

32000L0045

L 174/32

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

13.7.2000

KOMISJONI DIREKTIIV 2000/45/EÜ,

6. juuli 2000,

millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid A-vitamiini, E-vitamiini ja trüptofaani sisalduse määramiseks loomasöödas

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi 70/373/EMÜ sööda ametlikuks kontrolliks vajalike proovivõtu- ja analüüsimeetodite kehtestamise kohta ühenduses, ⁽¹⁾ viimati muudetud Austria, Soome ja Rootsi ühinemisaktiga, ⁽²⁾ eriti selle artiklit 2,

ning arvestades järgmist:

- (1) Direktiiv 70/373/EMÜ sätestab, et ametlikul kontrollimisel söötade nende kvaliteeti ja koostist reguleerivate õigusnormide nõuetele vastavuse suhtes kasutatakse ühenduses kehtestatud proovivