Lüsiin
Sigade segasööt	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Broilerite segasööt	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Valgukontsentraat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Eelsegu	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = osalenud laborite arv

Laboritevahelise standardhälbe (S_R) variatsioonikordaja (%)

Etalonaine	Aminohape			
	Treoniin	Tsüst(e)iin	Metioniin	Lüsiin
Sigade segasööt	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Broilerite segasööt	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Valgukontsentraat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Eelsegu	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = osalenud laborite arv

▼B**8. Etalonainete kasutamine**

Meetodi õige rakendamise kontrollimiseks tehakse korduvaid mõõtmisi sertifitseeritud etalonainetega, kui need ained on kättesaadavad. Soovitatav on kalibreerida aminohapete sertifitseeritud kalibreerimislahusega.

9. Tähelepanekud

- 9.1. Aminohappeanalüsaatorite erinevustest tingituna tuleb standardaminohapete kalibreerimislahuste (vt 3.27.4 ja 3.27.5) ja hüdrolüsaadi (vt 5.3.4) lõppkontsentratsioone vaadelda suunistena.

Kõigi aminohapete puhul tuleb kontrollida aparatuuri lineaarse ala vahemikku.

Standardlahus lahjendatakse tsitraatpuhvriga, et piigialad oleksid vahemiku keskel.

- 9.2. Kui hüdrolüsaatide analüüsiks kasutatakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia aparatuuri, tuleb katsetingimused optimeerida vastavalt tootja soovitudele.

- 9.3. Meetodi rakendamisel sööda suhtes, mille kloriidisisaldus on suurem kui 1 % (kontsentratsioonid, mineraalsöödad, täiendsöödad), võib analüüs näidata tegelikust väiksemat metioniinisaldust ning tuleb kasutada erimeetodit.

G. TRÜPTOFAANI MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata trüptofaani üldsisaldust ja vaba trüptofaani sisaldust söödas. Meetod ei erista D- ja L-vormi.

2. Põhimõte

Trüptofaani üldsisalduse määramiseks hüdrolüsatakse proovi leeliselises keskkonnas küllastunud baariumhüdroksiidi lahusega ja kuumutatakse 110 °C juures 20 tundi. Pärast hüdrolüsimist lisatakse sisestandard.

Vaba trüptofaani määramiseks ekstraheeritakse proovi nõrgalt happelistes tingimustes sisestandardi juuresolekul.

Trüptofaan ja sisestandard määratakse hüdrolüsaadis või ekstraktis HPLC-ga fluorestsentsdetektori abil.

3. Reaktiivid

- 3.1. Tuleb kasutada bidestilleeritud või samaväärse kvaliteediga vett (juhtivus < 10 µS/cm).
- 3.2. Standardaine: trüptofaan (puhtus/sisaldus ≥ 99 %), mis on kuivatatud vaakumis fosforpentoksiidi kohal.
- 3.3. Sisestandardaine: α-metüültrüptofaan (puhtus/sisaldus ≥ 99 %), mis on kuivatatud vaakumis fosforpentoksiidi kohal.
- 3.4. Baariumhüdroksiidi oktahüdraat (vältida Ba(OH)₂ · 8 H₂O ülemäärast kontakti õhuga, kuna see võib viia BaCO₃ moodustumiseni, mis võib määramist segada) (vt tähelepanek 9.3).
- 3.5. Naatriumhüdroksiid
- 3.6. Ortofosforhape, w (w/w) = 85 %
- 3.7. Soolhape, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanool, samaväärne kui HPLC-puhas.
- 3.9. Petrooleeter, keemivahemik 40–60 °C

▼B

- 3.10. Naatriumhüdroksiidi lahus, $c = 1 \text{ mol/l}$:
40,0 g NaOH (3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega (3.1) 1 liitrini.
- 3.11. Soolhape, $c = 6 \text{ mol/l}$:
Võetakse 492 ml HCl (3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.12. Soolhape, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Võetakse 82 ml HCl (3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.13. Soolhape, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
Võetakse 8,2 ml HCl (3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.14. Ortofosforhape, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
Võetakse 34 ml ortofosforhapet (3.6) ja täidetakse veega (3.1) 1 liitrini.
- 3.15. Trüptofaani (3.2) kontsentreeritud lahus, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
500 ml mõõtkolvis lahustatakse 0,2553 g trüptofaani (3.2) soolhappes (3.13) ja täidetakse soolhappes (3.13) määrgini. Säilitatakse temperatuuril $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ kuni neli nädalat.
- 3.16. Sisestandardi kontsentreeritud lahus, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
500 ml mõõtkolvis lahustatakse 0,2728 g α -metüültrüptofaani (3.3) soolhappes (3.13) ja täidetakse soolhappes (3.13) määrgini. Säilitatakse temperatuuril $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ kuni neli nädalat.
- 3.17. Trüptofaani ja sisestandardi kalibreerimisstandardlahus:
Võetakse 2,00 ml trüptofaani kontsentreeritud lahust (3.15) ja 2,00 ml sisestandardi (α -metüültrüptofaani) kontsentreeritud lahust (3.16). Lahjendatakse veega (3.1) ja metanooliga (3.8) umbes sama ruumalani ja umbes sama metanooli kontsentratsioonini (10–30 %), nagu on valmis hüdroliisaadil.

Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

Valmistamise ajal vältida otsest päikesevalgust.
- 3.18. Äädikhape
- 3.19. 1,1,1-trikloro-2-metüül-2-propanool
- 3.20. Etanoolamiin $w (w/w) > 98 \%$
- 3.21. 1 grammi 1,1,1-trikloro-2-metüül-2-propanooli (3.19) lahus 100 ml metanoolis (3.8).
- 3.22. HPLC liikuv faas: 3,00 g äädikhapet (3.18) + 900 ml vett (3.1) + 50,0 ml 1,1,1-trikloro-2-metüül-2-propanooli (3.19) lahust (3.21) 1g/100 ml metanoolis (3.8). Etanoolamiini (3.20) abil korrigeeritakse pH 5,00-le. Täidetakse veega (3.1) 1 000 ml-ni.
4. **Seadmed**
- 4.1. HPLC-seadmed spektrofluorimeetrilise detektoriga
- 4.2. Vedelikkromatograafia kolonn, 125 mm \times 4 mm, C_{18} , täidise terasuurus 3 μm , või samaväärne
- 4.3. pH-meeter
- 4.4. Laia kaela ja keeratava korgiga polüpropüleenkolb, maht 125 ml

▼B

- 4.5. Membraanfilter (0,45 µm)
- 4.6. Autoklaav, 110 (±2) °C, 1,4 (±0,1) bar
- 4.7. Mehaaniline loksuti või magnetsegur
- 4.8. Pöörisegaja

5. Töö käik**5.1. Proovide ettevalmistamine**

Proov jahvatatakse nii peeneks, et see läheks läbi 0,5-millimeetriste avadega sõela. Suure niiskusesisaldusega proovid tuleks enne jahvatamist kas kuivatada õhu käes temperatuuril kuni 50 °C või külmuivatada. Suure rasvasisaldusega proove tuleb enne jahvatamist ekstraheerida petrooleetriga (3.9).

5.2. Vaba trüptofaani määramine (ekstrakt)

Ettevalmistatud proovi (5.1) sobiv kogus (1–5 g) kaalutakse 1 mg täpsusega koonilisse kolbi. Lisatakse 100,0 ml soolhapet (3.13), $c = 0,1$ mol/l, ja 5,00 ml kontsentreeritud sisestandardlahust (3.16). Raputatakse või segatakse 60 min, kasutades mehaanilist loksutit või magnetsegurit (4.7). Settel lastakse settida ja 10,0 ml supernatanti viiakse pipetiga üle keeduklaasi. Lisatakse 5 ml ortofosforhapet (3.14). Naatriumhüdrosiidi (3.10) abil korrigeeritakse pH 3-le. Lisatakse piisavalt metanooli (3.8), et viia metanooli kontsentratsioon lõpplahuses 10–30 protsendini. Lahus viiakse üle sobiva suurusega mõõtekolbi ja lahjendatakse veega kuni kromatograafiaks sobiva koguseni (umbes sama kogus kui kalibreerimisstandardlahusel (3.17)).

Enne HPLC-koloni süstimist filtreeritakse mõned milliliitrid lahust läbi 0,45 µm membraanfiltrit (4.5). Jätkatakse kromatograafiaga vastavalt punktile 5.4.

Standardlahust ja ekstrakte tuleb kaitsta otsese päikesevalguse eest. Kui ekstrakte ei ole võimalik samal päeval analüüsida, siis võib neid hoida temperatuuril 5 °C kuni kolm päeva.

5.3. Trüptofaani üldsisalduse määramine (hüdrolüsaat).

0,1–1 g ettevalmistatud proovi (5.1) kaalutakse 0,2 mg täpsusega polüpropüleenkolbi (4.4). Kaalutud proovipartii lämmastikusisaldus peab olema umbes 10 mg. Lisatakse 8,4 g baariumhüdrosiidi oktahüdraati (3.4) ja 10 ml vett. Segatakse pöörisegajaga (4.8) või magnetseguriga (4.7). Tefloniga kaetud magnet jäetakse segusse. Nõu seinad loputatakse üle 4 ml veega. Keeratav kork pannakse peale ja kolb suletakse lõdvalt. Kolb pannakse autoklaavi (4.6) ja kuumutatakse keevas vees ja aurus 30–60 minutit. Autoklaav suletakse ja kuumutatakse 20 tundi 110 (± 2) °C juures.

Enne autoklaavi avamist langetatakse temperatuur natuke alla 100 °C kraadi. $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$ kristalliseerumise vältimiseks lisatakse soojale segule 30 ml toatemperatuuril olevat vett. Raputatakse või segatakse kergelt. Lisatakse 2,00 ml sisestandardi (α -metüültrüptofaani) kontsentreeritud lahust (3.16). Nõusid jahutatakse vee-/jäävannis 15 minutit.

Seejärel lisatakse 5 ml ortofosforhapet (3.14). Nõu hoitakse jahutusvannis ja neutraliseeritakse segamisel HCl-iga (3.11) ning pH korrigeeritakse 3,0-ni HCl (3.12) abil. Lisatakse piisavalt metanooli, et viia metanooli kontsentratsioon lõpplahuses 10–30 %ni. Viiakse üle sobiva suurusega mõõtekolbi ja lahjendatakse veega kindla, kromatograafiaks sobiva ruumalani (näiteks 100 ml). Metanooli lisamine ei tohi tekitada sadenemist.

▼B

Enne HPLC-koloni süstimist filtreeritakse mõned milliliitrid lahust läbi 0,45 µm membraanfiltriga (4.5). Jätkatakse kromatograafiaga vastavalt punktile 5.4.

Standardlahust ja hüdrolüsaate tuleb kaitsta otsese päikesevalguse eest. Kui hüdrolüsaate ei ole võimalik samal päeval analüüsida, siis võib neid hoida temperatuuril 5 °C kuni kolm päeva.

5.4. *HPLC määramine*

Soovitatakse juhendada järgmistest isokraatilise elueerimise tingimustest. Muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused (vt ka tähelepanekuid 9.1 ja 9.2):

Vedelikromatograafia kolonn (4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 3 µm või samaväärne
Koloni temperatuur:	Ruumitemperatuur
Liikuv faas (3.22):	3,00 g äädikhapet (3.18) + 900 ml vett (3.1) + 50,0 ml 1,1,1-trikloro-2-metüül-2-propanooli (3.19) lahust metanoolis (3.8) (1g/100ml). pH korrigeeritakse 5,00-le etanoolamiini (3.20) abil. Täidetakse veega (3.1) 1 000 ml-ni.
Voolukiirus:	1 ml/min
Summaarne voolutamisaeg:	umbes 34 min
Avastamise lainepikkus:	ergastamine: 280 nm, emissioon: 356 nm.
Sissesüstiv ruumala	20 µl

6. **Tulemuste arvutamine**

Arvutatakse trüptofaani (X) kogus grammides 100 g proovi kohta.

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

A = sisestandardi piipindala, kalibreerimisstandardlahus (3.17)

B = trüptofaani piigipindala, ekstrakt (5.2) või hüdrolüsaat (5.3)

V₁ = kalibreerimislahusele (3.17) lisatud kontsentreeritud trüptofaani lahuse (3.15) kogus milliliitrites (2 ml)

c = kalibreerimislahusele (3.17) lisatud kontsentreeritud trüptofaani lahuse (3.15) kontsentratsioon, µmol/ml (= 2,50)

V₂ = kontsentreeritud sisestandardlahuse (3.16) kogus milliliitrites, mis on lisatud ekstraheerimisel (5.2) (= 5,00 ml) või hüdrolüsaadile (5.3) (= 2,00 ml)

C = sisestandardi piigipindala, ekstrakt (5.2) või hüdrolüsaat (5.3)

D = trüptofaani piigipindala, kalibreerimisstandardlahus (3.17)

V₃ = kalibreerimisstandardlahusele (3.17) lisatud kontsentreeritud sisestandardlahuse (3.16) kogus milliliitrites (= 2,00 ml)

m = proovi mass grammides (korregeeritud esialgsele massile, kui proovi on kuivatatud ja/või rasvatustatud)

M = trüptofaani molaarmass (= 204,23 g/mol)

7. **Korratavus**

Sama proovi kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % suuremast tulemusest.

▼B

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati ühendusesisene ühisuurimine (neljas võrdlusuuring), mille käigus kuni 12 laborit analüüsisid hüdrolüüsimeetodi sertifitseerimiseks kolme proovi. Kõigile proovidele tehti kordusanalüüsid (5). Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

	Proov 1 Seasööt	Proov 2 L-trüptofaaniga rikastatud seasööt	Proov 3 Seasöödakontsent- raat
L	12	12	12
n	50	55	50
Keskmine 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 = tulemused esitanud laborite arv

n = üksiktulemuste arv pärast võõrväärtuste väljajättmist (Cochrani-Dixoni võõrväärtuste testi alusel)

s_r = korratavust iseloomustav standardhälve

S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

r = korratavus

R = reprodutseeritavus

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja, %

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

Teise ühendusesisese ühisuurimise (kolmanda võrdlusuuringu) käigus analüüsisid kuni 13 laborit vaba trüptofaani ekstraheerimise meetodi sertifitseerimiseks kahte proovi. Kõigile proovidele tehti kordusanalüüsid (5). Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

	Proov 4 Nisu ja soja segu	Proov 5 Nisu ja soja segu (= proov 4), millele on lisatud trüptofaani (0,457g/kg)
L	12	12
n	55	60
Keskvärtus 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 = tulemused esitanud laborite arv

n = üksiktulemuste arv pärast võõrväärtuste väljajättmist (Cochrani-Dixoni võõrväärtuste testi alusel)

s_r = korratavust iseloomustav standardhälve

S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

r = korratavus

R = reprodutseeritavus

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja, %

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

▼B

Veel ühe ühendusesise võrdlusuuringu käigus analüüsisid kuni seitse laborit trüptofaani hüdrolüüsi sertifitseerimise eesmärgiga nelja proovi. Tulemused on esitatud allpool. Kõigile proovidele tehti kordusanalüüsid (5).

	Proov 1 Sigade sööda- segu (CRM 117)	Proov 2 Väikese rasvasisaldusega kalajahu (CRM 118)	Proov 3 Sojajahu (CRM 119)	Proov 4 Lössipulber (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Keskvärtus 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 = tulemused esitanud laborite arv

n = üksiktulemuste arv pärast võõrväärtuste väljajätmist (Cochrani-Dixoni võõrväärtuste testi alusel)

s_r = korratavust iseloomustav standardhälve

S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

r = korratavus

R = reprodutseeritavus

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja, %

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

9. Tähelepanekud

9.1. Järgmised kromatograafia eritingimused võivad tagada trüptofaani ja α -metüültrüptofaani parema eraldumise teineteisest.

Isokraatiline elueerimine, millele järgneb kolonni gradientpuhastus:

Vedelikkromatograafia kolonn: 125 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 5 µm või samaväärne

Kolonni temperatuur: 32 °C

Liikuv faas: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/metanool, 95+5 (V+V).
B: Metanool

Gradientprogramm:	0 min	100 % A	0 % B
	15 min	100 % A	0 % B
	17 min	60 % A	40 % B
	19 min	60 % A	40 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	33 min	100 % A	0 % B

Voolukiirus: 1,2 ml/min

Summaarne voolutamisaeg: umbes 33 min

9.2. Kromatograafiline määramine oleneb HPLC tüübist ja kasutatavast kolonnitäidisest. Valitud süsteem peab tagama trüptofaani ja sisestandardi piikide täieliku eraldumise (kuni alusjooneni). Lisaks sellele on

▼B

oluline, et lagunemisproduktid eralduksid hästi trüptofaanist ja sisestandardist. Kolonni tuleb süstida hüdroolüsaate ilma sisestandardita, kontrollimaks, et sisestandardi piigi kohal ei moonutaks alusjoont lisandite väljumine. On oluline, et voolutamisaeg oleks piisavalt pikk kõigi lagunemisproduktide elueerimiseks, vastasel juhul võivad hiljem elueeruvad piigid segada järgnevaid kromatograafilisi määramisi.

Kasutatavate kontsentratsioonide vahemikus peavad kromatograafilise süsteemiga saadavad tulemused sõltuma kontsentratsioonist lineaarselt. Tulemuste lineaarsust tuleks kontrollida sisestandardi konstantsel (normaalsel) kontsentratsioonil erinevate trüptofaani kontsentratsioonidega. On oluline, et nii trüptofaani kui ka sisestandardi piigid oleksid HPLC-/fluorestsentsüsteemi lineaarses alas. Kui trüptofaani või sisestandardi piigid on liiga väikesed või liiga suured, siis tuleks analüüsi korrata teistsuguse proovi suurusega ja/või teistsuguse lõppruumalaga.

9.3. *Baariumhüdroksiid*

Baariumhüdroksiidi lahustamine raskeneb baariumhüdroksiidi vananemisel. Selle tulemusel saadakse HPLC-ga määramiseks hägune lahus, mis võib vähendada trüptofaani määramisel saadavaid tulemusi.

H. TOORÕLI JA -RASVA MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

See meetod võimaldab määrata toorõli ja -rasva sisaldust söödas. See ei hõlma õliseemnete ja õliviljade analüüsi.

Allpool kirjeldatud kahe meetodi kasutamine sõltub sööda laadist ja koostisest ning analüüsi tegemise põhjusest.

1.1. *Meetod A – otse ekstraheeritav toorõli ja -rasv*

Seda meetodit kohaldatakse taimsete söödatoorainete puhul, välja arvatud meetodiga B hõlmatud ainete puhul.

1.2. *Meetod B – kogu toorõli ja -rasv*

Seda meetodit kohaldatakse loomsete söödatoorainete ja kõigi segajõusöötade puhul. Seda kasutatakse kõigi ainete puhul, millest ei ole ilma eelneva hüdroolüüsita võimalik õli ja rasva ekstraheerida (nt gluteenid, pärm, kartulivalgud ning tooted, mille puhul kasutatakse muu hulgas pressimist, helvestamist või kuumutamist).

1.3. *Tulemuste tõlgendamine*

Kõigil juhtudel, kui meetodiga B saadakse suurem tulemus kui meetodiga A, loetakse meetodiga B saadud tulemus õigeks väärtuseks.

2. Põhimõte

2.1. *Meetod A*

Proov ekstraheeritakse petrooleetriga. Solvent destilleeritakse välja ning jääk kuivatatakse ja kaalutakse.

2.2. *Meetod B*

Proovi töödeldakse kuumalt soolhappega. Segu jahutatakse ja filtreeritakse. Jääk pestakse, kuivatatakse ja määratakse vastavalt meetodile A.

▼B**3. Reaktiivid**

- 3.1. Petrooleeter, keemisivahemik 40–60 °C. Broomiarv peab olema väiksem kui 1 ja aurustamise jääk alla 2 mg/100 ml.
- 3.2. Veevaba naatriumsulfaat.
- 3.3. Soolhape, $c = 3$ mol/l
- 3.4. Filteraine, nt Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. Seadmed

- 4.1. Ekstraheerimisaparaat. Kui see on varustatud sifooniga (Soxhleti aparaat), siis peab tagasivoolu kiirus olema selline, et tekiks umbes 10 tsüklit tunnis; kui aparaat on ilma sifoonita, siis peab tagasivoolu kiirus olema ligikaudu 10 ml minutis.
- 4.2. Ekstraheerimishülssid, milles ei ole petrooleetris lahustuvaid aineid ning mille poorsus vastab punkti 4.1 nõuetele.
- 4.3. Kuivatuskapp: kas vaakumkuivatuskapp, mis on seatud temperatuurile 75 ± 3 °C, või õhkuivatuskapp, mis on seatud temperatuurile 100 ± 3 °C.

5. Töö käik**5.1. Meetod A (vt punkt 8.1)**

5 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega, pannakse ekstraheerimishülssi (4.2) ja kaetakse rasvavaba vatiga.

Hülss asetatakse ekstraheerimisaparaati (4.1) ja ekstraheeritakse petrooleetriga (3.1) kuus tundi. Petrooleetri ekstrakt kogutakse kuiva kaalutud kolbi, milles on pimsskivitükid⁽¹⁾.

Solvent destilleeritakse välja. Jääk koos kolviga asetatakse poolteiseks tunniks kuivatuskappi (4.3) kuivama. Lastakse eksikaatoris jahtuda ning kaalutakse. Kuivatatakse veel 30 minutit, et veenduda, et õli ja rasva mass jääb samaks (massikadu kahe järjestikuse kaalumise vahel peab olema 1 mg või alla selle).

5.2. Meetod B

2,5 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega (vt punkt 8.2), pannakse 400 ml keeduklaasi või 300 ml Erlenmeyeri kolbi ning lisatakse 100 ml soolhapet (3.3) ja pimsskivitükke. Keeduklaas kaetakse kellaklaasiga või pannakse Erlenmeyeri kolbi külge püstjahuti. Segu kuumutatakse madala leegi või kuumutusplaadi kohal keemiseni ja keedetakse nõrgalt tund aega. Tuleb vältida toote sadestumist nõu seinte külge.

Jahtutatakse ja lisatakse selline kogus filterainet (3.4), mis on piisav õli- ja rasvakao vältimiseks filtreerimisel. Lahus filtreeritakse läbi niisutatud rasvavaba kahekordse filterpaberi. Jääki pestakse külmas vees kuni filtraadi neutraalse reaktsioonini. Kontrollitakse, et filtraat ei sisalda õli ega rasva. Kui filtraat sisaldab õli või rasva, tuleb proov enne hüdrolüüsi petrooleetriga ekstraheerida, kasutades meetodit A.

Kahekordne filterpaber koos jäägiga asetatakse kellaklaasile ja kuivatatakse poolteist tundi ventileeritavas kuivatuskapis (4.3) 100 ± 3 °C juures.

⁽¹⁾ Kui hiljem tuleb kontrollida õli või rasva kvaliteeti, asendatakse pimsskivitükid klaashelmestega.

▼B

Kahekordne filterpaber koos kuivjäädiga asetatakse ekstraheerimishülssi (4.2) ja kaetakse rasvavaba vatiga. Hülss asetatakse ekstraheerimisaparaati (4.1) ja jätkatakse vastavalt punkti 5.1 teisele ja kolmandale lõigule.

6. Tulemuste väljendamine

Jäägi mass väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. Korratavus

Sama analüüsija poolt sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— absoluutväärtusena väljendatult 0,2 %, kui õli ja rasva üldsisaldus on alla 5 %;

— 4,0 % suuremast tulemusest, kui toorõli ja -rasva sisaldus on 5–10 %;

— absoluutväärtusena väljendatult 0,4 %, kui toorõli ja -rasva sisaldus on üle 10 %.

8. Tähelepanekud

- 8.1. Suure õli- ja rasvasisaldusega toodete puhul, mida on keeruline peenestada või millest ei saa võtta homogeenset vähendatud proovi, toimitakse järgmiselt.

20 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ja segatakse vähemalt 10 g veevaba naatriumsulfaadiga (3.2). Segu ekstraheeritakse petrooleetriga (3.1) vastavalt punktile 5.1. Saadud ekstrakti täidetakse petrooleetriga (3.1) 500 ml-ni ja segatakse. 50 ml lahust pannakse väiksesse kuiva kaalutud kolbi, milles on pimsskivitükid (1). Solvent destilleeritakse välja, segu kuivatatakse ja jätkatakse vastavalt punkti 5.1 viimasele lõigule.

Hülssi jäänud ekstraheerimisjäädigist eemaldatakse solvent, peenestatakse jääk 1 mm osakesteks, pannakse see tagasi ekstraheerimishülssi (ilma naatriumsulfaati lisamata) ning jätkatakse vastavalt punkti 5.1 teisele ja kolmandale lõigule.

Õli- ja rasvasisaldus arvutatakse protsendimäärana proovist järgmise valemi abil:

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

kus:

m_1 = jäägi mass grammides pärast esimest ekstraheerimist (alikkvootne osa ekstraktist),

m_2 = jäägi mass grammides pärast teist ekstraheerimist.

- 8.2. Väikese õli- ja rasvasisaldusega toodete puhul võib uuritava proovi massi suurendada 5 grammini.
- 8.3. Suure veesisaldusega lemmikloomatoite võib olla vaja segada veevaba naatriumsulfaadiga enne hüdrolüüsi ja ekstraheerimist vastavalt meetodile B.
- 8.4. Punktis 5.2 võib olla tõhusam kasutada jäägi pesemiseks pärast filtreerimist külma vee asemel sooja vett.
- 8.5. Mõne sööda puhul võib olla vaja pikendada 1,5tunnist kuivamisega. Tuleb vältida liigset kuivatamist, kuna see võib põhjustada madalaid tulemusi. Kasutada võib ka mikrolaineahju.

▼B

- 8.6. Kui toorõli ja -rasva sisaldus on üle 15 %, on soovitatav proov enne hüdrolüüsi ekstraheerida meetodi A järgi ning uuesti ekstraheerida meetodi B järgi. Mingil määral sõltub see sööda ja selles leiduva õli ning rasva laadist.

I. KOGUKIU MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata söödas happelises ja leeliselises keskkonnas lahustumatuid rasvavabu orgaanilisi aineid, mida harilikult nimetatakse kogukiuks.

2. Põhimõte

Proovi, mis on vajaduse korral rasvatustatud, töödeldakse mitu korda järjest teatava kontsentratsiooniga väävelhappe ja kaaliumhüdroksiidi keevate lahustega. Jääk eraldatakse filtreerimise abil paagutatud klaasfiltril ning pestakse, kuivatatakse, kaalutakse ja tuhastatakse temperatuuril vahemikus 475–500 °C. Tuhastamisest tulenev massikadu vastab uuri-tavas proovis sisalduvale kogukiule.

3. Reaktiivid

- 3.1. Väävelhape, $c = 0,13 \text{ mol/l}$
- 3.2. Vahutamistavastane aine (nt n-oktaanol)
- 3.3. Filteraine (Celite 545 või samaväärne toode), mida soojendatakse temperatuuril 500 °C neli tundi (8.6)
- 3.4. Atsetoon
- 3.5. Petrooleeter, keemistemperatuur 40–60 °C
- 3.6. Soolhape, $c = 0,5 \text{ mol/l}$
- 3.7. Kaaliumhüdroksiidi lahus, $c = 0,23 \text{ mol/l}$

4. Seadmed

- 4.1. Väävelhappe ja kaaliumhüdroksiidi lahusega lagundamiseks mõeldud kuumutusseade, mis on varustatud filtertiigli (4.2) toe ja äravoolutoruga, millel on klapp vedeliku väljavoolu peatamiseks ja võimaluse korral suruõhuga tekitatud vaakum. Iga päev eelkuumutatakse seadet enne kasutamist keeva veega viis minutit.
- 4.2. Paagutatud kvartsklaasist filterplaadiga klaasist filtertiigel, poori suurus 40–90 µm. Enne esimest kasutamist kuumutatakse mõni minut kuni temperatuurini 500 °C ja jahutatakse (8.6).
- 4.3. Püstjahutiga vähemalt 270 ml silinder, mis sobib keetmiseks.
- 4.4. Termostaadiga kuivatuskapp.
- 4.5. Termostaadiga muhvelahi.
- 4.6. Ekstraheerimisseade, mis koosneb filtertiigli (4.2) tugiplaadist ja väljalasketorust, millel on klapp vaakumi ja vedeliku väljavoolu peatamiseks.
- 4.7. Ühendusrõngad kuumutusseadme (4.1), tiigli (4.2) ja silindri (4.3) ühendamiseks ning külmeekstraheerimisseadme (4.6) ja tiigli ühendamiseks.

5. Töö käik

1 g ettevalmistatud proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ja pannakse see tiiglisse (4.2) (vt tähelepanekud 8.1, 8.2 ja 8.3) ning lisatakse 1 g filterrainet (3.3).

▼B

Kuumutusseade (4.1) ja filtertiiigel (4.2) ühendatakse ning seejärel kinnitatakse silinder (4.3) tiigli külge. 150 ml keevat väävelhapet (3.1) valatakse ühendatud silindrisse ja tiiglisse ning vajadusel lisatakse mõned tilgad vahutamistavastast ainet (3.2).

Vedelik aetakse keema 5 ± 2 minutiga ja keedetakse tugevalt täpselt 30 minutit.

Väljalasketoru (4.1) klapp avatakse, väävelhappe filtreeritakse vaakumitingimustel läbi filtertiiigli ning jääki pestakse kolm korda järjest 30 ml keeva veega, tagades, et pärast iga pesemist filtreeritakse jääk kuivaks.

Äravooluklapp suletakse ning ühendatud silindrisse ja tiiglisse valatakse 150 ml keevat kaaliumhüdroksiidi lahust (3.7) ning lisatakse mõned tilgad vahutamistavastast ainet (3.2). Vedelik aetakse keema 5 ± 2 minutiga ja keedetakse tugevalt täpselt 30 minutit. Filtreeritakse ja korratakse pesemisprotseduuri, mida kasutati väävelhappe juures.

Pärast lõplikku pesemist ja kuivatamist ühendatakse tiigel ja selle sisu lahti ning ühendatakse see külmekstraheerimiseseadmega (4.6). Jääki pestakse tiiglis vaakumitingimustel kolm korda järjest 25 ml atsetooniga (3.4), tagades, et pärast iga pesemist filtreeritakse jääk kuivaks.

Tiiigel kuivatatakse püsikaaluni kuivatuskapis temperatuuril 130 °C. Pärast iga kuivatamist jahutatakse tiiglit eksikaatoris ja kaalutakse kiiresti. Tiiigel asetatakse muhvelahju ja tuhastatakse püsikaaluni (massikadu peab kahe järjestikuse kaalumise vahel olema 2 mg või alla selle) temperatuuril 475 °C kuni 500 °C vähemalt 30 minutit.

Pärast iga kuumutamist jahutatakse tiiglit enne kaalumist kõigepealt ahjus ja seejärel eksikaatoris.

Teostatakse ilma proovita pimekatse. Tuhastamisest tingitud massikadu ei tohi olla üle 4 mg.

6. Tulemuste arvutamine

Kogu kiu sisaldus arvutatakse protsendimäärana proovist järgmise valemi abil:

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

kus:

m = proovi mass grammides;

m_0 = massikadu pärast tuhastamist määramise ajal, grammides;

m_1 = massikadu pärast tuhastamist pimekatse ajal, grammides.

7. Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— absoluutväärtuses väljendatult 0,6 %, kui kogukiu sisaldus on alla 10 %;

— 6 % suuremast tulemusest, kui kogukiu sisaldus on 10 % või suurem.

8. Tähelepanekud

- 8.1. Sööt, mis sisaldab üle 10 % rasva, tuleb enne analüüsimist petrooleetriga (3.5) rasvatustada. Filtertiiigel (4.2) ja selle sisu ühendatakse külmekstraheerimiseseadmega (4.6) ja pestakse jääki vaakumitingimustel kolm korda

▼B

järjest 30 ml petrooleetriga, tagades, et jääk oleks kuiv. Tiigel ja selle sisu ühendatakse kuumutusseadmega (4.1) ja jätkatakse vastavalt punktile 5.

- 8.2. Sööt, mis sisaldab rasva ja mida ei saa ekstraheerida petrooleetriga (3.5) otse, tuleb rasvatustada vastavalt punktile 8.1 ja rasvatustada veel üks kord pärast happega keetmist. Pärast happega keetmist ja järgnevat pesemist ühendatakse tiigel ja selle sisu külmekstraheerimisseadmega (4.6) ja pestakse jääki kolm korda järjest 30 ml atsetooniga ning seejärel veel kolm korda 30 ml petrooleetriga. Filtreeritakse vaakumitingimustel kuivaks ja jätkatakse analüüsi vastavalt punktile 5, alustades töötlemisest kaaliumhüdrosiidiga.
- 8.3. Kui sööt sisaldab üle 5 % karbonaati, mis on väljendatud kaltsiumkarbonaadina, ühendatakse tiigel (4.2) kaalutud prooviga kuumutusseadme (4.1) külge. Proovi pestakse kolm korda 30 ml soolhappega (3.6). Pärast iga lisamist lastakse proovil seista umbes üks minut enne filtreerimist. Pestakse üks kord 30 ml veega ja jätkatakse seejärel vastavalt punktile 5.
- 8.4. Kui kasutatakse statiivitaolist seadet (mitu tiiglit on kinnitatud sama kuumutusseadme külge), ei või sama analüüsitava proovi suhtes teostada kahte üksikut määramist samas sarjas.
- 8.5. Kui pärast keetmist on raske filtreerida happelisi ja aluselisi lahuseid, kasutatakse kuumutusseadme väljalasketoru kaudu lastavat suruõhku ja jätkatakse seejärel filtreerimist.
- 8.6. Tuhastamistemperatuur ei tohi olla üle 500 °C, et pikendada klaasfiltertiiglite eluaega. Tuleb jälgida, et kuumutus- ja jahutustsüklite ajal ei tekiks liigset termolööki.

J. SUHKRU MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata redutseerivate suhkrute hulka ja pärast inversiooni üldsuhkru hulka, väljendatuna glükoosina või sõltuvalt olukorrast sahharoosina, kasutades ümberarvestustegurit 0,95. Seda meetodit kasutatakse segajõusöötade puhul. Muude söötade puhul on sätestatud erimeetodid. Vajaduse korral tuleb laktoosi hulk mõõta eraldi ja tulemuste arvutamisel seda arvesse võtta.

2. Põhimõte

Suhkrud ekstraheeritakse lahjendatud etanoolis; lahus selitatakse Carrezi lahustega I ja II. Pärast etanooli eemaldamist määratakse kogused enne ja pärast inversiooni Luff-Schoorli meetodi abil.

3. Reaktiivid

- 3.1. 40 % etanoolilahuse (v/v) tihedus: 0,948 g/ml 20 °C juures, fenoolftaleiini suhtes neutraalne
- 3.2. Carrezi lahus I: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati Zn (CH₃COO)₂ 2H₂O ja 3 g jää-äädikat. Täidetakse veega 100 milliliitriini.
- 3.3. Carrezi lahus II: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumferrotsüaniidi K₄Fe (CN)₆ 3H₂O. Täidetakse veega 100 milliliitriini.
- 3.4. Metüüloranž, 0,1 % lahus (w/v)
- 3.5. Soolhape, 4 mol/l
- 3.6. Soolhape, 0,1 mol/l.

▼B

- 3.7. Naatriumhüdrosiidi lahus, 0,1 mol/l
- 3.8. Luff-Schoorli reaktiiv
- Ettevaatlikult segades valatakse sidrunhappe lahus (3.8.2) naatriumkarbonaadi lahusesse (3.8.3). Lisatakse vasksulfaadi lahus (3.8.1) ja täidetakse veega 1 liitrini. Lastakse öö läbi settida ja filtreeritakse.
- Selliselt saadud reaktiivi kontsentratsiooni (Cu 0,05 mol/l; Na₂ CO₃ 1 mol/l) kontrollitakse, vt punkti 5.4 viimast lõiku. Lahuse pH on umbes 9,4.
- 3.8.1. Vasksulfaadi lahus: 25 g rauavaba vasksulfaati (Cu SO₄ 5H₂O) lahustatakse 100 ml vees.
- 3.8.2. Sidrunhappe lahus: 50 g sidrunhapet (C₆H₈O₇ · H₂O) lahustatakse 50 ml vees.
- 3.8.3. Naatriumkarbonaadi lahus: 143,8 g veevaba naatriumkarbonaati lahustatakse umbes 300 ml soojas vees. Jahutatakse.
- 3.9. Naatriumtiosulfaadilahus, 0,1 mol/l
- 3.10. Tärgliselahus: 1 liitrile keevale veele lisatakse 5 g lahustuva tärglise ja 30 ml vee segu. Keedetakse kolm minutit, lastakse jahtuda ja vajaduse korral lisatakse säilitusainena 10 mg elavhõbejodiidi.
- 3.11. Väävelhape, 3 mol/l
- 3.12. Kaaliumjodiidi lahus, 30 % (w/v)
- 3.13. Pimsskivigraanulid, mis on keedetud soolhappes, pestud vees ning kuivatatud
- 3.14. 3-metüülbutaan-1-ool

4. Seadmed

Segisti (trummel): umbes 35 kuni 40 p/min.

5. Töö käik**5.1. Proovi ekstraheerimine**

2,5 g proovi kaalutakse täpsusega 1 mg ja pannakse 250 ml mõõtekolbi. Lisatakse 200 ml etanooli (3.1) ning segatakse trumlis tund aega. Lisatakse 5 ml Carrezi lahust I (3.2) ja segatakse umbes 30 sekundit. Lisatakse 5 ml Carrezi lahust II (3.3) ja segatakse veel üks minut. Täidetakse etanooliga (3.1) märgini, homogeneeritakse ja filtreeritakse. Eemaldatakse 200 ml filtraati ja aurustatakse ligikaudu poole mahuni, et vabaneda enamikust etanoolist. Aurustamise jääk kantakse sooja vett kasutades kvantitatiivselt 200 ml mõõtekolbi, jahutatakse, täidetakse veega kuni märgini, homogeneeritakse ja vajaduse korral filtreeritakse. Seda lahust kasutatakse redutseerivate suhkrute hulga ja pärast inversiooni üldsuhkru hulga määramiseks.

5.2. Redutseerivate suhkrute määramine

Pipetiga eemaldatakse kuni 25 ml lahust, mis sisaldab alla 60 mg redutseerivaid suhkruid, mis on väljendatud glükoosina. Vajaduse korral täidetakse destilleeritud veega 25 ml-ni ja määratakse redutseerivate suhkrute hulk Luff-Schoorli meetodi abil. Tulemus väljendatakse glükoosisisalduse protsendimäärana proovist.

5.3. Üldsuhkru määramine pärast inversiooni

Pipetiga võetakse 50 ml lahust ja kantakse see 100 ml mõõtekolbi. Lisatakse mõni tilk metüüloranži lahust (3.4) ning seejärel lisatakse

▼B

hoolikalt ja samal ajal pidevalt segades soolhapet (3.5), kuni vedelik värvub selgelt punaseks. Lisatakse 15 ml soolhapet (3.6), asetatakse kolb tugevalt keeva veega vanni ning hoitakse seal 30 minutit. Jahutatakse kiiresti umbes 20 °C-ni ja lisatakse 15 ml naatriumhüdroksiidi lahust (3.7). Täidetakse veega 100 ml-ni ja homogeneeritakse. Eemaldatakse kuni 25 ml lahust, mis sisaldab alla 60 mg redutseerivaid suhkruid, mis on väljendatud glükoosina. Vajaduse korral täidetakse destilleeritud veega 25 ml-ni ja määratakse redutseerivate suhkrute hulk Luff-Schoorli meetodi abil. Tulemus väljendatakse glükoosi protsendimäärana või sõltuvalt olukorrast sahharoosi protsendimäärana, korrutades tulemuse teguriga 0,95.

5.4. *Tiitrimine Luff-Schoorli meetodi järgi*

Pipetiga võetakse 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi (3.8) ja kantakse see 300 ml Erlenmeyeri kolbi; lisatakse täpselt 25 ml selitatud suhkrulahust. Lisatakse 2 pimsskivigraanulit (3.13), kuumutatakse käsitsi segades keskmise kõrgusega lahtise leegi kohal ja segu kuumutatakse keemiseni umbes kahe minuti jooksul. Erlenmeyeri kolb asetatakse viivitamatult asbestkattega traatvõrgule, milles on umbes 6 cm läbimõõduga auk ning mille all on eelnevalt süüdatud leek. Leeki reguleeritakse nii, et kuumutataks üksnes Erlenmeyeri kolvi põhja. Erlenmeyeri kolvi külge pannakse püstjahuti. Keedetakse täpselt kümme minutit. Jahutatakse kohe külmas vees ja umbes viie minuti möödudes tiitritakse järgmiselt.

Lisatakse 10 ml kaaliumjodiidi lahust (3.12) ja kohe seejärel lisatakse (intensiivse vahutamise ohu tõttu ettevaatlikult) 25 ml väävelhapet (3.11). Tiitritakse naatriumtiosulfaadi lahusega (3.9) kuni kahvatukollase värvuse tekkimiseni, lisatakse tärgliseindikaator (3.10) ja viiakse tiitrimine lõpule.

Sama tiitrimine ilma keetmata tehakse seguga, milles on täpselt mõõdetud 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi (3.8) ja 25 ml vett ning millele on eelnevalt lisatud 10 ml kaaliumjodiidi lahust (3.12) ja 25 ml väävelhapet (3.11).

6. **Tulemuste arvutamine**

Tabeli abil määratakse glükoosi hulk milligrammides, mis vastab erinevusele kahe tiitrimise tulemuste vahel väljendatuna naatriumtiosulfaadi milligrammides (0,1 mol/l). Tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. **Erimenetlused**

- 7.1. Melassirikaste söötade ja muude mitte eriti homogeensete söötade puhul kaalutakse 20 g proovi ja pannakse see 500 ml veega üheliitrisse mõõtekolbi. Segatakse trumlis tund aega. Selitatakse Carrezi lahustega I (3.2) ja II (3.3) punkti 5.1 kohaselt, kasutades sealjuures iga reaktiivi neljakordset kogust. Täidetakse kuni märgini 80 % etanooliga (v/v).

Homogeneeritakse ja filtreeritakse. Etanool eemaldatakse punkti 5.1 kohaselt. Kui dekstriinitud tärglist ei ole, täidetakse destilleeritud veega kuni märgini.

- 7.2. Suhkrurikaste, kuid praktiliselt tärglisevabade melasside ja söödatoorainete puhul (jaanikaunad, kuivatatud peedipealsed jne) kaalutakse 5 g proovi, pannakse see 250 ml mõõtekolbi, lisatakse 200 ml destilleeritud vett ja segatakse trumlis tund aega või vajaduse korral kauem. Selitatakse Carrezi lahustega I (3.2) ja II (3.3) punkti 5.1 kohaselt. Täidetakse külma veega kuni märgini, homogeneeritakse ja filtreeritakse. Üldsuhkru hulga määramiseks jätkatakse vastavalt punktile 5.3.

8. **Tähelepanekud**

- 8.1. Vahutamise vältimiseks on soovitatav lisada (proovi kogusest sõltumata) umbes 1 ml 3-metüülbutaan-1-ooli (3.14) enne keetmist Luff-Schoorli reaktiiviga.

▼B

- 8.2. Sahharoosisisalduse protsendimäär on glükoosina väljendatud inversiooni järgse üldsuhkrute sisalduse ja glükoosina väljendatud redutseerivate suhkrute sisalduse vahe, mis on korrutatud 0,95-ga.
- 8.3. Redutseerivate suhkrute (v.a laktoosi) sisalduse määramiseks võib kasutada kahte meetodit:
- 8.3.1. Ligikaudseks arvutamiseks korrutatakse muu meetodi abil saadud laktoosisisaldus 0,675ga ja lahutatakse saadud tulemus redutseerivate suhkrute sisaldusest.
- 8.3.2. Redutseerivate suhkrute (v.a laktoosi) täpseks arvutamiseks tuleb sama prooviga teha kaks lõplikku määramist. Üks analüüs tehakse punkti 5.1 kohaselt saadud lahuse ühe osaga, teine analüüs sellise lahuse ühe osaga, mis on saadud laktoosi määramise käigus selleks ettenähtud meetodiga (pärast muude suhkruliikide fermenteerimist ja selitamist).

Mõlemal juhul määratakse proovis sisalduv suhkur Luff-Schoorli meetodi abil ja arvutatakse glükoosi milligrammideks. Üks väärtus lahutatakse teisest ja vahe väljendatakse protsendimäärana proovist.

Näide

Võetud kogused vastavad mõlema määramise puhul 250 mg massiga proovile.

Esimesel juhul tarbitakse 17 ml naatriumtiosulfaadi lahust (0,1 mol/l), mis vastab 44,2 mg glükoosile; teisel juhul tarbitakse 11 ml, mis vastab 27,6 mg glükoosile.

Vahe on 16,6 mg glükoosi.

Redutseerivate suhkrute (v.a laktoosi) sisaldus glükoosiks arvutatuna on seega:

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

Väärtuste tabel 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi jaoks

ml Na₂ S₂ O₃ (0,1 mol/l) pärast kahte minutit kuumutamist ja 10 minutit keetmist

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

▼B**K. LAKTOOSI MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata laktoosi taset söödas, mis sisaldab laktoosi üle 0,5 %.

2. Põhimõte

Suhkrud lahustatakse vees. Lahus kääratakse *Saccharomyces cerevisiae* pärmiga, mis jätab laktoosi esialgsele kujule. Pärast selitamist ja filtreerimist määratakse filtraadi laktoosisisaldus Luff-Schoorli meetodi abil.

3. Reaktiivid

3.1. *Saccharomyces cerevisiae* suspensioon: 25 g värsket pärmi suspendeeritakse 100 ml vees. Suspensioon säilib külmikus kõige rohkem ühe nädala.

3.2. Carrezi lahust I: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ja 3 g jää-äädikat. Täidetakse veega 100 milliliitri.

3.3. Carrezi lahust II: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumferrotsüaniidi $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Täidetakse veega 100 milliliitri.

3.4. Luff-Schoorli reaktiiv

Ettevaatlikult segades valatakse sidrunhappe lahust (3.4.2) naatriumkarbonaadi lahusesse (3.4.3). Lisatakse vasksulfaadi lahust (3.4.1) ja täidetakse veega 1 liitri. Lastakse öö läbi settida ja filtreeritakse. Selliselt saadud reaktiivi kontsentratsiooni (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 2 mol/l). Lahuse pH on umbes 9,4.

3.4.1. Vasksulfaadi lahust: 25 g rauavaba vasksulfaati ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) lahustatakse 100 ml vees.

3.4.2. Sidrunhappe lahust: 50 g sidrunhapet ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) lahustatakse 50 ml vees.

3.4.3. Naatriumkarbonaadi lahust: 143,8 g veevaba naatriumkarbonaati lahustatakse umbes 300 ml soojas vees. Jahutatakse.

3.5. Pimsskivigraanulid, mis on keedetud soolhappes, pestud vees ning kuivatatud.

3.6. Kaaliumjodiidi lahust, 30 % (w/v)

3.7. Väävelhape, 3 mol/l.

3.8. Naatriumtiosulfaadi lahust, 0,1 mol/l.

3.9. Tärkliselahust: 1 liitri keevale veele lisatakse 5 g lahustuva tärklise ja 30 ml vee segu. Keedetakse kolm minutit, lastakse jahtuda ja vajaduse korral lisatakse säilitusainena 10 mg elavhõbejodiidi.

4. Seadmed

Temperatuurile 38–40 °C seatud termostaadiga veevann.

5. Töö käik

1 g proovi kaalutakse täpsusega 1 mg ja pannakse selline kogus proovi 100 ml mõõtekolbi. Lisatakse 25–30 ml vett. Kolb asetatakse kolmekümneks minutiks keeva vee vanni ning jahutatakse seejärel umbes 35 °C-ni. Lisatakse 5 ml pärmisuspensiooni (3.1) ja homogeneeritakse. Lastakse kolvil seista kaks tundi veevannis temperatuuril 38–40 °C. Jahutatakse umbes 20 °C-ni.

Lisatakse 2,5 ml Carrezi lahust I (3.2) ja segatakse 30 sekundit, seejärel lisatakse 2,5 ml Carrezi lahust II (3.3) ja segatakse veel 30 sekundit. Täidetakse veega 100 milliliitri, segatakse ja filtreeritakse. Pipetiga

▼B

eemaldatakse filtraadikogus, mis ei ületa 25 ml ja mis soovitatvalt sisaldab 40–80 mg laktoosi, ning kantakse see 300 ml Erlenmeyeri kolbi. Vajaduse korral täidetakse veega 25 ml-ni.

5 ml pärmisuspensiooniga (3.1) tehakse samal viisil pimekatse. Laktoosisisaldus määratakse Luff-Schoorli meetodi abil järgmiselt: lisatakse täpselt 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi (3.4) ja kaks pimsskivigraanulit (3.5). Segatakse käsitsi keskmise kõrgusega lahtise leegi kohal ja segu kuumutatakse keemiseni umbes kahe minuti jooksul. Erlenmeyeri kolb asetatakse viivitamatult asbestkattega traatvõrgule, milles on umbes 6 cm läbimõõduga auk ning mille all on eelnevalt süüdatud leek. Leeki reguleeritakse nii, et kuumutataks üksnes Erlenmeyeri kolvi põhja. Erlenmeyeri kolvi külge pannakse püstjahuti. Keedetakse täpselt kümme minutit. Jahutatakse kohe külmas vees ja umbes viie minuti möödudes tiitritakse järgmiselt.

Lisatakse 10 ml kaaliumjodiidi lahust (3.6) ja kohe seejärel lisatakse (intensiivse vahutamise ohu tõttu ettevaatlikult) 25 ml väävelhapet (3.7). Tiitritakse naatriumtiosulfaadi lahusega (3.8) kuni kahvatukollase värvuse tekkimiseni, lisatakse tärgliseindikaator (3.9) ja viiakse tiitrimine lõpule.

Sama tiitrimine ilma keetmata tehakse seguga, milles on täpselt mõõdetud 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi (3.4) ja 25 ml vett ning millele on eelnevalt lisatud 10 ml kaaliumjodiidi lahust (3.6) ja 25 ml väävelhapet (3.7).

6. Tulemuste arvutamine

Juuresoleva tabeli abil määratakse laktoosi hulk milligrammides, mis vastab erinevusele kahe tiitrimise tulemuste vahel väljendatuna naatriumtiosulfaadi milligrammides (0,1 mol/l).

Veevabale laktoosile vastav tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. Tähelepanek

Toodete puhul, mis sisaldavad üle 40 % fermenteeritavat suhkrut, kasutatakse rohkem kui 5 ml pärmisuspensiooni (3.1).

Väärtuste tabel 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi jaoks

ml Na₂ S₂ O₃ (0,1 mol/l) pärast kahte minutit kuumutamist ja 10 minutit keetmist

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

▼B

L. TÄRKLISE MÄÄRAMINE

POLARIMEETRILINE MEETOD1. **Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodi abil on võimalik kindlaks määrata tärglise ja suure molekulmassiga tärglise lagunemisproduktide taset söödas, et kontrollida deklareeritud energiasalduse (VII lisa sätted) ja nõukogu direktiivi 96/25/EÜ⁽¹⁾ järgimist.

2. **Põhimõte**

Meetod hõlmab kahte määramist. Esimese puhul töödeldakse proovi lahjendatud soolhappega. Pärast selitamist ja filtreerimist mõõdetakse polarimeetrilisel teel lahuse optiline pöörang.

Teise määramise puhul ekstraheeritakse proovi 40 % etanooliga. Pärast filtraadi hapestamist soolhappega, selitamist ja filtreerimist mõõdetakse lahuse optiline pöörang esimese määramisega analoogsel viisil.

Proovi tärglisesisaldus saadakse nimetatud kahe määramise vahe korrutamisel teadaoleva koefitsiendiga.

3. **Reaktiivid**

3.1. Soolhappe 25 % lahus (w/w), tihedus: 1,126 g/ml

3.2. Soolhappe 1,13 % lahus, (w/v)

Kontsentratsiooni tuleb kontrollida titrimise teel, kasutades 0,1 mol/l naatriumhüdrosiidi lahust koos 0,1 % (w/v) metüülpunasega 94 % etanoolis (v/v). 10 ml neutraliseerimiseks on vaja 30,94 ml NaOH (0,1 mol/l).

3.3. Carrezi lahus I: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ja 3 g jää-äädikat. Täidetakse veega 100 milliliitriini.

3.4. Carrezi lahus II: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumferrotsüaniidi $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Täidetakse veega 100 milliliitriini.

3.5. Etanooli 40 % lahus (v/v), tihedus: 0,948 g/ml 20 °C juures

4. **Seadmed**

4.1. Standardse lihühenduse ja püstjahutiga 250 ml Erlenmeyeri kolb.

4.2. Polarimeeter või sahharimeeter.

5. **Töö käik**

5.1. *Proovi ettevalmistamine*

Peenestada proov nii, et see läbib täielikult 0,5 mm ümaravadega sõela.

5.2. *Polarisatsioonitasandi optilise kogupöörangu (P või S) määramine (vt tähelepanek 7.1)*

2,5 g peenestatud proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ning pannakse see 100 ml mõõtekolbi. Lisatakse 25 ml soolhapet (3.2), loksutatakse proovi ühtlase jaotumise saavutamiseks ning lisatakse veel 25 ml soolhapet (3.2). Kolb asetatakse keeva vee vanni, loksutades seda esimesed kolm

⁽¹⁾ EÜT L 125, 23.5.1996, lk 35.

▼B

minutit tugevasti ja ühtlaselt, et vältida klompide teket. Vannis peab olema piisavalt vett, et vesi säilitaks kolvi vanni asetamisel keemistemperatuuri. Kolbi ei tohi loksutamise ajal vannist välja võtta. Täpselt 15 minuti möödudes võetakse kolb vannist välja, lisatakse 30 ml külma vett ja jahutatakse otsekohe temperatuurini 20 °C.

Lisatakse 5 ml Carrezi lahust I (3.3) ja loksutatakse umbes 30 sekundit. Seejärel lisatakse 5 ml Carrezi II lahust (3.4) ja jätkatakse loksutamist veel 30 sekundi jooksul. Täidetakse veega märgini, segatakse ja filtreeritakse. Kui filtraat ei ole täiesti selge (seda juhtub harva), korratakse määramist, kasutades rohkem Carrezi I ja II lahust (näiteks 10 ml).

Lahuse optiline pöörang mõõdetakse 200 mm torus polarimeetri või sahharimeetri abil.

5.3. *4 % etanoolis lahustuvate ainete optilise pöörangu (P' või S') määramine*

5 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega, pannakse see 100 ml mõõtekolbi ning lisatakse umbes 80 ml etanooli (3.5) (vt tähelepanek 7.2). Kolb jäetakse üheks tunniks toatemperatuurile seisma; selle aja jooksul loksutatakse kolbi kuus korda tugevasti, nii et proov seguneks põhjalikult etanooliga. Täidetakse etanooliga (3.5) märgini, segatakse ja filtreeritakse.

50 ml filtraati (vastab 2,5 g proovile) pipetitakse 250 ml Erlenmeyeri kolbi, lisatakse 2,1 ml soolhapet (3.1) ja loksutatakse tugevasti. Püstjahuti ühendatakse Erlenmeyeri kolviga ja kolb asetatakse keeva vee vanni. Täpselt 15 minuti möödudes eemaldatakse Erlenmeyeri kolb vannist, viiakse selle sisu 100 ml mõõtekolbi, loputatakse vähese külma veega ja jahutatakse temperatuurini 20 °C.

Selitatakse Carrezi I (3.3) ja II (3.4) lahuse abil, täidetakse veega märgini, segatakse, filtreeritakse ja mõõdetakse optiline pöörang punkti 5.2 teises ja kolmandas lõigus kirjeldatud viisil.

6. **Tulemuste arvutamine**

Tärglisesisaldus (%) arvutatakse järgmiselt:

6.1. *Mõõtmine polarimeetriga*

$$\text{Tärglisesisaldus (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = optiline kogupöörang kraadides

P' = 40 % etanoolis (v/v) lahustuvate ainete optiline pöörang kraadides;

$[\alpha]_D^{20}$ = puhta tärglise optiline eripöörang. Selle teguri puhul tavaliselt aktsepteeritavad arvulised väärtused on järgmised:

+185,9°: riisitärglis

+185,7°: kartulitärglis

+184,6°: maisitärglis

+182,7°: nisutärglis

+181,5°: odratärglis

+181,3°: kaeratärglis

+184,0°: muud tärglisesiigid ja tärglisesegud segajõuosõdas

6.2. *Mõõtmine sahharimeetriga*

$$\text{Tärglisesisaldus (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

▼B

- S = optiline kogupöörang sahharimeetri kraadides
 S' = 40 % etanoolis (v/v) lahustuvate ainete optiline pöörang sahharimeetri kraadides
 N = sahharoosi mass (grammides) 100 ml vees, mis annab optiliseks pööranguks 100 sahharimeetri kraadi, kui mõõtmisel kasutatakse 200 mm toru:
 16,29 g prantsuse sahharimeetrite puhul;
 26,00 g saksa sahharimeetrite puhul;
 20,00 g muude sahharimeetrite puhul;
 $[\alpha]_D^{20}$ = puhta tärglise optiline eripöörang (vt punkt 6.1).

6.3. *Korratavus*

Sama prooviga läbi viidud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevuse absoluutväärtus ei tohi alla 40 % tärglisesisalduse puhul ületada 0,4 ning suhteline erinevus 40 % või suurema tärglisesisalduse puhul 1 %.

7. **Tähelepanekud**

- 7.1. Kui proov sisaldab üle 6 % karbonaate, arvutatuna kaltsiumkarbonaadina, tuleb need enne optilise kogupöörangu määramist täpselt sobiva koguse lahjendatud väävelhappega töödeldes lagundada.
- 7.2. Suure laktoosisisaldusega toodete, näiteks pulbrilise piimavadaku või lõssipulbri puhul tuleb pärast 80 ml etanooli (3.5) lisamist toimida järgmiselt. Kolviga ühendatakse püstjahuti ning kolb asetatakse 30 minutiks 50 °C veevanni. Lastakse maha jahtuda ja jätkatakse analüüsi punktis 5.3 kirjeldatud viisil.
- 7.3. Järgmised söödatoorained võivad juhul, kui neid sisaldub loomasöödas märkimisväärses koguses, polarimeetrilise meetodiga tärglisesisalduse määramisel esile kutsuda häireid, mis võivad viia ebaõigetele tulemustele:
- (suhkru)peedisaadused, näiteks (suhkru)peedipulp, (suhkru)peedimellass, melasseeritud (suhkru)peedipulp, (suhkru)peedimellassi raba, (peedi)suhkur;
 - tsitruspulp;
 - linaseeme; linakook; linasrott;
 - rapsiseeme; rapsikook; rapsisrott; rapsiseemnekestad;
 - päevaliliseemned; päevalillesrott; osaliselt kooritud päevalillesrott;
 - koprakook; koprasrott;
 - kartulipulp;
 - veetustatud pärm;
 - inuliinirikkad tooted (nt maapirniliistakud või -jahu);
 - rasvakõrmed

M. KOGUTUHA MÄÄRAMINE

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata sööda kogutuha sisaldust.

▼ B**2. Põhimõte**

Proov tuhastatakse 550 °C juures; jääk kaalutakse.

3. Reaktiivid

Ammooniumnitraadi 20 % lahus (w/v)

4. Seadmed

4.1. Kuumutusplaat.

4.2. Elektriline termostaadiga muhvelahi.

4.3. Nelinurksed (umbes 60 × 40 × 25 mm) või ümmargused (läbimõõt: 60–75 mm, kõrgus: 20–40 mm) kvarts-, portselan- või platinatiiglid tuhastamiseks.

5. Töö käik

Umbes 5 g proovi (toodete puhul, millel on kalduvus paisuda, 2,5 g) kaalutakse 1 mg täpsusega, pannakse tuhastamistiiglisse, mis on eelnevalt kuumutatud temperatuurini 550 °C, maha jahutatud ja tareeritud. Tiigel asetatakse kuumutusplaadile ja kuumutatakse järk-järgult kuni aine söestumiseni. Tuhastatakse vastavalt punktile 5.1 või 5.2.

5.1. Tiigel asetatakse taadeldud muhvelahju, mis on seatud temperatuurile 550 °C. Tiiglit hoitakse sel temperatuuril, kuni tekib valge, helehall või punakas tuhk, milles ei paista söeosakesi. Tiigel asetatakse eksikaatorisse, lastakse jahtuda ning kaalutakse viivitamata.

5.2. Tiigel asetatakse taadeldud muhvelahju, mis on seatud temperatuurile 550 °C. Tuhastatakse 3 tundi. Tiigel asetatakse eksikaatorisse, lastakse jahtuda ning kaalutakse viivitamata. Tuhastatakse veel 30 minutit, et veenduda, et tuha mass jääb samaks (massikadu kahe järjestikuse kaalumise vahel peab olema väiksem kui 1 mg).

6. Tulemuste arvutamine

Jäägi massi arvutamiseks lahutatakse nõu mass.

Tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. Tähelepanekud

7.1. *Raskesti tuhastatavate ainete* tuhka tuleb eelnevalt tuhastada vähemalt kolm tundi, seejärel jahutada ja lisada mõned tilgad 20 % ammooniumnitraadi lahust või vett (ettevaatlikult, et vältida tuha hajumist ja tompude tekkimist). Pärast kuivatuskapis kuivatamist jätkatakse kaltsineerimist. Korratatakse seni, kuni aine on täielikult tuhastunud.

7.2. Ainete puhul, mille puhul punktis 7.1 kirjeldatud meetod *ei anna tulemust*, toimitakse järgmiselt: pärast kolmetunnist tuhastamist pannakse tuhk sooja vette ja filtreeritakse läbi väikese tuhavaba filtri. Filter ja selle sisu tuhastatakse esialgses tiiglis. Filtraat pannakse jahtunud tiiglisse, aurustatakse kuivaks, tuhastatakse ja kaalutakse.

7.3. *Õlide ja rasvade* puhul pannakse sobiva suurusega tiiglisse 25 g suurune täpselt kaalutud proov. Aine süüdatakse tuhavaba filterpaberi ribaga ja söestatakse. Pärast põlemist niisutatakse võimalikult vähese veega. Kuivatatakse ja tuhastatakse punkti 5 kohaselt.

▼B**N. SOOLHAPPES LAHUSTUMATU TUHA MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata soolhappes lahustumatute mineraalainete taset söödas. Proovi laadist sõltuvalt võib kasutada kahte meetodit.

1.1. *Meetod A:* kasutatakse orgaanilise söödatooraine ja enamuse segajõusöötade puhul.

1.2. *Meetod B:* kasutatakse mineraalsöötade ja söödasegude puhul ning selliste segasöötade puhul, kus soolhappes lahustumatute ainete sisaldus, mis määratakse meetodiga A, on üle 1 %.

2. Põhimõte

2.1. *Meetod A:* proov tuhastatakse, tuhk keedetakse soolhappes ning lahustumatu jääk filtreeritakse ja kaalutakse.

2.2. *Meetod B:* proovi töödeldakse soolhappega. Lahus filtreeritakse, jääk tuhastatakse ja selliselt saadud tuhk töödeldakse meetodi A järgi.

3. Reaktiivid

3.1. Soolhape, 3 mol/l.

3.2. Trikloroäädikhappe 20 % lahus (w/v).

3.3. Trikloroäädikhappe 1 % lahus (w/v).

4. Seadmed

4.1. Kuumutusplaat.

4.2. Elektriline termostaadiga muhvelahi.

4.3. Nelinurksed (umbes 60 × 40 × 25 mm) või ümmargused (läbimõõt: 60–75 mm, kõrgus: 20–40 mm) kvarts-, portselan- või plaatinatiiglid tuhastamiseks.

5. Töö käik**5.1. Meetod A**

Proov tuhastatakse kogutuha määramiseks ettenähtud meetodi järgi. Kasutada võib ka kõnealusel analüüsil saadud tuhka.

Tuhk pannakse 250–400 ml keeduklaasi, kasutades 75 ml soolhapet (3.1). Segu aetakse aeglaselt keema ja keedetakse vaikselt 15 minutit. Soe lahus filtreeritakse läbi tuhavaba filterpaberi ja jääk pestakse sooja veega, kuni happe reaktsioon ei ole enam nähtav. Filter jäägiga kuivatatakse ja tuhastatakse tareeritud tiiglis temperatuuril mitte alla 550 °C ja mitte üle 700 °C. Jahutatakse eksikaatoris ja kaalutakse.

5.2. Meetod B

Umbes 5 g proovi kaalutakse täpsusega 1 mg ja pannakse 250–400 ml keeduklaasi. Lisatakse üksteise järel 25 ml vett ja 25 ml soolhapet (3.1), segatakse ning oodatakse, kuni kihisemine on lõppenud. Lisatakse veel 50 ml soolhapet (3.1). Oodatakse gaaside eraldumise lõppemiseni, seejärel asetatakse keeduklaas keeva vee vanni ja hoitakse seal kolmkümmend minutit või vajaduse korral kauem lahuses sisalduva tärglise täielikuks hüdrolüüsiks. Filtreeritakse soojalt läbi tuhavaba filtri ning

▼B

filter pestakse 50 ml soojas vees (vt tähelepanek 7). Filter jäägiga asetatakse tuhastamiseks ettenähtud tiiglisse, kuivatatakse ja tuhastatakse temperatuuril mitte alla 550 °C ja mitte üle 700 °C. Tuhk pannakse 250–400 ml keeduklaasi, kasutades 75 ml soolhapet (3.1); jätkatakse vastavalt punkti 5.1 teisele lõigule.

6. **Tulemuste arvutamine**

Jäägi massi arvutamiseks lahutatakse nõu mass. Tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. **Tähelepanek**

Kui filtreerimine osutub raskeks, tehakse analüüs uuesti, sealjuures asendatakse 50 ml soolhapet (3.1) 50 ml 20 % trikloroäädikhappega (3.2) ja pestakse filter soojas 1 % trikloroäädikhappe lahuses (3.3).

O. **KARBONAATIDE MÄÄRAMINE**

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata harilikult kaltsiumkarbonaadina väljendatavate karbonaatide sisaldust enamikus söötades.

Teatavatel juhtudel (näiteks raudkarbonaadi puhul) tuleb kasutada erimeetodit.

2. **Põhimõte**

Karbonaadid lagundatakse soolhappes; tekkiv süsinikdioksiid kogutakse büretti ja gaasi ruumala võrreldakse ruumalaga, mis tekib samadel tingimustel teadaolevast kogusest kaltsiumkarbonaadist.

3. **Reaktiivid**

- 3.1. Soolhape, tihedus 1,10 g/ml.
- 3.2. Kaltsiumkarbonaat.
- 3.3. Väävelhape, umbes 0,05 mol/l, värvitud metüülpunasega.

4. **Seadmed**

Scheibler-Dietrichi aparaat (vt joonis) või samaväärne aparaat.

5. **Töö käik**

Sõltuvalt proovi karbonaadisisaldusest, kaalutakse järgmine osa proovist:

- 0,5 g toodete puhul, mis sisaldavad 50–100 % kaltsiumkarbonaadina väljendatud karbonaate;
- 1 g toodete puhul, mis sisaldavad 40–50 % kaltsiumkarbonaadina väljendatud karbonaate;
- 2–3 g muude toodete puhul.

Proovi osa pannakse aparadi spetsiaalsesse kolbi (4), mille küljes on väike purunematust materjalist toru ja mis sisaldab 10 ml soolhapet (3.1), ning kolb ühendatakse aparadiga. Kraan (5) keeratakse nii, et toru (1) oleks ühenduses välisõhuga. Kasutades tõstetavat toru (2), mis on täidetud väävelhappega (3.3) ja ühendatud büreti (1) külge, viiakse vedeliku tase nullmargini. Torude (1) ja (3) ühendamiseks keeratakse kraani (5) ning kontrollitakse, et vedeliku tase on nullis.

Soolhape (3.1) juhitakse kolbi (4) kallutades aeglaselt proovi osa peale. Rõhu võrdsustamiseks langetatakse toru (2). Kolbi (4) raputatakse, kuni süsinikdioksiidi eraldumine on täielikult lõppenud.

Rõhu taastamiseks viiakse vedelik torudes (1) ja (2) samale tasemele. *Mõne minuti* möödudes, kui gaasi hulk on konstantne, loetakse tulemus.

Samades tingimustes tehakse kontrollkatse 0,5 g kaltsiumkarbonaadiga (3.2).

▼ B**6. Tulemuste arvutamine**

Kaltsiumkarbonaadina väljendatud karbonaatide sisaldus arvutatakse järgmise valemi abil:

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

kus:

X = kaltsiumkarbonaadina väljendatud karbonaatide protsendimäär (w/w) proovis;

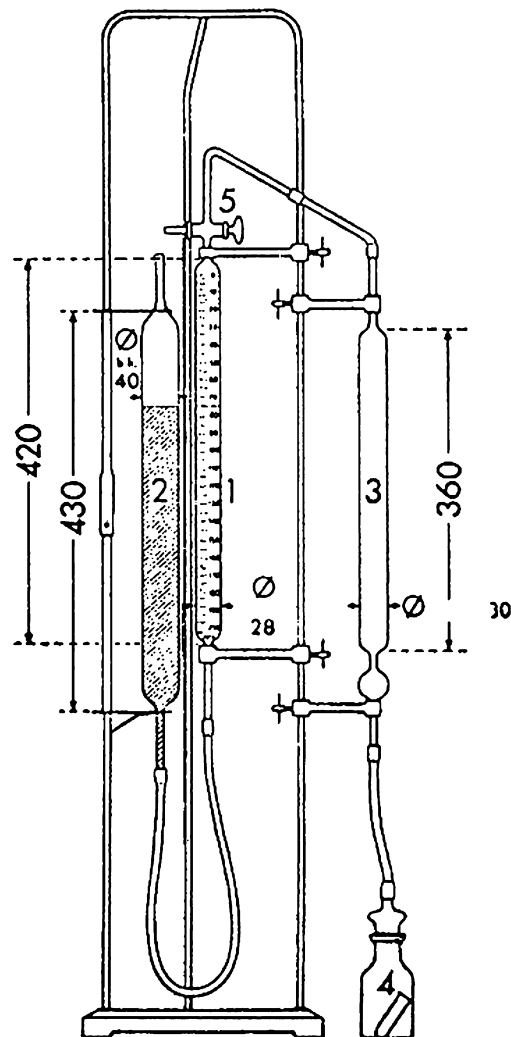
V = proovi osast saadud CO₂ milliliitrites;

V₁ = 0,5 g CaCO₃-st saadud CO₂ milliliitrites;

m = proovi osa mass grammides.

7. Tähelepanekud

- 7.1. Kui proovi osa kaalub üle 2 g, lisatakse enne katset kolbi (4) 15 ml destilleeritud vett ja segatakse. Kontrollkatse jaoks võetakse sama kogus vett.
- 7.2. Kui kasutatava aparadi maht erineb Scheibler-Dietrichi aparadi mahust, tuleb proovist ja kontrollainest võetud osad ning tulemuste arvutamist vastavalt kohandada.

SCHEIBLER-DIETRICH APARAAT CO₂ MÄÄRAMISEKS

(mõõtmised millimeetrites)

▼B**P. ÜLDFOSFORI MÄÄRAMINE****FOTOMEETRILINE MEETOD****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata üldfosfori sisaldust sötöades. See sobib eriti hästi väikese fosforisisaldusega toodete analüüsimiseks. Teatavatel juhtudel (suure fosforisisaldusega toodete puhul) võib kasutada gravimeetrilist meetodit.

2. Põhimõte

Proov mineraliseeritakse kas kuivtuhastamise (orgaanilise sööda puhul) või märgtuhastamise (mineraalsete ühendite ja vedelsööda puhul) teel ja pannakse happelahusesse. Lahust töödeldakse molübdovanadaatrektiiviga. Sel viisil saadud kollase lahuse optilist tihedust mõõdetakse spektrofotomeetriga lainepikkusel 430 nm.

3. Reaktiivid

3.1. Kaltsiumkarbonaat.

3.2. Soolhape, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (umbes 6 mol/l).

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

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

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

3.6. Molübdovanadaatrektiiv: liitrises mõõtekolvis segatakse 200 ml ammooniumheptamolübdadaadi lahust (3.6.1), 200 ml ammooniummonovanadaadi lahust (3.6.2) ja 134 ml lämmastikhapet (3.4). Kolb täidetakse veega märgini.

3.6.1. Ammooniumheptamolübdadaadi lahus: 100 g ammooniumheptamolübdadaadi ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) lahustatakse soojas vees. Lisatakse 10 ml ammooniumhüdrosiidi (tihedus: 0,91 g/ml) ja täidetakse veega kuni 1 liitrini.

3.6.2. Ammooniummonovanadaadi lahus: 2,35 g ammooniummonovanadaadi NH_4VO_3 lahustatakse 400 ml kuumas vees. Pidevalt segades lisatakse aeglaselt 20 ml lahjendatud lämmastikhapet (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) ja täidetakse veega kuni 1 liitrini.

3.7. Fosfori standardlahus, 1 mg/ml: vees lahustatakse 4,387 grammi kaaliumdivesinikfosfaati KH_2PO_4 . Täidetakse veega 1 liitrini.

4. Seadmed

4.1. Kvarts-, portselan- või plaatinatiigid tuhastamiseks.

4.2. Temperatuurile 550 °C seatud termostaadiga elektriline muhvelahi.

4.3. 250 ml Kjeldahli kolb.

4.4. Mõõtelkolvid ja gradueeritud pipetid.

4.5. Spektrofotomeeter.

4.6. 16 mm diameetriga katseklaasid, millel on 14,5 mm diameetriga korgid; maht: 25–30 ml.

5. Töö käik**5.1. Lahuse valmistamine**

Sõltuvalt proovi laadist valmistatakse lahus punkti 5.1.1 või 5.1.2 kohaselt.

5.1.1. Tavaline menetlus

1 g või rohkem proovi kaalutakse täpsusega 1 mg. Uuritav proov pannakse Kjeldahli kolbi, lisatakse 20 ml väävelhapet (3.5), raputatakse,

▼B

et aine seguneks täielikult happega ja et see ei sadestuks kolvi seinte külge, kuumutatakse ja hoitakse 10 minutit keemistemperatuuril. Lastakse veidi jahtuda, lisatakse 2 ml lämmastikhapet (3.4), kuumutatakse kergelt, lastakse veidi jahtuda, lisatakse veel veidi lämmastikhapet (3.4) ja viiakse tagasi keemistemperatuurile. Menetlust korratakse värvusetu lahuse saamiseni. Jahutatakse, lisatakse veidi vett, vedelik dekanteeritakse 500 ml mõõtekolbi, loputades Kjeldahli kolbi sooja veega. Lastakse jahtuda, täidetakse kuni märgini veega, homogeneenitakse ja filtreeritakse.

5.1.2. **Proovid, mis sisaldavad orgaanilisi aineid ja milles ei leidu kaltsiumdivesinikfosfaati ega magneesiumdivesinikfosfaati**

Tuhastustiigilise pannakse umbes 2,5 g proovi, mis on kaalutud 1 mg täpsusega. Uuritavat proovi segatakse, kuni see on täielikult segunenud 1g kaltsiumkarbonaadiga (3.1). Tuhastatakse temperatuurile 550 °C seatud kuivatuskapis kuni valge või halli tuha saamiseni (võib sisaldada veidi sütt). Tuhk pannakse 250 ml keeduklaasi. Lisatakse 20 ml vett ja soolhapet (3.2) kuni kihisemise lakkamiseni. Lisatakse veel 10 ml soolhapet (3.2). Keeduklaas pannakse liivavannile ja aurustatakse kuivaks, et silikaadid muutuksid lahustumatuks. Jääk lahustatakse uuesti 10 ml lämmastikhappes (3.3) ja keedetakse liivavannil või kuumutusplaadil 5 minutit, ilma et see kuivaks aurustuks. Vedelik dekanteeritakse 500 ml mõõtekolbi, loputades keeduklaasi mitu korda kuuma veega. Lastakse jahtuda, täidetakse kuni märgini veega, homogeneenitakse ja filtreeritakse.

5.2. *Värvuse arendamine ja optilise tiheduse mõõtmine*

Punkti 5.1.1 või 5.1.2 kohaselt saadud filtraadi alikvoot lahjendatakse nii, et fosfori kontsentratsioon oleks kuni 40 µg/ml. 10 ml seda lahust pannakse katseklaasi (4.6) ja lisatakse 10 ml molübdovanadaatreaktiivi (3.6). Homogeneenitakse ja lastakse seista temperatuuril 20 °C vähemalt 10 minutit. Saadud lahuse optilist tihedust mõõdetakse spektrofotomeetriga lainepikkusel 430 nm, lisades 10 ml molübdovanadaatreaktiivi (3.6) 10 ml veele.

5.3. *Kalibreerimiskõver*

Standardlahusest (3.7) valmistatakse lahused, mis sisaldavad 1 ml kohta 5, 10, 20, 30 ja 40 µg fosforit. Igast lahusest võetakse 10 ml ja lisatakse sellele 10 ml molübdovanadaatreaktiivi (3.6). Homogeneenitakse ja lastakse seista temperatuuril 20 °C vähemalt 10 minutit. Optiline tihedus mõõdetakse punkti 5.2 kohaselt. Optiliste tiheduste ja vastavate fosforikoguste põhjal joonestatakse kalibreerimiskõver. Kontsentratsioonide puhul, mis jäävad vahemikku 0–40 µg/ml, on kõver lineaarne.

6. **Tulemuste arvutamine**

Uuritavas proovis sisalduv fosforikogus määratakse kalibreerimiskõvera abil.

Tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— 3 % suuremast väärtusest fosforisisalduse puhul, mis on väiksem kui 5 %;

— absoluutväärtusena väljendatult 0,15 % fosforisisalduse puhul, mis on vähemalt 5 %.

▼B**Q. KLORIIDIDEST PÄRIT KLOORI MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata kloori kogust vees lahustuvates kloriidides, mida harilikult väljendatakse naatriumkloriidina. Meetodit kasutatakse kõigi söötade puhul.

2. Põhimõte

Kloriidid lahustatakse vees. Kui toode sisaldab orgaanilisi aineid, see selitatakse. Lahus hapestatakse kergelt lämmastikhappega ja kloriidid sadestatakse hõbekloriidina hõbenitraadilahuse abil. Hõbenitraadi ülekogus tiitritakse ammooniumtiotsüanaadi lahusega, kasutades Volhardi meetodit.

3. Reaktiivid

3.1. Ammooniumtiotsüanaadi lahus, 0,1 mol/l.

3.2. Hõbenitraadi lahus, 0,1 mol/l.

3.3. Ammooniumraudsulfaadi $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ küllastunud lahus.

3.4. Lämmastikhape, tihedus: 1,38 g/ml.

3.5. Dietüüleeter.

3.6. Atsetoon.

3.7. Carrezi lahus I: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ja 3 g jää-äädikat. Täidetakse veega 100 milliliitriini.

3.8. Carrezi lahus II: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumferrotsüaniidi $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Täidetakse veega 100 milliliitriini.

3.9. Kloriidivaba ja kloriide mitte absorbeeriv aktiivsüsi.

4. Seadmed

Segisti (trummel): umbes 35 kuni 40 p/min.

5. Töö käik**5.1. Lahuse valmistamine**

Sõltuvalt proovi laadist valmistatakse lahus punkti 5.1.1, 5.1.2 või 5.1.3 kohaselt.

Samal ajal tehakse *pimekatse*, jättes välja analüüsitava proovi.

5.1.1. Proovid, mis ei sisalda orgaanilisi aineid

Alla 10 g proovi, mis ei sisalda kloriididena rohkem kui 3 g kloori, kaalutakse täpsusega 1 mg. See pannakse 400 ml veega 500 ml mõõtekolbi temperatuuril ligikaudu 20 °C. Segatakse trumlis 30 minutit, täidetakse veega kuni märgini, homogeneeritakse ja filtreeritakse.

5.1.2. Orgaanilist ainet sisaldavad proovid, välja arvatud punktis 5.1.3 loetletud tooted

Umbes 5 g proovi kaalutakse täpsusega 1 mg ja pannakse 1 g aktiivsõega 500 ml mõõtekolbi. Lisatakse 400 ml vett temperatuuriga ligikaudu 20 °C ja 5 ml Carrezi lahust I (3.7), segatakse ning lisatakse 5 ml Carrezi lahust II (3.8). Segatakse trumlis 30 minutit, täidetakse veega kuni märgini, homogeneeritakse ja filtreeritakse.

▼B

- 5.1.3. Kuumtöödeldud söödad, linakoogid ja -jahu, lina-jahurikkad tooted ja muud taimeliimi- või kolloidaineterikkad tooted (näiteks dekstriinituditärklis)

Lahus valmistatakse punkti 5.1.2 kohaselt, kuid seda ei filtreerita. Dekanteeritakse (vajaduse korral tsentrifuugitakse), eemaldatakse 100 ml supernatanti ja kantakse 200 ml mõõtekolbi. Segatakse atsetooniga (3.6), täidetakse lahustiga kuni märgini, homogeneeritakse ja filtreeritakse.

- 5.2. *Tiitrimine*

Sõltuvalt arvatavast kloorisisaldusest kantakse pipeti abil Erlenmeyeri kolbi 25–100 ml punkti 5.1.1, 5.1.2 või 5.1.3 kohaselt saadud filtraati. Alikvoot ei tohi sisaldada rohkem kui 150 mg kloori (Cl). Vajaduse korral lahjendatakse vähemalt 50 ml veega, lisatakse 5 ml lämmastikhapet (3.4), 20 ml ammoniumraudsulfaadi küllastunud lahust (3.3) ja nullmärgini täidetud büreti abil kaks tilka ammoniumtiotsüanaadi lahust (3.1). Büreti abil lisatakse hõbenitraadi lahust (3.2), nii et saadakse ülekogus 5 ml. Lisatakse 5 ml dietüületrit (3.5) ja loksutatakse tugevalt sademe koaguleerimiseks. Hõbenitraadi ülekogus tiitritakse ammoniumtiotsüanaadi lahusega (3.1), kuni punakaspruun värvus püsib ühe minuti.

6. **Tulemuste arvutamine**

Koriini (X) kogus, väljendatuna protsendimäärana naatriumkloriidist, arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

V_1 = lisatud 0,1 mol/l hõbenitraadi lahuse kogus milliliitrites;

V_2 = tiitrimiseks kasutatud 0,1 mol/l ammoniumtiotsüanaadi lahuse kogus milliliitrites;

m = proovi mass.

Kui pimekatse näitab 0,1 mol/l hõbenitraadi lahuse tarbimist, lahutatakse see väärtus kogusest ($V_1 - V_2$).

7. **Tähelepanekud**

- 7.1. Tiitrida võib ka potentsiomeetriliselt.
- 7.2. Väga õli- ja rasvarikaste toodete puhul rasvatustatakse proov eelnevalt dietüüleetri või petrooleetriga.
- 7.3. Kalajahu puhul võib tiitrida Mohri meetodi abil.



IV LISA

SÖÖDAS LUBATUD SÖÖDALISANDITE TASEME KONTROLLIMISE
ANALÜÜSIMETODID

A. A-VITAMIINI MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata A-vitamiini (retinooli) kogust söödas ja eelsegudes. A-vitamiini all mõistetakse täielikult *trans*-konfiguratsioonis retinüülalkoholi ja selle *cis*-isomeere, nii nagu need määratakse käesoleva meetodiga. A-vitamiini sisaldust väljendatakse rahvusvahelistes ühikutes (RÜ) kilogrammi kohta. Üks RÜ vastab 0,300 µg täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini alkoholi või 0,344 µg täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini atsetaadi või 0,550 µg täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaadi aktiivsusele.

Kvantifikatsiooni piir on 2 000 RÜ A-vitamiini kilogrammi kohta.

2. Põhimõte

Proov hüdrolüüsitakse kaaliumhüdroksiidi etanoolilahusega ja A-vitamiin ekstraheeritakse petrooleetrisse. Lahusti aurustatakse ja jääk lahustatakse metanoolis ning vajadusel lahjendatakse nõutud kontsentratsioonini. A-vitamiini sisaldus määratakse pööratud faasi kõrgefektiivse vedelkromatograafia (RP-HPLC) meetodiga, kasutades UV- või fluorestsentsdetektorit. Kromatograafilised parameetrid valitakse nii, et täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini alkohol ja selle *cis*-isomeerid jääksid lahutamata.

3. Reaktiivid

- 3.1. Etanool, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petrooleeter, keemivahemik 40–60 °C
- 3.3. Metanool
- 3.4. Kaaliumhüdroksiidi lahus, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Naatriumaskaarbaadi lahus, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (vt tähelepanek 7.7)
- 3.6. Naatriumsulfiid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Naatriumsulfiidi lahus, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ glütseroolis, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (kui $x = 9$) (vt tähelepanek 7.8)
- 3.7. Fenoolftaleiini lahus, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ etanoolis (3.1)
- 3.8. 2-propanool
- 3.9. HPLC liikuv faas: metanooli (3,3) ja vee segu, nt 980 + 20 (v+v). Täpne vahekord määratakse kasutatava kolonni parameetrite järgi.
- 3.10. Hapnikuvaba lämmastik
- 3.11. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini atsetaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega, nt $2,80 \times 10^6 \text{ RÜ/g}$
- 3.11.1. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini atsetaadi põhilahus: 50 mg A-vitamiini atsetaati (3.11) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja pannakse see 100 ml mõõtekolbi. Lahustatakse 2-propanoolis (3.8) ja täidetakse sama lahustiga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 1 400 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktidele 5.6.3.1.
- 3.12. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega, nt $1,80 \times 10^6 \text{ RÜ/g}$

▼B

3.12.1. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaadi põhilahus: 80 mg A-vitamiini palmitaati (3.12) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja pannakse 100 ml mõõtekolbi. Lahustatakse 2-propanoolis (3.8) ja täidetakse sama lahustiga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 1 400 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktidele 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*tert*-butüül-4-metüülfenool (BHT) (vt tähelepanek 7.5).

4. Seadmed

4.1. Vaakumpöördaurusti

4.2. Tumedast klaasist nõud

4.2.1. Lihvavaga lamedapõhjalised või koonilised kolvid, 500 ml

4.2.2. Lihvkorgiga kitsakaelalised mõõtkolvid 10, 25, 100 ja 500 ml

4.2.3. Lihvkorgiga koonilised jaotuslehtid, 1 000 ml

4.2.4. Lihvavaga pirnkolvid, 250 ml

4.3. Lihvühendusega Allihni tagasivoolujahuti, ümbrise pikkus 300 mm, gaasitoru adapteriga

4.4. Kurdfilterpaber faaside eraldamiseks, diameeter 185 mm (nt Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. HPLC-seadmed sissepritesüsteemiga

4.5.1. Vedelikkromatograafia kolonn, 250 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 5 või 10 µm, või samaväärne (lahutuskriteerium: ainult üks piik kõigi retinooli isomeeride jaoks antud HPLC tingimustel)

4.5.2. Muudetava lainepikkusega UV- või fluorestsentsdetektor

4.6. Spektrofotomeeter 10 mm kvartsküvetidega

4.7. Magnetseguriga veevann

4.8. Ekstraktsiooniseade (vt joonis 1), mis koosneb:

4.8.1. 1-liitrisest lihvava ja lihvkorgiga klaassilindrist;

4.8.2. lihviga klaasotsakust, mis on varustatud kõrvaltoruga ja keskelt läbi mineva üles-alla nihutatava toruga. Nihutataval torul peab olema U-kujuline alumine ots ja teises otsas düüs, nii et silindris oleva vedeliku ülemist kihti oleks võimalik viia üle jaotuslehtrisse.

5. Töö käik

Märkus: A-vitamiin on tundlik (UV-) valguse ja oksüdeerumise suhtes. Kõik toimingud tuleb teostada valguse ja hapniku juurdepääsuta (kasutades tumedast klaasist või alumiiniumfooliumiga kaetud nõusid ja voolutades lämmastikuga). Ekstraheerimise ajal tuleb vedeliku kohal olev õhk asendada lämmastikuga (üleriõhu vältimiseks tuleb korki aeg-ajalt kergitada).

5.1. *Proovi ettevalmistamine*

Proov jahvatatakse kuumenemist vältides nii peeneks, et see läheks läbi 1 mm avadega sõela. Jahvatamine peab toimuma **vahetult** enne kaalumist ja seebistamist, vastasel juhul võib esineda A-vitamiini kadusid.

▼B5.2. *Seebistamine*

500 ml lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (4.2.1) kaalutakse 1 mg täpsusega 2–25 g proovi, sõltuvalt A-vitamiini sisaldusest. Seejärel lisatakse ringliigutustega segades 130 ml etanooli (3.1), umbes 100 mg BHT (3.13), 2 ml naatriumaskorbaadi lahust (3.5) ja 2 ml naatriumsulfiidi lahust (3.6). Kolvi otsa ühendatakse tagasivoolujahuti (4.3) ja kolb pannakse magnetseguriga veevanni (4.7). Kuumutatakse keemiseni ja keedetakse tagasivoolujahuti all 5 minutit. Seejärel lisatakse läbi jahuti (4.3) 25 ml kaaliumhüdrosiidi lahust (3.4) ja lastakse segamisel keeda tagasivoolujahuti all veel 25 minutit, voolutades nõrgalt lämmastikuga. Seejärel loputatakse jahutit umbes 20 ml veega ja jahutatakse kolvi sisu toatemperatuurini.

5.3. *Ekstraheerimine*

Seebistamislahus viiakse dekanteerimise teel kvantitatiivselt üle 1 000 ml jaotuslehtrisse (4.2.3) või ekstraktsiooniseadmesse (4.8), loputades kokku 250 ml veega. Seebistamiskolbi loputatakse järjest 25 ml etanooli (3.1) ja 100 ml petrooleetriga (3.2) ja viiakse ka need vedelikukogused üle jaotuslehtrisse või ekstraktsiooniseadmesse. Vee ja etanooli vahekord ühendatud lahuses peab olema umbes 2:1. Raputatakse tugevasti kaks minutit ja lastakse kaks minutit selgineda.

5.3.1. *Ekstraheerimine jaotuslehtriiga (4.2.3)*

Kui kihid on eraldunud (vt tähelepanek 7.3), kantakse petrooleetri kiht üle teise jaotuslehtrisse (4.2.3). Seda ekstraheerimist korratakse kaks korda 100 ml petrooleetriga (3.2) ja kaks korda 50 ml petrooleetriga (3.2).

Ühendatud ekstrakte pestakse jaotuslehtris kergelt loksutades (et vältida emulsiooni tekkimist) kaks korda 100 ml veekogustega ja seejärel korduval raputamisel veel 100 ml veekogustega, kuni vesi ei muuda enam värvust fenoolftaleiini lahuse (3.7) lisamisel (tavaliselt piisab neljakordsest pesemisest). Emulgeerunud vee kõrvaldamiseks filtreeritakse pestud ekstrakt läbi kuiva faasieraldusfiltri (4.4) 500 ml mõõtekolbi (4.2.2). Jaotuslehtrit ja filtrit loputatakse 50 ml petrooleetriga (3.2), täidetakse petrooleetriga (3.2) märgini ja segatakse hästi.

5.3.2. *Ekstraheerimine ekstraktsiooniseadmega (4.8)*

Kui kihid on eraldunud (vt tähelepanek 7.3), pannakse klaasilindri (4.8.1) korgi asemele lihviga klaasotsak (4.8.2) ja seatakse nihutatava toru U-kujuline alumine ots nii, et see oleks täpselt faaside eralduspinna kohal. Tõstes gaasivooliku kaudu kõrvaltorusse juhitava lämmastiku rõhku, viiakse ülemine petrooleetri kiht üle 1 000 ml jaotuslehtrisse (4.2.3). Klaasilindrisse lisatakse 100 ml petrooleetrit (3.2), suletakse korgiga ja raputatakse tugevasti. Kihtidel lastakse eralduda ja ülemine kiht viiakse üle jaotuslehtrisse nagu ennegi. Ekstraheerimist korratakse järgmise 100 ml petrooleetriga (3.2), siis kaks korda 50 ml petrooleetri (3.2) kogustega ja viiakse petrooleetri kihid üle jaotuslehtrisse.

Ühendatud petrooleetri ekstrakte pestakse, nagu on kirjeldatud punktis 5.3.1, ja jätkatakse, nagu seal on kirjeldatud.

5.4. *Proovilahuse valmistamine HPLC jaoks*

Petrooleetri lahuse (punktist 5.3.1 või 5.3.2) alikvoot viiakse pipetiga 250 ml pirkolbi (4.2.4). Vaakumpöördaurustiga (4.1) aurustatakse lahusti vaakumis peaaegu kuivaks veevanni temperatuuril mitte üle 40 °C. Kolbi lastakse lämmastik (3,10) kuni atmosfäärirõhuni ja kolb eemaldatakse vaakumpöördaurustist. Järelejäänud lahusti eemaldatakse

▼B

lämmastikuga (3.10) voolutades ja jääk lahustatakse kohe teadaoleva koguse (10–100 ml) metanooliga (3.3) (A-vitamiini kontsentratsioon peab jääma vahemikku 5–30 RÜ/ml).

5.5. *Määramine HPLC-ga*

A-vitamiin eraldatakse C₁₈ pöördfaaskolonnil (4.5.1) ja mõõdetakse selle kontsentratsioon UV-detektori (325 nm) või fluorestsentsdetektori (ergastamine: 325 nm, emissioon: 475 nm) (4.5.2) abil.

Punktis 5.4 saadud metanoolilahuse alikvoot (nt 20 µl) süstitakse kolonni ja elueeritakse liikuva faasiga (3.9). Arvutatakse sama proovilahuse erinevate süstide keskmine piigi kõrgus (pindala) ja kalibreerimislahuste (5.6.2) mitme süsti keskmised piigi kõrgused (pindalad).

HPLC tingimused

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused).

Vedelikromatograafia kolonn (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 5 või 10 µm või samaväärne
Liikuv faas (3.9):	Metanooli (3.3) ja vee segu, nt 980 + 20 (v + v).
Voolukiirus:	1–2 ml/min
Detektor (4.5.2):	UV-detektor (325 nm) või fluorestsentsdetektor (ergastamine: 325 nm/emissioon: 475 nm)

5.6. *Kalibreerimine*5.6.1. *Standardtöölaluste ettevalmistamine*

20 ml A-vitamiini atsetaadi põhilahust (3.11.1) või 20 ml A-vitamiini palmitaadi põhilahust (3.12.1) pipetatakse 500 ml lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (4.2.1) ja hüdrolüüsitakse vastavalt punktile 5.2, kuid ilma BHT-d lisamata. Seejärel ekstraheeritakse petrooleetriga (3.2) vastavalt punktile 5.3 ja täidetakse kuni 500 ml-ni petrooleetriga (3.2). 100 ml seda ekstrakti aurustatakse vaakumpöördaurustil (vt 5.4) peaaegu kuivaks, järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (3.10) voolutades ja jääk lahustatakse uuesti 10,0 ml metanooliga (3.3). Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 560 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktile 5.6.3.3. Standardtöölahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

2,0 ml kõnealust standardtöölahust pipetatakse 20 ml mõõtekolbi, täidetakse metanooliga (3.3) kuni märgini ja segatakse. Selle **lahjendatud** standardtöölahuse nominaalne kontsentratsioon on 56 RÜ A-vitamiini ml kohta.

5.6.2. *Kalibreerimislahuste valmistamine ja kalibreerimisgraafiku koostamine*

1,0, 2,0, 5,0 ja 10,0 ml **lahjendatud** standardtöölahust viiakse üle 20 ml mõõtekolbidesse, täidetakse metanooliga (3.3) märgini ja segatakse. Nende lahuste nominaalsed kontsentratsioonid on 2,8, 5,6, 14,0 ja 28,0 RÜ A-vitamiini ml kohta.

Igast kalibreerimislahusest süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse keskmised piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kasutades keskmisi piigi kõrgusi (pindalad) ja arvestades UV-kontrolli (5.6.3.3) tulemusi.

▼B

5.6.3. Standardlahuste UV-standardiseerimine

5.6.3.1. A-vitamiini atsetaadi põhilahus

2,0 ml A-vitamiini atsetaadi põhilahust (3.11.1) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi (4.2.2) ja täidetakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 56 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. 3,0 ml A-vitamiini atsetaadi lahjendatud lahust pipetatakse 25 ml mõõtekolbi ja täidetakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Spektrofotomeetriga (4.6) mõõdetakse selle lahuse UV-spekter 2-propanooli (3.8) suhtes vahemikus 300–400 nm. Ekstinktsioonimaksimum peab olema vahemikus 325–327 nm.

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

$$\text{RÜ A-vitamiini milliliitri kohta} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ A-vitamiini atsetaadi puhul} = 1\,530 \text{ lainepikkusel } 326 \text{ nm } 2\text{-propanoolis})$$

5.6.3.2. A-vitamiini palmitaadi põhilahus

2,0 ml A-vitamiini palmitaadi põhilahust (3.12.1) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi (4.2.2) ja täidetakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 56 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. 3,0 ml A-vitamiini palmitaadi põhilahust pipetatakse 25 ml mõõtekolbi ja täidetakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Spektrofotomeetriga (4.6) mõõdetakse selle lahuse UV-spekter 2-propanooli (3.8) suhtes vahemikus 300–400 nm. Ekstinktsioonimaksimum peab olema vahemikus 325–327 nm.

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

$$\text{RÜ A-vitamiini milliliitri kohta} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ A-vitamiini palmitaadi puhul} = 957 \text{ lainepikkusel } 326 \text{ nm } 2\text{-propanoolis})$$

5.6.3.3. A-vitamiini standardtöölahus

3,0 ml A-vitamiini **lahjendamata** standardtöölahust, mis on valmistatud vastavalt punktile 5.6.1, pipetatakse 50 ml mõõtekolbi (4.2.2) ja täidetakse 2-propanooliga (3.8) märgini. 5,0 ml seda lahust pipetatakse 25 ml mõõtekolbi ja täidetakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Spektrofotomeetriga (4.6) mõõdetakse selle lahuse UV-spekter 2-propanooli (3.8) suhtes vahemikus 300–400 nm. Ekstinktsioonimaksimum peab olema vahemikus 325–327 nm.

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

$$\text{RÜ A-vitamiini milliliitri kohta} = E_{325} \times 18,3$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ A-vitamiini alkoholi puhul} = 1\,821 \text{ lainepikkusel } 325 \text{ nm } 2\text{-propanoolis})$$

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse A-vitamiini piigi keskmisest kõrgusest (pindalast) määratakse kalibreerimisgraafiku (5.6.2) järgi proovilahuse kontsentratsioon RÜ-des milliliitri kohta.

▼B

Proovi A-vitamiini sisaldus w RÜ-des kilogrammi kohta arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = A-vitamiini kontsentratsioon proovilahuses (5.4) RÜ/ml;
 V_1 = proovilahuse (5.4) kogus milliliitrites;
 V_2 = vastavalt punktile 5.4 võetud alikvoodi kogus milliliitrites;
 m = kaalutise mass grammides.

7. Tähelepanekud

- 7.1. Madala A-vitamiini kontsentratsiooniga proovides võib olla kasulik ühendada kahe seebistamiseks võetud koguse (kaalutud kogus: 25 g) petrooleetri ekstraktid üheks proovilahuseks, mida määratakse HPLC-ga.
- 7.2. Analüüsiks võetud proov ei tohi sisaldada üle 2 g rasva.
- 7.3. Faaside halva eraldumise puhul lisatakse emulsiooni lõhkumiseks umbes 10 ml etanooli (3.1).
- 7.4. Kalamaksaõli ja muude puhaste rasvade puhul tuleb seebistamise aega pikendada 45–60 minutini.
- 7.5. BHT asemel võib kasutada hüdrokiinoni.
- 7.6. Normaalfaasikoloni kasutamisel on võimalik retinooli isomeeride eraldumine. Kuid sel juhul tuleb arvutustes kõigi *cis*- ja *trans*-isomeeride piigi kõrgused (pindalad) summeerida.
- 7.7. Naatriumaskorbaadi lahuse asemel võib kasutada umbes 150 mg askorbiinhapet.
- 7.8. Naatriumsulfiidi lahuse asemel võib kasutada umbes 50 mg etüleendiamiintetraatsetaati.
- 7.9. A-vitamiini analüüsimisel piimaasendajates tuleb erilist tähelepanu pöörata
 - seebistamisele (5.2): tulenevalt proovi rasvasisaldusest võib olla vaja suurendada kaaliumhüdroksiidi lahuse kogust (3.4);
 - ekstraheerimisele (5.3): tulenevalt emulsioonide sisaldusele võib olla vajalik muuta vee ja etanooli vahekorda 2:1.

Et kontrollida rakendatud analüüsimeetodi tulemuste usaldusväärsust kõnealuse spetsiifilise põhiaine (piimaasendaja) puhul, tuleb täiendava kaalutisega teha saagisekatse. Kui saagise määr on alla 80 %, esitatakse analüüsi tulemus saagisekorrektsiooniga.

8. Korratavus

Sama proovi kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 15 % suuremast tulemusest.

▼B9. Ühisuuringu tulemused ⁽¹⁾

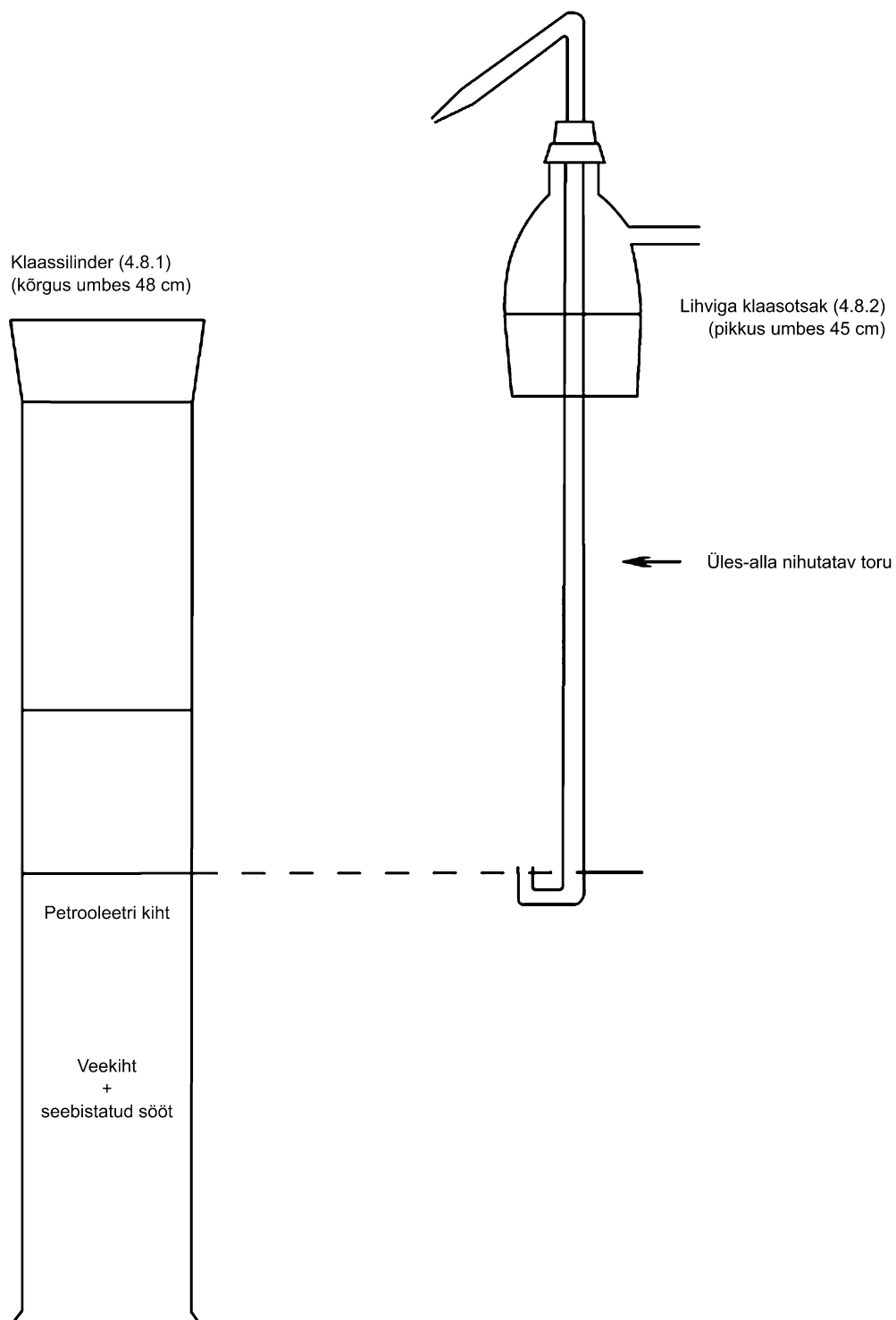
	Eelsegu	Sööda eelsegu	Mineraalkonts- entraat	Valgurikas sööt	Pörsasööt
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
keskmine [RÜ/kg]	17,02 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁶	537 100	151 800	18 070
s _r [IU/kg]	0,51 x 10 ⁶	0,039 x 10 ⁶	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	1,43 x 10 ⁶	0,109 x 10 ⁶	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [IU/kg]	1,36 x 10 ⁶	0,069 x 10 ⁶	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	3,81 x 10 ⁶	0,193 x 10 ⁶	129 640	64 568	10 119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

- L = laboratooriumide arv
 n = üksikmääramiste arv
 s_r = korratavust iseloomustav standardhälve
 S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve
 r = korratavus
 R = reprodutseeritavus
 CV_r = korratavuse variatsioonikordaja
 CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

⁽¹⁾ Määramised viis läbi ühenduse Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) söötade uurimisgrupp.

▼B

Joonis 1: Ekstraktsiooniseade (4.8)



▼B**B. E-VITAMIINI MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata E-vitamiini kogust söödas ja eelsegudes. E-vitamiini sisaldust väljendatakse DL- α -tokoferoolatsetaadi milligrammides kilogrammi kohta. 1 mg DL- α -tokoferoolatsetaati vastab 0,91 mg DL- α -tokoferoolile (E-vitamiin).

Kvantifitseerimispiir on 2 mg E-vitamiini kilogrammi kohta. See kvantifitseerimispiir on saavutatav vaid fluorestsentsdetektoriga. UV-detektoriga on kvantifitseerimispiir 10 mg/kg.

2. Põhimõte

Proov hüdrolüüsitakse kaaliumhüdroksiidi etanoolilahusega ja E-vitamiin ekstraheeritakse petrooleetrisse. Lahusti aurustatakse ja jääk lahustatakse metanoolis ning vajadusel lahjendatakse nõutud kontsentratsioonini. E-vitamiini sisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (RP-HPLC) meetodiga, kasutades UV- või fluorestsentsdetektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Etanool, $\sigma = 96\%$

3.2. Petrooleeter, keemisivahemik 40–60 °C

3.3. Metanool

3.4. Kaaliumhüdroksiidi lahus, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$

3.5. Naatriumaskorbaadi lahus, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (vt tähelepanek 7.7)

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

3.6.1. Naatriumsulfiidi lahus, $c = 0,5\text{ mol}/\text{l}$ glütseroolis, $\beta = 120\text{ g}/\text{l}$ (kui $x = 9$) (vt tähelepanek 7.8)

3.7. Fenoolftaleiini lahus, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ etanoolis (3.1)

3.8. HPLC liikuv faas: metanooli (3.3) ja vee segu, nt 980 + 20 (v+v). Täpne vahekord määratakse kasutatava kolonni parameetrite järgi.

3.9. Hapnikuvaba lämmastik

3.10. DL- α -tokoferoolatsetaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega

3.10.1. DL- α -tokoferoolatsetaadi põhilahus: 100 ml mõõtekolbi kaalutakse 0,1 mg täpsusega 100 mg DL- α -tokoferoolatsetaati (3.10). Lahustatakse etanoolis (3.1) ja täidetakse sama lahustiga märgini. 1 ml seda lahust sisaldab 1 mg DL- α -tokoferoolatsetaati. (UV-kontrolli kohta vt 5.6.1.3; stabiliseerimise kohta vt tähelepanek 7.4).

3.11. DL- α -tokoferool, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega

3.11.1. DL- α -tokoferooli põhilahus: 100 ml mõõtekolbi kaalutakse 0,1 mg täpsusega 100 mg DL- α -tokoferooli (3.11). Lahustatakse etanoolis (3.1) ja täidetakse sama lahustiga märgini. 1 ml seda lahust sisaldab 1 mg DL- α -tokoferooli. (UV-kontrolli kohta vt 5.6.2.3; stabiliseerimise kohta vt tähelepanek 7.4).

3.12. 2,6-di-*tert*-butüül-4-metüülfenool (BHT) (vt tähelepanek 7.5).

4. Seadmed

4.1. Filter-pöördaurusti

▼B

- 4.2. Tumedast klaasist nõud
 - 4.2.1. Lihvavaga lamedapõhjalised või koonilised kolvid, 500 ml
 - 4.2.2. Lihvkorgiga kitsakaelalised mõõtkolvid 10, 25, 100 ja 500 ml
 - 4.2.3. Lihvkorgiga koonilised jaotuslehtid, 1 000 ml
 - 4.2.4. Lihvavaga pirnkolvid, 250 ml
- 4.3. Lihvühendusega Allihni tagasivoolujahuti, ümbrise pikkus 300 mm, gaasitoru adapteriga
- 4.4. Kurdfilterpaber faaside eraldamiseks, diameeter 185 mm (nt Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. HPLC-seadmed sissepritsesüsteemiga
 - 4.5.1. Vedelikkromatograafia kolonn, 250 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 5 või 10 µm või samaväärne
 - 4.5.2. Muudetava lainepikkusega UV- või fluorestsentsdetektor
- 4.6. Spektrofotomeeter 10 mm kvartsküvetidega
- 4.7. Magnetseguriga veevann
- 4.8. Ekstraktsiooniseade (vt joonis 1), mis koosneb:
 - 4.8.1. 1-liitrisest lihvava ja lihvkorgiga klaasilindrist;
 - 4.8.2. lihviga klaasotsakust, mis on varustatud kõrvaltoruga ja keskelt läbi mineva üles-alla nihutatava toruga. Nihutataval torul peab olema U-kujuline alumine ots ja teises otsas düüs, nii et silindris oleva vedeliku ülemist kihti oleks võimalik viia üle jaotuslehtrisse.

5. Töö käik

Märkus: E-vitamiin on tundlik (UV-) valguse ja oksüdeerumise suhtes. Kõik toimingud tuleb teostada valguse ja hapniku juurdepääsuta (kasutades tumedast klaasist või alumiiniumfooliumiga kaetud nõusid ja voolutades lämmastikuga). Ekstraheerimise ajal tuleb vedeliku kohal olev õhk asendada lämmastikuga (ülerõhu vältimiseks tuleb korki aeg-ajalt kergitada).

5.1. Proovi ettevalmistamine

Proov jahvatatakse kuumenemist vältides nii peeneks, et see läheks läbi 1 mm avadega sõela. Jahvatamine peab toimuma **vahetult** enne kaalumist ja seebistamist, vastasel juhul võib esineda E-vitamiini kadusid.

5.2. Seebistamine

500 ml lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (4.2.1) kaalutakse 0,01 g täpsusega 2–25 g proovi, sõltuvalt E-vitamiini sisaldusest. Seejärel lisatakse ringliigutustega segades 130 ml etanooli (3.1), umbes 100 mg BHT (3.12), 2 ml naatriumaskorbaadi lahust (3.5) ja 2 ml naatriumsulfiidi lahust (3.6). Kolvi otsa ühendatakse jahuti (4.3) ja kolb pannakse magnetseguriga veevanni (4.7). Kuumutatakse keemiseni ja keedetakse tagasivoolujahuti all 5 minutit. Seejärel lisatakse läbi jahuti (4.3) 25 ml kaaliumhüdrosiidi lahust (3.4) ja lastakse segamisel keeda tagasivoolujahuti all veel 25 minutit, voolutades nõrgalt lämmastikuga. Seejärel loputatakse jahutit umbes 20 ml veega ja jahutatakse kolvi sisu toatemperatuurini.

▼B5.3. *Ekstraheerimine*

Seebistamislahus viiakse dekanteerimise teel kvantitatiivselt üle 1 000 ml jaotuslehtrisse (4.2.3) või ekstraktsiooniseadmesse (4.8), loputades kokku 250 ml veega. Seebistamiskolbi loputatakse järjest 25 ml etanooli (3.1) ja 100 ml petrooleetriga (3.2) ja viiakse ka need vedelikukogused üle jaotuslehtrisse või ekstraktsiooniseadmesse. Vee ja etanooli vahekord ühendatud lahuses peab olema umbes 2:1. Raputatakse tugevasti kaks minutit ja lastakse kaks minutit selgineda.

5.3.1. *Ekstraheerimine jaotuslehtriiga (4.2.3)*

Kui kihid on eraldunud (vt tähelepanek 7.3), kantakse petrooleetri kiht üle teise jaotuslehtrisse (4.2.3). Seda ekstraheerimist korratakse kaks korda 100 ml petrooleetriga (3.2) ja kaks korda 50 ml petrooleetriga (3.2).

Ühendatud ekstrakte pestakse jaotuslehttris kergelt loksutades (et vältida emulsiooni tekkimist) kaks korda 100 ml veekogustega ja seejärel korduval raputamisel veel 100 ml veekogustega, kuni vesi ei muuda enam värvust fenoolftaleiini lahuse (3.7) lisamisel (tavaliselt piisab neljakordsest pesemisest). Emulgeerunud vee kõrvaldamiseks filtreeritakse pestud ekstrakt läbi kuiva faasieraldusfiltri (4.4) 500 ml mõõtekolbi (4.2.2). Jaotuslehtrit ja filtrit loputatakse 50 ml petrooleetriga (3.2), täidetakse petrooleetriga (3.2) märgini ja segatakse hästi.

5.3.2. *Ekstraheerimine ekstraktsiooniseadmega (4.8)*

Kui kihid on eraldunud (vt tähelepanek 7.3), pannakse klaasilindri (4.8.1) korgi asemele lihviga klaasotsak (4.8.2) ja seatakse nihutatava toru U-kujuline alumine ots nii, et see oleks täpselt faaside eralduspinna kohal. Tõstes gaasivooliku kaudu kõrvaltorusse juhitava lämmastiku rõhku, viiakse ülemine petrooleetri kiht üle 1 000 ml jaotuslehtrisse (4.2.3). Klaasilindrisse lisatakse 100 ml petrooleetrit (3.2), suletakse korgiga ja raputatakse tugevasti. Kihtidel lastakse eralduda ja ülemine kiht viiakse üle jaotuslehtrisse nagu ennegi. Ekstraheerimist korratakse järgmise 100 ml petrooleetriga (3.2), siis kaks korda 50 ml petrooleetri (3.2) kogustega ja viiakse petrooleetri kihid üle jaotuslehtrisse.

Ühendatud petrooleetri ekstrakte pestakse, nagu on kirjeldatud punktis 5.3.1, ja jätkatakse, nagu seal on kirjeldatud.

5.4. *Proovilahuse valmistamine HPLC jaoks*

Petrooleetri lahuse (punktist 5.3.1 või 5.3.2) alikvoot viiakse pipetiga 250 ml pirnkolbi (4.2.4). Vaakumpöördaurustiga (4.1) aurustatakse lahusti vaakumis peaaegu kuivaks veevanni temperatuuril mitte üle 40 °C. Kolbi lastakse lämmastik (3.9) kuni atmosfäärirõhuni ja kolb eemaldatakse vaakumpöördaurustist. Järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (3.9) voolutades ja jääk lahustatakse kohe teadaoleva koguse (10–100 ml) metanooliga (3.3) (DL- α -tokoferooli kontsentratsioon peab jääma vahemikku 5–30 $\mu\text{g/ml}$).

5.5. *Määramine HPLC-ga*

E-vitamiin eraldatakse C_{18} pöördfaasikolonnil (4.5.1) ja mõõdetakse selle kontsentratsioon fluorestsentsdetektori (ergastamine: 295 nm, emissioon: 330 nm) (4.5.2) abil või UV-detektoriga (292 nm) (4.5.2).

▼B

Punktis 5.4 saadud metanoolilahuse alikvoot (nt 20 µl) süstitakse kolonni ja elueeritakse liikuva faasiga (3.8). Arvutatakse sama proovilahuse erinevate süstide keskmine piigi kõrgus (pindala) ja kalibreerimislahuste (5.6.2) mitme süsti keskmised piigi kõrgused (pindalad).

HPLC tingimused

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused).

Vedelikkromatograafia kolonn (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 5 või 10 µm või samaväärne
Liikuv faas (3.8):	Metanooli (3.3) ja vee segu, nt 980 + 20 (v + v).
Voolukiirus:	1–2 ml/min
Detektor (4.5.2):	Fluorestsentsdetektor (ergastamine: 295 nm/emissioon: 330 nm) või UV-detektor (292 nm)

5.6. Kalibreerimine (*DL-α-tokoferoolatsetaadi* või *DL-α-tokoferooli*)5.6.1. *DL-α-tokoferoolatsetaadi* standard5.6.1.1. *Standardtöölahuse valmistamine*

25 ml *DL-α-tokoferoolatsetaadi* põhilahust (3.10.1) viiakse pipetiga 500-milliliitrisse lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (4.2.1) ja hüdrolüüsitakse vastavalt punktis 5.2 kirjeldatule. Seejärel ekstraheeritakse petrooleetriga (3.2) vastavalt punktis 5.3 kirjeldatule ja täidetakse petrooleetriga 500 milliliitri. 25 ml seda ekstrakti aurustatakse vaakumpöördaurustil (vt 5.4) peaaegu kuivaks, järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (3.9) voolutades ja jääk lahustatakse uuesti 25,0 ml metanooliga (3.3). Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 45,5 µg *DL-α-tokoferooli* ml kohta, mis on ekvivalentne 50 µg *DL-α-tokoferoolatsetaadi* ml kohta. Standardtöölahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

5.6.1.2. *Kalibreerimislahuste valmistamine ja kalibreerimisgraafiku koostamine*

1,0, 2,0, 4,0 ja 10,0 ml standardtöölahust viiakse üle 20-milliliitrisse mõõtkolbidesse, täidetakse metanooliga (3.3) märgini ja segatakse. Nende lahuste nominaalsed kontsentratsioonid on 2,5, 5,0, 10,0 ja 25,0 µg/ml *DL-α-tokoferoolatsetaadi*, s.o 2,28, 4,55, 9,10 ja 22,8 µg/ml *DL-α-tokoferooli*.

Igast kalibreerimislahusest süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse keskmised piigi kõrgused (pindalad). Kasutades keskmisi piigi kõrgusi (pindalad), koostatakse kalibreerimisgraafik.

5.6.1.3. *DL-α-tokoferoolatsetaadi põhilahuse (3.10.1) UV-standardiseerimine*

5,0 ml *DL-α-tokoferoolatsetaadi* põhilahust (3.10.1) lahjendatakse etanooliga 25,0 milliliitri ja mõõdetakse spektrofotomeetriga (4.6) selle lahuse UV-spekter vahemikus 250–320 nm etanooli (3.1) suhtes.

Neeldumismaksimum peaks olema 284 nm:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ etanoolis } 284 \text{ nm juures}$$

Sellisel lahjendusel peaks ekstinktsiooni väärtus olema vahemikus 0,84–0,88.

▼B5.6.2. DL- α -tokoferooli standard

5.6.2.1. Standardtöölause valmistamine

2 ml DL- α -tokoferooli põhilahust (3.11.1) viiakse pipetiga 50 ml mõõtekolbi, lahustatakse metanoolis (3.3) ja täidetakse metanooliga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 40 μg DL- α -tokoferooli ml kohta, mis on ekvivalentne 44,0 μg DL- α -tokoferoolatsetaadiga ml kohta. Standardtöölause tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

5.6.2.2. Kalibreerimislahuste valmistamine ja kalibreerimisgraafiku koostamine

1,0, 2,0, 4,0 ja 10,0 ml standardtöölausest viiakse üle 20-milliliitristesse mõõtkolbidesse, täidetakse metanooliga (3.3) märgini ja segatakse. Nende lahuste nominaalsed kontsentratsioonid on 2,0, 4,0, 8,0 ja 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tokoferooli, s.o 2,20, 4,40, 8,79 ja 22,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tokoferoolatsetaati.

Igast kalibreerimislahusest süstitakse 20 μl mitu korda kolonni ja määratakse keskmised piigi kõrgused (pindalad). Kasutades keskmisi piigi kõrgusi (pindalaid), koostatakse kalibreerimisgraafik.

5.6.2.3. DL- α -tokoferooli põhilahuse (3.11.1) UV-standardiseerimine

2,0 ml DL- α -tokoferoolatsetaadi põhilahust (3.11.1) lahjendatakse etanooliga 25,0 milliliitri ja mõõdetakse spektrofotomeetriga (4.6) selle lahuse UV-spekter vahemikus 250–320 nm etanooli (3.1) suhtes. Neeldumismaksimum peaks olema 292 nm:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ etanoolis } 292 \text{ nm juures}$$

Sellisel lahendusel peab ekstinktsiooni väärtus olema 0,6.

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse E-vitamiini piikide keskmisest kõrgusest (pindalast) määratakse kalibreerimisgraafiku (5.6.1.2 või 5.6.2.2) järgi proovilahuse kontsentratsioon μg -des milliliitri kohta (arvutatuna α -tokoferoolatsetaadina).

Proovi E-vitamiini sisaldus w mg-des kilogrammi kohta arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = E-vitamiini kontsentratsioon (α -tokoferoolatsetaadina) μg -des milliliitri kohta proovilahuses (5.4);

V_1 = proovilahuse (5.4) kogus milliliitrites;

V_2 = punktis 5.4 võetud alikvoodi ruumala milliliitrites;

m = kaalutise mass grammides.

7. Tähelepanekud

7.1. Madala E-vitamiini kontsentratsiooniga proovides võib olla kasulik ühendada kahe seebistamiseks võetud koguse (kaalutud kogus: 25 g) petrooleetri ekstraktid üheks proovilahuseks, mida määratakse HPLC-ga.

7.2. Analüüsiks võetud proov ei tohi sisaldada üle 2 g rasva.

7.3. Faaside halva eraldumise puhul lisatakse emulsiooni lõhkumiseks umbes 10 ml etanooli (3.1).

▼B

- 7.4. Pärast DL- α -tokoferoolatsetaadi või DL- α -tokoferooli lahuste spektrofotomeetrilist mõõtmist vastavalt punktidele 5.6.1.3 või 5.6.2.3 lisatakse lahusele (3.10.1 või 3.10.2) umbes 10 mg BHT-d (3.12) ja hoitakse lahust külmkapis (kõlblikkusaeg maksimaalselt neli nädalat).
- 7.5. BHT asemel võib kasutada hüdrokiinoni.
- 7.6. Normaalfaasikolonne kasutamisel on võimalik α -, β -, γ - ja δ -tokoferooli eraldumine.
- 7.7. Naatriumaskorbaadi lahuse asemel võib kasutada umbes 150 mg askorbiinhapet.
- 7.8. Naatriumsulfiidi lahuse asemel võib kasutada umbes 50 mg etüleendiamiintetraatsetaati.
- 7.9. E-vitamiini atsetaat hüdrolüüsib aluselises keskkonnas väga kiiresti ning on seepärast väga tundlik oksüdeerumise suhtes, eriti selliste mikroelementide nagu raua ja vase olemasolul. Kui eelsegudes määratud E-vitamiini kogus on suurem kui 5 000 mg/kg, võib selle tagajärjeks olla E-vitamiini lagunemine. Seepärast soovitatakse kindluse mõttes kasutada HPLC meetodit, mis hõlmab E-vitamiini vormi ensümaatilist mineraliseerimist ilma aluselise seebistamise sammuta.

8. Korratavus

Sama proovi kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 15 % suuremast tulemusest.

9. Ühisuuringu tulemused ⁽¹⁾

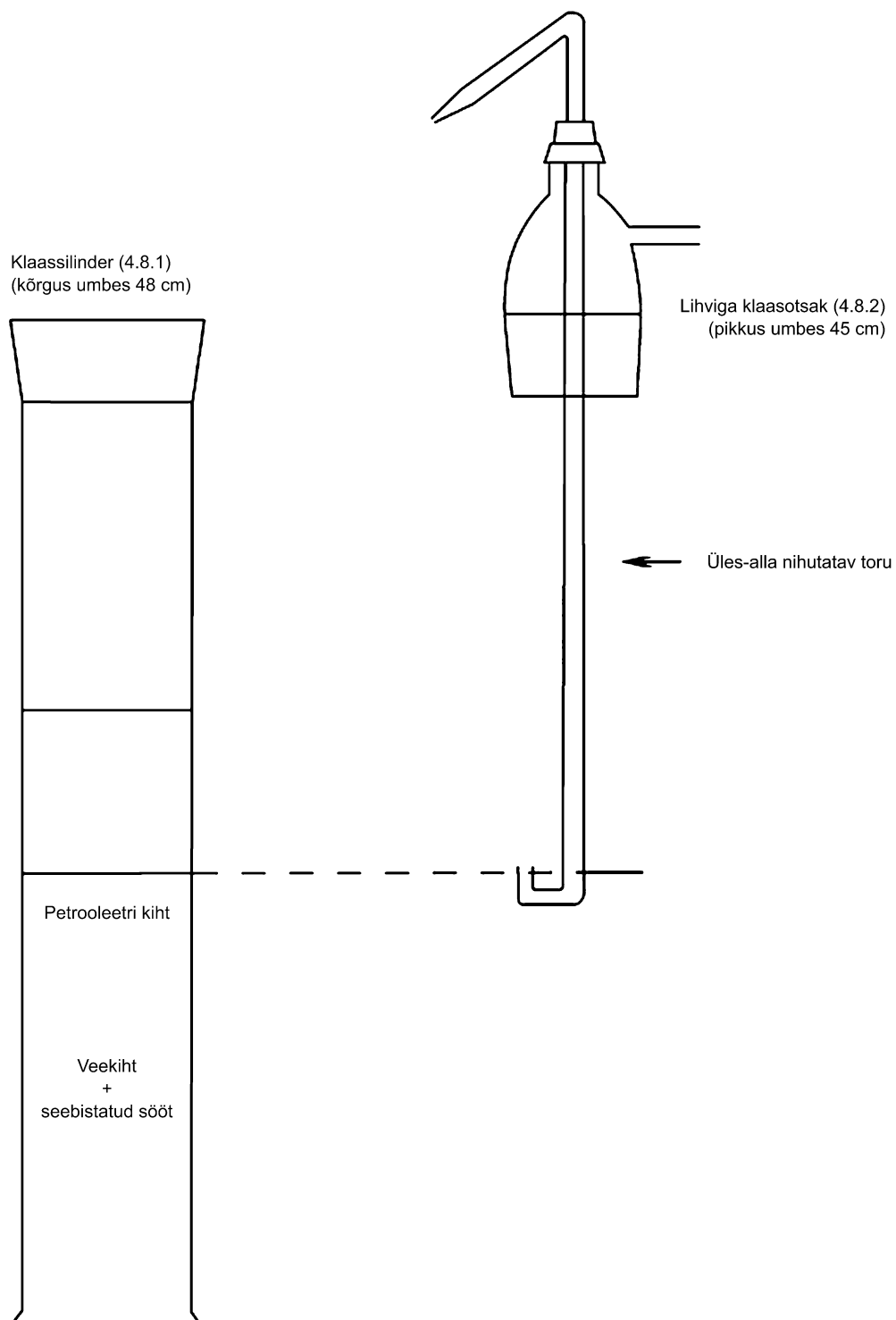
	Eelsegu	Sööda eelsegu	Mineraalkontsentraat	Valgurikas sööt	Pörsasööt
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
keskmine [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
S_R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

- L = laboratooriumide arv
n = üksikmääramiste arv
 s_r = korratavust iseloomustav standardhälve
 s_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve
r = korratavus
R = reprodutseeritavus
 CV_r = korratavuse variatsioonikordaja
 CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

⁽¹⁾ Määramised viis läbi ühenduse Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) söötade uurimisgrupp.

▼B

Joonis 1: Ekstraktsiooniseade (4.8)



▼B**C. MIKROELEMENTIDE RAUA, VASE, MANGAANI JA TSINGI MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata söödas mikroelemente: rauda, vaske, mangaani ja tsinki. Kvantifikatsioonipiirid on:

- raud (Fe): 20 mg/kg;
- vask (Cu): 10 mg/kg;
- mangaan (Mn): 20 mg/kg;
- tsink (Zn): 20 mg/kg.

2. Põhimõte

Proov lahustatakse soolhappes pärast võimaliku orgaanilise aine hävitamist. Elemendid raud, vask, mangaan ja tsink määratakse aatomabsorptsioonspektromeetriaga pärast asjakohast lahendamist.

3. Reaktiivid*Sissejuhatavad märkused*

Reaktiivide ja analüütiliste lahuste ettevalmistamiseks kasutatakse katioonivaba vett, mis on saadud kas vee bidestilleerimisel borosilikaat- või kvartsklaasist destillaatoris või kahekordsel töötlemiselioonvahetusvaikudega.

Reaktiivid peavad olema vähemalt analüütiliselt puhtad. Määratava elemendi puudumist tuleb kontrollida pimekatse abil. Vajaduse korral tuleb reaktiive täiendavalt puhastada.

Allpool kirjeldatud standardlahuste asemel võib kasutada müügil olevaid standardlahuseid, tingimusel, et neil on garantii ning neid on enne kasutamist kontrollitud.

- 3.1. Soolhape (d: 1,19 g/ml).
- 3.2. Soolhape (6 mol/l).
- 3.3. Soolhape (0,5 mol/l).
- 3.4. 38–40 % vesinikfluoriidhape (v/v), mille raua (Fe) sisaldus on alla 1 mg/l ning jääk pärast aurustamist alla 10 mg/l (sulfaadina).
- 3.5. Väävelhape (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Vesinikperoksiid (ligikaudu 100 mahuosa hapnikku (30 massiprotsenti)).
- 3.7. Raua standardlahus (1 000 µg Fe/ml), mis on valmistatud järgmiselt (või kasutatakse samaväärset müügil olevat lahust): 1 g raudtraati lahustatakse 200 ml 6 mol/l soolhappes (3.2), lisatakse 16 ml vesinikperoksiidi (3.6) ning täidetakse veega ühe liitrini.
- 3.7.1. Raua standardtöölalus (100 µg Fe/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (3.7) veega vahekorras 1:9.
- 3.8. Vase standardlahus (1 000 µg Cu/ml), mis on valmistatud järgmiselt (või kasutatakse samaväärset müügil olevat lahust):
 - 1 g vasepulbrit lahustatakse 25 ml 6 mol/l soolhappes (3.2), lisatakse 5 ml vesinikperoksiidi (3.6) ning täidetakse veega ühe liitrini.
- 3.8.1. Vase standardtöölalus (10 µg Cu/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (3.8) veega vahekorras 1:9 ning seejärel lahjendades saadud lahust veega vahekorras 1:9.

▼ B

- 3.9. Mangaani standardlahus (1 000 µg Mn/ml), mis on valmistatud järgmiselt (või kasutatakse samaväärset müügil olevat lahust):
- 1 g mangaanipulbrit lahustatakse 25 ml 6 mol/l soolhappes (3.2) ning täidetakse veega ühe liitrini.
- 3.9.1. Mangaani standardtöölalus (10 µg Mn/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (3.9) veega vahekorras 1:9 ning seejärel lahjendades saadud lahust veega vahekorras 1:9.
- 3.10. Tsingi standardlahus (1 000 µg Zn/ml), mis on valmistatud järgmiselt (või kasutatakse samaväärset müügil olevat lahust):
- 1 g riba- või lehttsinki lahustatakse 25 ml 6 mol/l soolhappes (3.2) ning täidetakse veega ühe liitrini.
- 3.10.1. Tsingi standardtöölalus (10 µg Zn/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (3.10) veega vahekorras 1:9 ning seejärel lahjendades saadud lahust veega vahekorras 1:9.
- 3.11. Lantaankloriidi lahus: 12 g lantaanoksiidi lahustatakse 150 ml vees, lisatakse 100 ml 6 mol/l soolhapet (3.2) ning täidetakse veega ühe liitrini.

4. Seadmed

- 4.1. Temperatuuriregulaatori ja võimalusel salvestiga muhvelahi.
- 4.2. Klaasnõud peavad olema vastupidavast borosilikaatklaasist ning on soovitatav kasutada vahendeid, mida kasutatakse üksnes mikroelementide määramiseks.
- 4.3. Aatomabsorptsioonispektrofotomeeter, mis vastab kasutatava meetodi nõuetele, võttes arvesse tundlikkust ning täpsust nõutud ulatuses.

5. Töö käik⁽¹⁾**5.1. Orgaanilist ainet sisaldavad proovid**

- 5.1.1. Tuhastamine ja lahuse analüüsiks ettevalmistamine⁽²⁾
- 5.1.1.1. 5–10 g proovi kaalutakse 0,2 mg täpsusega, asetatakse kvarts- või platinatiiglisse (vt märkus b), kuivatatakse kuivatuskapis 105 °C juures ning tiigel asetatakse külma muhvelahju (4.1). Ahi suletakse (vt märkus c) ning järk-järgult tõstetakse ligikaudu 90 minuti jooksul temperatuur 450–475 °C-ni. Kõnealust temperatuuri hoitakse 4–16 tundi (nt õõ jooksul), et eemaldada söeosakesed, ning seejärel ahi avatakse ning lastakse jahtuda (vt märkus d).

⁽¹⁾ Kasutada võib ka teisi lagundamismeetodeid, kui on kindlaks tehtud, et nendega saadakse samaväärsed tulemused (näiteks rõhu all mikrolainelagundamine).

⁽²⁾ Haljassööt (värske või kuivatatud) võib sisaldada suurel hulgal taimset räni, mis võib hoida kinni mikroelemente ning tuleb eemaldada. Kõnealuse sööda proovide korral tuleb seega järgida järgmist muudetud menetlust. Sooritada punktis 5.1.1.1 osutatud toiming kuni filtreerimiseni. Lahustumatut jääki sisaldav filterpaber pestakse kaks korda keeva veega ning asetatakse kvarts- või platinatiiglisse. Põletatakse muhvelahjus (4.1) temperatuuril alla 550 °C, kuni kõik söeosakesed on täielikult kadunud. Lastakse jahtuda, lisatakse mõned tilgad vett ning 10–15 ml vesinikfluoriidhapet (3.4) ning aurustatakse kuivaks ligikaudu 150 °C juures. Kui jääkides on siiski räni, lahustatakse see uuesti paaril milliliitris vesinikfluoriidhappes (3.4) ning aurustatakse kuivaks. Lisatakse viis tilka vävelhapet (3.5) ning kuumutatakse, kuni enam ei eraldu valget auru. Pärast 5 ml 6 mol/l soolhappe (3.2) ja ligikaudu 30 ml vee lisamist kuumutatakse, lahus filtreeritakse 250 ml mõõtekolbi ning täidetakse kuni määrgini veega (HCl kontsentratsioon ligikaudu 0,5 mol/l). Mikroelementide määramist jätkatakse punktist 5.1.2.

▼B

Tuhka niisutatakse veega ja viiakse üle 250 ml keelduklaasi. Tiigel pestakse ligikaudu 5 ml soolhappega (3.1) ning soolhape lisatakse aeglaselt ja ettevaatlikult keeduklaasi (CO₂ moodustumise tõttu võib tekkida tugev reaktsioon). Soolhape (3.1) lisatakse tilkhaaval ja loksutades kuni kihisemise lakkamiseni. Aurustatakse kuivaks, aeg-ajalt klaaspulgaga segades.

Järgmisena lisatakse jäägile 15 ml 6 mol/l soolhapet (3.2) ning ligikaudu 120 ml vett. Segatakse klaaspulgaga, mis jäetakse keeduklaasi, ning keeduklaas kaetakse kellaklaasiga. Segu lastakse aeglaselt keema ning hoitakse keemistemperatuuril, kuni lahustuvat tuhka ei ole enam näha. Filtreeritakse läbi tuhavaba filterpaberi ning filtraat kogutakse 250 ml mõõtekolbi. Keeduklaas ja filter pestakse 5 ml kuuma 6 mol/l soolhappega (3.2) ning kaks korda keeva veega. Mõõtekolb täidetakse kuni märgini veega (HCl kontsentratsioon ligikaudu 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Kui filtris olev jääk on must (süsinik), pannakse see tagasi ahju ning tuhastatakse uuesti 450–475 °C juures. Kõnealune tuhastamine, mis võtab aega vaid mõne tunni (3–5 tundi), on lõppenud, kui tuhk on valge või peaaegu valge. Jääk lahustatakse ligikaudu 2 ml soolhappega (3.1), aurustatakse kuivaks ning sellele lisatakse 5 ml 6 mol/l soolhapet (3.2). Segu kuumutatakse, lahus filtreeritakse mõõtekolbi ning täidetakse kuni märgini veega (HCl kontsentratsioon ligikaudu 0,5 mol/l).

Märkused

- a) Mikroelementide määramisel on oluline pöörata tähelepanu saastamissohule, eriti tsingi, vase ja rauaga. Seetõttu ei tohi proovide ettevalmistamisel kasutatavad vahendid sisaldada kõnealuseid metalle.

Üldise saastamisohu vähendamiseks tuleb töötada tolmuvas keskkonnas hoolikalt puhastatud vahendite ja korralikult pestud klaasnõudega. Tsingi määramine on eriti tundlik mitmete saasteallikate suhtes, nt klaasnõud, reaktiivid, tolm jne.

- b) Tuhastatava proovi mass arvutatakse sööda ligikaudse mikroelementisalduse põhjal vastavalt kasutatava spektrofotomeetri tundlikkusele. Teatavate väikese mikroelementide sisaldusega söötade puhul alustatakse 10–20 g proovist, mille lõpplahus täidetakse vaid kuni 100 ml lahuse saamiseni.
- c) Tuhastamine peab toimuma suletud ahjus õhu või hapniku juurdepääsuta.
- d) Püromeetri temperatuuri näit ei tohi ületada 475 °C.

5.1.2. Spektrofotomeetriline määramine

5.1.2.1. Kalibreerimislahuste valmistamine

Iga määratava elemendi jaoks valmistatakse punktides 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 ja 3.10.1 osutatud standardtöolahustest kalibreerimislahused, millest iga lahuse HCl kontsentratsioon on ligikaudu 0,5 mol/l ning (raua, mangaani ja tsingi korral) lantaankloriidi kontsentratsioon on samaväärne 0,1 % lantaaniga (w/v).

Valitud mikroelementide kontsentratsioonid peavad jääma kasutatava spektrofotomeetri tundlikkuse piiresse. Järgmistes tabelites on näitena esitatud tavapäraste kalibreerimislahuste koostised, kuid sõltuvalt kasutatava spektrofotomeetri tüübist ja tundlikkusest võib osutada vajalikuks valida muud kontsentratsioonid.

▼B**Raud**

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

+ 10 ml lantaankloriidi lahust (3.11) ning täidetakse veega 100 ml lahuse saamiseni.

Vask

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml standardtöölalust (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Mangaan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml standardtöölalust (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantaankloriidi lahust (3.11) ning täidetakse veega 100 ml lahuse saamiseni.

Tsink

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

+ 10 ml lantaankloriidi lahust (3.11) ning täidetakse veega 100 ml lahuse saamiseni.

5.1.2.2. Lahuse ettevalmistamine analüüsiks

Vase määramiseks saab vastavalt punktile 5.1.1 valmistatud lahust tavaliselt kohe kasutada. Kui lahuse kontsentratsioon on vaja viia kalibreerimislahuste piiresse, võib lahuse alikvoodi pipetida 100 ml mõõtekolbi ning täita margini 0,5 mol/l soolhappega (3.3).

Raua, mangaani ja tsingi määramiseks pipetatakse vastavalt punktile 5.1.1 valmistatud lahuse alikvoot 100 ml mõõtekolbi, lisatakse 10 ml lantaankloriidilahust (3.11) ning täidetakse margini 0,5 mol/l soolhappega (3.3) (vt ka punkt 8 „Tähelepanekud”).

5.1.2.3. Pimekatse

Pimekatse peab hõlmama kõiki protseduuri ettenähtud etappe, välja arvatud see, et proovimaterjal jäetakse välja. Pimekatsel ei tohi kasutada kalibreerimislahust 0.

5.1.2.4. Aatomabsorptsiooni mõõtmine

Kalibreerimislahuste ja analüüsitava lahuse aatomabsorptsiooni mõõdetakse oksüdeerivat õhk-atsetüleenleeki kasutades järgmistel lainepikkustel:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

▼B

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Iga mõõtmist tuleb teha neli korda.

5.2. *Mineraalsööt*

Kui proov ei sisalda orgaanilist ainet, ei ole eelnev tuhastamine vajalik. Toimitakse vastavalt punkti 5.1.1.1, alustades teisest lõigust. Vesinikfluoriidhappega aurustamise võib ära jätta.

6. **Tulemuste arvutamine**

Mikroelementide kontsentratsioon analüüsitavas lahuses arvutatakse kalibreerimiskõverat kasutades ning tulemus väljendatakse mikroelementide milligrammides ühe kilogrammi proovi kohta (miljondikkudes).

7. **Korratavus**

Sama analüüsija poolt sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

- absoluutväärtusena väljendatult 5 mg/kg, kui asjaomase mikroelemendi sisaldus on kuni 50 mg/kg;
- 10 % suuremast tulemusest, kui asjaomase mikroelemendi sisaldus on 50–100 mg/kg;
- absoluutväärtusena väljendatult 10 mg/kg, kui asjaomase mikroelemendi sisaldus on 100–200 mg/kg;
- 5 % suuremast tulemusest, kui asjaomase mikroelemendi sisaldus on üle 200 mg/kg.

8. **Tähelepanekud**

Suure koguse fosfaadi sisaldus võib takistada raua, mangaani ja tsingi määramist. See takistus tuleb kõrvaldada, lisades proovi lantaankloriidilahust (3.11). Kuid kui proovis on massi vahekord Ca + Mg/P > 2, siis võib lantaankloriidilahuse (3.11) lisamise analüüsitavale lahusele ja kalibreerimislahusele ära jätta.

D. HALOFUGINOONI MÄÄRAMINE

DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hüdroksü-2-piperidüül)atsetonüül]-kinasoliin-4-(3H)-oon-vesinikbromiid

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata halofuginooni kogust söödas. Määramispiir on 1 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Pärast kuuma veega töötlemist ekstraheeritakse halofuginoon vaba alusena etüülatsetaati ning eraldatakse hüdrokloriidina happe vesilahusesse. Ekstrakt puhastatakse ioonvahetuskromatograafia abil. Halofuginoonisisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikchromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. **Reaktiivid**

- 3.1. HPLC-puhtusastmega atsetonitriil
- 3.2. Amberlite XAD-2 vaik
- 3.3. Ammooniumatsetaat
- 3.4. Etüülatsetaat
- 3.5. Jää-äädikhape

▼B

- 3.6. Halofuginooni standardaine (DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hüdroksü-2-piperidüül)atsetonüül]-kinasoliin-4-(3H)-üks hüdrobromiid, E 764)
- 3.6.1. Halofuginooni põhistandardlahus, 100 µg/ml
- 50 mg halofuginooni (3.6) kaalutakse 0,1 mg täpsusega 500 ml mõõtekolbi, lahustatakse ammooniumatsetaadi puhverlahuses (3.18), täidetakse kuni märgini puhverlahusega ja segatakse. See lahus säilib pimedas 5 °C juures kolm nädalat.
- 3.6.2. Kalibreerimislahused
- 100 ml mõõtekolbidesse kantakse 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ja 6,0 ml põhistandardlahust (3.6.1). Täidetakse kuni märgini liikuva faasiga (3.21) ja segatakse. Nende lahuste halofuginoonikontsentratsioonid on vastavalt 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ja 6,0 µg/ml. 8,0 ja 10,0 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.
- 3.7. Soolhape (ρ_{20} umbes 1,16 g/ml)
- 3.8. Metanool
- 3.9. Höbenitraat
- 3.10. Naatriumaskorbaat
- 3.11. Naatriumkarbonaat
- 3.12. Naatriumkloriid
- 3.13. EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape, dinaatriumsool)
- 3.14. HPLC-puhtusastmega vesi
- 3.15. Naatriumkarbonaadi lahus, $c = 10$ g/100 ml
- 3.16. Naatriumkloriidiga küllastatud naatriumkarbonaadi lahus, $c = 5$ g/100 ml
- 50 g naatriumkarbonaati (3.11) lahustatakse vees, lahjendatakse 1 liitrini ja lisatakse kuni lahuse küllastumiseni naatriumkloriidi (3.12).
- 3.17. Soolhape, umbes 0,1 mol/l
- 10 ml soolhapet (3.7) lahjendatakse kuni 1 liitrini veega.
- 3.18. Ammooniumatsetaadi puhverlahus, umbes 0,25 mol/l
- 19,3 g ammooniumatsetaati (3.3) ja 30 ml äädikhapet (3.5) lahustatakse vees (3.14) ja lahjendatakse kuni 1 liitrini.
- 3.19. Amberlite XAD-2 vaigu ettevalmistamine
- Asjakohane kogus Amberlite'i (3.2) pestakse veega, kuni äravalatud vesifaasile tehtud höbenitraadi (3.20) test näitab, et kõik klooriioonid on eemaldatud. Vaiku pestakse 50 ml metanooliga (3.8), metanool valatakse ära ja vaik säilitatakse värskes metanoolis.
- 3.20. Höbenitraadi lahus, umbes 0,1 mol/l
- 0,17 g höbenitraati (3.9) lahustatakse 10 ml vees.
- 3.21. HPLC liikuv faas
- 500 ml atsetonitriili (3.1) segatakse 300 ml ammooniumatsetaadi puhverlahusega (3.18) ja 1 200 ml veega (3.14). Äädikhappe (3.5) abil korreeritakse pH 4,3-le. Filtreeritakse läbi 0,22 µm filtri (4,8) ja lahus degaaseeritakse (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit). See lahus säilib suletud mahutis pimedas hoituna üks kuu.

▼ B**4. Seadmed**

- 4.1. Ultrahelivann
- 4.2. Filter-pöördaurusti
- 4.3. Tsentrifuug
- 4.4. HPLC-seade muudetava lainepikkusega ultraviolet-detektoriga või dioodireadetektoriga
 - 4.4.1. Vedelikkromatograafia kolonn, 300 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm, või samaväärne
- 4.5. Klaaskolonn (300 mm × 10 mm), millel on paagutatud klaasfilter ja korkkraan
- 4.6. Klaaskiudfiltrid diameetriga 150 mm
- 4.7. Membraanfiltrid 0,45 µm.
- 4.8. Membraanfiltrid 0,22 µm.

5. Töö käik

Märkus: halofuginoon on vaba alusena leelistes ja etüülatsetaadi lahustes ebastabiilne. Seda ei tohi hoida etüülatsetaadis üle 30 minuti.

5.1. Üldsätted

- 5.1.1. Tuleb analüüsida võrdlussõota, veendumaks, et selles ei ole halofuginooni ega segavaid aineid.
- 5.1.2. Saagisekatses analüüsitakse võrdlussõota, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus halofuginooni. Kontsentratsiooni 3 mg/kg saamiseks lisatakse 10 g võrdlussõodale 300 µl põhistandardlahust (3.6.1), segatakse ja oodatakse enne ekstraheerimise (5.2) alustamist 10 minutit.

Märkus: selle meetodi puhul peab võrdlussõot olema prooviga samaaadne ja analüüsimisel ei tohi selles leiduda halofuginooni.

5.2. Ekstraheerimine

10 g ettevalmistatud proovi kaalutakse 0,1 g täpsusega 200 ml tsentrifuugiküveti, lisatakse 0,5 g naatriumaskorbaati (3.10), 0,5 g EDTAd (3.13) ja 20 ml vett ning segatakse. Küvett asetatakse 5 minutiks veevanni (80 °C). Pärast toatemperatuurini jahutamist lisatakse 20 ml naatriumkarbonaadi lahust (3.15) ja segatakse. Lisatakse kohe 100 ml etüülatsetaati (3.4) ja loksutatakse käes tugevalt 15 sekundit. Küvett asetatakse kolmeks minutiks ultrahelivanni (4.1) ning avatakse kork. Tsentrifuugitakse kaks minutit ja dekanteeritakse etüülatsetaadi faas läbi klaaskiudfiltrid (4.6) 500 ml jaotuslehtrisse. Proovi ekstraheerimist korratakse teise 100 ml etüülatsetaadi kogusega. Kogutud ekstrakte pestakse üks minut 50 ml naatriumkloriidiga küllastatud naatriumkarbonaadi lahusega (3.16) ja veekiht valatakse ära.

Orgaanilist kihti ekstraheeritakse 1 minut 50 ml soolhappega (3.17). Alumine happekiht kallatakse 250 ml jaotuslehtrisse. Orgaanilist kihti ekstraheeritakse uuesti 1,5 minutit täiendava 50 ml soolhappega ja lisatakse esimesele ekstraktile. Kogutud happeekstrakte pestakse 10 ml etüülatsetaadiga (3.4) loksutades umbes 10 sekundit.

▼B

Veekiht kantakse kvantitatiivselt 250 ml ümarkolbi ja orgaaniline faas valatakse ära. Happelahusest aurustatakse filter-pöördaurusti (4.2) abil kogu allesjäänud etüülatsetaat. Veevanni temperatuur ei tohi olla üle 40 °C. Umbes 25-millibaarises vaakumis eemaldatakse 5 minutiga temperatuuril 38 °C kogu allesjäänud etüülatsetaat.

5.3. Puhastamine

5.3.1. Amberlite'i kolonni ettevalmistamine

XAD-2 kolonn valmistatakse ette eraldi iga proovi ekstrakti jaoks. 10 g valmistatud Amberlite'i (3.19) kantakse metanooliga (3.8) klaaskoloni (4.5). Vaigukihi peale pannakse väike klaasvillatrop. Metanool kallatakse kolonnist välja ja vaiku pestakse 100 ml veega, peatades voolu, kui vedelik jõuab vaigukihi ülemise piirini. Kolonnil lastakse enne kasutamist 10 minutit tasakaalustuda. Kolonni ei tohi kunagi lasta ära kuivada.

5.3.2. Proovi puhastamine

Ekstrakt (5.2) kantakse kvantitatiivselt ettevalmistatud Amberlite'i kolonni (5.3.1), elueeritakse, valades eluaadi ära. Elueerimiskiirus ei tohi ületada 20 ml/min. Ümarkolb loputatakse 20 ml soolhappega (3.17) ja seda lahust kasutatakse vaigukoloni pesemiseks. Allesjäänud happelahus kõrvaldatakse õhuvoolu abil. Pesulahused valatakse ära. Kolonni lisatakse 100 ml metanooli (3.8) ja lastakse elueerida 5–10 ml, kogudes eluaadi 250 ml ümarkolbi. Allesjäänud metanoolil lastakse 10 minutit vaiguga tasakaalustuda ja jätkatakse elueerimist kiirusel kuni 20 ml/min, kogudes eluaadi samasse ümarkolbi. Metanool aurustatakse filter-pöördaurusti (4.2) abil, veevanni temperatuur ei tohi olla üle 40 °C. Jääk kantakse liikuva faasi (3.21) abil kvantitatiivselt 10 ml mõõtekolbi. Täidetakse liikuva faasiga kuni märgini ja segatakse. Alikvootne osa filtreeritakse läbi membraanfiltrit (4.7). See lahus hoitakse HPLC määramise (5.4) jaoks.

5.4. HPLC määramine

5.4.1. Parameetrid

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused):

Vedelikkromatograafia kolonn (4.4.1)

HPLC liikuv faas (3.21)

Voolukiirus: 1,5–2 ml/min.

Avastamise lainepikkus: 243 nm

Sissesüstitava ruumala: 40 kuni 100 µl.

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides korduvalt kalibreerimislahust (3.6.2) kontsentratsiooniga 3,0 µg/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigi kõrgused (pindalad) ja retentsiooniajad.

5.4.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (3.6.2) süstitakse korduvalt ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes ordinaatteljele kalibreerimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

▼B

5.4.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.3.2) süstitakse mitu korda samas mahus kui kalibreerimislahuste puhul ja määratakse halofuginoonipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse halofuginoonipiikide keskmise kõrguse (pindala) alusel määratakse kalibreerimisgraafiku (5.4.2) abil proovilahuse kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$).

Halofuginoonisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = proovilahuse halofuginoonikontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$);

m = kaalutise mass grammides.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. *Identsus*

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja 6,0 $\mu\text{g/ml}$ sisaldusega kalibreerimislahuse (3.6.2) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstraktile lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (3.6.2). Lisatud halofuginoonikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud halofuginoonikogus.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma üksnes halofuginoonipiigi kõrgus. Piigi laius poolal kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti halofuginoonipiigi laiusest.

7.1.2. Diodireadektoriga kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- (a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadektoriga lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;
- (b) lainepikkustel 225–300 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad proovi ja standardi piigi tipu spektrid kromatogrammil ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- (c) lainepikkustel 225–300 nm ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduv osas, tipus ja allapoole suunduv osas registreeritud spektrid erineda üksteisest nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

▼ B

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olema-solu tõestatuks.

7.2. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi kuni 3 mg/kg suuruste halofuginoonisisalduste puhul ületada 0,5 mg/kg.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga fooniproovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %.

8. **Ühisuuringu tulemused**

Korraldati ühisuuring, ⁽¹⁾ mille käigus kaheksas laboratooriumis analüüsi kolme proovi.

Tulemused

	Proov A (võrdlus- proov) Algul	Proov B (jahu)		Proov C (graanulid)	
		Algul	Kahe kuu pärast	Algul	Kahe kuu pärast
Keskmine [mg/kg]	ND	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
Sg [%]		86	74	88	75

ND = allpool avastamisläve

S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja (%)

Sg = saagis (%)

E. **ROBENIDIINI MÄÄRAMINE**

1,3-bis[(p-klorobensülideen)amino]guanidiinhüdrokloriid

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata robenidiini kogust söödas. Määramispiir on 5 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Proov ekstraheeritakse hapestatud metanooliga. Ekstrakt kuivatatakse ja selle alikvootne osa puhastatakse alumiiniumoksiidi kolonnis. Robeniidiin elueeritakse kolonnist metanooliga, kontsentreeritakse ja viiakse liikuva faasiga sobiva mahuni. Robeniidiinisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. **Reaktiivid**

3.1. Metanool

3.2. Hapestatud metanool

4,0 ml soolhapet ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) viiakse 500 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse kuni märgini metanooliga (3.1) ja segatakse. See lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

⁽¹⁾ *The Analyst* 108, 1983, lk 1252–1256.

▼B

- 3.3. HPLC-puhtusastmega atsetonitriil
- 3.4. Molekulaarsõel
- Tüüp 3A, 8–12 mešši (1,6–2,5 mm osakesed, kristalne alumosilikaat, pooride läbimõõt 0,3 mm)
- 3.5. Alumiiniumoksiid, happeline aktiivsusaste 1, kolonnkromatograafia jaoks
- 100 g alumiiniumoksiidi viiakse sobivasse anumasse ja lisatakse 2,0 ml vett. Suletakse ja loksutatakse ligikaudu 20 minutit. Hoitakse korralikult suletud anumal.
- 3.6. Kaaliumdivesinikfosfaadi lahus, $c = 0,025 \text{ mol/l}$
- 1 000 ml mõõtekolvis lahustatakse 3,40 g kaaliumdivesinikfosfaati vees (HPLC-puhtusastmega), kolb täidetakse märgini ja segatakse.
- 3.7. Dinaatriumvesinikfosfaadi lahus, $c = 0,025 \text{ mol/l}$
- Üheliitrisel mõõtekolvis lahustatakse 3,55 g veevaba dinaatriumvesinikfosfaati (või 4,45 g dihidraati või 8,95 g dodekahüdraati) vees (HPLC-puhtusastmega), kolb täidetakse märgini veega ja segatakse.
- 3.8. HPLC liikuv faas
- Segada järgmised reaktiivid:
- 650 ml atsetonitriili (3.3),
- 250 ml vett (HPLC-puhtusastmega),
- 50 ml kaaliumdivesinikfosfaadi lahust (3.6),
- 50 ml kaaliumdivesinikfosfaadi lahust (3.7).
- Filtreeritakse läbi 0,22 μm filtri (4.6) ja lahus degaseeritakse (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit).
- 3.9. Standardaine
- Puhas robenidiin: 1,3-bis[(p-klorobensülideen) amino]guanidiinhüdrokloriid.
- 3.9.1. Robenidiini põhistandardlahus: 300 $\mu\text{g/ml}$
- 30 mg robenidiini standardinet (3.9) kaalutakse 0,1 mg täpsusega. Lahustatakse hapestatud metanooliga 100 ml mõõtekolvis (3.2), täidetakse kolb märgini sama lahustiga ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi ja hoitakse pimedas kohas.
- 3.9.2. Robenidiini vahestandardlahus: 12 $\mu\text{g/ml}$
- Valatakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.9.1) 250 ml mõõtekolbi, täidetakse see liikuva faasiga (3.8) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi ja hoitakse pimedas kohas.
- 3.9.3. Kalibreerimislahused
- 50 ml mõõtekolbidesse viiakse 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ja 25,0 ml vahestandardlahust (3.9.2). Täidetakse kuni märgini liikuva faasiga (3.8) ja segatakse. Lahuste robenidiinisisaldused on vastavalt 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 ja 6,0 $\mu\text{g/ml}$. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.
- 3.10. HPLC-puhtusastmega vesi

▼ B**4. Seadmed**

4.1. Klaaskolonn

Valmistatud tumedast klaasist, korkkraaniga, ligikaudu 150 ml reservuaariga, sisemine läbimõõt 10–15 mm, kõrgus 250 mm.

4.2. Mehaaniline loksuti või magnetsegur

4.3. Filter-pöördaurusti

4.4. HPLC-seadmed erinevatel lainepikkustel registreeriva ultraviolettdetektoriga või diodireadetektoriga, mis töötab vahemikus 250–400 nm.

4.4.1. Vedelikkromatograafia kolonn: 300 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm või samaväärne

4.5. Klaaskiudfilterpaber (Whatman GF/A või samaväärne)

4.6. Membraanfiltrid 0,22 µm.

4.7. Membraanfiltrid 0,45 µm.

5. Töö käik

Märkus: robenidiin on valgustundlik. Kõikide operatsioonide puhul tuleb kasutada tumedast klaasist anumaid.

5.1. Üldsätted

5.1.1. Tuleb analüüsida võrdlussõota, veendumaks, et selles ei ole robenidiini ega teisi segavaid aineid.

5.1.2. Tuleb teha saagisekatse, analüüsides võrdlussõota (5.1.1), mida on rikastatud ligikaudu sama koguse robenidiiniga, nagu seda sisaldab proov. Et saada kontsentratsiooni 60 mg/kg, kantakse 3,0 ml põhistandardlahust (3.9.1) 250 ml koonilisse kolbi. Lahus aurustatakse lämmastikuvoolus kuni ligikaudu 0,5 ml-ni. Lisatakse 15 g võrdlussõota, segatakse ja jäetakse enne ekstraheerimist (5.2) asumist 10 minutiks seisma.

Märkus: selle meetodi puhul peab võrdlussõot olema prooviga samalaadne ja analüüsimisel ei tohi selles leiduda halofuginooni.

5.2. Ekstraheerimine

Umbes 15 g ettevalmistatud proovi kaalutakse 0,01 g täpsusega. Proov pannakse 250 ml koonilisse kolbi ja lisatakse 100,0 ml hapestatud metaanooli (3.2), kolb suletakse ja loksutatakse üks tund loksutil (4.2). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiudfilterpaberi (4.5) ja kogu filtraat kogutakse 150 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 7,5 g molekulaarsõela (3.4), suletakse ja loksutatakse viis minutit. Filtreeritakse kohe läbi klaaskiudfilterpaberi. See lahus säilitatakse puhastamiseks (5.3).

5.3. Puhastamine

5.3.1. Alumiiniumoksiidi kolonni ettevalmistamine

Klaaskolonni (4.1) põhja asetatakse väike klaasvatist tropp ja surutakse see klaaspulka kasutades kokku. Kaalutakse 11,0 g ettevalmistatud alumiiniumoksiidi (3.5) ja pannakse kolonni. Tuleb jälgida, et kokku puutumine õhuga oleks selles etapis minimaalne. Koputatakse kergelt vastu kolonni alumist otsa, et alumiiniumoksiid paigutuks ühtlaselt.

▼B

5.3.2. Proovi puhastamine

Koloni pipetitakse 5,0 ml vastavalt punktidele 5.2 ettevalmistatud prooviekstrakti. Pipeti ots asetatakse tihedalt koloni seina vastu ja lastakse lahusel absorbeeruda alumiiniumoksiidi. Robenidiin elueeritakse kolonist, kasutades 100 ml metanooli (3.1) voolukiirusel 2–3 ml/min, ja eluaat kogutakse 250 ml ümarkolbi. Metanoolilahus aurustatakse filter-pöördaurusti (4.3) abil kuivaks vähendatud rõhul, temperatuuril 40 °C. Jääk lahustatakse uuesti 3–4 ml liikuvast faasis (3.8) ja viiakse kvantitatiivselt 10 ml mõõtekolbi. Kolbi loputatakse mitme 1–2 ml koguse liikuva faasiga ja pannakse need loputusvedelikud mõõtekolbi. Kolb täidetakse sama lahustiga märgini ja segatakse. Alikvootne osa filtreeritakse läbi 0,45 µm membraanfiltrit (4.7). Seda lahust hoitakse HPLC määramiseks (5.4).

5.4. HPLC määramine

5.4.1. Parameetrid

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need annavad samaväärsed tulemused):

Vedelikkromatograafia kolonn (4.4.1)

HPLC liikuv faas (3.8)

Voolukiirus: 1,5–2 ml/min

Detektori lainepikkus: 317 nm,

Sissesüstiv ruumala: 20–50 µl.

Kromatograafilise süsteemi stabiilsust kontrollitakse, süstides 3,6 µg/ml sisaldavat kalibreerimislahust (3.9.3) mitu korda, kuni saavutatakse konsstantsed piigi kõrgused ja retentsiooniajad.

5.4.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (3.9.3) süstitakse korduvalt ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimiskõver, kasutades kalibreerimislahuste keskmisi piigi kõrgusi või pindalasiid ordinaatidena ja vastavaid kontsentratsioone µg/ml abstsissidena.

5.4.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.3.2) süstitakse mitu korda, kasutades sama mahtu nagu kalibreerimislahuste puhul, ja määratakse robenidiini piikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse robenidiini piikide keskmise kõrguse (pindala) järgi määratakse proovilahuse kontsentratsioon µg/ml, kasutades kalibreerimisgraafikut (5.4.2).

Robenidiini sisaldus *w* (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = proovilahuse robenidiinikontsentratsioon (µg/ml);

m = kaalutise mass grammides.

▼B**7. Tulemuste kehtivuse kontroll****7.1. Identsus**

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja 6 µg/ml sisaldusega kalibreerimislahuse (3.9.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstraktile lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (3.9.3). Lisatav robenidiinikogus peab olema ligikaudu võrdne prooviekstrakti analüüsimisel leitud robenidiini kogusega.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma ainult robenidiinipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsenteerimata prooviekstrakti robenidiinipiigi laiusest.

7.1.2. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori puhul on see tavaliselt ligikaudu 2 nm;
- b) lainepikkustel 250–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad proovi ja standardi piigi tipu spektrid kromatogrammil ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) 250 ja 400 nm vahel ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduvas osas, tipus ja allapoole suunduvas osas registreeritud spektrid erineda üksteisest nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olemasolu tõestatuks.

7.2. Korratavus

Robenidiinisalduse puhul, mis on suurem kui 15 mg/kg, ei tohi sama proovi kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ületada 10 % suuremast tulemusest.

7.3. Saagis

Suurendatud kontsentratsiooniga fooniproovi puhul peab saagis olema vähemalt 85 %.

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati ühenduse ühisuuring, milles 12 laboratooriumi analüüsisid nelja kodulindude ja küülikute söödajahu või -graanulite proovi. Iga proovi puhul tehti kaks analüüsi. Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

▼B

	Kodulinnud		Küülikud	
	Jahu	Graanulid	Jahu	Graanulid
Keskmine [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
Saagis [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = korratavust iseloomustav standardhälve

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja, %

S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

F. DIKLASURIILI MÄÄRAMINE

(+)-4-klorofenüül [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diookso-1,2,4-triasiin-2-üül) fenüül] atsetonitriil

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata diklasuriili kogust söödas ja eelsegudes. Avastamiskiir on 0,1 mg/kg, määramiskiir 0,5 mg/kg.

2. Põhimõte

Pärast sisestandardi lisamist ekstraheeritakse proov hapestatud metanooliga. Söötade puhul puhastatakse ekstrakti alikvoot tahkefaasilises C_{18} -ekstraktsioonihülsis. Diklasuriil elueeritakse ekstraheerimishülsist välja hapestatud metanooli ja vee seguga. Pärast lahuse aurustamist lahustatakse jääk N, N-dimetüülformamiidi vesilahuses. Eelsegude puhul aurustatakse ekstrakt kohe ja jääk lahustatakse N, N-dimetüülformamiidi vesilahuses. Diklasuriilisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades kolmekomponendilist gradienti ja UV-detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. HPLC-puhtusastmega vesi

3.2. Ammooniumatsetaat

3.3. Tetrabutüülammooniumvesiniksulfaat (TBHS)

3.4. HPLC-puhtusastmega atsetonitriil

3.5. HPLC-puhtusastmega metanool

3.6. N, N-dimetüülformamiid (DMF).

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

3.8. Standardaine: diklasuriil II-24: garanteeritud puhtusega (+)-4-klorofenüül [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diookso-1,2,4-triasiin-2-üül) fenüül] atsetonitriil, E771

3.8.1. Diklasuriili põhistandardlahus, 500 μ g/ml

25 mg diklasuriili standardainet (3.8) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja viiakse 50 ml mõõtekolbi. Lahustatakse N, N-dimetüülformamiidis (3.6), kolb täidetakse N, N-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutmatuseta ühe kuu.

▼B

- 3.8.2. Diklasuriili standardlahus, 50 µg/ml
- 5,00 ml põhistandardlahust (3.8.1) pannakse 50 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse N, N-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.
- 3.9. Sisestandardaine: 2,6-dikloro- α -(4-klorofenüül)-4-(4,5-dihüdro-3,5-diokso-1,2,4-triasiin-2(3H)-üül)- α -metüülbenseenatsetonitriil
- 3.9.1. Sisepõhistandardlahus, 500 µg/ml
- 25 mg sisestandardainet (3.9) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja pannakse 50 ml mõõtekolbi. Lahustatakse N, N-dimetüülformamiidis (3.6), kolb täidetakse N, N-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.
- 3.9.2. Sisestandardlahus, 50 µg/ml
- 5,00 ml sisepõhistandardlahust (3.9.1) pannakse 50 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse N, N-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.
- 3.9.3. Sisestandardlahus eelsegude jaoks, p/1000 mg/ml
- (p = diklasuriili nominaalsisaldus eelsegus (mg/kg))
- p/10 mg sisestandardlahust kaalutakse täpsusega 0,1 mg, pannakse 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse ultrahelivannis (4.6) N, N-dimetüülformamiidis (3.6), kolb täidetakse N, N-dimetüülformamiidiga kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.
- 3.10. Kalibreerimislahus, 2 µg/ml
- 2,00 ml diklasuriili standardlahust (3.8.2) ja 2,00 ml sisestandardlahust (3.9.2) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 16 ml N, N-dimetüülformamiidi (3.6), täidetakse kolb veega kuni märgini ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.
- 3.11. Tahkefaasiline C₁₈-ekstraktsioonihülss (nt Bond Elut), maht: 1 cm³, sorbendi mass: 100 mg
- 3.12. Ekstrahent: hapestatud metanool
- 5,0 ml soolhapet (3.7) pipetatakse 1 000 ml metanooli (3.5) ja segatakse.
- 3.13. HPLC liikuv faas
- 3.13.1. Eluent A: ammooniumatsetaadi ja tetrabutüülammooniumvesiniksulfaadi lahus.
- 5 g ammooniumatsetaati (3.2) ja 3,4 g tetrabutüülammooniumvesiniksulfaati (3.3) lahustatakse 1 000 ml vees (3.1) ja segatakse.
- 3.13.2. Eluent B: atsetonitriil (3.4)
- 3.13.3. Eluent C: metanool (3.5)

▼B**4. Seadmed**

- 4.1. Mehaaniline loksuti.
- 4.2. HPLC seadmed, mis võimaldavad kasutada kolmekomponendilist gradienti
- 4.2.1. Vedelikkromatograafia kolonn 100 × 4,6 mm, täidis: Hypersil ODS, 3 µm või samaväärne
- 4.2.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor
- 4.3. Filter-pöördaurusti
- 4.4. Membraanfilter, 0,45 µm
- 4.5. Vaakumkollektor
- 4.6. Ultrahelivann

5. Töö käik**5.1. Üldsätted****5.1.1. Võrdlussõöt**

Tuleb analüüsida võrdlussõota, veendumaks, et selles ei ole ei diklasuriili ega segavaid aineid. Võrdlussõöt peab olema prooviga samalaadne ja selles tohi leiduda diklasuriili ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatses analüüsitakse võrdlussõota, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus diklasuriili. Et saada kontsentratsiooni 1 mg/kg, kantakse 50 g võrdlussõodale 0,1 ml põhistandardlahust (3.8.1), segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades veel mitu korda enne katse jätkamist vastavalt punktile 5.2.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussõöt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardsel lisamismeetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitavale proovile ligikaudu sama suur diklasuriilikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsenteerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine**5.2.1. Sõöt**

Umbes 50 g proovi kaalutakse 0,01 g täpsusega. See pannakse 500 ml koonilisse kolbi, lisatakse 1,00 ml sisestandardlahust (3.9.2) ja 200 ml ekstrahenti (3.12) ning korgitakse kolb kinni. Segu loksutatakse õõjooksul loksutil (4.1). Lastakse 10 minutit settida. Kantakse 20 ml supernatandi alikvooti sobivasse klaasanumasse ja lahjendatakse 20 ml veega. Lahus kantakse ekstraktsioonihülsile (3.11) ja juhitakse sellest läbi vaakumi abil (4.5). Hülsi pestakse 25 ml ekstrahendi (3.12) ja vee seguga, 65 + 35 (v + v). Kogutud fraktsioonid visatakse ära ning elueeritakse ühendid, kasutades 25 ml ekstrahendi (3.12) ja vee segu 80 + 20 (v + v). Seda fraktsiooni aurustatakse 60 °C juures pöördaurustil (4.3), kuni see saab kuivaks. Jääk lahustatakse 1,0 ml N, N-dimetüülformamiidis (3.6), lisatakse 1,5 ml vett (3.1) ja segatakse. Filtreeritakse läbi membraanfiltri (4.4). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.2.2. Eelsegud

Umbes 1 g proovi kaalutakse 0,001 g täpsusega. See pannakse 500 ml koonilisse kolbi, lisatakse 1,00 ml sisestandardlahust (3.9.3) ja 200 ml ekstrahenti (3.12) ning korgitakse kolb kinni. Segu loksutatakse õõ

▼B

jooksul loksutil (4.1). Lastakse 10 minutit settida. Kantakse 10 000/p ml (p = diklasuriili nominaalsisaldus eelsegus mg/kg) supernatandi alikvooti sobiva suurusega ümarkolbi. Aurustatakse pöördaurustis (4.3) alandatud rõhu ja 60 °C juures, kuni proov saab kuivaks. Jääk lahustatakse uuesti 10,0 ml N, N-dimetüülformamiidis (3.6), lisatakse 15,0 ml vett (3.1) ja segatakse. Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.3. *HPLC määramine*5.3.1. *Parameetrid*

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused):

Vedelikromatograafia kolonn (4.2.1):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, täidise terasuurus 3 µm või samaväärne
Liikuv faas:	Eluent A (3.13.1): ammooniumatsetaadi ja tetrabutüül-ammooniumvesiniksulfaadi vesilahus Eluent B (3.13.2): atsetonitriil Eluent C (3.13.3): metanool
Elueerimisviis:	— lineaarne gradient — algtingimused: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — 10 minuti pärast gradientelueerimine 30 minutit: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Elueeritakse B _{ga} 10 minutit
Voolukiirus:	1,5–2 ml/min
Sissesüstitava ruumala:	20 µl
Detektori lainepikkus:	280 nm

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides mitu korda kolonni kalibreerimislahust (3.10) kontsentratsiooniga 2 µg/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. *Kalibreerimislahus*

Kalibreerimislahusest (3.10) süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse diklasuriili ning sisestandardi piikide keskmine kõrgus (pindala).

5.3.3. *Proovilahus*

Proovilahusest (5.2.1 või 5.2.2) süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse diklasuriili ning sisestandardi piikide keskmine kõrgus (pindala).

6. **Tulemuste arvutamine**6.1. *Söödad*

Diklasuriilisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 \text{ V}}{m} \text{ [mg/kg]}$$

▼B

kus:

$h_{d,s}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.1);
 $h_{i,s}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.1);
 $h_{d,c}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) kalibreerimislahuses (3.10);
 $h_{i,c}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) kalibreerimislahuses (3.10);
 $c_{d,c}$ = diklasuriili kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) kalibreerimislahuses (3.10);
 m = kaalutise mass grammides;
 V = prooviekstrakti maht vastavalt punktidele 5.2.1 (s.o 2,5 ml).

6.2. *Eelsegud*

Diklasuriilisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kus:

$h_{d,c}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) kalibreerimislahuses (3.10);
 $h_{i,c}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) kalibreerimislahuses (3.10);
 $h_{d,s}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.2);
 $h_{i,s}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.2);
 $c_{d,c}$ = diklasuriili kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) kalibreerimislahuses (3.10);
 m = kaalutise mass grammides;
 V = prooviekstrakti maht vastavalt punktidele 5.2.2 (s.o 25 ml);
 p = diklasuriili nominaalsaldus eelsegus (mg/kg).

7. **Tulemuste kehtivuse kontroll**7.1. *Identsus*

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (5.2.1 või 5.2.2) ja kalibreerimislahuse (3.10) spektreid.

7.1.1. *Täiendav kromatograafia*

Prooviekstrakte (5.2.1 või 5.2.2) lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (3.10). Lisatud diklasuriilikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud diklasuriilikogus.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma üksnes diklasuriilipiigi ja sisestandardi piigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsenteerimata prooviekstrakti diklasuriili piigi või sisestandardi piigi laiusest.

7.1.2. *Diodireadektoriga kasutamine*

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt.

- a) Proovi ja standardi kromatogrammidele oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langeda. Diodireadektoriga lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm.

▼B

- b) Lainepikkustel 230–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad proovi ja standardi piigi tipu spektrid kromatogrammil ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) Lainepikkustel 230–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olemasolu tõestatuks.

7.2. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

- 30 % suuremast tulemusest diklasuriilisalduse vahemikus 0,5–2,5 mg/kg;
- 0,75 mg/kg diklasuriilisalduse vahemikus 2,5–5 mg/kg;
- 15 % suuremast tulemusest, kui diklasuriilisaldus on suurem kui 5 mg/kg.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga (fooni)proovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %.

8. **Ühisuuringu tulemused**

Korraldati ühisuuring, mille käigus 11 laboratooriumis analüüsiti 5 proovi. Proovideks olid kaks eelsegu: üht oli segatud orgaanilise maatriksiga (O 100) ja teist anorgaanilise maatriksiga (A 100). Teoreetiline diklasuriilisaldus on 100 mg/kg. Kolm eri tootjat (NL) (L1/Z1/K1) valmistasid kolm kodulindude söödasegu. Teoreetiline diklasuriilisaldus on 1 mg/kg. Laboratooriumidele tehti ülesandeks iga proovi üks kord või kaks korda analüüsida. (Üksikasjalikum teavet selle ühisuuringu kohta võib leida ajakirjas *Journal of AOAC International*, köide 77, nr 6, 1994, lk 1359–1361.) Tulemused on esitatud järgmises tabelis.

	Proov 1 A 100	Proov 2 O 100	Proov 3 L1	Proov 4 Z1	Proov 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Keskmine	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nominaalsisaldus mg/kg)	100	100	1	1	1

L = laboratooriumide arv
n = üksikmääramiste arv
S_r = korratavust iseloomustav standardhälve
CV_r = korratavuse variatsioonikordaja

▼B

S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

9. Tähelepanekud

Eelnevalt peab olema näidatud, et diklasuriili piigi kõrgus (pindala) on mõõdetavas vahemikus lineaarses sõltuvuses kontsentratsioonist.

G. NAATRIUMLASALOTSIIDI MÄÄRAMINE

Polüeteermonokarboksüülhappe naatriumsool, saadud Streptomyces lasaliensis'est

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata naatriumlasalotsiidi kogust söödas ja eelsegudes. Avastamiskünnis on 5 mg/kg, määramispiir 10 mg/kg.

2. Põhimõte

Naatriumlasalotsiid ekstraheeritakse proovist hapestatud metanooliga ja määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades spektrofluoromeetrilist detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4)

3.2. Ortofosforhape, w (w/w) = 85 %

3.3. Ortofosforhappe lahus, c = 20 %

23,5 ml ortofosforhapet (3.2) lahjendatakse veega 100 milliliitriini.

3.4. 6-metüül-2-heptüülamiin ehk 1,5-dimetüülheksüülamiin, w (w/w) = 99 %

3.5. HPLC-puhtusastmega metanool

3.6. Soolhape, tihedus = 1,19 g/ml.

3.7. Fosfaatpuhverlahus, c = 0,01 mol/l

1,36 g KH_2PO_4 (3.1) lahustatakse 500 ml vees (3.11), lisatakse 3,5 ml ortofosforhapet (3.2) ja 10,0 ml 6-metüül-2-heptüülamiini (3.4). pH korrigeeritakse ortofosforhappe lahusega (3.3) 4,0-ni ja lahjendatakse veega (3.11) 1 000 milliliitriini.

3.8. Hapestatud metanool

5,0 ml soolhapet (3.6) pannakse 1 000 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb metanooliga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.9. HPLC liikuv faas, fosfaatpuhverlahus + metanoolilahus: 5 + 95 (V + V)

5 ml fosfaatpuhverlahust (3.7) segatakse 95 ml metanooliga (3.5).

3.10. Garanteeritud puhtusega naatriumlasalotsiidi standardaine $C_{34}H_{53}O_8Na$ (polüeteermonokarboksüülhappe naatriumsool, saadud *Streptomyces lasaliensis'est*), E763

3.10.1. Naatriumlasalotsiidi põhistandardlahus, 500 µg/ml

50 mg naatriumlasalotsiidi (3.10) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja pannakse 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse hapestatud metanoolis (3.8), täidetakse kolb sama lahustiga kuni märgini ja segatakse. See lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

▼B

3.10.2. Naatriumlasalotsiidi vahestandardlahus, 50 µg/ml

10,0 ml põhistandardlahust (3.10.1) pipetatakse 100 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb hapestatud metanooliga (3.8) kuni märgini ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10.3. Kalibreerimislahused

1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 ml vahestandardlahust pannakse (3.10.2) 50 ml mõõtekolbidesse. Kolvid täidetakse hapestatud metanooliga (3.8) kuni märgini ja segatakse. Nende lahuste naatriumlasalotsiidisisaldus on vastavalt 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.11. HPLC-puhtusastmega vesi

4. **Seadmed**

4.1. Temperatuuri reguleerimise seadmetega ultrahelivann (või loksutiga veevann)

4.2. Membraanfiltrid, 0,45 µm

4.3. HPLC seade koos sissepritseüsteemiga, mis võimaldab süstida mahus 20 µl.

4.3.1. Vedelikkromatograafia kolonn 125 × 4 mm, pöördfaasiline C₁₈-ekstraktsioonihülss, täidise terasuurus 5 µm või samaväärne

4.3.2. Spektrofluorimeeter, mis võimaldab ergastuse ja emissiooni lainepikkusi muuta.

5. **Töö käik**5.1. *Üldsätted*5.1.1. *Võrdlussõöt*

Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs, veendumaks, et selles ei ole naatriumlasalotsiidi ega segavaid aineid. Võrdlussõöt peab olema prooviga samalaadne ning selles ei tohi leiduda naatriumlasalotsiidi ega segavaid aineid.

5.1.2. *Saagisekatse*

Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus naatriumlasalotsiidi. Et saada kontsentratsiooni 100 mg/kg, kantakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.10.1) 250 ml koonilisse kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitrini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse põhjalikult ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerimist (5.2) asumist veel mitu korda.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussõöt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardsel lisamismeetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitavale proovile ligikaudu sama suur naatriumlasalotsiidikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. *Ekstraheerimine*5.2.1. *Sõöt*

5–10 g proovi kaalutakse täpsusega 0,01 g ja pannakse 250 ml koonilisse korgiga kolbi. Lisatakse pipetiga 100,0 ml hapestatud metanooli

▼B

(3.8). Korgitakse kinni ja raputatakse segi. Kolb pannakse 20 minutiks ligikaudu 40 °C ultrahelivanni (4.1), seejärel võetakse sealt välja ja jahutatakse toatemperatuurini. Lastakse umbes 1 tund seista, kuni heljuv aine on settinud, siis filtreeritakse alikvoot läbi 0,45 µm membraanfiltriga (4.2) sobivasse anumasse. Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.2.2. Eelsegud

Umbes 2 g jahvatamata eelsegu kaalutakse täpsusega 0,001 g ja pannakse 250 ml mõõtekolbi. Lisatakse 100,0 ml hapestatud metanooli (3.8) ja raputatakse segi. Kolb koos sisuga pannakse 20 minutiks ligikaudu 40 °C ultrahelivanni (4.1), seejärel võetakse sealt välja ja jahutatakse toatemperatuurini. Lahjendatakse hapestatud metanooliga (3.8) kuni märgini ja segatakse hoolikalt. Lastakse tund aega seista, kuni heljuv aine on settinud, siis filtreeritakse alikvoot läbi 0,45 µm membraanfiltriga (4.2). Vajalik kogus selginud filtraati lahjendatakse hapestatud metanooliga (3.8), et saada lõplik katselahus, mis sisaldab umbes 4 µg/ml naatriumlasalotsiidi. Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.3. HPLC määramine

5.3.1. Parameetrid

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused).

Vedelikkromatograafia kolonn (4.3.1):	125 mm × 4 mm, pöördfaasiline C ₁₈ , täidise terasuurus 5 µm, või samaväärne
Liikuv faas (3.9):	Fosfaatpuhverlahuse (3.7) ja metanooli (3.5) segu, 5+95 (V+V)
Voolukiirus:	1,2 ml/min
Avastamise lainepikkused:	
Ergastamine:	310 nm
Emissioon:	419 nm
Sissesüstitav ruumala:	20 µl

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides kolonni mitu korda kalibreerimislahust (3.10.3) kontsentratsiooniga 4,0 µg/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused (pindalad) ja retentsioonijad.

5.3.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (3.10.3) süstitakse mitu korda ja määratakse igale kontsentratsioonile vastavad keskmised piigikõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes ordinaatteljele keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.3.3. Proovilahus

Punktide 5.2.1 või 5.2.2 kohaselt saadud prooviekstrakte süstitakse mitu korda samas mahus, mis kalibreerimislahuse puhul, ja määratakse naatriumlasalotsiidipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse (5.3.3) süstimisega saadud piikide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kalibreerimisgraafiku abil naatriumlasalotsiidi kontsentratsioon (µg/ml).

▼ B6.1. *Sööt*

Naatriumlasalotsiidi sisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = naatriumlasalotsiidi kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) proovilahuses (5.2.1);

V_1 = prooviekstrakti maht milliliitrites vastavalt punktile 5.2.1 (s.o 100);

m = kaalutise mass grammides.

6.2. *Eelsegud*

Naatriumlasalotsiidi sisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = naatriumlasalotsiidi kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) proovilahuses (5.2.2);

V_2 = prooviekstrakti maht milliliitrites vastavalt punktile 5.2.2 (s.o 250);

f = punkti 5.2.2 kohane lahjendusfaktor;

m = kaalutise mass grammides.

7. **Tulemuste kehtivuse kontroll**7.1. *Identsus*

Spektrofluoromeetrilised meetodid on vähem tundlikud kõrvaliste lisandite suhtes kui UV-meetodid. Analüüsitava proovi identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil.

7.1.1. *Täiendav kromatograafia*

Prooviekstrakte (5.2.1 või 5.2.2) lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (3.10.3). Lisatud naatriumlasalotsiidikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud naatriumlasalotsiidi kogus. Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma üksnes naatriumlasalotsiidipiigi kõrgus. Piigi laius poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui $\pm 10\%$ kontsentreerimata prooviekstrakti naatriumlasalotsiidipiigi laiusest.

7.2. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

- 15 % suuremast tulemusest, kui naatriumlasalotsiidi sisaldus on vahemikus 30–100 mg/kg;
- 15 mg/kg, kui naatriumlasalotsiidi sisaldus on vahemikus 100–200 mg/kg;
- 7,5 % suuremast tulemusest, kui naatriumlasalotsiidisisaldus on suurem kui 200 mg/kg.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga (fooni)söödaproovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %. Suurendatud kontsentratsiooniga eelseguproovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

▼B

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati ühisuuring, (*) mille käigus 12 laboratooriumis analüüsiti kahte eelsegu (proovid 1 ja 2) ja viit sööta (proovid 3–7). Iga proovi puhul tehti kaks analüüsi. Tulemused on esitatud alljärgnevas tabelis:

	Proov 1 Kanasööda eelsegu	Proov 2 Kalkuni- sööda eelsegu	Proov 3 Kalkunite graanulid	Proov 4 Kanade kuivikup- uru	Proov 5 Kalkuni- sööt	Proov 6 Kodulin- dude sööt A	Proov 7 Kodulin- dude sööt B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Keskmine [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
Nominaalsi- saldus [mg/ kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) tootja deklareeritud sisaldus

(**) laboratooriumis valmistatud sööt

L = laboratooriumide arv

n = üksiktulemuste arv

s_r = korratavust iseloomustav standardhälve

s_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja, %

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %



V LISA

SÖÖDAS SOOVIMATUTE AINETE SISALDUSE KONTROLLIMISE
ANALÜÜSIMEETODID

A. VABA GOSSÜPOLI JA GOSSÜPOLI ÜLDSISALDUSE
MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata sisaldust puuvillaseemnetes, puuvillaseemnejahus ja puuvillakoogis ning neid söödatooraineid sisaldavates segasöödades, kui need sisaldavad 20 mg/kg vaba gossüpoli, üldgossüpoli ja gossüpolile keemiliselt sarnaseid aineid.

2. Põhimõte

Gossüpol ekstraheeritakse 3-aminopropaan-1-ooli manulusel kas propaan-2-ooli ja heksaani seguga, et määrata vaba gossüpoli sisaldus, või dimetüülformamiidiga, et määrata gossüpoli üldsisaldus. Gossüpol muundatakse aniliini abil gossüpol-dianiliiniks, mille optiline tihedus mõõdetakse lainepikkusel 440 nm.

3. Reaktiivid

3.1. Propaan-2-ool-heksaani segu: segatakse 60 mahuosa analüütiliselt puhast propaan-2-ooli 40 mahuosa *n*-heksaaniga.

3.2. Lahusti A: liitrisse mõõtekolbi pannakse ligikaudu 500 ml propaan-2-ooli ja heksaani segu (3.1), 2 ml 3-aminopropaan-1-ooli, 8 ml jää-äädikhapet ja 50 ml vett. Kolb täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. See lahus säilib üks nädal.

3.3. Lahusti B: 100 ml mõõtekolbi viiakse pipetiga 2 ml 3-aminopropaan-1-ooli ja 10 ml jää-äädikhapet. Jahutatakse toatemperatuurini ning täidetakse kolb N, N-dimetüülformamiidiga märgini. See lahus säilib üks nädal.

3.4. Aniliin: kui pimekatses saadud optiline tihedus ületab 0,022, lisatakse aniliinile tsingitolmu ja destilleeritakse aniliin, visates ära esimese ja viimase 10 % destillaadist. Külmkapis säilib reaktiiv pruunis korgiga suletud klaaspudelis mitu kuud.

3.5. Gossüpoli standardlahus A: 250 ml mõõtekolbi pannakse 27,9 mg gossüpolatsetaati. Lahustatakse ja täidetakse märgini lahustiga A (3.2). 50 ml seda lahust pipetatakse 250 ml mõõtekolbi ja kolb täidetakse lahustiga A märgini. Gossüpoli kontsentratsioon lahuses on 0,02 mg/ml. Enne kasutamist lastakse üks tund toatemperatuuril seista.

3.6. Gossüpoli standardlahus B: 50-milliliitrisse mõõtekolbi pannakse 27,9 mg gossüpolatsetaati. Lahustatakse ja täidetakse märgini lahustiga B (3.3). Gossüpoli kontsentratsioon lahuses on 0,5 mg/ml.

Valguse eest kaitstult püsivad gossüpoli standardlahused A ja B 24 tundi.

4. Seadmed

4.1. Segisti (trummel): ligikaudu 35 p/min

▼B

4.2. Spektrofotomeeter

5. **Töö käik**5.1. *Analüüsitav proov*

Proovi kasutatav kogus sõltub proovi eeldatavast gossüpolisisaldusest. Eelistatav on töötada väikese prooviga ja filtraadi suhteliselt suure alikvootse osaga, et saada piisavalt gossüpoli täpseks fotomeetriliseks mõõtmiseks. *Vaba gossüpoli* määramiseks puuvillaseemnetes, puuvillaseemnejahus ja puuvillakoogis ei tohi proov olla suurem kui 1 g, segasööda puhul võib see olla kuni 5 g. Enamikul juhtudest sobib filtraadi alikvootne osa mahuga 10 ml; see peab sisaldama 50–100 µg gossüpoli. *Gossüpoli üldsisalduse* määramiseks peab proovi suurus olema 0,5–5 g, et filtraadi alikvootne osa 2 ml sisaldaks 40–200 µg gossüpoli.

Analüüs tuleb läbi viia toatemperatuuril umbes 20 °C juures.

5.2. *Vaba gossüpoli määramine*

Proov pannakse lihvitud kaelaga 250 ml kolbi, mille põhi on kaetud purustatud klaasiga. Lisatakse pipeti abil 50 ml lahustit A (3.2), kolb suletakse korgiga ja segatakse segistis üks tund. Filtreeritakse läbi kuiva filtri ja kogutakse filtraat väiksesse lihvitud kaelaga kolbi. Filtreerimise ajal kaetakse lehter kellaklaasiga.

Pipetiga viiakse kahte 25 ml mõõtekolbi (A ja B) filtraadi ühesugused alikvootsed osad, mis sisaldavad 50–100 µg gossüpoli. Vajaduse korral täidetakse lahustiga A (3.2) 10 milliliitrit. Seejärel täidetakse kolb A propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Saadud lahust kasutatakse võrdluslahusena, mille suhtes mõõdetakse proovilahust.

Kahte teise 25 ml mõõtekolbi (C ja D) viiakse pipetiga kummassegi 10 ml lahustit A (3.2). Kolb C täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Saadud lahust kasutatakse võrdluslahusena, mille suhtes mõõdetakse pimekatse lahust.

Kolbidesse D ja B lisatakse kummassegi 2 ml aniliini (3.4). Värvuse tekkimiseks kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Kolvid jahutatakse toatemperatuurini, täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini, segatakse ja lastakse üks tund seista.

Spektrofotomeetriga määratakse sentimeetrites klaasküvettides lainepikkusel 440 nm pimekatse lahuse (D) optiline tihedus võrdluslahuse (C) suhtes ning proovi lahuse (B) optiline tihedus võrdluslahuse (A) suhtes.

Proovilahuse optilisest tihedusest lahutatakse pimekatse lahuse optiline tihedus (= korrigeeritud optiline tihedus). Selle väärtuse põhjal arvutatakse vaba gossüpoli sisaldus, nagu on näidatud punktis 6.

5.3. *Gossüpoli üldsisalduse määramine*

1–5 mg gossüpoli sisaldav proov pannakse 50 ml mõõtekolbi ja lisatakse 10 ml lahustit B (3.3). Samal ajal valmistatakse ette pimekatse, pannes teise 50 ml mõõtekolbi 10 ml lahustit B (3.3). Neid kahte kolbi kuumutatakse keeval veevannil 30 minutit. Jahutatakse toatemperatuurini ning

▼B

täidetakse mõlemad kolvid propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Segatakse ja jäetakse 10–15 minutiks selginema, seejärel filtreetritakse ja kogutakse filtraadid lihvitud kaelaga kolbidesse.

Kahte 25 ml mõõtekolbi viiakse kummassegi pipetiga 2 ml proovi filtraati ning kahte teise 25 ml mõõtekolbi kummassegi 2 ml pimekatse filtraati. Kummagi seeria üks kolb täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) 25 milliliitriini. Saadud lahuseid kasutatakse võrdluslahusena.

Kahte teise kolbi lisatakse kummassegi 2 ml aniliini (3.4). Värvuse tekkimiseks kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) 25 milliliitriini, segatakse ja lastakse üks tund seista.

Määratakse optiline tihedus, nagu on kirjeldatud vaba gossüpoli määramise eeskirja punktis 5.2. Saadud väärtusest arvutatakse gossüpoli üldsisaldus vastavalt punktile 6.

6. Tulemuste arvutamine

Tulemused võib arvutada kas optilise eritiheduse (6.1) või kalibreerimiskõvera (6.2) järgi.

6.1. Optilise eritiheduse järgi

Eespool kirjeldatud tingimustel on optilised eritihedused järgmised:

$$\text{Vaba gossüpol: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Üldgossüpol: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Vaba gossüpoli sisaldus või gossüpoli üldsisaldus proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\text{gossüpoli \% : } \frac{E \times 1\,250}{E_1 \frac{\%}{\text{cm}} \times p \times a}$$

kus:

E = korrigeeritud optiline tihedus, mis on määratud vastavalt punktile 5.2;

p = proovi mass (g);

a = filtraadi alikvootse osa ruumala (ml)

6.2. Kalibreerimisgraafiku järgi

6.2.1. Vaba gossüpoli sisaldus

Valmistatakse ette kaks seeriat mõõtekolbe, kummaski viis 25 ml kolbi. Mõlema seeria kolbidesse viiakse pipetiga gossüpoli standardlahuse A (3.5) alikvootsed osad 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ja 10,0 ml. Täidetakse lahustiga A (3.5) 10 milliliitriini. Mõlemad seeriad lõpetatakse 25 ml mõõtekolbiga, mis sisaldab üksnes 10 ml lahustit A (3.2) (pimekatse).

Esimese seeria kolvid (kaasa arvatud kolb pimekatsega) täidetakse 25 milliliitriini propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) (võrdlusseeria).

▼B

Teise seeria igasse kolbi (kaasa arvatud kolb pimekatsega) lisatakse 2 ml aniliini (3.4). Värvuse tekkimiseks kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, kolvid täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini, segatakse ja lastakse üks tund seista (standardseeria).

Vastavalt punktile 5.2 määratakse standardseeria lahuste optiline tihedus vastavate võrdlusseeria lahuste suhtes. Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes sellele gossüpoli kogused µg-des ja neile vastavad optilised tihedused.

6.2.2. Gossüpoli üldsisaldus

Valmistatakse ette kuus 50 ml mõõtekolbi. Esimesse kolbi viiakse 10 ml lahustit B (3.3) ja teistesse vastavalt 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ja 10,0 ml gossüpoli standardlahust B (3.6). Lahuse maht igas kolvis viiakse lahusti B (3.3) lisamisega 10 milliliitrini. Kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini ja homogeenitakse.

2,0 ml neid lahuseid pannakse kahe kuuest 25 ml mõõtekolvist koosneva seeria igasse kolbi. Esimese seeria kolvid täidetakse märgini propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) (võrdlusseeria).

Teise seeria igasse kolbi lisatakse 2 ml aniliini (3.4). Kuumutatakse 30 minutit keeval veevannil. Jahutatakse toatemperatuurini, kolvid täidetakse propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini, segatakse ja lastakse üks tund seista (standardseeria).

Vastavalt punktile 5.2 määratakse standardseeria lahuste optiline tihedus vastavate võrdlusseeria lahuste suhtes. Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes sellele gossüpoli kogused µg-des ja neile vastavad optilised tihedused.

6.3. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— suhtelise väärtusena väljendatult 15 % , kui gossüpoli sisaldus on alla 500 mg/kg;

— absoluutväärtusena väljendatult 75 mg/kg, kui gossüpoli sisaldus on 500–750 mg/kg;

— 10 % suuremast tulemusest, kui gossüpoli sisaldus on üle 750 mg/kg.

▼M6

B. DIOKSIINIDE (PCDD/PCDF) JA PCBde SISALDUSE MÄÄRAMINE

I PEATÜKK

Proovivõtumeetodid ja analüüsitulemuste tõlgendamine

1. Kohaldamisala ja mõisted

Proovid polüklorodibenso-*p*-dioksiinide (PCDDd), polüklorodibensofuraanide (PCDFid), dioksiinitaoliste polüklooritud bifentüülide (PCBd) ⁽¹⁾ ja mittedioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks söödas võetakse I lisa sätete kohaselt. Söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimise kvantitatiivseid nõudeid kohaldatakse, nagu on sätestatud I lisa punktis 5.1. Selliselt võetud koondproove käsitatakse selle partii või osapartii esinduslike proovidena, millest need on võetud. Direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piirmormidele vastavust kontrollitakse laboriproovides määratud sisalduste alusel.

Käesolevas B osas kohaldatakse komisjoni otsuse 2002/657/EÜ ⁽²⁾ I lisa esitatud mõisteid.

⁽¹⁾ PCDDde, PCDFide ja dioksiinitaoliste PCBde toksilisusefaktorite (TEF) tabel. Inimestele avalduva riski hindamisel kasutatavad WHO-TEFid põhinevad 2005. aasta juunis Genfis peetud Maailma Terviseorganisatsiooni rahvusvahelise kemikaaliohutuse programmi (IPCS) ekspertkohtumise järeldustel (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)).

Analoog	TEFi väärtus	Analoog	TEFi väärtus
Dibenso- <i>p</i> -dioksiinid (PCDDd) ja dibenso- <i>p</i> -furaanid (PCDFid)		Dioksiinitaolised PCBd ortoasendamata PCBd + orto-monoasendatud PCBd	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ortoasendamata PCBd	
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	Orto-monoasendatud PCBd	
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		

Kasutatud lühendid: T = tetra; Pe = penta; Hx = heksta; Hp = hepta; O = okta; CDD = klorodibensodioksiin; CDF = klorodibensofuraan; CB = klorobifenüül.

⁽²⁾ Komisjoni 14. augusti 2002. aasta otsus 2002/657/EÜ, millega rakendatakse nõukogu direktiivi 96/23/EÜ analüüsimeetodite tulemuslikkuse ja tulemuste tõlgendamise osas (EÜT L 221, 17.8.2002, lk 8).

▼ **M6**

Lisaks neile mõistetele kasutatakse käesolevas B osas järgmisi mõisteid.

„Sõeluuringumeetodid” on meetodid selliste proovide tuvastamiseks, mille PCDD/Fide ja dioksiinitaaliste PCBde sisaldus ületab piinormi või häiretaseme. Need meetodid võimaldavad kulutõhusalt analüüsida suurt arvu proove ning see suurendab võimalusi avastada uusi juhtumeid, mis on tarbijate jaoks suure kokkupuute- ja terviseriskiga. Sõeluuringumeetodid peavad põhinema bioanalüütilistel või GC-MS meetoditel. Proovide tulemusi, mis ületavad piinormile vastavuse kontrolli läviväärtust, tuleb üle kontrollida esialgse proovi täieliku kordusanalüüsiga kinnitaval meetodil.

„Kinnitavad meetodid” on meetodid, mis annavad täielikku või täiendavat teavet, mis võimaldab PCDD/Fid ja dioksiinitaalised PCBd tuvastada ja määrata üheselt nende sisaldus piinormile või vajaduse korral häiretasemele vastaval läviväärtusel. Nende meetodite puhul kasutatakse gaasikromatograafiat koos kõrglahutus-massispektromeetriaga (GC-HRMS) või gaasikromatograafiat koos tandemmassispektromeetriaga (GC-MS/MS).

2. Partii või osapartii vastavus piinormile

2.1. Mittedioksiinitaaliste PCBde puhul

Partii või osapartii vastab piinormile, kui PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 ja PCB 180 (edaspidi „mittedioksiinitaalised PCBd”) summaarse sisalduse analüüsi tulemus ei ületa direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piinormi, võttes arvesse mõõtmise laiendmääramatust⁽¹⁾. Partii või osapartii ei vasta direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piinormile, kui ülemise tõkke põhimõtte⁽²⁾ kohase kahe analüüsitulemuse põhjal on kordusanalüüsiga⁽³⁾ saadud aritmeetiline keskmine, mis ületab mõõtmise laiendmääramatust arvesse võttes kahtlusetu piinormi, st vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud kontsentratsiooni väärtust, millest on lahutatud mõõtmise laiendmääramatus.

Mõõtmise laiendmääramatuse arvutamiseks kasutatakse kattetegurit 2, millega tagatakse umbes 95 % usaldusnivoo. Partii või osapartii ei vasta nõuetele, kui mõõtmistulemuste keskvärtusest laiendmääramatuse lahutamise saadud väärtus ületab piinormi.

⁽¹⁾ Vajaduse korral järgitakse dokumendis „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” (Juhend mõõtemääramatuse kohta laboritele, kus tehakse PCDDde/PCDFide ja PCBde analüüse isotooplahjendusega massispektromeetria abil) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) kirjeldatud põhimõtteid.

⁽²⁾ Ülemise tõkke põhimõtte kohaselt vastab iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus määramispiiri väärtusele. Alumise tõkke põhimõtte kohaselt vastab iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus nullile. Vaheväärtuse põhimõtte kohaselt vastab iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus poolele määramispiiri väärtusest.

⁽³⁾ Kordusanalüüs – huvipakkuvate analüütide eraldi analüüs sama homogeniseeritud proovi teise alikvoodi põhjal. Üldiselt kohaldatakse kordusanalüüsi suhtes II lisa C peatüki punktis 3 sätestatud nõudeid. Meetodite puhul, milles kasutatakse asjaomaste analüütide jaoks ¹³C-märgistatud sisestandardit, on kordusanalüüs vajalik ainult siis, kui esimese määramise tulemus ei vasta nõuetele. Kordusanalüüs on vajalik, et välistada sisemise ristasaastumise või proovide juhusliku segiajamise võimalus. Kui analüüs tehakse seoses saastamisjuhtumiga, võib kinnitava kordusanalüüsi jätta tegemata, kui analüüsiks valitud proovid on jälgitavuse alusel seostatavad asjaomase saastamisjuhtumiga ning tuvastatud saasteainete sisaldus ületab oluliselt piinormi.

▼ **M6**

Käesoleva punkti eespool esitatud lõikudes nimetatud eeskirju kohaldatakse ametlikuks kontrolliks ette nähtud proovide analüüsitulemuste suhtes. Kaitse- või vahekohtumenetluse eesmärgil tehtud analüüside suhtes kohaldatakse siseriiklikke eeskirju.

2.2. *PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde puhul*

Partii või osapartii vastab piirnormile, kui ühe analüüsi tulemus,

— mis on saadud sõeluuringumeetodiga, mille valenegatiivsete tulemuste osakaal on alla 5 %, näitab, et sisaldus ei ületa asjaomast direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud PCDD/Fide piirnormi ega PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa piirnormi;

— mis on saadud kinnitava meetodiga, näitab, et sisaldus ei ületa asjaomast direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud PCDD/Fide piirnormi ega PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa piirnormi, kui võetakse arvesse mõõtmise laiendmääramatust.

Sõeluuringu puhul määratakse läviväärtus, mille alusel otsustatakse, kas proov vastab PCDD/Fide jaoks kehtestatud piirnormile või PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa jaoks kehtestatud piirnormile.

Partii või osapartii ei vasta direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piirnormile, kui ülemise tõkke põhimõtte ⁽¹⁾ kohase kahe analüüsitulemuse põhjal on kinnitava meetodiga tehtud kordusanalüüsiga ⁽²⁾ saadud aritmeetiline keskmine, mis ületab mõõtmise laiendmääramatust arvesse võttes kahtlusetat piirnormi, st vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud kontsentratsiooni väärtust, millest on lahutatud mõõtmise laiendmääramatus.

Mõõtmise laiendmääramatuse arvutamiseks kasutatakse kattetegurit 2, millega tagatakse umbes 95 % usaldusnivoo. Partii või osapartii ei vasta nõuetele, kui mõõtmistulemuste keskvaartusest laiendmääramatuse lahutamise saadud väärtus ületab piirnormi.

PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa puhul tuleb kasutada PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde eraldi määramise analüüsitulemuste hinnanguliste laiendmääramatuste summat.

Käesoleva punkti eespool esitatud lõikudes nimetatud eeskirju kohaldatakse ametlikuks kontrolliks ette nähtud proovide analüüsitulemuste suhtes. Kaitse- või vahekohtumenetluse eesmärgil tehtud analüüside suhtes kohaldatakse siseriiklikke eeskirju.

⁽¹⁾ Ülemise tõkke põhimõtte kohaselt vastab toksilisusekvivalendi (TEQ) arvutamisel iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus määramispiiri väärtusele. Alumise tõkke põhimõtte kohaselt vastab TEQ arvutamisel iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus nullile. Vahevaartuse põhimõtte kohaselt vastab TEQ arvutamisel iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus poolele määramispiiri väärtusest.

⁽²⁾ Üldiselt kohaldatakse kordusanalüüsi suhtes II lisa C peatüki punktis 2 sätestatud nõudeid. Kinnitavate meetodite puhul, milles kasutatakse asjaomaste analüütide jaoks ¹³C-märgistatud sisestandardit, on kordusanalüüs vajalik ainult siis, kui esimese määramise tulemus ei vasta nõuetele. Kordusanalüüs on vajalik, et välistada sisemise ristsaastumise või proovide juhusliku segiajamise võimalus. Kui analüüs tehakse seoses saastamisjuhtumiga, võib kinnitava kordusanalüüsi jätta tegemata, kui analüüsiks valitud proovid on jälgitavuse alusel seostatavad asjaomase saastamisjuhtumiga ning tuvastatud saasteainete sisaldus ületab oluliselt piirnormi.

▼ **M6****3. Direktiivi 2002/32/EÜ II lisas sätestatud häiretasemeid ületavad tulemused**

Häiretasemeid kasutatakse proovide valimiseks juhul, kui on vaja kindlaks teha saasteallikas ja võtta meetmeid saastumise vähendamiseks või kõrvaldamiseks. Sõeluuringumeetoditega tehakse kindlaks selliste proovide valimiseks sobivad läviväärtused. Kui saasteallika kindlakstelemiseks ja saaste vähendamiseks või kõrvaldamiseks on vaja suuri pingutusi, on asjakohane kontrollida häiretaseme ületamist kinnitaval meetodil kordusanalüüsiga ja võtta seejuures arvesse mõõtmise laiendmääramatust⁽¹⁾.

*II PEATÜKK****Proovi ettevalmistamine ja nõuded analüüsimeetoditele, mida kasutatakse dioksiinide (PCDD/Fide) ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks söödas*****1. Kohaldamisala**

Käesolevas peatükis sätestatud nõudeid kohaldatakse sööda analüüsimisel 2,3,7,8-asendatud PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks, samuti seoses proovide ettevalmistamise ja analüüsimisega muul regulatiivsel eesmärgil, sealhulgas kontrollide puhul, mida söödakäitlejad teevad, et tagada vastavus Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EÜ) nr 183/2005⁽²⁾ sätetele.

PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde esinemist söödas võib kontrollida kaht liiki analüüsimeetoditega:

a) Sõeluuringumeetodid

Sõeluuringumeetoditega tuvastatakse sellised proovid, mille PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisaldus ületab piinormi või häiretaseme. Sõeluuringumeetodid peavad võimaldama kulutõhusalt analüüsida suurt arvu proove ning see suurendab võimalusi avastada uusi juhtumeid, mis on tarbijate jaoks suure kokkupuute- ja terviseriskiga. Nende kasutamise eesmärk on valenegatiivsete tulemuste vältimine. Nende hulka kuulub bioanalüütilisi ja GC-MS-meetodeid.

Sõeluuringumeetoditega võrreldakse analüüsitulemusi läviväärtusega ning saadakse jaatav või eitav vastus piinormi või häiretaseme võimaliku ületamise kohta. Piinormile mittevastavuse kahtlusega proovides tuleb PCDD/Fide kontsentratsioon ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summaarne kontsentratsioon määrata või kinnitada kinnitava meetodi abil.

Peale selle võivad sõeluuringumeetodid anda teavet proovis leiduvate PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse kohta. Bioanalüütiliste sõeluuringumeetodite kasutamise korral väljendatakse tulemus bioanalüütilistes ekvivalentides (BEQdes), füüsikalise-keemiliste GC-MS-meetodite kasutamise korral toksilisusekvivalentides (TEQ).

⁽¹⁾ Häiretaseme kontrollimise kordusanalüüsi suhtes kehtivad samad selgitused ja nõuded, mis on esitatud eespool joonealuses märkuses 2 piinormide kohta.

⁽²⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 12. jaanuari 2005. aasta määrus (EÜ) nr 183/2005, millega kehtestatakse söödahügieeni nõuded (ELT L 35, 8.2.2005, lk 1).

▼ **M6**

Sõeluuringumeetodite numbrilised tulemused sobivad nõuetekohasuse või nõuetele mittevastavuse kahtluse või häiretaseme ületamise tõendamiseks ning kinnitavate meetoditega järelanalüüsi jaoks asjaomase kontsentratsioonivahemiku hindamiseks. Need meetodid ei sobi taustsisalduse ja söödaga saadavate annuste hindamiseks, sisalduse ajatrendide jälgimiseks ega häiretaseme ja piinormi ümberhindamiseks.

b) *Kinnitavad meetodid*

Kinnitavate meetoditega on võimalik proovis leiduvaid PCDD/Fe ja dioksiinitalisi PCBsid üheselt tuvastada ja määrata nende sisaldus ning saada nende kohta täielikud andmed analoogide tasemel. Seega saab selliste meetoditega kontrollida piinorme ja häiretasemeid, sealhulgas kinnitada sõeluuringumeetoditega saadud tulemusi. Lisaks võib tulemusi kasutada muudel eesmärkidel, nagu sööda seires väikese taustsisalduse määramine, ajatrendide jälgimine, kokkupuute hindamine ning andmebaasi koostamine häiretasemete ja piinormide võimalikuks ümberhindamiseks. Need meetodid on olulised ka analoogide kombinatsioonide kindlakstegemiseks, et tuvastada võimalik saasteallikas. Nende meetodite puhul kasutatakse GC-HRMSi. Piinormile vastavuse või mittevastavuse kinnitamiseks võib kasutada ka GC-MS/MSi.

2. **Taustteave**

Toksilisusekvivalentides (TEQdes) väljendatud kontsentratsioonide arvutamiseks korrutatakse üksikainete kontsentratsioonid asjaomases proovis vastava toksilisusefaktoriga (TEF) (vt I peatüki allmärkus 1) ja liidetakse seejärel kokku, et saada TEQdes väljendatud dioksiinitaliste ühendite üldkontsentratsioon.

Käesolevas B osas tähendab üksikanaloogi aktsepteeritav määramispiir väikseimat analüüdisisaldust, mida saab mõistliku statistilise usaldusväärsusega mõõta ning mis vastab määramiskriteeriumidele, mis on sätestatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardites, nagu standard EN 16215:2012 „Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS” (Loomasööt – dioksiinide ja dioksiinitaliste PCBde sisalduse määramine gaasikromatograafia ja kõrglahutus-massispektrometria (GC-HRMS) abil ning indikaator-PCBde sisalduse määramine GC-HRMSi abil) ja/või EPA meetodid 1613 ja 1668 (läbivaadatud).

Üksikanaloogi määramispiiri võib määratleda järgmiselt:

- a) prooviekstraktis leiduva analüüdi selline kontsentratsioon, mis annab kahe erineva jälgitava iooni puhul mõteseadmes mõõtmistulemuse, mille puhul nõrgema töötlemata andmesignaali signaali ja müra suhe on 3: 1 või
- b) väikseima kontsentratsiooni punkt kalibreerimiskõveral, mille puhul saadakse vastuvõetav ($\leq 30\%$) ja järjepidev (mõõdetud vähemalt proovide analüüsiseeria alguses ja lõpus) hälve keskmisest suhtelisest kalibreerimistegurist, mis on arvutatud iga prooviseeria kalibreerimiskõvera kõikide punktide järgi, kui tehnilistel põhjustel signaali ja müra suhte arvutus ei anna usaldusväärset tulemust. Määramispiir LOQ arvutatakse väikseima kontsentratsiooni järgi, võttes arvesse sisestandardite saagist ja proovikogust.

▼M6

Bioanalüütilised sõeluuringumeetodid ei anna tulemusi analoogi tasemel, vaid näitavad ⁽¹⁾ üksnes TEQ väärtust, väljendatuna BEQdes, millega võetakse arvesse asjaolu, et kõik prooviekstraktis leiduvad ühendid, mis katses vastuse annavad, ei tarvitse vastata kõikidele TEQ-põhimõtte nõuetele.

Sõeluuringu- ja kinnitavaid meetodeid võib teatavas maatriksis sisalduse kontrollimiseks kasutada vaid juhul, kui kõnealused meetodid on piisavalt tundlikud, et häiretasemele või piirnõrmile vastavat sisaldust usaldusväärselt määrata.

3. Kvaliteedi tagamise nõuded

- 3.1. Igas proovivõtu- ja analüüsetapis tuleb võtta meetmed ristsaastumise vältimiseks.
- 3.2. Proove tuleb säilitada ja transportida säilitamiseks sobivates klaas-, alumiinium-, polüpropüleen- või polüetüleenõudes, mis ei mõjuta proovide PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisaldust. Paberitolmu jäägid tuleb proovinõust eemaldada.
- 3.3. Proove tuleb säilitada ja transportida nii, et söödaproovi koostis ei muutuks.
- 3.4. Vajaduse korral iga laboriproov jahvatatakse peeneks ja segatakse põhjalikult meetodil, mis tagab tõendatult täielikult homogeense proovi (näiteks jahvatatakse proov nii peeneks, et see läbiks 1 mm suuruste avadega sõela). Liiga suure niiskusesisaldusega proove tuleb enne jahvatamist kuivatada.
- 3.5. Oluline on kontrollida, et reaktiivid, klaasnõud ja seadmed ei mõjutaks TEQdes või BEQdes väljendatud tulemusi.
- 3.6. Tuleb teha tühikatse, mille puhul tehakse läbi kõik analüüsetapid ilma proovita.
- 3.7. Bioanalüütiliste meetodite puhul tuleb kontrollida, et ükski analüüsis kasutatav klaasnõu või lahusti ei sisaldaks ühendeid, mis segavad uuritavate ühendite avastamist meetodi töövahemikus. Klaasnõu tuleb loputada lahustiga või kuumutada temperatuuril, mis sobib selle pinnalt PCDD/Fide, dioksiinitaoliste ühendite ja segavate ühendite jääkide eemaldamiseks.
- 3.8. Ekstraheeritava proovi kogus peab olema piisav, et see vastaks nõuetele, mida kohaldatakse piisavalt väikestele kontsentratsioonidele vastavas töövahemikus, sh piirnõrmile ja häiretasemele vastavas kontsentratsioonide vahemikus.
- 3.9. Uuritavatest toodetest võetud proovide ettevalmistamiseks kasutatavate konkreetsete meetodite puhul tuleb järgida rahvusvaheliselt tunnustatud suuniseid.

⁽¹⁾ Bioanalüütilised meetodid ei ole spetsiifilised toksilisusfaktori (TEF) süsteemi analoogide suhtes. Prooviekstrakt võib sisaldada muid sarnase struktuuriga AhR-aktiivseid ühendeid, mis mõjutavad üldist tulemust. Seega ei saa bioanalüütilist tulemust pidada TEQ taseme hinnanguks, pigem viitab see proovi TEQ võimalikule tasemele.

▼ **M6****4. Nõuded laboritele**

- 4.1. Vastavalt määrusele (EÜ) nr 882/2004 peavad laborid olema ISO juhendi 58 kohaselt tegutseva tunnustatud asutuse poolt akrediteeritud, millega tagatakse, et laborid kohaldavad analüüsimisel kvaliteeditagamissüsteemi. Laborid tuleb akrediteerida standardi EN ISO/IEC 17025 kohaselt. Vajaduse korral järgitakse põhimõtteid, mida on kirjeldatud tehnilistes suunistes, milles käsitletakse mõõtemääramatuse ja määramispiiride hinnangulise väärtuse leidmist PCDD/Fide ja PCBde analüüsimisel ⁽¹⁾.
- 4.2. Labori pädevust tuleb tõendada pideva eduka osalemisega laboritevahelistes uuringutes, mida korraldatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaliste PCBde kontsentratsiooni määramiseks asjakohastes söödamaatriksites ja kontsentratsioonivahemikes.
- 4.3. Laborid, kus kasutatakse proovide tavakontrolliks sõeluuringumeetodeid, peavad tegema nii kvaliteedi kontrollimisel kui ka saastekahtlusega proovide analüüsitulemuste kinnitamisel tihedat koostööd kinnitavat meetodit kasutavate laboritega.

5. Põhinõuded dioksiinide (PCDDde/PCDFide) ja dioksiinitaliste PCBde analüüsile

- 5.1. *Väikeste kontsentratsioonidega töövahemik ja määramispiirid*
- Kuna osa kõnealustest ühenditest on äärmiselt toksilised, peavad tuvastatavad PCDD/Fide kogused olema femtogrammi (10^{-15} g) ülemises vahemikus. Enamiku PCBde analoogide puhul piisab nanogrammi täpsusega (10^{-9} g) määramispiirist. Toksilisemate dioksiinitaliste PCBde analoogide (eriti ortoasendamata analoogide) sisalduse määramiseks peab töövahemiku alumine osa ulatuma pikogrammi (10^{-12} g) alumiste väärtusteni. Kõigi muude PCBde analoogide puhul piisab nanogrammi (10^{-9} g) täpsusega määramispiirist.
- 5.2. *Suur selektiivsus (spetsiifilisus)*
- 5.2.1. PCDD/Fisid ja dioksiinitalisi PCBsid peab olema võimalik eristada paljudest muudest kaasa ekstraheeruvatest ja segada võivatest ühenditest, mille kontsentratsioon võib olla mitu suurusjärku suurem kui uuritavate analüütide kontsentratsioon. GC-MS-meetodite korral peab olema võimalik eristada eri analooge, näiteks toksilisi analooge (nt seitseteist 2,3,7,8-asendatud PCDD/Fi ning kaksteist dioksiinitalist PCBd) muudest analoogidest.
- 5.2.2. Bioanalüütiliste meetoditega peab olema võimalik määrata uuritavaid ühendeid PCDD/Fide ja/või dioksiinitaliste PCBde summana. Proove tuleb puhastada, et kõrvaldada valepositiivseid tulemusi põhjustavad ühendid ja ühendid, mis võivad signaali vähendada, põhjustades valenegatiivseid tulemusi.
- 5.3. *Suur mõõtetäpsus (tõesus ja kordustäpsus, bioanalüüsi näiline saagis)*
- 5.3.1. GC-MS-meetodite puhul peab määramine tagama kehtiva hinnangu aine tegeliku kontsentratsiooni kohta proovis. Suur mõõtetäpsus on vajalik, et vältida analüüsitulemuse tagasilükkamist määratud TEQ väärtuse vahese

⁽¹⁾ „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” (Juhend mõõtemääramatuse kohta laboritele, kus tehakse PCDDde/PCDFide ja PCBde analüüse isotooplahjendusega massispektromeetria abil) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food” (Juhend avastamispiiri ja määramispiiri hinnangulise väärtuse määramiseks söödas ja toidus esinevate saasteainete mõõtmisel) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

▼ **M6**

usaldusväärsuse tõttu. Mõõdetäpsust väljendatakse *tõesuse* (sertifitseeritud materjalis sisalduva analüüdi mõõdetud keskmise väärtuse ja analüüdi sertifitseeritud väärtuse erinevus protsentides) ja *kordustäpsusena* (RSD_R on suhteline standardhälve, mis arvutatakse korratavuse tingimustes saadud tulemuste põhjal).

- 5.3.2. Bioanalüütiliste meetodite korral määratakse bioanalüüsi näiline saagis. „Bioanalüüsi näiline saagis” tähendab BEQ väärtust, mis arvutatakse 2,3,7,8-tetraklorodibenso-*p*-dioksiini (TCDD) või PCB 126 kalibreerimiskõvera alusel, mida korrigeeritakse tühiprooviga ja jagatakse seejärel kinnitava meetodi abil määratud TEQ väärtusega. Sellega püütakse korrigeerida selliseid tegureid nagu PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste ühendite kadu ekstraheerimisel ja puhastamisel, kaasa ekstraheeruvad ühendid, mis suurendavad või vähendavad tulemust (agonistlik ja antagonistlik mõju), kalibreerimiskõvera sobivus ning toksilisusfaktori (TEF) ja suhtelise potentsuse (REP) väärtuste erinevused. Bioanalüüsi näiline saagis arvutatakse sobivate võrdlusproovide alusel, milles analoogide kombinatsioon on representatiivne ja nende sisaldus vastab ligikaudu huvipakkuvale sisalduste vahemikule.
- 5.4. *Valideerimine piirnormi vahemikus ja kvaliteedikontrolli üldmeetmed*
- 5.4.1. Labor peab tõendama valideerimismenetluse ja tavaanalüüsiga meetodi tulemuslikkust piirnormi hõlmavas vahemikus, nt piirnormi 0,5-, 1- ja 2-kordsele väärtusele vastava sisalduse juures, kordusanalüüsi puhul peab variatsioonikordaja väärtus olema vastuvõetav.
- 5.4.2. Sisemiste kvaliteedikontrolli meetmetena tuleb teha regulaarseid tühiproovidega ja rikastatud proovidega katseid või analüüsida kontrollproove (võimaluse korral tuleb eelistada sertifitseeritud etalonaineid). Tühiproovide ja rikastatud proovidega katsete ning kontrollproovide analüüsi kohta tuleb koostada kvaliteedikontrolli kaardid, mille alusel kontrollitakse, kas analüüsivate tulemuslikkus vastab nõuetele.
- 5.5. *Määramispiir*
- 5.5.1. Bioanalüütilise sõeluuringumeetodi puhul ei ole määramispiiri tingimata vaja kindlaks määrata, kuid tuleb tõendada, et meetodiga on võimalik eristada tühiproovi väärtust läviväärtusest. BEQ väärtuse esitamise korral määratakse kindlaks teatamiskünnis, et oleks võimalik eristada proove, mille puhul saadud väärtus on sellest künnisest väiksem. Tuleb tõendada, et teatamiskünnis erineb tühiproovide väärtusest vähemalt kolm korda ja tulemus jääb töövahemikust allapoole. Seejärel arvutatakse see proovide alusel, mis sisaldavad uuritavaid ühendeid ligikaudu nõutud miinimumkoguses, mitte signaali-müra suhte või tühikatte põhjal.
- 5.5.2. Kinnitava meetodi puhul peab määramispiir olema ligikaudu üks viiendik piirnormist.
- 5.6. *Analüüsikriteeriumid*
- Kinnitava meetodi või sõeluuringumeetodi abil usaldusväärsete tulemuste saamiseks peavad piirnormile vastavasse vahemikku jääva TEQ väärtuse ja vastava BEQ väärtuse puhul olema täidetud järgmised kriteeriumid, olenemata sellest, kas TEQ või BEQ määratakse summaarsena (PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summaarse sisalduse alusel) või PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde kohta eraldi.

▼ **M6**

	Sõeluuring bioanalüütiliste või füüsikalis-keemiliste meetoditega	Kinnitavad meetodid
Valenegatiivsete tule- muste osakaal ⁽¹⁾	< 5 %	
Tõesus		– 20 % kuni + 20 %
Korduvus (RSD _r)	< 20 %	
Vahepealne korduvus- täpsus (RSD %)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ Piinormide puhul.

5.7. *Sõeluuringumeetodi erinõuded*

5.7.1. Sõeluuringuks võib kasutada nii GC-MS-meetodeid kui ka bioanalüütilisi meetodeid. GC-MS-meetodite suhtes kohaldatakse punktis 6 sätestatud nõudeid. Rakupõhiste bioanalüütiliste meetodite erinõuded on sätestatud punktis 7.

5.7.2. Laborid, kus proovide tavakontrolliks kasutatakse sõeluuringumeetodeid, peavad tegema tihedat koostööd kinnitavat meetodit kasutavate laboritega.

5.7.3. Tavaanalüüsides käigus tuleb kontrollida sõeluuringumeetodi tulemuslikkust analüüsi kvaliteedi kontrollimise ja meetodi pideva valideerimise teel. Nõuetele vastavate tulemuste kontrollimiseks peab olema kehtestatud pidev kava.

5.7.4. Raku reaktsiooni võimaliku pärssimise ja tsütotoksilisuse kontroll

20 % prooviekstraktidest tuleb kontrollida tavapärase sõeluuringuga, lisades neile või jättes lisamata piinormile või häiretasemele vastavas koguses 2,3,7,8-TCDDd, et kontrollida, kas prooviekstraktis esinevad segavad ained võivad reaktsiooni pärssida. Rikastatud proovis mõõdetud kontsentratsiooni võrreldakse rikastamata ekstraktis määratud kontsentratsiooni ja rikastamisel kasutatud kontsentratsiooni summaga. Kui kõnealune mõõdetud kontsentratsioon on arvatud (summaarsest) kontsentratsioonist üle 25 % väiksem, viitab see signaali võimalikule pärssimisele ning asjaomast proovi tuleb analüüsida GC-HRMS-meetodil tehtava kinnitava analüüsiga. Tulemusi kontrollitakse kvaliteedikontrolli kaartide põhjal.

5.7.5. Nõuetele vastavate proovide kvaliteedikontroll

Ligikaudu 2–10 % nõuetele vastavate proovide tulemustest tuleb olenevalt proovi maatriksist ja labori kogemustest kinnitada GC-HRMS-meetodiga.

5.7.6. Valenegatiivsete tulemuste osakaalu arvutamine kvaliteedikontrolli andmete põhjal

Määratakse, kui suur on valenegatiivsete tulemuste osakaal, mis on saadud alla- ja ülespoole piinormi või häiretaset jäävate proovide sõeluuringul. Valenegatiivsete tulemuste tegelik osakaal peab jääma alla 5 %. Kui proovi maatriksi või maatriksite rühma kohta on olemas vähemalt 20 nõuetele vastava proovi kvaliteedikontrolliga kinnitatud tulemused, arvutatakse nende andmete põhjal valenegatiivsete tulemuste

▼ **M6**

osakaal. Valenegatiivsete tulemuste osakaalu hindamiseks vajaliku 20 tulemuse hulka võib arvata ka laboritevahelistes võrdluskatsetes või seoses saastamisjuhtumiga analüüsitud proovide tulemused, milles määratava aine kontsentratsioon ületab piinormi näiteks kuni kaks korda. Proovid peavad hõlmama kõige levinumaid analoogide kombinatsioone, mis esindavad eri allikaid.

Ehkki sõeluuringu esmane eesmärk on teha kindlaks häiretaset ületava sisaldusega proovid, lähtutakse valenegatiivsete tulemuste osakaalu kindlakstegemisel piinormist ning seejuures võetakse arvesse kinnitava meetodi kohast mõõtmise laiendmääramatust.

- 5.7.7. Sõeluuringuga tuvastatud võimalikke nõuetele mittevastavaid tulemusi tuleb alati kontrollida esialgse proovi täieliku kordusanalüüsiga, kasutades kinnitavat meetodit. Neid proove võib kasutada ka valepositiivsete tulemuste osakaalu hindamiseks. Sõeluuringumeetodite puhul on valepositiivsete tulemuste osakaal selliste tulemuste osakaal, mis tunnistatakse kinnitava analüüsiga nõuetele vastavaks, kuigi varasemal sõeluuringul on proov osutunud nõuetele mittevastavuse kahtlusega prooviks. Sõeluuringumeetodi eeliste hindamisel tuleb valepositiivse tulemuse andnud proovide arvu võrrelda kontrollitud proovide koguarvuga. See osakaal peab olema piisavalt väike, et sõeluuringumeetodit oleks mõtet kasutada.
- 5.7.8. Bioanalüütiliste meetodid peavad valideerimistingimustes võimaldama usaldusväärset viidet TEQ võimalikule tasemele, arvatud ja väljendatud BEQna.

Ka korduvuse tingimustes kasutatavate bioanalüütiliste meetodite puhul peaks laborisisene RSD_r olema üldjuhul väiksem kui korratavuse tingimustes (RSD_R).

6. GC-MS-meetodite erinõuded, mida tuleb täita sõeluuringu või kinnitava analüüsi puhul

- 6.1. *WHO-TEQ tulemuste ülemise tõkke ja alumise tõkke vaheline vastuvõetav erinevus*

Ülemise ja alumise tõkke vaheline erinevus ei tohi piinormi ja vajaduse korral häiretaseme ületamise kinnitamiseks olla suurem kui 20 %.

6.2. *Saagiste kontroll*

- 6.2.1. Analüüsimeetodi valideerimiseks tuleb ^{13}C -märgistatud 2,3,7,8-klooritud PCDD/Fide sisestandardid ja ^{13}C -märgistatud dioksiinitaoliste PCBde sisestandardid lisada kohe analüüsi alguses, näiteks enne ekstraheerimist. Iga tetra- kuni oktaklooritud PCDD/Fide homoloogilise rühma kohta ning iga dioksiinitaoliste PCBde homoloogilise rühma kohta tuleb lisada vähemalt üks analoog (alternatiivina võib lisada vähemalt ühe analoogi iga valitud iooni massispektrometrilise registreerimise funktsiooni kohta, mida kasutatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse kontrolliks). Kinnitavate meetodite puhul tuleb kasutada kõiki seitsetteist ^{13}C -märgistatud 2,3,7,8-asendatud PCDD/Fide sisestandardit ja kõiki kahteist ^{13}C -märgistatud dioksiinitaoliste PCBde sisestandardit.

▼ **M6**

- 6.2.2. Asjakohaseid kalibreerimislahuseid kasutades tuleb määrata suhtelised kalibreerimistegurid ka neile analoogidele, mille puhul ¹³C-märgistatud analoogi ei lisata.
- 6.2.3. Alla 10 % rasvasisaldusega taimse ja loomse sööda puhul tuleb sisestandardid kindlasti lisada enne ekstraheerimist. Üle 10 % rasvasisaldusega loomse sööda puhul tuleb sisestandardid lisada kas enne või pärast rasva ekstraheerimist. Ekstraheerimise tõhusus tuleb valideerida sobival viisil olenevalt sellest, millises etapis sisestandardid lisatakse.
- 6.2.4. Enne GC-MS-analüüsi tuleb lisada 1 või 2 saagise (surrogaat)standardit.
- 6.2.5. Saagise kogust tuleb kontrollida. Kinnitava meetodi puhul peavad individuaalsete sisestandardite saagised olema vahemikus 60–120 %. Individuaalsete analoogide, eriti mõne hepta- või oktaklooritud dibenso-*p*-dioksiini ja dibensofuraani puhul on lubatud väiksemad või suuremad saagised, kui nende panus TEQ väärtusesse ei ületa 10 % TEQ koguväärtusest (PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa alusel). GC-MS-sõeluurumetodite puhul peavad saagised olema vahemikus 30–140 %.
- 6.3. *Segavate ainete eemaldamine*
- PCDD/Fid eraldatakse segavatest klooritud ühenditest, näiteks mitte-dioksiinitaolistest PCBdest ja klooritud difenüüleetritest, sobiva kromatograafilise meetodiga (eelistada tuleks florisil-, alumiiniumoksiid- ja/või süsinikkolonne).
 - Isomeeride gaasikromatograafiline lahutus peab olema selline, et 1,2,3,4,7,8-HxCDFi ja 1,2,3,6,7,8-HxCDFi piikide kattuvus on alla 25 %.
- 6.4. *Kalibreerimine standardkõveraga*
- Kalibreerimiskõvera vahemik peab hõlmama asjakohast piirnormi või häiretaset.
- 6.5. *Kinnitavate meetodite erikriteeriumid*
- GC-HRMSi puhul:

HRMSi puhul peab lahutusvõime kogu massivahemikus olema üldjuhul vähemalt 10 000, kui piikidevahelise ala kõrgus jääb alla 10 %;

järgitakse rahvusvaheliselt tunnustatud standardites, näiteks standardis EN 16215:2012 „Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS” (Loomasööt – dioksiinide ja dioksiinitaoliste PCBde määramine GC-HRMSiga ning indikaator-PCBde määramine GC-HRMSiga) ja/või USA Keskkonnakaitseameti meetodite 1613 ja 1668 läbivaadatud versioonides kirjeldatud tuvastamise ja kinnitamise lisakriteeriume.
 - GC-MS/MSi puhul:

jälgitakse vähemalt 2 spetsiifilist eellasiooni, millest kummalgi on vastav spetsiifiline ülemineku-järglasioon kõikide märgistatud ja märgistamata analüütide jaoks analüüsitavas vahemikus;

valitud ülemineku-järglasioonide suhteliste signaalitugevuste suurim lubatud hälve võib olla ± 15 % võrreldes arvatud või mõõdetud väärtustega (kaliibrimisstandardite keskmine), identsetes MS/MSi tingimustes, eelkõige põrkeenergia ja põrkegaasi rõhu osas, iga analüüdi ülemineku puhul;

▼ **M6**

iga kvadrupooli lahutusvõime peab olema võrdne ühikmassilahutusvõimega või sellest parem (ühikmassilahutusvõime: lahutusvõime, mis on piisav kahe teineteisest ühe massiühiku kaugusel asuva piigi eristamiseks), et minimeerida võimalikku segavat mõju uuritavatele analüütidele;

järgitakse rahvusvaheliselt tunnustatud standardites, näiteks standardis EN 16215:2012 „Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS” (Loomasööt – dioksiinide ja dioksiinilaiste PCBde määramine GC-HRMSiga ning indikaator-PCBde määramine GC-HRMSiga) ja/või USA Keskkonnakaitseameti meetodite 1613 ja 1668 muudetud versioonides kirjeldatud tuvastamise ja kinnitamise lisakriteeriume, välja arvatud kohustust kasutada GC-HRMSi.

7. Bioanalüütiliste meetodite esitatavad erinõuded

Bioanalüütilised meetodid on bioloogiliste põhimõtetele tuginevad meetodid, nagu rakupõhine, retseptor- ja immuunanalüüs. Käesolevas punktis 7 sätestatakse bioanalüütiliste meetodite üldnõuded.

Sõeluuringumeetodiga liigitatakse proov põhimõtteliselt nõuetele vastavaks või nõuetele mittevastavuse kahtlusega prooviks. Sel otstarbel võrreldakse arvatud BEQ väärtust läviväärtusega (vt punkt 7.3). Läviväärtusest allapoole jäävad proovid tunnistatakse nõuetele vastavaks, läviväärtusega võrdsed või seda ületavad proovid loetakse mittevastavuse kahtlusega proovideks ning neid tuleb analüüsida kinnitava meetodiga. Praktikas võib kõige sobivamaks läviväärtuseks olla BEQ väärtus, mis vastab 2/3 piirnормist, eeldusel, et on tagatud valenegatiivsete tulemuste osakaal alla 5 % ja vastuvõetav valepositiivsete tulemuste osakaal. Kui PCDD/Fide piirnорм ning PCDD/Fide ja dioksiinilaiste PCBde summa piirnорм on erinevad, on proovide nõuetele vastavuse kontrollimiseks ilma fraksioneerimata vaja PCDD/Fide jaoks asjakohaseid bioanalüüsi läviväärtusi. Häiretaset ületavate proovide kontrollimisel on sobivaks läviväärtuseks asjakohane protsent vastavatest häiretasemetest.

Kui hinnangulist sisaldust väljendatakse BEQna, peavad proovi analüüsitulemused jääma töövahemikku ja ületama teatamiskünnise (vt punktid 7.1.1 ja 7.1.6).

7.1. Analüüsitulemuste hindamine

7.1.1. Üldised nõuded

— Kui kontsentratsioone arvutatakse TCDD kalibreerimiskõvera alusel, iseloomustab kõvera ülemise osa väärtusi suur hajuvus (variatsioonikordaja CV suur väärtus). Töövahemik on ala, kus CV on alla 15 %. Töövahemiku alumine piir (teatamiskünnis) peab olema vähemalt kolm korda suurem tühikatsete tulemusest. Töövahemiku ülemine piir esitatakse tavaliselt EC₇₀ väärtusena (70 % suurimast efektiivsest kontsentratsioonist), kuid see on väiksem, kui CV on selles vahemikus üle 15 %. Töövahemik määratakse valideerimise käigus. Läviväärtused (vt punkt 7.3) peavad kindlalt jääma töövahemikku.

— Standardlahuste ja prooviekstraktide analüüsimisel tehakse kolm või vähemalt kaks kordusmõõtmist. Kordusanalüüsi korral annab 4–6 üle plaadi jaotatud kannus analüüsiv standardlahus või kontrollekstrakt tulemuse või kontsentratsiooni (võimalik ainult töövahemikus), mis põhineb CV-l, mis on väiksem kui 15 %.

▼ **M6**

7.1.2. Kalibreerimine

7.1.2.1. Kalibreerimine standardkõveraga

- Proovide dioksiinisalduse hindamiseks võrreldakse analüüsitulemust TCDD (või PCB 126 või PCDD/PCDFi/dioksiinitaolise PCB standardsegu) kalibreerimiskõveraga, millest arvutatakse ekstrakti ja seejärel proovi BEQ väärtus.
- Kalibreerimiskõver peab hõlmama 8–12 kontsentratsiooni (vähemalt kahe kordusmõõtmisega), nii et kõvera alumises osas (töövahemikus) oleks piisavalt kontsentratsioonipunkte. Erilist tähelepanu tuleb pöörata kõvera sobivusele töövahemikus. Mittelineaarse regressiooni korral ei ole R^2 väärtusest regressiooni sobivuse hindamisel eriti või üldse abi. Parem mudeli sobivus saavutatakse arvatud sisalduse ja mõõdetud sisalduse vahe (nt ruuthälvete summa) minimeerimisega töövahemikule vastavas kõvera osas.
- Seejärel tuleb korrigeerida prooviekstrakti hinnangulist dioksiinisaldust uuritava maatriksiga või lahustiga tühiproovi kohta arvatud BEQ väärtuse põhjal (et võtta arvesse kasutatud lahustites ja kemikaalides esinevaid lisandeid) ning näilise saagise põhjal (arvutatakse sellise sobiva võrdlusproovi BEQ väärtuse alusel, mille representatiivne analoogide kombinatsioon vastab ligikaudu piinormile või häiretasemele). Saagise korrigeerimiseks peab näiline saagis alati olema nõutavas vahemikus (vt punkt 7.1.4). Saagise korrigeerimiseks kasutatavad võrdlusproovid peavad vastama punktis 7.2 sätestatud nõuetele.

7.1.2.2. Kalibreerimine võrdlusproovide abil

Teise võimalusena võib kasutada vähemalt nelja võrdlusproovi alusel koostatud kalibreerimiskõverat (vt punkt 7.2.4): üks maatriksiga tühiproov ning kolm võrdlusproovi sisaldustega, mis võrduvad 0,5-, 1- ja 2-kordse piinormi või häiretasemega; kui võrdlusproovide maatriksi omadused kattuvad tundmatute proovide maatriksi omadustega, ei ole vaja arvestada tühikats ja saagise parandit. Sellisel juhul võib otse nende proovide alusel arvutada analüüsitulemuse, mis vastab 2/3 piinormist (vt punkt 7.3), ja kasutada seda läviväärtusena. Häiretaset ületavate proovide kontrollimisel on sobivaks läviväärtuseks asjakohane protsent sellistest häiretasemetest.

7.1.3. PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde eraldi määramine

Ekstraktid võib jagada PCDD/Fisid ja dioksiinitaolisi PCBsid sisaldavateks fraktsioonideks, mis võimaldab eraldi määrata PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde TEQ väärtused (väljendatuna BEQna). Dioksiinitaolisi PCBsid sisaldava fraktsiooni analüüsimise tulemuste hindamiseks tuleb eelistatavalt kasutada standardiga PCB 126 saadud kalibreerimiskõverat.

7.1.4. Bioanalüüsi näilised saagised

Bioanalüüsi näiline saagis arvutatakse sobivate võrdlusproovide alusel, mille representatiivne analoogide kombinatsioon vastab ligikaudu piinormile või häiretasemele, ja seda väljendatakse BEQ väärtuse protsendina TEQ väärtusest. Olenevalt analüüsi liigist ja kasutatud TEFidest⁽¹⁾ võib dioksiinitaoliste PCBde TEF- ja REP-kordajate erinevuse tõttu dioksiinitaoliste PCBde näiline saagis olla PCDD/Fide näilise saagisega võrreldes väike. Seepärast peab PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde

⁽¹⁾ Kehtivad nõuded põhinevad TEFidel, mis on avaldatud artiklis: M. van den Berg *et al.*, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ **M6**

eraldi määramisel bioanalüüsi näiline saagis olema järgmine: dioksiinitaoliste PCBde puhul 20–60 % ja PCDD/Fide puhul 50–130 % (vahemik kehtib TCDD kalibreerimiskõvera kasutamisel). Dioksiinitaoliste PCBde osakaal PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summas võib eri maatriksite ja proovide puhul erineda; need vahemikud kajastuvad PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa bioanalüüsi näilises saagises, mis peab olema 30–130 %. Kui liidu õigusaktides muudetakse oluliselt PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde TEFide väärtusi, tuleb need vahemikud läbi vaadata.

7.1.5. Saagiste kontroll puhastamisel

Valideerimise käigus kontrollitakse ühendite kadu puhastamisel. Analooide seguga rikastatud tühiproov (korduskatsete arv n on vähemalt 3) puhastatakse ning saagist ja varieeruvust kontrollitakse kinnitava meetodiga. Saagis peab olema vahemikus 60–120 %, eelkõige selliste analooide puhul, mis moodustavad eri segude TEQ väärtusest üle 10 %.

7.1.6. Teatamiskünnis

BEQ väärtustest teatamisel tuleb teatamiskünnis kindlaks määrata tüüpilisi analooide kombinatsioone sisaldavast asjakohasest maatriksist võetud proovide alusel, mitte standarditel põhineva kalibreerimiskõvera alusel, kuna kõvera alumises osas on täpsus väike. Arvestada tuleb ekstraheerimise ja puhastamise mõju. Teatamiskünnis peab olema tühi- katsete tulemusest vähemalt kolm korda suurem.

7.2. Võrdlusproovide kasutamine

7.2.1. Võrdlusproovid peavad esindama proovi maatriksit, analooide kombinatsioone ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde kontsentratsioone vahemikus, mis vastab piirnормile või häiretasemele.

7.2.2. Igas katseseerias tuleb kasutada tühikatset, eelistatavalt maatriksiga tühiproovi, ja piirnормile või häiretasemele vastava sisaldusega võrdlusproovi. Neid proove tuleb ekstraheerida ja analüüsida samal ajal ja samades tingimustes. Võrdlusprooviga saadud väärtus peab olema selgelt suurem tühiprooviga saadud väärtusest, mis tõendab katsemeetodi sobivust. Kõnealuseid proove võib kasutada tühikatset ja saagist arvestava parandi tegemisel.

7.2.3. Saagist arvestava parandi tegemiseks valitud võrdlusproovid peavad olema analüüsitava proovi suhtes representatiivsed, st analooide kombinatsioonid ei tohi põhjustada sisalduse alahindamist.

7.2.4. Et tõendada analüüsi nõuetekohast tulemuslikkust huvipakkuvas sisalduse vahemikus piirnормi või häiretaseme kontrollimiseks, võib kasutada täiendavaid võrdlusproove, milles uuritava aine sisaldus vastab näiteks piirnормi või häiretaseme 0,5- ja 2-kordsele väärtusele. Üheskoos võib neid proove kasutada analüüsivate proovide BEQ väärtuste arvutamiseks (vt punkt 7.1.2.2).

▼ **M6**7.3. *Läviväärtuste määramine*

Tuleb teha kindlaks BEQ väärtustes väljendatud bioanalüütiliste tulemuste ja TEQ väärtustes väljendatud kinnitava meetodi tulemuste vaheline seos (nt asjakohase maatriksiga tehtud kalibreerimiskatsetega, milles kasutatakse võrdlusproove, mille rikastustasemed on 0, 0,5-, 1- ja 2-kordne piirnorm, ja mida korratakse igal tasemel 6 korda ($n = 24$)). Selle seose alusel saab hinnata (tühiproovi ja saagise) parandeid, kuid neid tuleb kontrollida punkti 7.2.2 kohaselt.

Läviväärtused tuleb määrata selleks, et otsustada, kas proov vastab piirnormile, või vajaduse korral häiretaseme kontrollimiseks, kusjuures asjaomased piirnormid või häiretasemed on kehtestatud kas ainult PCDD/Fide või dioksiinitaaliste PCBde jaoks või PCDD/Fide ja dioksiinitaaliste PCBde summa jaoks. Läviväärtus on bioanalüüsi tulemuste (mida on parandatud tühikate ja saagise arvestamiseks) jaotuse *alumine* piir, mis vastab 95 % usaldusnivooga kinnitava meetodi otsustuspiirile (eeldades, et valenegatiivsete tulemuste osakaal on $< 5\%$ ja $RSD_R < 25\%$). Kinnitava meetodi otsustuspiir on piirnorm, mille puhul on arvesse võetud mõõtmise laiendmääramatust.

Läviväärtuse (BEQdes) võib arvutada, kasutades üht punktides 7.3.1, 7.3.2 ja 7.3.3 sätestatud lähenemisviisidest (vt joonis 1).

7.3.1. 95 % usaldusnivoole vastava usaldusvahemiku *alumise* piiri kasutamine, mis vastab kinnitava meetodi otsustuspiirile:

$$\text{Läviväärtus} = \text{BEQ}_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

kus

BEQ_{DL} on BEQ, mis vastab kinnitava meetodi otsustuspiirile, mis on piirnorm, mille puhul on arvesse võetud mõõtmise laiendmääramatust,

$s_{y,x}$ on jääkstandardhälve,

$t_{\alpha,f=m-2}$ on Studenti tegur ($\alpha = 5\%$, $f =$ vabadusastmete arv, ühepoolse piiranguga),

m on kalibreerimispunktide koguarv (indeks j),

n on korduste arv igal tasemel,

x_i on kinnitava meetodiga määratud, TEQna väljendatud kontsentratsioon proovis kalibrimispunktis i ,

\bar{x} on kõikide kalibrimisproovide kontsentratsioonide keskvärtus (TEQdes),

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ on ruutude summa parameeter, } i - \text{ kalibreerimispunkti } i \text{ indeks.}$$

7.3.2. Arvutamine kinnitava meetodi otsustuspiirile vastava saatumisega proovide korduval analüüsimisel ($n \geq 6$) saadud (tühikate ja saagise arvestamiseks parandatud) bioanalüütiliste tulemuste põhjal; see on jaotuse *alumine* piir vastava keskmise BEQ väärtuse korral:

$$\text{Läviväärtus} = \text{BEQ}_{DL} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

kus

SD_R on bioanalüüsi tulemuste standardhälve BEQ_{DL} korral, mõõdetuna laborisisesse korratavuse tingimustes.

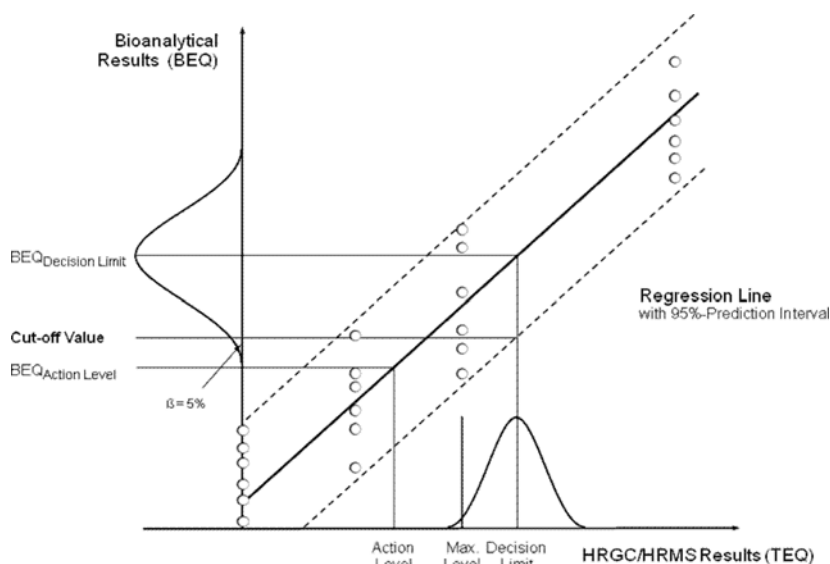
▼ **M6**

7.3.3. Arvutamine 2/3 piirnормi või häiretaseme väärtusele (põhineb tähelepanekul, et kõnealune tase vastab umbkaudu punkti 7.3.1 või 7.3.2 alusel kindlaks määratud läviväärtusele) vastava saastumisega proovide korduval analüüsimisel ($n \geq 6$) saadud bioanalüütiliste tulemuste (BEQdes, parandatud tühikate ja saagise arvestamiseks) keskvaartusena:

Läviväärtuste arvutamine 95 % usaldusnivoo korral eeldusel, et valenegatiivsete tulemuste osakaal on $< 5\%$ ja $RSD_R < 25\%$:

- 1) 95 % usaldusnivoole vastava usaldusvahemiku *alumise* piiri alusel, mis vastab kinnitava meetodi otsustuspiirile;
- 2) kinnitava meetodi otsustuspiirile vastava saastumisega proovide korduva analüüsimise ($n \geq 6$) alusel saadud tulemuste jaotuse (joonisel kellukesekujuline kõver) *alumise* piiri järgi sellekohase keskmise BEQ väärtuse juures.

Joonis 1



7.3.4. Läviväärtustele kehtestatud piirangud

BEQ-põhised läviväärtused, mis on arvatud valideerimise käigus saadud RSD_R alusel, kasutades piiratud arvu proove erinevate maatriksite ja analoogide kombinatsiooniga, võivad olla suuremad kui TEQ-põhised piirnормile või häiretasemele vastavad sisaldused, kuna valideerimisel saavutatakse suurem kordustäpsus kui tavaolukorras, kus tuleb kontrollida võimalike analoogide kombinatsioonide tundmatut spektrit. Sellisel juhul võetakse läviväärtuse arvutamisel aluseks kas $RSD_R = 25\%$ või eelistatakse sisaldust, mis on 2/3 piirnормi või häiretaseme väärtusest.

7.4. Tulemuslikkuse näitajad

7.4.1. Bioanalüütiliste meetodite puhul ei ole võimalik kasutada sisestandardeid, mistõttu tuleb katseseeriasises ja katseseeriavahelise standardhälbe kohta andmete saamiseks teha katsed bioanalüütiliste meetodite korduvuse kohta. Korduvus peab jääma alla 20 % ja laborisisene korratavus alla 25 %. See peab põhinema arvatud BEQ väärtustel pärast tühikate- ja saagiseparandi arvessevõtmist.

▼ M6

- 7.4.2. Valideerimise käigus tõendatakse, et analüüs võimaldab eristada tühi-proovi ja läviväärtusele vastavat sisaldust, mis võimaldab kindlaks teha proovid, milles asjaomane läviväärtus on ületatud (vt punkt 7.1.2).
- 7.4.3. Määratakse uuritavad ühendid, võimalikud segavad tegurid ja tühiproovi suurimad lubatud väärtused.
- 7.4.4. Ühe prooviekstrakti kolmekordsel analüüsimisel ei tohi protsentides väljendatud standardhälve olla suurem kui 15 % analüüsitulemusest või selle alusel arvatud sisaldusest (võimalik üksnes töövahemikus).
- 7.4.5. Bioanalüütilise meetodi tulemuslikkuse hindamiseks kindlas ajavahe-mikus kasutatakse võrdlusproovi(de) (tühiproov ning piinormile ja häiretasemele vastava sisaldusega proov) korrigeerimata tulemusi, mis on väljendatud BEQdes.
- 7.4.6. Tühiproovide ja iga tüüpi võrdlusproovide kohta tuleb koostada kvali-teedikontrolli kaardid ja kontrollida, kas analüüsi tulemuslikkus vastab nõuetele; eelkõige on nõutav teatava miinimumerinevuse olemasolu tühi-proovide ja töövahemiku alumise piiri vahel ning võrdlusproovide puhul on nõutav laborisisene korratavus. Tühikateid tuleb põhjalikult kontrol-lida, et vältida valenegatiivsete tulemuste saamist pärast tühiproovi tule-muse lahutamist.
- 7.4.7. Nõuetele mittevastavuse kahtlusega proovide ja 2–10 % nõuetekohaste proovide (vähemalt 20 proovi iga maatriksi kohta) kinnitava meetodiga saadud tulemused tuleb koondada ning kasutada söeluringumeetodi tulemuslikkuse ning BEQ ja TEQ vahelise seose hindamiseks. Neid andmeid võib kasutada asjaomase valideeritud maatriksiga tavaproovide suhtes kohaldatavate läviväärtuste ümberhindamiseks.
- 7.4.8. Meetodi tulemuslikkust võib tõendada ka laboritevahelistes võrdluskat-setes osalemisega. Võrdluskatsete käigus analüüsitud proovid hõlmavad nt kuni kahekordse piinormini ulatuvat kontsentratsioonide vahemikku ja nende tulemusi võib kasutada valenegatiivsete tulemuste osakaalu hindamisel, kui labor suudab tõendada meetodi tulemuslikkust asja-omases laboris. Proovid peavad hõlmama kõige levinumaid analoogide kombinatsioone, mis esindavad eri allikaid.
- 7.4.9. Saastumisjuhtumite korral võidakse läviväärtused ümber hinnata, võttes arvesse asjaomase juhtumiga seotud konkreetse maatriksi omadusi ja esinevaid analoogide kombinatsioone.

8. Tulemuste esitamine**8.1. Kinnitavad meetodid**

- 8.1.1. Analüüsitulemused peavad hõlmama iga üksiku PCDD/Fi ja dioksiini-taolise PCB analoogi sisaldusi ning TEQ väärtus tuleb esitada nii alumise ja ülemise tõkke kui ka vaheväärtuse põhisenä, et tagada võima-likult suure hulga andmete olemasolu katseprotokollis ja võimaldada tulemuste tõlgendamist lähtuvalt konkreetsetest nõuetest.
- 8.1.2. Protokollis esitatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde ekstraheeri-miseks kasutatud meetod.

▼ **M6**

- 8.1.3. Üksikute sisestandardite saagised tuleb esitada juhul, kui need jäävad väljapoole punktis 6.2.5 nimetatud vahemikku ja kui on ületatud piirnorm (sellisel juhul ühe korduskatse saagised) või kui nõutakse neist teatamist.
- 8.1.4. Kuna proovi nõuetekohasuse hindamisel tuleb arvestada mõõtmise laiendmääramatust, esitatakse ka see näitaja. Analüüsitulemused tuleb seega esitada kujul $x \pm U$, kus x on analüüsitulemus ja U on mõõtmise laiendmääramatus, kusjuures arvutamisel kasutatakse kattetegurit 2, mis annab ligikaudu 95 % usaldusnivoo. Kui PCDD/Fid ja dioksiinitaolised PCBd määratakse eraldi, tuleb PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa kohta kasutada PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde eraldi saadud analüüsitulemuste hinnanguliste laiendmääramatuste summat.
- 8.1.5. Tulemused tuleb esitada samades ühikutes ja vähemalt sama tüvenumbrite arvuga, nagu on esitatud direktiiviga 2002/32/EÜ sätestatud piirnormid.
- 8.2. *Bioanalüütilised sõeluuringumeetodid*
- 8.2.1. Sõeluuringu tulemus esitatakse järgmisel kujul: nõuetele vastav või nõuetele mittevastavuse kahtlusega („kahtlane”).
- 8.2.2. Lisaks sellele võib PCDDde/Fide ja/või dioksiinitaoliste PCBde esialgse sisalduse esitada BEQdes, mitte TEQdes.
- 8.2.3. Allapoole teatamiskünnist jääva tulemusega proovi kohta märgitakse „allpool teatamiskünnist”. Töövahemiku ülempiirist suurema sisaldusega proovi puhul esitatakse tulemus kujul „ületab töövahemiku ülempiiri” ning märgitakse töövahemiku ülempiirile vastav BEQ väärtus.
- 8.2.4. Katseprotokollis tuleb iga proovimatriksi tüübi kohta esitada piirnorm või häiretase, millel hindamine põhineb.
- 8.2.5. Protokollis esitatakse kasutatud analüüsimeetodi liik, analüüsimise aluspõhimõtted ja kalibreerimise viis.
- 8.2.6. Protokollis esitatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde ekstraheermiseks kasutatud meetod.
- 8.2.7. Mittevastavuse kahtlusega proovide puhul tuleb protokollis lisada märkus võetavate meetmete kohta. Suurema sisaldusega proovides tuleb PCDD/Fide kontsentratsioon ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summaarne kontsentratsioon määrata/kinnitada kinnitava meetodi abil.
- 8.2.8. Esitatakse üksnes kinnitava analüüsiga saadud nõuetele mittevastavad tulemused.
- 8.3. *Füüsikalised-keemilised sõeluuringumeetodid*
- 8.3.1. Sõeluuringu tulemus esitatakse järgmisel kujul: nõuetele vastav või nõuetele mittevastavuse kahtlusega („kahtlane”).
- 8.3.2. Katseprotokollis tuleb iga proovimatriksi tüübi kohta esitada piirnorm või häiretase, millel hindamine põhineb.

▼M6

- 8.3.3. Peale selle võib esitada iga üksiku PCDD/Fi ja dioksiinitaolise PCB analoogi sisalduse ning TEQ väärtuse alumise tõkke, ülemise tõkke ja vaheväärtuse järgi. Tulemused tuleb esitada samades ühikutes ja vähemalt sama tüvenumbrite arvuga, nagu on direktiiviga 2002/32/EÜ sätestatud piirnormid.
- 8.3.4. Üksikute sisestandardite saagised tuleb esitada juhul, kui need jäävad väljapoole punktis 6.2.5 nimetatud vahemikku ja kui on ületatud piirnorm (sellisel juhul ühe korduskatse saagised) või kui nõutakse neist teatamist.
- 8.3.5. Katseprotokollis märgitakse, millist GC-MSi meetodit kasutati.
- 8.3.6. Protokollis esitatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde ekstraheerimiseks kasutatud meetod.
- 8.3.7. Mittevastavuse kahtlusega proovide puhul tuleb protokollis lisada märkus võetavate meetmete kohta. Suurema sisaldusega proovides tuleb PCDD/Fide kontsentratsioon ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summaarne kontsentratsioon määrata/kinnitada kinnitava meetodi abil.
- 8.3.8. Otsuse nõuetele mittevastavuse kohta võib teha üksnes pärast kinnitavat analüüsi.

*III PEATÜKK**Proovi ettevalmistamine ja nõuded analüüsimeetoditele, mida kasutatakse mittedioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks söödas***1. Kohaldamisala**

Käesolevas peatükis sätestatud nõudeid kohaldatakse sööda analüüsimisel mittedioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks, samuti seoses proovide ettevalmistamise ja analüüsimisega muul regulatiivsel eesmärgil, sealhulgas kontrollide puhul, mida söödakäitlejad teevad määruse (EÜ) nr 183/2005 sätetele vastavuse tagamiseks.

2. Kasutatavad tuvastamismeetodid

Gaasikromatograafia koos elektronhaarde detekteerimisega (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS või samaväärsed meetodid.

3. Uuritavate analüütide määramine ja kinnitamine

- 3.1. Suhteline retentsiooniaeg vastavalt sisestandarditele või võrdlusstandarditele (lubatud hälve +/- 0,25 %).
- 3.2. Mittedioksiinitaoliste PCBde gaasikromatograafiline lahutamine segavastest ainetest, eelkõige nendega koos elueeruvatest PCBdest, eriti juhul, kui sisaldus proovis on ligikaudselt võrreldav kehtiva piirnormiga, ning on vaja kinnitada nõuetele mittevastavust⁽¹⁾.
- 3.3. Nõuded GC-MSi meetoditele

Vähemalt järgmise arvu molekulaarioonide või asjaomasesse molekuliühikku kuuluvate iseloomulike ioonide jälgimine:

- a) HRMSi puhul kaks spetsiifilist iooni;

⁽¹⁾ Sageli koos elueeruvad analoogid on nt PCB 28/31, PCB 52/69 ja PCB 138/163/164. GC-MSi puhul tuleb arvestada ka suuremal määral klooritud analoogide fragmentide võimalikku segavat mõju.

▼ M6

- b) LRMSi puhul kolm spetsiifilist iooni;
- c) MS-MSi puhul kaks spetsiifilist eellasiooni, millest kummalgi on üks neile vastav üleminekul tekkinud spetsiifiline järglasioon.

Valitud massiga fragmentide isotoopsuhte suurimad lubatud hälbed:

valitud massiga fragmentide isotoopsuhte suhteline hälve teoreetilisest isotoopide kogusest või uuritava iooni (kõige levinum jälgitav ioon) ja iseloomuliku iooni (iseloomulike ionide) kalibreerimisstandardist: $\pm 15 \%$.

3.4. Nõuded GC-ECD meetoditele

Piirnõrmi ületavaid tulemusi tuleb kinnitada kahe GC-kolonniga, millel on eri polaarsusega statsionaarne faas.

4. Meetodi tulemuslikkuse tõendamine

Meetodi tulemuslikkus valideeritakse piinormile vastava sisalduse vahemikus (0,5- kuni 2-kordsele piinormile vastava sisaldusega); tõendatakse, et korduvanalüüsi variatsioonikordaja on vastuvõetav (vt vahetäpsuse nõuded, punkt 9).

5. Määramispiir

Mittedioksiinitaalsete PCBde määramispiiride summa ⁽¹⁾ ei tohi ületada ühte kolmandikku piinormi väärtusest ⁽²⁾.

6. Kvaliteedikontroll

Korrapärane tühiproovide, rikastatud proovide ja kvaliteedikontrolli proovide analüüsimine, osalemine asjaomaste maatriksitega tehtavates laboritevahelistes uuringutes.

7. Saagiste kontroll

7.1. Kasutatakse sobivaid sisestandardeid, mille füüsikalise-keemilised omadused on võrreldavad uuritavate analüütide omadega.

7.2. Sisestandardite lisamine:

lisamine toodetele (enne ekstraheerimist ja puhastamist).

7.3. Nõuded meetoditele, mille puhul kasutatakse kõiki kuut isotoopmärgistatud mittedioksiinitaalsete PCB analoogi:

- a) tulemustesse viiakse sisse sisestandardite saagiseid arvestav parand;
- b) isotoopmärgistatud sisestandardi saagis peab olema 60–120 %;
- c) individuaalsetel analoogidel, mille osatähtsus mittedioksiinitaalsete PCBde summas on alla 10 %, võivad olla väiksemad või suuremad saagised.

7.4. Nõuded meetoditele, mille puhul ei kasutata kõiki kuut isotoopmärgistatud sisestandardit või kasutatakse muid sisestandardeid:

- a) kontrollitakse iga proovi sisestandardi(te) saagist;

⁽¹⁾ Vajaduse korral järgitakse dokumendis „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food” (Juhend avastamispiiri ja määramispiiri hinnangulise väärtuse määramiseks söödas ja toidus esinevate saasteainete mõõtmisel) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) kirjeldatud põhimõtteid.

⁽²⁾ On väga soovitatav, et reaktiiviga tühiproovi tulemus oleks väike võrreldes proovis leiduva saasteaine sisaldusega. Labor on kohustatud kontrollima tühiproovi tulemuste varieeruvust, eriti siis, kui tühiproovi tulemus tuleb lahutada.

▼ **M6**

- b) sisestandardi(te) saagis peab olema 60–120 %;
- c) tulemustesse viiakse sisse sisestandardite saagiseid arvestav parand.

7.5. Märjastamata analoogide saagiseid kontrollitakse rikastatud proovide või kvaliteedikontrolli proovidega, milles uuritava aine kontsentratsioon on piinormi lähedane. Selliste analoogide aktsepteeritavad saagised on 60–120 %.

8. Nõuded laboritele

Vastavalt määrusele (EÜ) nr 882/2004 peavad laborid olema ISO juhendi 58 kohaselt tegutseva tunnustatud asutuse poolt akrediteeritud, millega tagatakse, et laborid kohaldavad analüüsimisel kvaliteeditagamissüsteemi. Laborid tuleb akrediteerida standardi EN ISO/IEC 17025 kohaselt. Peale selle järgitakse vajaduse korral põhimõtteid, mida on kirjeldatud tehnilistes suunistes, milles käsitletakse mõõtemääramatuse ja määramispiiride hinnangulise väärtuse määramist PCBde analüüsimisel ⁽¹⁾.

9. Tulemuslikkuse näitajad: piinormile vastava mittedioksiinitaoliste PCBde summaarse sisalduse suhtes kohaldatavad kriteeriumid

	Isotooplahjendusega massispektrometria ⁽¹⁾	Muud meetodid
Tõesus	– 20 kuni + 20 %	– 30 kuni + 30 %
Vahetäpsus (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Ülemise ja alumise tõkke erinevus	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Nõutav on kõigi kuue ¹³C-ga märjastatud analoogi kasutamine sisestandardina.

10. Tulemuste esitamine

- 10.1. Selleks et katseprotokoll sisaldaks võimalikult palju andmeid ja võimaldaks tulemuste tõlgendamist konkreetsetest nõuetest lähtuvalt, peavad analüüsitulemused hõlmama iga üksiku mittedioksiinitaolise PCB sisaldust ja nende PCB analoogide summaarset sisaldust ning olema esitatud alumise ja ülemise tõkke ning vaheväärtusena.
- 10.2. Protokollis esitatakse PCBde ekstraheerimiseks kasutatud meetod.
- 10.3. Üksikute sisestandardite saagised tuleb esitada juhul, kui need jäävad väljapoole punktis 7 nimetatud vahemikku, kui on ületatud piinorm või muudel juhtudel, kui nõutakse teatamist.
- 10.4. Kuna proovi nõuetekohasuse hindamisel tuleb arvestada mõõtmise laiendmääramatust, esitatakse ka see näitaja. Analüüsitulemused tuleb seega esitada kujul $x \pm U$, kus x on analüüsitulemus ja U on mõõtmise laiendmääramatus, kusjuures arvutamisel kasutatakse kattetegurit 2, mis annab ligikaudu 95 % usaldusnivoo.
- 10.5. Tulemused tuleb esitada samades ühikutes ja vähemalt sama tüvenumbrite arvuga, nagu on direktiiviga 2002/32/EÜ sätestatud piinormid.

⁽¹⁾ Kehtivad nõuded põhinevad TEFidel, mis on avaldatud artiklis: M. van den Berg *et al.*, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ **M2**

VI LISA

ANALÜÜSIMETODID LOOMSE PÄRITOLUGA OSAKESTE MÄÄRAMISEKS SÖÖDA AMETLIKUL KONTROLLIMISEL

1. EESMÄRK JA REGULEERIMISALA

Loomse päritoluga komponendid söödas määratakse valgusmikroskoopia või polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil vastavalt käesolevas lisas esitatud sätetele.

Nende kahe meetodi abil on võimalik tuvastada loomse päritoluga osakeste esinemist söödamaterjalides ja segajösöödas. Nende meetodite abil ei ole siiski võimalik arvutada selliste osakeste hulka söödamaterjalides või segajösöödas. Mõlema meetodi avastamispiir on alla 0,1 massiprotsendi.

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodi abil on võimalik tuvastada, millisesse taksonoomilisse rühma kuuluvad söödamaterjalides ja segajösöödas esinevad loomse päritoluga osakesed.

Neid meetodeid kasutatakse määruse (EÜ) nr 999/2001 artikli 7 lõikes 1 ja IV lisas ning määruse (EÜ) nr 1069/2009 artikli 11 lõikes 1 sätestatud keeldude kohaldamise kontrolliks.

Sõltuvalt kontrollitava sööda liigist võib neid meetodeid kasutada ühe katse-eeskirja raames kas eraldi või koos vastavalt ELi referentlabori poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökorrale söödas leiduvate loomsete valkude määramiseks (EURL-AP) ⁽¹⁾.

2. MEETODID

2.1. Valgusmikroskoopia

2.1.1. ► **M7** Põhimõte

Loomse päritoluga osakesed, mis võivad esineda analüüsimiseks saadetud söödamaterjalides ja segasöödas, tehakse kindlaks tüüpiliste mikroskoobiga nähtavate tunnuste alusel (nt lihaskiud ja muud lihaosakesed, kõhr, luu- või sarveosakesed, karvad, harjased, veri, piima gloobulid, laktoosikristallid, suled, munakoored, kalaluud, soomused). ◀

2.1.2. Reaktiivid ja seadmed

2.1.2.1. Reaktiivid

2.1.2.1.1. Kongsentreeriv aine

2.1.2.1.1.1. Tetrakloroetüleen (tihedus 1,62)

2.1.2.1.2. Värvimisreaktiiv

2.1.2.1.2.1. Alisariinpunase lahus (lahjendada 2,5 ml 1 M soolhapet 100 ml vees ja lisada saadud lahusele 200 mg alisariinpunast)

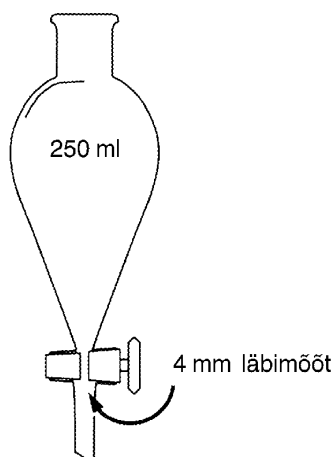
2.1.2.1.3. Kinnitid

2.1.2.1.3.1. Leelis (NaOH 2,5 % w/v või KOH 2,5 % w/v)

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

- 2.1.2.1.3.2. ► **M7** Glütserool (lahjendamata, viskoossus: 1 490 cP) või kinniti, millel on võrdväärased omadused mittepüsiva vaatluspreparaadi valmistamiseks. ◀
- 2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (viskoossus: 1 200 cP) või vaik, millel on nimetatud vahendiga võrdväärased omadused objektklaasil püsipreparaadi valmistamiseks.
- 2.1.2.1.4. Värvivate omadustega kinnitid
- 2.1.2.1.4.1. Lugoli lahus (lahustada 2 g kaaliumjodiidi 100 ml vees ja lisada pidevalt loksutades 1 g joodi)
- 2.1.2.1.4.2. Tsüstiini määramise reaktiiv (2 g pliiatsetaati, 10 g NaOH 100 ml vees)
- 2.1.2.1.4.3. Fehlingi reaktiiv (valmistatakse enne kasutamist põhilahuste A ja B võrdsetest kogustest (1/1). Lahus A: lahustada 6,9 g vask(II)sulfaatpentahüdraati 100 ml vees. Lahus B: lahustada 34,6 g kaaliumnaatriumtartraattetraahüdraati ja 12 g NaOH 100 ml vees)
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametüülbensidiin/vesinikperoksiid (lahustada 1 g 3,3',5,5'-tetrametüülbensidiini (TMB) 100 ml jää-äädikhappes ja 150 ml vees. Enne kasutamist segada 4 osa saadud TMB lahust 1 osa 3-protsendilise vesinikperoksiidiga)
- 2.1.2.1.5. Loputusained
- 2.1.2.1.5.1. Etanool $\geq 96\%$ (tehniline)
- 2.1.2.1.5.2. Atsetoon (tehniline)
- 2.1.2.1.6. Pleegitav reaktiiv
- 2.1.2.1.6.1. Kaubanduslik naatriumhüpokloriti lahus (9–14 % aktiivkloori)
- 2.1.2.2. Seadmed
- 2.1.2.2.1. Analüütiline kaal täpsusega 0,001 g
- 2.1.2.2.2. ► **M7** Jahvatusseade: löiketeradega või rootorveski. Kui kasutatakse rootorveskit, ei tohi kasutada sõelaseid, mille võrguava on $\leq 0,5$ mm ◀
- 2.1.2.2.3. ► **M7** 0,25 mm ja 1 mm ruudukujuliste võrguavadega sõelad. Materjalikao vältimiseks ei tohiks sõelade diameeter ületada 10 cm, välja arvatud proovi eelsõelumisel. Sõelade kalibreerimine ei ole nõutav ◀
- 2.1.2.2.4. 250 ml kooniline klaasist jaotuslehter, mille koonuse põhjas on teflonist või lihvklaasist korkkraan. Korkkraani ava läbimõõt peab olema ≥ 4 mm. Alternatiivina võib kasutada koonilise põhjaga selitusklaasi, kui labor on tõestanud, et tuvastatav kontsentratsioon on sama kui koonilise klaasist jaotuslehtri kasutamise puhul.

Jaotuslehter

▼ M2

- 2.1.2.2.5. Vähemalt 6,5–40-kordse suurendusvahemikuga stereomikroskoop
- 2.1.2.2.6. Vähemalt 100–400-kordse suurendusvahemikuga kombineeritud mikroskoop, mida saab kasutada vaatluseks läbiva valgusega valgevälja meetodil. Lisaks võib kasutada polariseeritud valgust ja diferentsiaalset interferentskontrasti
- 2.1.2.2.7. Tavalised klaasist laborinõud
- 2.1.2.2.8. Vaatluspreparaadi valmistamise vahendid: tavalised mikroskoobi objektiklaasid, süvendiga objektiklaasid, katteklaidid (20 × 20 mm), pintsetid, õhuke spaatel

▼ M7

- 2.1.2.2.9. Laboriahi
- 2.1.2.2.10. Tsentrifuug
- 2.1.2.2.11. Filterpaber: kvalitatiivseks analüüsiks sobiv tselluloosfilter (poori suurus 4–11 µm)

▼ M2

- 2.1.3. *Proovi võtmine ja ettevalmistamine*
- 2.1.3.1. ► M7 Proovi võtmine
Määramiseks kasutatakse käesoleva määruse I lisa sätete kohaselt võetud representatiivset proovi. ◀
- 2.1.3.2. Ettevaatusabinõud
Laboratoorse ristsaastumise vältimiseks tuleb kõik taaskasutatavad seadmed enne kasutamist hoolikalt puhastada. Jaotuslehtri osad tuleb enne puhastamist lahti võtta. Jaotuslehtri osad ja klaasnõud pestakse kõigepealt käsitsi ja seejärel pesumasinas. Sõelu tuleb puhastada jäikade harjastega sünteetilise harjaga. Pärast rasvaste materjalide, näiteks kalajahu sõelumist on soovitatav sõelu puhastada atsetooni ja suruõhuga.
- 2.1.3.3. Muude kui rasva- ja õliproovide ettevalmistamine
- 2.1.3.3.1. ► M7 Proovide kuivatamine: proovid niiskusesisaldusega > 14 % kuivatatakse enne käitlemist vastavalt käesoleva määruse III lisale. ◀.
- 2.1.3.3.2. ► M7 Proovide eelsõelumine: selleks et koguda teavet sööda võimaliku keskkonnatekkelise saastumise kohta, on soovitatav granuliseeritud söötasid ja seemneid läbi 1 mm ava eelsõeluda ja seejärel kaks saadud fraktsiooni, mida tuleb käsitada eraldiseivate proovidena, ette valmistada, analüüsida ja nende kohta aruanne koostada. ◀
- 2.1.3.3.3. Osaproovide võtmine ja peenestamine: vähemalt 50 g proovist võetakse analüüsimiseks ja peenestatakse.
- 2.1.3.3.4. Sademe ekstraheerimine ja ettevalmistamine: 10 g (täpsusega 0,01 g) suurune kogus jahvatatud osaproovist pannakse jaotuslehtrisse või koonilise põhjaga selitusklaasi ja lisatakse 50 ml tetrakloroetüleeni. Lehtrisse viidav kogus on maksimaalselt 3 g, kui tegemist on kalajahu või muu puhtalt loomse saaduse, mineraalse komponendi või eelseguga, mis tekitab rohkem kui 10 % sadet. Segu loksutatakse tugevasti vähemalt 30 sekundit ja seejärel lisatakse ettevaatlikult veel vähemalt 50 ml tetrakloroetüleeni, loputades sellega lehtri sisepinda, et eemaldada kõik sellele jäänud osakesed. Saadud segul lastakse seista vähemalt 5 minutit, enne kui sade eraldatakse korkkraani avamisega.

Koonilise põhjaga selitusklaasi kasutamisel segatakse segu tugevasti vähemalt 15 sekundit ja pestakse klaasi sisepinnalt vähemalt 10 ml tetrakloroetüleeni hoolikalt maha kõik kinni jäänud osakesed. Segul lastakse 3 minutit seista ja segatakse uuesti 15 sekundit ning pestakse klaasi sisepinnalt vähemalt 10 ml puhta tetrakloroetüleeni hoolikalt maha kõik kinni jäänud osakesed. Saadud segul lastakse seista vähemalt 5 minutit ning seejärel vedel osa eemaldatakse ja valatakse ära hoolika dekanteerimisega, jälgides, et sade jääks täielikult alles.

▼ M7

Sade kogutakse lehrisse asetatud filterpaberile, et võimaldada ülejäänud tetrakloroetüleen eraldamist, vältides samal ajal sademes rasva kogunemist. Sade kuivatatakse. Seejärel on soovitatav sade kaaluda (täpsusega 0,001 g), et määrata sadestumise aste. Lõpuks sõelutakse sade 0,25 mm sõelaga ja uuritakse kahte saadud fraktsiooni, välja arvatud juhul, kui sõelumist ei peeta vajalikuks.

▼ M2

2.1.3.3.5. Heljumi ekstraheerimine ja ettevalmistamine: pärast sademe eraldamist eespool kirjeldatud meetodi abil peab jaotuslehrisse jääma kaks faasi: vedel faas, mis koosneb tetrakloroetüleenist, ja heljumist saadud tahke faas. Tahke faas on heljum ja selle saamiseks lastakse tetrakloroetüleen lehrist täielikult välja korkkraani avamisega. Jaotuslehter pööratakse ümber ja valatakse heljum suurde Petri tassi ning kuivatatakse õhu käes tõmbe all. Kui heljumis on rohkem kui 5 % osakesi suurusega > 0,50 mm, sõelutakse see 0,25 mm sõelaga ja uuritakse mõlemat saadud fraktsiooni.

2.1.3.3.6. Lähtematerjali ettevalmistamine: valmistatakse ette vähemalt 5 g suurune jahvatatud osaproov. Kui rohkem kui 5 % materjalist koosneb osakestest suurusega > 0,50 mm, sõelutakse see 0,25 mm sõelaga ja uuritakse mõlemat saadud fraktsiooni.

2.1.3.4. Rasvast ja õlist koosnevate proovide ettevalmistamine

Rasvast ja õlist koosnevate proovide ettevalmistamiseks võib kasutada järgmist eeskirja:

- kui rasv on tahke, soojendatakse seda ahjus kuni vedeldumiseni;
- pipeti abil viiakse 40 ml rasva või õli proovi põhjast tsentrifuugitopsi;
- tsentrifuugitakse 10 minutit kiirusel 4 000 p/min;
- kui rasv on pärast tsentrifuugimist tahke, soojendatakse seda ahjus kuni vedeldumiseni;
- tsentrifuugimist korratakse 5 minutit kiirusel 4 000 p/min;
- väikese lusika või spaatli abil viiakse pool dekanteeritud lisanditest uurimiseks mikroskoobi objektiklaasile, kinnitina soovitatakse kasutada glütserooli;
- ülejäänud lisandeid kasutatakse sademe ettevalmistamiseks vastavalt punktile 2.1.3.3.

2.1.3.5. Värvimisreaktiivide kasutamine

Loomset päritolu osakeste nõuetekohase kindlakstegemise hõlbustamiseks võib katse teostaja kasutada proovide ettevalmistamisel värvimisreaktiive kooskõlas EURL-AP koostatud juhistega, mis on avaldatud labori veebisaidil.

Kui sademe värvimiseks kasutatakse alisariinpunase lahust, kasutatakse järgmist eeskirja:

- kuivatatud sade pannakse katseklaasi ja loputatakse kaks korda umbes 5 ml etanooliga (iga kord kasutatakse pöörisesgajat 30 sekundit, lahustil lastakse umbes üks minut ja 30 sekundit settida ja lahusti kallatakse ära);
- sade pleegitatakse vähemalt 1 ml naatriumhüpokloriti lahuse lisamisega. Reaktsioonil lastakse kesta 10 minutit. Katseklaasi täidetakse veega, sademel lastakse 2–3 minutit settida ning vesi ja suspendeeritud osakesed kallatakse ettevaatlikult ära;

▼ M2

- sadet loputatakse veel kaks korda umbes 10 ml veega (kummalgi korral kasutatakse pöörise-gajat 30 sekundit, lastakse settida ja vesi kallatakse ära);
- lisatakse 2–10 tilka alisariinpunase lahust ja segu segatakse pöörise-gajaga. Reaktsioonil lastakse kesta 30 sekundit ja värvitud sadet loputatakse kaks korda umbes 5 ml etanooliga ja seejärel üks kord atsetooniga (iga kord kasutatakse pöörise-gajat 30 sekundit, lahustil lastakse umbes 1 minut selgida ja kallatakse ära);
- värvitud sade kuivatatakse.

2.1.4. *Mikroskoopiline uurimine*

2.1.4.1. Vaatluspreparaadi ettevalmistamine

▼ M7

Sademest ja katse teostaja valikul kas heljumist või lähteainest valmistatakse vaatluspreparaadid.

▼ M2

On vaja ette valmistada piisav arv vaatluspreparaate, et tagada punktis 2.1.4.2 esitatud uurimiseeskirja täies ulatuses teostamine.

Vaatluspreparaadid peavad olema kinnitatud nõuetekohaste kinnitite abil vastavalt EURL-AP standardsele töökorrale, mis on avaldatud labori veebisaidil. Vaatluspreparaadid peavad olema kaetud katteklasiidiga.

▼ M7

2.1.4.2. Vaatluse voodiagramm loomse päritoluga osakeste tuvastamiseks segasöödas ja söödamaterjalis

Mikroskoobiga vaatlemiseks ettevalmistatud preparaate vaadeldakse vastavalt joonistel 1 ja 2 esitatud vaatluse voodiagrammidele.

Sademe mikroskoobiga vaatlemiseks kasutatakse kombineeritud mikroskoopi ja sõltuvalt katse teostaja valikust uuritakse kas heljumit või lähtematerjali. Jämedama fraktsiooni uurimiseks võib peale kombineeritud mikroskoobi kasutada ka stereomikroskoopi. Kõiki vaatluspreparaate uuritakse põhjalikult, kasutades erinevaid suurendusi. Täpsed selgitused vaatluse voodiagrammide kasutamise kohta esitatakse standardses töökorras, mille on koostanud ja oma veebisaidil avaldanud loomasöödas sisalduvate loomsete valkude liidu referentlabor.

Vaatluse voodiagrammi igas etapis vaadeldavate vaatluspreparaatide miinimumarvust tuleb rangelt kinni pidada, välja arvatud juhul, kui kogu fraktsiooni materjalist ei ole võimalik saada nõutavat arvu vaatluspreparaate, näiteks juhul, kui sadet ei saadud. Osakeste arvu registreerimiseks vaadeldakse ühe määramise käigus kuni kuut vaatluspreparaati.

Kui heljumist või lähtematerjalist valmistatakse täiendavad vaatluspreparaadid, kasutades spetsiifilisemat punktis 2.1.2.1.4 nimetatud värvivate omadustega kinnitit, et täpsemalt iseloomustada struktuure (nt suled, karvad, lihaskiud või vereosakesed), mis on avastatud muude punktis 2.1.2.1.3 nimetatud kinnitite abil valmistatud vaatluspreparaatidel, loendatakse osakesed, võttes ühe määramise käigus arvesse kuni kuut vaatluspreparaati, mille hulgas on spetsiifilisema kinnitiga täiendavad vaatluspreparaadid.

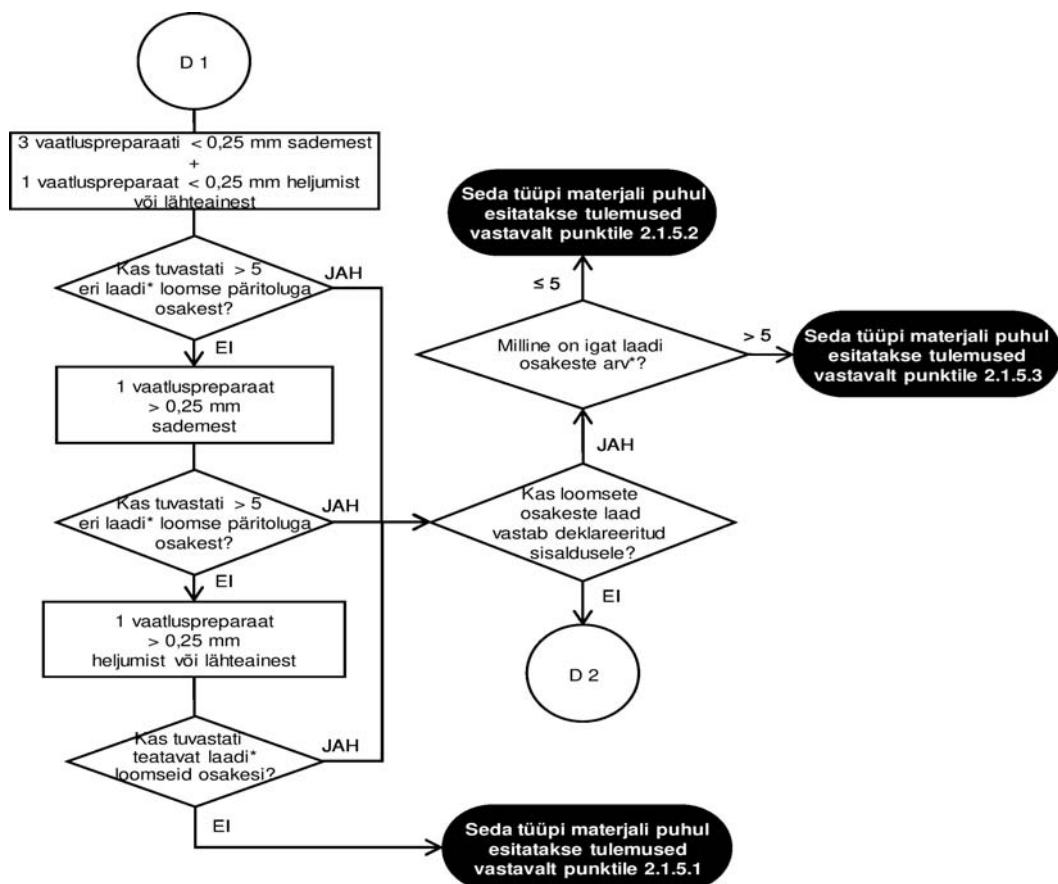
Katse teostaja võib osakeste laadi ja päritolu kindlakstegemise hõlbustamiseks kasutada abivahendeid, näiteks otsustamise tugisüsteeme, fotoarhiive ja etalonproove.

▼ M7

Joonis 1

Vaatluse voodiagramm loomse päritoluga osakeste tuvastamiseks segasöödas ja söödamaterjalis esimesel määramisel

(D1 ja D2 viitavad esimesele ja teisele määramisele; *: selgroogsed maismaaloomad, kalad)

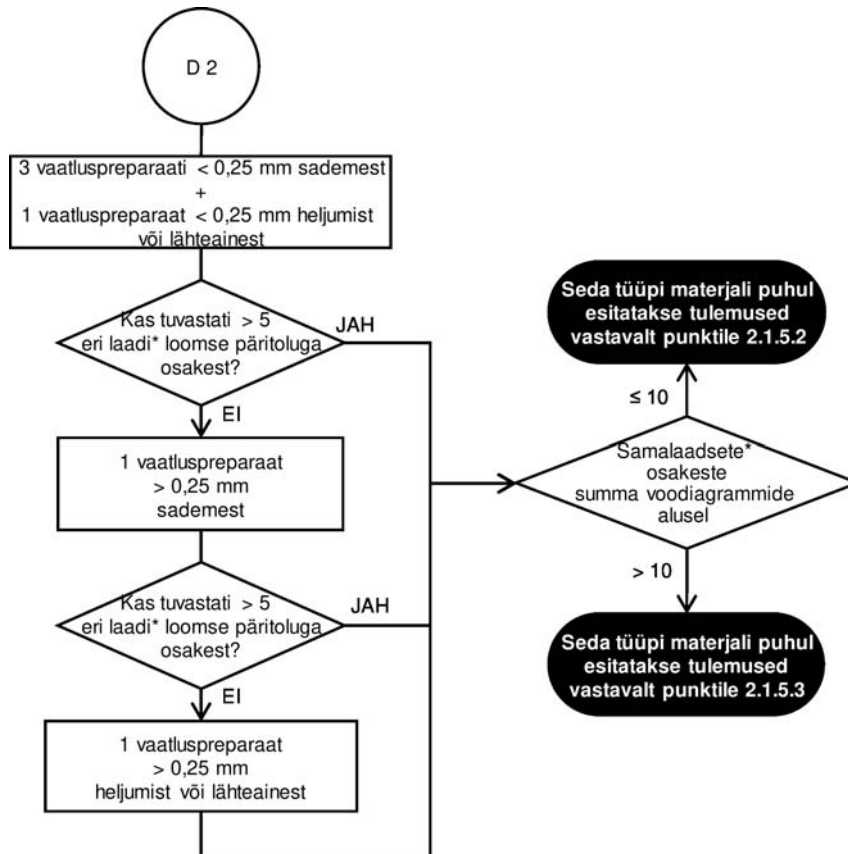


▼ M7

Joonis 2

Vaatluse voodiagramm loomse päritoluga osakeste tuvastamiseks segasöödas ja söödamaterjalis teisel määramisel

(D1 ja D2 viitavad esimesele ja teisele määramisele; *: selgroogsed maismaaloomad, kalad)



▼ **M2**2.1.4.3. ► **M7** Määramiste arv

Määramised tehakse eri osaproovidega, millest igaüks kaalub 50 g.

Kui joonisel 1 esitatud vaatluse voodiagrammi kohaselt tehtud esimese määramise tulemusena ei tuvastata loomse päritoluga osakesi, ei ole täiendav määramine vajalik ning analüüsi tulemus esitatakse, kasutades punkti 2.1.5.1 sõnastust.

Kui joonisel 1 esitatud vaatluse voodiagrammi kohaselt tehtud esimese määramise tulemusena tuvastatakse üks või mitu teatavat laadi loomse päritoluga osakest (st selgroogsetelt maismaaloomadelt või kaladelt pärit osakesed) ning leitud osakeste laad vastab proovi kohta deklareeritud sisaldusele, ei ole teistkordset määramist vaja. Kui teatavat laadi loomse päritoluga osakeste arv on esimesel määramisel suurem kui 5, esitatakse analüüsi tulemus loomse osakese laadi kaupa, kasutades punkti 2.1.5.3 sõnastust. Muudel juhtudel esitatakse analüüsi tulemus loomse osakese laadi kaupa, kasutades punkti 2.1.5.2 sõnastust.

Muudel juhtudel, sealhulgas juhul, kui laborile ei ole deklareeritud sisaldust, tehakse uus määramine uue osaproovi põhjal.

Kui joonisel 2 esitatud vaatluse voodiagrammi kohaselt tehtud teise määramise tulemusena on kahe määramisega tuvastatud vastavat laadi loomse päritoluga osakeste summa suurem kui 10, esitatakse analüüsi tulemus, kasutades punkti 2.1.5.3 sõnastust. Muudel juhtudel esitatakse analüüsi tulemus, kasutades punkti 2.1.5.2 sõnastust. ◀

2.1.5. ► **M7** Tulemuste esitamine

Tulemuste esitamisel teatab labor, millist tüüpi materjali analüüsiti (sade, heljum või lähteaine). Aruandes näidatakse selgelt, mitu määramist on tehtud ja kas vaatluspreparaatide ettevalmistamisele eelnev fraktsioonide sõelumine vastavalt punkti 2.1.3.3.4 viimasele lõigule on ära jäetud.

Labori aruanne peab sisaldama vähemalt teavet selgroogsetest maismaaloomadest ja kalast pärit osakeste leidumise kohta.

Erinevad tulemused esitatakse järgmiselt.

2.1.5.1. Ei tuvastatud ühtki kõnealust laadi loomse päritoluga osakest:

— „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovis selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakesi.”

— „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovis kalast saadud osakesi.”

▼ **M2**

2.1.5.2. Ühe määramise käigus tuvastati 1–5 teatavat laadi loomset osakest, või kahe määramise käigus tuvastati 1–10 teatavat laadi osakest (tuvastatud osakeste arv on väiksem kui otsustuspiir, mille loomastõõdas sisalduvate loomsete valkude Euroopa Liidu referentlabor on standardses töökorras kehtestanud ning oma veebisaidil avaldanud) ⁽¹⁾:

Kui on tehtud ainult üks määramine:

— „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis rohkem kui viis selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv...]. Selline väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”

— „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis rohkem kui viis kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus...]. Selline väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”

Kui on tehtud kaks määramist:

— „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv...]. Selline väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”

— „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus...]. Selline väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”

Peale selle:

— Proovi eelsõelumise puhul märgib labor, millises fraktsioonis (sõelutud fraktsioon, granuleeritud fraktsioon või seemned) on tuvastatud loomse päritoluga osakesi, kuna ainult sõelutud fraktsioonist tuvastatud loomse päritoluga osakesed võivad tähendada keskkonnatekkelist saastumist.

— Kui tuvastatakse ainult sellised loomsed osakesed, mida ei saa liigitada selgroogsetelt maismaaloomadelt ega kaladelt pärit osakesteks (nt lihaskiud), märgitakse aruandes, et tuvastati ainult sellised loomsed osakesed ja ei saa välistada, et need pärinevad selgroogsetelt maismaaloomadelt.

2.1.5.3. Ühe määramise käigus tuvastati rohkem kui viis teatavat laadi loomset osakest või kahe määramise käigus tuvastati rohkem kui kümme teatavat laadi osakest:

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

Kui on tehtud ainult üks määramine:

- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis rohkem kui viis selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv...].”
- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis rohkem kui viis kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus...].”

Kui on teostatud kaks määramist:

- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv...].”
- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus...].”

Peale selle:

- Proovi eelsõelumise puhul märgib labor, millises fraktsioonis (sõelutud fraktsioon, granuleeritud fraktsioon või seemned) on tuvastatud loomse päritoluga osakesi, kuna ainult sõelutud fraktsioonist tuvastatud loomse päritoluga osakesed võivad tähendada keskkonnatekkelist saastumist.
- Kui tuvastatakse ainult sellised loomsed osakesed, mida ei saa liigitada selgroogsetelt maismaaloomadelt ega kaladelt pärit osakesteks (nt lihaskiud), märgitakse aruandes, et tuvastati ainult sellised loomsed osakesed ja ei saa välistada, et need pärinevad selgroogsetelt maismaaloomadelt. ◀

2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

2.2.1. Põhimõte

Loomse päritoluga desoksüribonukleiinhappe (DNA) fragmendid, mis võivad esineda söödamerjalides ja segajõusöödas, tuvastatakse polümeraasi ahelreaktsiooni abil geeni kordistamise meetodiga, mis on suunatud liigispetsiifilise DNA-järjestuse tuvastamisele.

PCR-meetodi puhul on kõigepealt nõutav DNA eraldamine. Selliselt saadud DNAGA tehakse geeni kordistamine, et tuvastada katsega kontrollitavaid loomaliike.

2.2.2. Reaktiivid ja seadmed

2.2.2.1. Reaktiivid

2.2.2.1.1. DNA eraldamise reaktiivid

Kasutatakse ainult EURL-AP labori poolt heaks kiidetud ja labori veebisaidil avaldatud reaktiive.

2.2.2.1.2. Geeni kordistamise reaktiivid

▼ **M2**

- 2.2.2.1.2.1. Praimerid ja sondid
Kasutatakse ainult EURL-AP poolt valideeritud oligonukleotiidide järjestusega praimereid ja sonde ⁽¹⁾.
- 2.2.2.1.2.2. Master Mix
Kasutatakse ainult neid Master Mix'i lahuseid, mis ei sisalda reaktiive, mis loomse DNA juuresoleku tõttu võivad anda vale tulemuse ⁽²⁾.
- 2.2.2.1.2.3. Saastusest puhastamise reaktiivid
- 2.2.2.1.2.3.1. Soolhappe lahus (0,1N).
- 2.2.2.1.2.3.2. Pleegitav reaktiiv (0,15 % aktiivklooriga naatriumhüpokloriti lahus)
- 2.2.2.1.2.3.3. Kallite seadmete, nagu analüütiliste kaalude (näiteks MP Biomedicals DNA Erase™) saastusest puhastamiseks ettenähtud mittesöövitavad reaktiivid
- 2.2.2.2. Seadmed
- 2.2.2.2.1. Analüütilised kaalud täpsusega 0,001 g
- 2.2.2.2.2. Jahvatusseadmed
- 2.2.2.2.3. Reaalajas PCR tegemist võimaldav termotsükler
- 2.2.2.2.4. Mikrotsentrifuug mikrotsentrifuugitopside jaoks
- 2.2.2.2.5. 1 µl – 1 000 µl pipeteerimist võimaldavad mikropipetid
- 2.2.2.2.6. Standardsed plastikust molekulaarbioloogia vahendid: mikrotsentrifuugitopsid, mikropipettide filtriga plastikotsikud, termotsükleri plaadid.
- 2.2.2.2.7. Proovide ja reaktiivide hoidmiseks ettenähtud külmikud
- 2.2.3. *Proovi võtmine ja proovi ettevalmistamine*
- 2.2.3.1. Proovi võtmine
Määramiseks kasutatakse I lisa kohaselt võetud representatiivset proovi.
- 2.2.3.2. Proovi ettevalmistamine
Laboriproovide ettevalmistamine kuni DNA eraldamiseni teostatakse vastavalt II lisa sätestatud nõuetele. Vähemalt 50 g proovist võetakse analüüsimiseks osaproovid ja peenestatakse.

Proovi ettevalmistamine teostatakse muudes ruumides kui DNA eraldamiseks ja geeni kordistamiseks ettenähtud ruumid vastavalt standardile ISO 24276.

Ette valmistatakse kaks proovi suurusega vähemalt 100 mg.
- 2.2.4. *DNA eraldamine*
Iga proovi DNA eraldatakse vastavalt ELi referentlabori EURL-AP kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökorrale.

Iga eraldamise puhul tehakse kaks eraldamise kontrollkatset vastavalt standardile ISO 24276:

— eraldamise tühikatse,

— DNA eraldamise positiivne kontrollkatse.

⁽¹⁾ Iga uuritava loomaliigi jaoks olemasolevate praimerite ja sondide loeteluga saab tutvuda EURL-AP veebisaidil.

⁽²⁾ Vajalike Master Mix'i lahuste näited on esitatud EURL-AP veebisaidil.

▼ **M2**2.2.5. *Geeni kordistamine*

Geeni kordistamine teostatakse kõikide kontrollimist vajavate liikide jaoks valideeritud meetodite abil. Need meetodid on esitatud ELi referentlabori EURL-AP poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardses töökorras. Iga eraldatud DNA-proovi analüüsitakse vähemalt kahe erineva lahjendusega, et hinnata inhibeerimist.

Iga sihtliigi kohta tehakse kaks kordistamise kontrollkatset vastavalt standardis ISO 24276 kirjeldatud meetodile:

- igal plaadil või PCR-katsete seerias kasutatakse sihtliigi DNA positiivset kontrolli;
- igal plaadil või PCR-katsete seerias kasutatakse kordistusreaktiivi kontrolli (mida nimetatakse ka matriitsita kontrolliks).

2.2.6. *Tulemuste tõlgendamine ja esitamine*

Tulemuste esitamisel teatab labor vähemalt kasutatud proovide massi, kasutatud ekstraheerimismeetodi, teostatud määramiste arvu ja meetodi avastamispiiri.

Tulemusi ei tõlgendata ega esitata, kui DNA eraldamise positiivne kontrolliproov ja DNA positiivne sihtkontrolliproov ei anna katsega kontrollitava sihtliigi puhul positiivseid tulemusi, samas kui kordistamisreaktiivi kontroll on negatiivne.

Kui kahe proovi tulemused ei ole kooskõlas, korratakse vähemalt geeni kordistamist. Kui labor kahtlustab, et nimetatud lahkumineku põhjuseks võib olla DNA eraldamine, tehakse enne tulemuste tõlgendamist uus DNA eraldamine ja seejärel geeni kordistamine.

Tulemuste lõplik väljendamine peab põhinema kahe proovi tulemuste ühendamisel ja tõlgendamisel vastavalt ELi referentlabori EURL-AP poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökorrale.

2.2.6.1. Negatiivne tulemus

Negatiivne tulemus esitatakse järgmiselt:

Analüüsimiseks esitatud proovis ei tuvastatud Xst pärinevat DNAd (X on katsega kontrollitav loomaliik või liikide rühm).

2.2.6.2. Positiivne tulemus

Positiivne tulemus esitatakse järgmiselt:

Analüüsimiseks esitatud proovis tuvastati Xst pärinev DNA (X on katsega kontrollitav loomaliik või liikide rühm).



VII LISA

KODULINDUDE SÖÖDA ENERGIASISALDUSE ARVUTAMISE MEETOD**1. Energiasisalduse arvutamine ja väljendamine**

Kodulindude segasööda energiasisaldus tuleb arvutada teatavate söödas sisalduvate analüütiliste koostisosade protsendimäära põhjal vastavalt allpool esitatud valemile. Energiasisaldus väljendatakse ainevahetuses tekkiva energiana (ME) (lämmastiku suhtes korregeerituna) megadžaulides (MJ) segasööda kilogrammi kohta:

Ainevahetuses tekkiv energia (MJ/kg) = 0,1551 × kogu valgu protsent + 0,3431 × kogu rasva protsent + 0,1669 × tärklise protsent + 0,1301 × sahharoosina väljendatud üldsuhkru protsent

2. Avaldatud väärtuse lubatud hälbed

Kui ametlikul kontrollimisel ilmneb erinevus (sööda energiasisaldus on suurem või väiksem) kontrollitulemuste ja avaldatud energiasisalduse vahel, on ainevahetuses tekkiva energia lubatud minimaalne hälve 0,4 MJ/kg.

3. Tulemuste väljendamine

Eespool esitatud valemil kasutades saadud tulemus tuleb esitada ühe kümnendkoha täpsusega.

4. Proovivõtu- ja analüüsimeetodid

Proovid tuleb segasöödast võtta ja arvutusmeetodis märgitud analüütiliste koostisosade sisaldus tuleb kindlaks määrata vastavalt sööda ametlikuks kontrolliks ettenähtud ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetoditele.

Kasutatakse järgmisi meetodeid:

— kogu rasvasisalduse määramiseks: III lisa H osas sätestatud meetod B toorõli- ja -rasvasisalduse määramiseks;

— tärklisesisalduse määramiseks: III lisa L osas sätestatud polarimeetriline meetod.



VIII LISA

SÖÖDAS MITTE ENAM LUBATUD LISANDITE EBASEADUSLIKU
SISALDUSE KONTROLLIMISE ANALÜÜSIMEETODID*Olulised märkused*

Et avastada söödas mitte enam lubatud lisandite ebaseaduslikku sisaldust, võib kasutada käesoleva lisa analüüsimeetoditest tundlikumaid analüüsimeetodeid.

Käesolevas lisas nimetatud analüüsimeetodeid kasutatakse kinnitamiseks.

A. METÜÜLBENSOKAADI MÄÄRAMINE

7-bensüüloksü-6-butüül-3-metoksükarbonüül-4-kinoloon

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata metüülbensokaadi taset söödas. Määramispiir on 1 mg/kg.

2. Põhimõte

Metüülbensokaat ekstraheeritakse proovist metaansulfoonhappe metaanoolilahusega. Ekstrakt puhastatakse diklorometaaniga ioonvahetuschromatograafia abil ja seejärel uuesti diklorometaaniga. Metüülbensokaadi sisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikchromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Diklorometaan

3.2. HPLC-puhtusastmega metanool

3.3. HPLC liikuv faas

metanooli (3.2) ja vee (HPLC-puhtusastmega) segu 75/25 (v + v).

Filtreeritakse läbi 0,22 µm filtri (4,5) ja lahus degaseeritakse (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit).

3.4. Metaansulfoonhappe lahus, c = 2 %

20,0 ml metaansulfoonhapet lahjendatakse metanooliga (3.2) 1 000 ml-ni.

3.5. Soolhappe lahus, c = 10 %

100 ml soolhapet ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) lahjendatakse veega 1 000 ml-ni.

3.6. Kationvahetusvaik Amberlite CG-120 (Na-vormis), 100–200 mešši.

Vaiku töödeldakse enne kasutamist 100 g vaiku immutatatakse 500 ml soolhappe lahusega (3.5) ja kuumutatakse kuuma plaadil pidevalt segades keemiseni. Lastakse jahtuda ja hape dekanteeritakse. Filtreeritakse läbi filterpaberi, kasutades vaakumit. Vaiku pestakse kaks korda 500 ml veeportsjonitega ja seejärel 250 ml metanooliga (3.2). Vaiku loputatakse veel 250 ml metanooliga ja kuivatatakse filtrikoogist õhku läbi lastes. Kuivatatud vaiku hoitakse korgiga suletud pudelis.

3.7. Standardaine: puhas metüülbensokaat (7-bensüüloksü-6-butüül-3-metoksükarbonüül-4-kinoloon)

▼B

3.7.1. Metüülbensokaadi põhistandardlahus, 500 µg/ml

50 mg standardainet (3.7) kaalutakse 0,1 mg täpsusega, lahustatakse 100 ml mõõtekolbis metaansulfoonhappe lahuses (3.4), kolb täidetakse märgini ja segatakse.

3.7.2. Metüülbensokaadi vahestandardlahus, 50 µg/ml

5,0 ml metüülbensokaadi põhistandardlahust (3.7.1) viiakse 50 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse metanooliga (3.2) märgini ja segatakse.

3.7.3. Kalibreerimislahused

Vastavalt 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ja 5,0 ml metüülbensokaadi vahestandardlahust (3.7.2) viiakse 25 ml mõõtekolbidesse. Kolvid täidetakse liikuva faasiga (3.3) märgini ja segatakse. Lahuste metüülbensokaadi kontsentratsioonid on vastavalt 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ja 10,0 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

4. **Seadmed**

4.1. Laboratoorne loksuti

4.2. Filter-pöördaurusti

4.3. Klaaskolonn (250 mm × 15 mm) korkkraani ja ligikaudu 200 ml reservuaariga

4.4. HPLC-seade muudetava lainepikkusega ultraviolet-detektoriga või dioodireadetektoriga

4.4.1. Vedelikkromatograafia kolonn: 300 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm või samaväärne

4.5. Membraanfiltrid 0,22 µm.

4.6. Membraanfiltrid 0,45 µm.

5. **Töö käik**5.1. *Üldsätted*

5.1.1. Võrdlussööt analüüsitakse, et selles ei oleks metüülbensokaati ega teisi segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööt, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus metüülbensokaati. Kontsentratsiooni 15 mg/kg saamiseks lisatakse 20 g võrdlussöödale 600 µl põhistandardlahust (3.7.1), segatakse ja oodatakse enne ekstraheerimise (5.2) alustamist 10 minutit.

Märkus: selle meetodi rakendamiseks peab võrdlussööt olema tüübilt sarnane prooviga ja analüüsi tulemusena ei tohi sellest leida metüülbensokaati.

5.2. *Ekstraheerimine*

Umbes 20 g ettevalmistatud proovi kaalutakse 0,01 g täpsusega ja viiakse 250 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 100,0 ml metaansulfoonhappe lahust (3.4) ja loksutatakse mehaaniliselt (4.1) 30 minutit. Lahus filtreeritakse läbi filterpaberi ja filtraat hoitakse vedelik-vedelik ekstraktsiooniks (5.3).

5.3. *Vedelik-vedelik-ekstraktsioon*

500 ml jaotuslehttrisse, mis sisaldab 100 ml soolhappe lahust (3.5), viiakse 25,0 ml punktis 5.2 saadud filtraati. Lehttrisse lisatakse 100 ml

▼B

diklorometaani (3.1) ja loksutatakse üks minut. Kihtidel lastakse eralduda ning alumine (diklorometaani) kiht viiakse 500 ml ümarkolbi. Veefaasi ekstraheerimist korratakse veel kahe 40 ml portsjoni diklorometaaniga ja need ühendatakse esimese ekstraktiga ümarkolvis. Diklorometaani ekstrakt aurustatakse pöördaurusti (4.2) abil kuivaks vähendatud rõhul, temperatuuril 40 °C. Jääk lahustatakse 20–25 ml metanoolis (3.2), kolb suletakse ja kogu ekstrakt hoitakse ioonvahetuskromatograafiaks (5.4).

5.4. *Ioonvahetuskromatograafia*5.4.1. *Katioonvahetuskolonnide ettevalmistamine*

Klaasvatist tropp asetatakse klaaskolonnide (4.3) põhja. 5,0 g töödeldud katioonvahetusvaiku (3.6) immutatakse 50 ml soolhappega (3.5), valatakse klaaskolonnide ja lastakse settida. Liigsel happel lastakse läbi kolonnide voolata, kuni happe tase on jõudnud vaigu ülemisele pinnale, ja kolonnide pestakse veega, kuni väljavoolav pesuvee on lakmuse suhtes neutraalne. 50 ml metanooli (3.2) viiakse kolonnide ja lastakse läbi kolonnide voolata, kuni metanooli tase on jõudnud vaigu pinnale.

5.4.2. *Kolonnkromatograafia*

Pipeti abil viiakse punktis 5.3 saadud ekstrakt ettevaatlikult kolonnide. Ümarkolbi loputatakse kahe 5–10 ml metanooli (3.2) portsjoniga ja need pesuveedelikud viiakse kolonnide. Ekstraktid lastakse läbi kolonnide voolata, kuni ekstrakti tase on jõudnud vaigu pinnale, ja kolonnide pestakse 50 ml metanooliga nii, et voolu kiirus ei ületaks 5 ml minutis. Väljavoolanud vedelik kallatakse ära. Metüülbensokaat elueeritakse kolonnist, kasutades 150 ml metaansulfoonhapet (3.4), ja kolonnide eluaat kogutakse 250 ml koonilisse kolbi.

5.5. *Vedelikvedelik-ekstraktsioon*

Punktis 5.4.2 saadud eluaat viiakse liitrisse jaotuslehtrisse. Koonilist kolbi loputatakse 5–10 ml metanooliga (3.2) ja lisatakse loputusvedelikud samasse jaotuslehtrisse. Lisatakse 300 ml soolhappe lahust (3.5) ja 130 ml diklorometaani (3.1). Loksutatakse üks minut ja lastakse faasidel eralduda. Alumine (diklorometaani) kiht viiakse 500 ml ümarkolbi. Veefaasi ekstraheerimist korratakse veel kahe 70 ml portsjoni diklorometaaniga ja need ekstraktid ühendatakse esimesega ümarkolvis.

Diklorometaani ekstrakt aurustatakse pöördaurusti (4.2) abil kuivaks vähendatud rõhul, temperatuuril 40 °C. Jääk lahustatakse kolvis umbes 5 ml metanoolis (3.2) ning saadud lahus viiakse kvantitatiivselt 10 ml mõõtekolbi. Ümarkolbi loputatakse veel kahe portsjoni 1–2 ml metanooliga ja viiakse need mõõtekolbi. Kolb täidetakse metanooliga märgini ja segatakse. Lahuse alikvootne osa filtreeritakse läbi membraanifiltri (4.6). Lahust hoitakse HPLC määramiseks (5.6).

5.6. *HPLC määramine*5.6.1. *Parameetrid*

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need annavad samaväärsed tulemused):

- vedelikkromatograafia kolonn (4.4.1);
- HPLC liikuv faas: metanooli ja vee segu (3.3);
- voolukiirus: 1 kuni 1,5 ml/min;
- avastamise lainepikkus: 265 nm;
- sissesüstitava ruumala: 20–50 µl.

▼B

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides kolonni mitu korda kalibreerimislahust (3.7.3) kontsentratsiooniga 4 g/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused või pindalad ja retentsiooniajad.

5.6.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (3.7.3) süstitakse mitu korda ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes ordinaatteljele kalibreerimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsisssteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.6.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.5) süstitakse mitu korda, kasutades sama mahtu nagu kalibreerimislahuste puhul, ning määratakse metüülbensokaadi piigi keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse kontsentratsioon määratakse µg/ml proovilahuse metüülbensokaadi piikide keskmise kõrguse (pindala) järgi, kasutades kalibreerimisgraafikut (5.6.2).

Proovi metüülbensokaadi sisaldus w (mg/kg) arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

kus:

c = proovilahuse metüülbensokaadi kontsentratsioon µg/ml;

m = kaalutise mass grammides.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. Identsus

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja 10 µg/ml sisaldusega kalibreerimislahuse (3.7.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstrakti metüülbensokaadi kontsentratsiooni suurendatakse, lisades vahestandardlahust (3.7.2) sobivas koguses. Lisatav metüülbensokaadi kogus peab olema sarnane prooviekstrakti analüüsil leitud metüülbensokaadi kogusega.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma ainult metüülbensokaadi piigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti metüülbensokaadi piigi laiusest.

7.1.2. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi spektrite maksimumneeldumise lainepikkused, mis on registreeritud kromatogrammi piigi tipus, peavad langema kokku detekteerimissüsteemi lahutusvõime määratud piires. Diodireadetektori puhul on see tavaliselt ligikaudu 2 nm;

▼B

- b) 220 ja 350 nm vahel ei tohi kromatogrammi piigi tipus registreeritud proovi ja standardi spektrid teineteisest erineda nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) vahemikus 220–350 nm ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduvas osas, tipus ja allapoole suunduvas osas registreeritud spektrid erineda üksteisest nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused mitte üheski uuritud punktis ei ületa 15 % piigi tipu vastavatest neeldumisspektritest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olemasolu tõestatuks.

7.2. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada: 10 % suuremast tulemusest metüülbensokaadisalduse puhul, mis jääb 4–20 mg/kg vahele.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga fooniproovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. **Ühisuringu tulemused**

10 laboratooriumi analüüsisid viit proovi. Iga proovi puhul tehti kaks analüüsi.

	Võrdlussõöt	Jahu 1	Graanulid 1	Jahu 2	Graanulid 2
Keskmine [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Saagis [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = allpool avastamisläve

s_r = korratavust iseloomustav standardhälve

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja, %

s_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

B. OLAKVINDOKSI MÄÄRAMINE

(2-[N-2'-(hüdroksüetüül)karbamoyül]-3-metüülkinoksaliin- N^1 , N^4 -dioksiid)

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Selle meetodiga on võimalik määrata olakvindoksi taset söödas. Määramispiir on 5 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Proov ekstraheeritakse metanooli vesilahuses. Olakvindoksisaldus määratakse pöördfasiliselt kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades ultraviolettdetektorit.

▼B**3. Reaktiivid**

3.1. Metanool

3.2. HPLC-puhtusastmega metanool

3.3. HPLC-puhtusastmega vesi

3.4. HPLC liikuv faas

Vee (3.3) ja metanooli (3.2) segu, 900 +100 (V + V).

3.5. Standardaine: puhas olakvindoks 2-[N-2'-(hüdroksüetüül)karbamooül]-3-metüülkinoksaliin-N¹,N⁴-dioksiid, E 851.

3.5.1. Olakvindoksi põhistandardlahus, 250 µg/ml.

50 mg olakvindoksi (3.5) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ning asetatakse 200 ml mõõtekolbi ja lisatakse ligikaudu 190 ml vett. Kolb asetatakse 20 minutiks ultrahelivanni (4.1). Pärast ultraheliga mõjutamist viiakse lahuse temperatuur toatemperatuurini, täidetakse kolb veega kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi ja säilitatakse külmikus. See lahus tuleb igal kuul uuesti valmistada.

3.5.2. Olakvindoksi vahestandardlahus, 25 µg/ml.

10,0 ml põhistandardlahust (3.5.1) valatakse 100 ml mõõtekolbi, täidetakse see liikuva faasiga (3.4) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi ja säilitatakse külmikus. See lahus tuleb iga päev uuesti valmistada.

3.5.3. Kalibreerimislahused

50 ml mõõtekolbidesse pannakse 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 ja 20,0 ml vahestandardlahust (3.5.2). Kolvid täidetakse liikuva faasiga (3,4) märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi. Nende lahuste olakvindoksisisaldus on vastavalt 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 ja 10,0 µg/ml.

Need lahused tuleb iga päev uuesti valmistada.

4. Seadmed

4.1. Ultrahelivann

4.2. Mehaaniline loksuti.

4.3. HPLC seade muudetava lainepikkusega ultraviolettdetektoriga või diodireadetektoriga.

4.3.1. Vedelikkromatograafia kolonn, 250 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm või samaväärne

4.4. Membraanfiltrid 0,45 µm.

5. Töö käik

Märkus: olakvindoks on valgustundlik. Kõik protseduurid tehakse nõrgas valguses või kasutatakse tumedast klaasist anumaid.

5.1. Üldsätted

5.1.1. Tuleb analüüsida võrdlussööt, veendumaks, et selles ei ole ei olakvindoksit ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööt, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus olakvindoksit. Et saada kontsentratsiooni 50 mg/kg, viiakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.5.1) 250 ml

▼B

koonilisse kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitri. Lisatakse 50 g võrdlussõta, segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerima (5.2) asumist veel mitu korda.

Märkus: selle meetodi puhul peab võrdlussõot olema prooviga samaaadne ja selles ei tohi leiduda olakvindoksit.

5.2. Ekstraheerimine

Umbes 50 g proovi kaalutakse 0,01 g täpsusega ning viiakse 1 000 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 100 ml metanooli (3.1) ja asetatakse kolb 5 minutiks ultrahelivanni (4.1). Lisatakse 410 ml vett ja hoitakse kolbi ultrahelivannis veel 15 minutit. Kolb võetakse ultrahelivannist välja, loksutatakse 30 minutit loksutil (4.2) ja filtreeritakse läbi kurdfiltr. 10,0 ml filtraati kallatakse 20 ml mõõtekolbi, täidetakse veega kuni märgini ja segatakse. Alikvootne osa filtreeritakse läbi membraanfiltr (4.4). (vt tähelepanek 9). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.3. HPLC määramine

5.3.1. Parameetrid

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused):

Analüütiline kolonn (4.3.1)

Liikuv faas (3.4):	vee (3.3) ja metanooli (3.2.) segu, 900 + 100 (V + V)
Voolukiirus:	1,5–2 ml/min
Avastamise lainepikkus:	380 nm
Sissesüstitava ruumala:	20–100 µl

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides kolonni mitu korda kalibreerimislahust (3.5.3) kontsentratsiooniga 2,5 g/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (3.5.3) süstitakse mitu korda ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes ordinaatteljele kalibreerimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.3.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.2) süstitakse mitu korda, kasutades sama mahtu nagu kalibreerimislahuste puhul, ning määratakse olakvindoksi piigi keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse olakvindoksiipikide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kalibreerimisgraafiku (5.3.2) abil proovilahuse kontsentratsioon (µg/ml).

Proovi olakvindoksisisaldus w (mg/kg) arvutatakse järgmise valemiga alusel:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

▼B

kus:

c = olakvindoksi kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) prooviekstraktis (5.2);
 m = kaalutise mass grammides (5.2).

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. *Identsus*

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (5.2) ja $5,0 \mu\text{g/ml}$ sisaldusega kalibreerimislahuse (3.5.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstraktile (5.2) lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (3.5.3). Lisatud olakvindoksikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud olakvindoksikogus.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma üksnes olakvindoksiipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti olakvindoksiipiigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine diodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt $\pm 2 \text{ nm}$;
- b) lainepikkustel 220–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad proovi ja standardi piigi tipu spektrid kromatogrammil ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 220–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olemasolu tõestatuks.

7.2. *Korratavus*

Kui olakvindoksisisaldus on 10–200 mg/kg, ei tohi sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ületada 15 % suuremast tulemusest.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga fooniproovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

▼B**8. Ühisuuringu tulemused**

Korraldati EÜ ühisuuring, mille käigus kuni 13 laborit analüüsisid nelja põrsasõõda proovi, millest üks oli võrdlussõöt. Tulemused olid järgmised:

	Proov 1	Proov 2	Proov 3	Proov 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
keskmine [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S _r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S _R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV _r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV _R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Nominaalsisaldus [mg/kg]	—	15	50	100
saagis: %	—	97,3	96,0	95,4

L = laboratooriumide arv
 n = üksikmääramiste arv
 S_r = korratavust iseloomustav standardhälve
 S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve
 CV_r = korratavuse variatsioonikordaja
 CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

9. Tähelepanek

Kuigi meetodid ei ole kontrollitud söötade suhtes, mille olakvindoksisisaldus on üle 100 mg/kg, võib saavutada rahuldavaid tulemusi, kasutades väiksema massiga proove ja/või lahjendades ekstrakti (5.2) kalibreerimisgraafiku (5.3.2) vahemikku jääva kontsentratsiooni saamiseks.

C. AMPROOLIUMI MÄÄRAMINE

1-[(4-amino-2-propüülpürimidiin-5-üül)metüül]-2-metüülpüridiiniumkloriidhüdrokloriid

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata amprooliumi kogust söödas ja eelsegudes. Avastamiskünnis on 1 mg/kg, määramispiir 5 mg/kg.

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse metanooli vesilahuses. Pärast liikuva faasiga lahjendamist ja membraanfiltreerimist määratakse amprooliumisisaldus kõrgeefektive katioonvahetus-vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Metanool

3.2. HPLC-puhtusastmega atsetonitriil

3.3. HPLC-puhtusastmega vesi

3.4. Naatriumdiveinikfosfaadi lahus, c = 0,1 mol/l

1 000 ml mõõtekolvis lahustatakse vees (3.3) 13,80 g naatriumdiveinikfosfaadi monohüdraati, täidetakse kolb veega (3.3) kuni märgini ja segatakse.

3.5. Naatriumperklooraadi lahus, c = 1,6 mol/l

1 000 ml mõõtekolvis lahustatakse vees (3.3) 224,74 g naatriumperklooraadi monohüdraati, täidetakse kolb veega (3.3) kuni märgini ja segatakse.

▼B

- 3.6. HPLC liikuv faas (vt tähelepanek 9.1).

Atsetonitrili (3.2), naatriumdivesinikfosfaadi lahuse (3.4) ja naatriumperklooraadi lahuse (3.5) segu, 450 + 450 + 100 (v+v+v). Enne kasutamist filtreeritakse lahus läbi 0,22 µm membraanfiltri (4.3) ja degaseeritakse (nt ultrahelivannis (4.4) vähemalt 15 minutit).

- 3.7. Standardaine: puhas amproolium, 1-[(4-amino-2-propüülpürimidiin-5-üül)metüül]-2-metüülpüridiiniumkloriidhüdrokloriid, E 750 (vt 9.2).

- 3.7.1. Amprooliumi põhistandardlahus, 500 µg/ml

50 mg amprooliumi (3.7) kaalutakse täpsusega 0,1 mg, pannakse see 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse 80 ml metanoolis (3.1) ja asetatakse kolb 10 minutiks ultrahelivanni (4.4). Pärast ultraheliga mõjutamist viiakse lahuse temperatuur toatemperatuurini, täidetakse kolb veega kuni märgini ja segatakse. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuks ühe kuu.

- 3.7.2. Amprooliumi vahestandardlahus, 50 µg/ml

5,0 ml põhistandardlahust (3.7.1) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi, täidetakse see ekstrahendiga (3.8) kuni märgini ja segatakse. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuks ühe kuu.

- 3.7.3. Kalibreerimislahused

0,5, 1,0 ja 2,0 ml vahestandardlahust (3.7.2) pannakse 50 ml mõõtekolbidesse. Kolvid täidetakse liikuva faasiga (3.6) märgini ja segatakse. Nende lahuste amprooliumisisaldus on 0,5, 1,0 ja 2 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

- 3.8. Ekstrahent

Metanooli (3.1) ja vee segu 2+1 (v+v)

4. Seadmed

- 4.1. HPLC seade koos sissepritsesüsteemiga, mis võimaldab süstida 100 µl.

- 4.1.1. Vedelikkromatograafia kolonn 125 × 4 mm, katioonvahetaja Nucleosil 10 SA, täidise terasuurus 5 või 10 µm või samaväärne

- 4.1.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor

- 4.2. Membraanfilter, polütetrafluoroetüleenist, 0,45 µm.

- 4.3. Membraanfilter 0,22 µm.

- 4.4. Ultrahelivann

- 4.5. Mehaaniline loksuti või magnetsegur

5. Töö käik

- 5.1. Üldsätted

- 5.1.1. Võrdlussõöt

Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussõõda analüüs, veendumaks, et selles ei ole ei amprooliumi ega segavaid aineid. Võrdlussõöt peab olema prooviga samalaadne ja selles ei tohi leiduda amprooliumi või segavaid aineid.

▼B

5.1.2. Saagisekatsed

Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus amprooliumi. Et saada kontsentratsiooni 100 mg/kg, viiakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.7.1) 250 ml koonilisse kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitrini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerimist (5.2) asumist veel mitu korda.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussööt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardsel lisamismeetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitavale proovile ligikaudu sama suur amprooliumikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine

5.2.1. Eelsegud (amprooliumisisaldus < 1 %) ja söödad

Olenevalt amprooliumisisaldusest kaalutakse 5–40 g proovi täpsusega 0,01 g, kantakse see 500 ml koonilisse kolbi ja lisatakse 200 ml ekstrahenti (3.8). Kolb asetatakse ultrahelivanni (4.4) ja jäetakse 15 minutiks seisma. Kolb võetakse ultrahelivannist välja ja loksutatakse loksutil või segatakse magnetseguril (4.5) üks tund. Ekstrakti alikvoot lahjendatakse liikuva faasiga (3.6) amprooliumisisalduseni 0,5–2 µg/ml ja segatakse (vt tähelepanek 9.3). 5–10 ml lahjendatud lahust filtreeritakse läbi membraanfiltrit (4.2). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.2.2. Eelsegud (amprooliumisisaldus ≥ 1 %)

Olenevalt amprooliumisisaldusest kaalutakse 1–4 g proovi täpsusega 0,001 g, kantakse see 500 ml koonilisse kolbi ja lisatakse 200 ml ekstrahenti (3.8). Kolb asetatakse ultrahelivanni (4.4) ja jäetakse 15 minutiks seisma. Kolb võetakse ultrahelivannist välja ja loksutatakse loksutil või segatakse magnetseguril (4.5) üks tund. Ekstrakti alikvoot lahjendatakse liikuva faasiga (3.6) amprooliumisisalduseni 0,5–2 µg/ml ja segatakse. 5–10 ml lahjendatud lahust filtreeritakse läbi membraanfiltrit (4.2). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.3. HPLC määramine

5.3.1. Parameetrid

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused):

Vedelikkromatograafia

Kolonn (4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationvahetaja Nucleosil 10 SA, täidise terasuurus 10 µm või samaväärne
Liikuv faas (3.6):	atsetonitriili (3.2), naatriumi, divesiniksulfaadi lahuse (3.4) ja naatriumperklooraadi (3.5) segu, 450+450+100 (v+v+v)
Voolukiirus:	0,7–1 ml/min
Avastamise lainepikkus:	264 nm
Sissesüstitava ruumala:	100 µl

▼B

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides kolonni mitu korda kalibreerimislahust (3.5.3) kontsentratsiooniga 1,0 µg/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (3.7.3) süstitakse mitu korda ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad keskmised piigikõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes ordinaatteljele kalibreerimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.3.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.2) süstitakse mitu korda, kasutades sama mahtu, mis kalibreerimislahuste puhul, ja määratakse amprooliumipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse amprooliumipiikide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kalibreerimisgraafiku (5.3.2) abil proovilahuse kontsentratsioon (µg/ml).

Proovi amprooliumisisaldus w (mg/kg) arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

V = punkti 5.2 kohane ekstrahendi (3.8) maht milliliitrites (s.o 200 ml);

c = amprooliumi kontsentratsioon (µg/ml) prooviekstraktis (5.2);

f = punkti 5.2 kohane lahendusfaktor;

m = kaalutise mass grammides.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. Identsus

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (5.2) ja 2,0 µg/ml sisaldusega kalibreerimislahuse (3.7.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstraktile (5.2) lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (3.7.3). Lisatud amprooliumikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud amprooliumikogus.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahendust, peab tõusma üksnes amprooliumipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolal kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti amprooliumipiigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine diodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidele oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;

▼B

- b) lainepikkustel 210–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad proovi ja standardi piigi tipu spektrid kromatogrammil ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 210–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olemasolu tõestatuks.

7.2. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

- 15 % suuremast tulemusest, kui amprooliumisisaldus on vahemikus 25–500 mg/kg;
- 75 mg/kg, kui amprooliumisisaldus on vahemikus 500–1 000 mg/kg;
- 7,5 % suuremast tulemusest, kui amprooliumisisaldus on suurem kui 1 000 mg/kg.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga (fooni)proovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. **Ühisuuringu tulemused**

Korraldati ühisuuring, mille käigus analüüsiti kolme kodulindude sööta (proovid 1–3), ühte mineraalsööta (proov 4) ja ühte eelsegu (proov 5). Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

	Proov 1 (võrdlussööt)	Proov 2	Proov 3	Proov 4	Proov 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Keskmine [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
Nominaalsisaldus [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

- L = laboratooriumide arv
n = üksikmääramiste arv
 s_r = korratavust iseloomustav standardhälve
CV_r = korratavuse variatsioonikordaja
 s_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve
CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

▼B**9. Tähelepanekud**

- 9.1. Kui proov sisaldab tiamiini, ilmub kromatogrammil tiamiinipiik veidi enne amprooliumipiiki. Selle meetodi kohaselt peavad amproolium ja tiamiin teineteisest eralduma. Kui amproolium ja tiamiin selle meetodi puhul kasutatavas kolonnis (4.1.1) teineteisest siiski ei eraldu, tuleb kuni 50 % liikuva faasi (3.6) atsetonitriilist asendada metanooliga.
- 9.2. Briti farmakopöa andmetel on soolhappelahuses ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) amprooliumi lahuse ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) neeldumismaksimumid 246 ja 262 nm juures. Neelduvus on 246 nm juures 0,84 ja 262 nm juures 0,80.
- 9.3. Ekstrakt tuleb iga kord liikuva faasiga lahjendada, sest vastasel korral võib amprooliumipiigi retentsiooniaeg ioontugevuse muutuste tõttu oluliselt nihkuda.

D. KARBADOKSI MÄÄRAMINE

Metüül-3-(2-kinoksalinüülmetüleén)karbasaat- N^1 , N^4 -dioksiid

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata karbadoksi kogust söödas, eelsegudes ja preparaatides. Avastamiskünnis on 1 mg/kg. Määramispiir on 5 mg/kg.

2. Põhimõte

Proovil lastakse vees seista ja ekstraheeritakse metanooli ja atsetonitriili seguga. Sööda puhul lastakse filtreeritud ekstrakti alikvoodil selgida alumiiniumoksiidkolonnil. Eelsegude ja preparaatide puhul lahjendatakse filtreeritud ekstrakti alikvoot vee, metanooli ja atsetonitriiliga sobiva kontsentratsioonini. Karbadoksisisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades ultraviolettdetektorit.

3. Reaktiivid

- 3.1. Metanool
- 3.2. HPLC-puhtusastmega atsetonitriil
- 3.3. Äädikhape, $w = 100 \%$
- 3.4. Alumiiniumoksiid: neutraalne, aktiivsuse aste I
- 3.5. Metanool + atsetonitriil 1:1 (v + v)
- 500 ml metanooli (3.1) segatakse 500 ml atsetonitriiliga (3.2).
- 3.6. Äädikhape, $\sigma = 10 \%$
- 10 ml äädikhapet (3.3) lahjendatakse veega 100 milliliitriini.
- 3.7. Naatriumatsetaat
- 3.8. HPLC-puhtusastmega vesi
- 3.9. Atsetaatpuhverlahus, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$
- 0,82 g naatriumatsetaati (3.7) lahustatakse 700 ml vees (3.8) ja pH korrigeeritakse äädikhappega (3.6) 6,0-ni. Lahus kallatakse 1 000 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse veega (3.8) kuni määrgini ja segatakse.
- 3.10. HPLC liikuv faas
- 825 ml atsetaatpuhverlahust (3.9) segatakse 175 ml atsetonitriiliga (3.2).
- Filtreeritakse läbi 0,22 μm filtri (4,5) ja lahus degaseeritakse (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit).

▼B

3.11. Standardaine

Puhas karbadoks: metüül-3-(2-kinoksalinüülmetüleen)karbasaat-N¹,N⁴-dioksiid, E 850

3.11.1. Karbadoksi põhistandardlahus, 100 µg/ml (vt märkus 5. Töö kõik).

25 mg karbadoksi standardainet (3.11) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja asetatakse see 250 ml mõõtekolbi. Lahustatakse ultraheliga mõjutades (4.7) metanooli ja atsetonitriili segus (3.5). Pärast ultraheliga mõjutamist viiakse lahuse temperatuur toatemperatuurini, täidetakse kolb metanooli ja atsetonitriili seguga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat anumad ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.11.2. Kalibreerimislahused

2,0, 5,010,0 ja 20,0 ml põhistandardlahust (3.11.1) pannakse 100 ml mõõtekolbidesse. Lisatakse 30 ml vett, täidetakse kolvid metanooli ja atsetonitriili seguga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi. Need lahused sisaldavad karbadoksi vastavalt 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 µg/ml.

Kalibreerimislahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

Märkus: karbadoksi määramiseks söödas, mille karbadoksisisaldus on alla 10 mg/kg, tuleb valmistada kalibreerimislahused, mille kontsentratsioon on alla 2,0 µg/ml.

3.12. Vee ja (metanooli + atsetonitriili) (3.5) segu, 300 + 700 (v + v)

300 ml vett segatakse 700 ml metanooli ja atsetonitriili seguga (3.5).

4. Seadmed

4.1. Laboratooriumiloksuti või magnetsegur

4.2. Klaaskiudfilterpaber (Whatman GF/A või selle analoog)

4.3. Klaaskolonn (pikkus 300–400 mm, sisediameeter ligikaudu 10 mm) paagutatud klaasfiltri ja äravooluklapiga.

Märkus: kasutada võib ka sulgemiskraaniga või koonuseks töödeldud otsaga klaaskolonn; sel juhul pannakse kolonni alumisse otsa väike klaasvillatropp, mis tambitakse klaaspulgaga tihedaks.

4.4. HPLC seade koos sissepritsesüsteemiga, mis võimaldab süstida 20 µl.

4.4.1. Vedelikkromatograafia kolonn: 300 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm või samaväärne

4.4.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor, mis töötab vahemikus 225–400 nm.

4.5. Membraanfilter 0,22 µm.

4.6. Membraanfilter 0,45 µm.

4.7. Ultrahelivann

▼B**5. Töö käik**

Märkus: karbadoks on valgustundlik. Kõik protseduurid tehakse nõrgas valguses või kasutatakse tumedat või alumiiniumfooliumi mähitud anumat.

5.1. Üldsätted**5.1.1. Võrdlussõöt**

Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs, veendumaks, et selles ei ole ei karbadoksi ega segavaid aineid. Võrdlussõöt peab olema prooviga samalaadne ja selles tohi leiduda karbadoksi ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta (5.1.1), millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus karbadoksi. Et saada kontsentratsiooni 50 mg/kg, kantakse 5,0 ml põhistandardlahust (3.11.1) 200 ml koonilisse kolbi. Lahus aurustatakse lämmastikuvoolus ligikaudu 0,5 milliliitriini. Lisatakse 10 g võrdlussööta, segatakse ja jäetakse enne ekstraheerimata (5.2) asumist 10 minutiks seisma.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussõöt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardsel lisamismeetodil. Sel juhul lisatakse proovile ligikaudu sama suur karbadoksikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine**5.2.1. Sõöt**

10 g proovi kaalutakse täpsusega 0,01 g ja pannakse 200 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 15,0 ml vett, segatakse ja lastakse seista 5 minutit. Lisatakse 35,0 ml metanooli ja atsetonitriili segu (3.5), korgitakse kinni ja loksutatakse 30 minutit loksutil või segatakse magnetseguril (4.1). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiust filterpaberi (4.2). See lahus säilitatakse puhastamiseks (5.3).

5.2.2. Eelsegud (0,1–2,0 %)

1 g jahvatamata proovi kaalutakse täpsusega 0,001 g ja pannakse 200 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 15,0 ml vett, segatakse ja lastakse seista 5 minutit. Lisatakse 35,0 ml metanooli ja atsetonitriili segu (3.5), korgitakse kinni ja loksutatakse 30 minutit loksutil või segatakse magnetseguril (4.1). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiust filterpaberi (4.2).

Filtraadi alikvoot pipetitakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 15,0 ml vett, täidetakse kolvid metanooli ja atsetonitriili seguga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Lõpplahuse karbadoksikontsentratsioon on ligikaudu 10 µg/ml. Alikvoot filtreeritakse läbi 0,45 µm filtri (4.6).

Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.4).

5.2.3. Preparaadid (> 2 %)

0,2 g jahvatamata proovi kaalutakse täpsusega 0,001 g ja pannakse 250 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 45,0 ml vett, segatakse ja lastakse seista 5 minutit. Lisatakse 105,0 ml metanooli ja atsetonitriili segu (3.5),

▼B

korgitakse kinni ja homogeneeritakse. Proovi mõjutatakse ultraheliga (4.7) 15 minutit, seejärel loksutatakse või segatakse 15 minuti jooksul (4.1). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiust filterpaberi (4.2).

Filtraadi alikvoot lahjendatakse vee ning metanooli ja atsetonitriili seguga (3.12), kuni karbadoksi lõppkontsentratsioon on 10–15 µg/ml (10 % preparaadi puhul on lahjendusaste 10). Alikvoot filtreeritakse läbi 0,45 µm filtri (4.6).

Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.4).

5.3. Puhastamine

5.3.1. Alumiiniumoksiidikolonn ettevalmistamine

Kaalutakse 4 g alumiiniumoksiidi (3.4) ja pannakse klaaskoloni (4.3).

5.3.2. Proovi puhastamine

Alumiiniumoksiidikoloni lisatakse 15 ml filtreeritud ekstrakti (5.2.1) ja visatakse eluaadi esimesed 2 ml ära. Järgmised 5 ml kogutakse ning filtreeritakse alikvoot läbi 0,45 µm filtri (4.6).

Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.4).

5.4. HPLC määramine

5.4.1. Parameetrid

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need annavad samaväärsed tulemused):

Vedelikkromatograafia

kolonn (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 10 µm või samaväärne
Liikuv faas (3.10):	atsetaathühendilahuse (3.9) ja atsetonitriili (3.2) segu, 825 + 175 (v+v)
Voolukiirus:	1,5–2 ml/min
Avastamise lainepikkus:	365 nm
Sissesüstitava ruumala:	20 µl

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides koloni mitu korda kalibreerimislahust (3.11.2) kontsentratsiooniga 5,0 µg/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.4.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (3.11.2) süstitakse mitu korda ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad piigikõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kandes ordinaatteljele kalibreerimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.4.3. Proovilahus

Prooviekstrakti [(5.3.2) söötade, (5.2.2) eelsegude ja (5.2.3) preparaatide puhul] süstitakse mitu korda ja määratakse karbadoksiipiikide keskmine kõrgus (pindala).

▼B**6. Tulemuste arvutamine**

Proovilahuse karbadoksi piikide keskmise kõrguse (pindala) järgi määratakse proovilahuse karbadoksikontsentratsioon $\mu\text{g/ml}$, kasutades kalibreerimisgraafikut (5.4.2).

6.1. *Sööt*

Karbadoksisisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = karbadoksi kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) prooviekstraktis (5.3.2);
 V_1 = ekstrahendi maht, ml (s.o 50);
 m = kaalutise mass grammides.

6.2. *Eelsegud ja preparaadid*

Karbadoksisisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi järgi:

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

kus:

c = karbadoksi kontsentratsioon (g/ml) prooviekstraktis (5.2.2 või 5.2.3);
 V_2 = ekstrahendi maht, ml (s.o 50 eelsegude, 150 preparaatide puhul);
 f = punkti 5.2.2 (eelsegud) või 5.2.3 (preparaadid) kohane lahjendusfaktor;
 m = kaalutise mass grammides.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll7.1. *Identsus*

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatsel abil või kasutades diodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja $10,0 \mu\text{g/ml}$ sisaldusega kalibreerimislahuse (3.11.2) spektreid.

7.1.1. *Täiendav kromatograafia*

Prooviekstraktile lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (3.11.2). Lisatud karbadoksikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist hinnanguline karbadoksikogus.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma üksnes karbadoksi piigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti karbadoksi piigi laiusest.

7.1.2. *Diodireadetektori kasutamine*

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidele oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsideadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori puhul on see tavaliselt vahemikus $\pm 2 \text{ nm}$;

▼B

- b) lainepikkustel 225–400 nm ei tohi kromatogrammi piigi tipus registreeritud proovi ja standardi spektrid teineteisest erineda nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 225–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olemasolu tõestatuks.

7.2. *Korratavus*

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi 10 mg/kg ja suuremate sisalduste puhul ületada 15 % suuremast tulemusest.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga (fooni)proovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. **Ühisuuringu tulemused**

Korraldati ühisuuring, mille käigus analüüsiti 8 laboratooriumis kuut sööta, nelja eelsegu ja kolme preparaati. Iga proovi puhul tehti kaks analüüsi. (Üksikasjalikum teavet selle ühisuuringu kohta võib leida ajakirjas *Journal of AOAC, köide 71, 1988, lk 484–490.*) Tulemused (välja arvatud kõrvalekalded) on esitatud järgmises tabelis:

Tabel 1.

Ühisuuringu tulemused sööda kohta

	Proov 1	Proov 2	Proov 3	Proov 4	Proov 5	Proov 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Keskmine (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nominaalsisaldus (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabel 2.

Ühisuuringu tulemused eelsegude ja preparaatide kohta

	Eelsegud				Preparaadid		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Keskmine (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7

▼B

	Eelsegud				Preparaadid		
	A	B	C	D	A	B	C
CV _R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nominaalsaldus (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = laboratooriumide arv

n = üksikmääramiste arv

S_r = korratavust iseloomustav standardhälve

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja

S_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja



IX LISA

ARTIKLIS 6 OSUTATUD VASTAVUSTABELID

1. **Direktiiv 71/250/EMÜ**

Direktiiv 71/250/EMÜ	Käesolev määrus
Artikli 1 esimene lõik	Artikkel 3
Artikli 1 teine lõik	Artikkel 2
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa 1. osa	II lisa
Lisa 2. osa	—
Lisa 3. osa	—
Lisa 4. osa	III lisa O osa
Lisa 5. osa	III lisa M osa
Lisa 6. osa	III lisa N osa
Lisa 7. osa	III lisa Q osa
Lisa 9. osa	III lisa K osa
Lisa 10. osa	—
Lisa 11. osa	—
Lisa 12. osa	III lisa J osa
Lisa 14. osa	III lisa D osa
Lisa 16. osa	—

2. **Direktiiv 71/393/EMÜ**

Direktiiv 71/393/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa I osa	III lisa A osa
Lisa II osa	III lisa E osa
Lisa III osa	III lisa P osa
Lisa IV osa	III lisa H osa

3. **Direktiiv 72/199/EMÜ**

Direktiiv 72/199/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
I lisa 1. osa	III lisa L osa
I lisa 2. osa	III lisa C osa
I lisa 3. osa	—
I lisa 4. osa	—
I lisa 5. osa	V lisa A osa
II lisa	—

4. **Direktiiv 73/46/EMÜ**

Direktiiv 73/46/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
I lisa 1. osa	III lisa B osa
I lisa 2. osa	—
I lisa 3. osa	III lisa I osa

▼B5. **Direktiiv 76/371/EMÜ**

Direktiiv 76/371/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 1
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa	I lisa

6. **Direktiiv 76/372/EMÜ**

Direktiiv 76/372/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa	—

7. **Direktiiv 78/633/EMÜ**

Direktiiv 78/633/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa 1. osa	—
Lisa 2. osa	—
Lisa 3. osa	IV lisa C osa

8. **Direktiiv 81/715/EMÜ**

Direktiiv 81/715/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa	—

9. **Direktiiv 84/425/EMÜ**

Direktiiv 84/425/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	—
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa	—

10. **Direktiiv 86/174/EMÜ**

Direktiiv 86/174/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 4
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa	VII lisa

11. **Direktiiv 93/70/EMÜ**

Direktiiv 93/70/EMÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa	IV lisa D osa

▼B**12. Direktiiv 93/117/EÜ**

Direktiiv 93/117/EÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artiklid 3 ja 5
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Lisa 1. osa	IV lisa E osa
Lisa 2. osa	VIII lisa A osa

13. Direktiiv 98/64/EÜ

Direktiiv 98/64/EÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artiklid 3 ja 5
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Lisa A osa	III lisa F osa
Lisa C osa	VIII lisa B osa

14. Direktiiv 1999/27/EÜ

Direktiiv 1999/27/EÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artiklid 3 ja 5
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Artikkel 5	—
Artikkel 6	—
Artikkel 7	—
Lisa A osa	VIII lisa C osa
Lisa B osa	IV lisa F osa
Lisa C osa	VIII lisa D osa

15. Direktiiv 1999/76/EÜ

Direktiiv 1999/76/EÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Lisa	IV lisa G osa

16. Direktiiv 2000/45/EÜ

Direktiiv 2000/45/EÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Lisa A osa	IV lisa A osa
Lisa B osa	IV lisa B osa
Lisa C osa	III lisa G osa

▼B17. **Direktiiv 2002/70/EÜ**

Direktiiv 2002/70/EÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 1
Artikkel 2	Artiklid 2 ja 3
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Artikkel 5	—
I lisa	I lisa ja V lisa B osa (I)
II lisa	II lisa ja V lisa B osa (II)

18. **Direktiiv 2003/126/EÜ**

Direktiiv 2003/126/EÜ	Käesolev määrus
Artikkel 1	Artikkel 3
Artikkel 2	—
Artikkel 3	—
Artikkel 4	—
Artikkel 5	—
Artikkel 6	—
Lisa	VI lisa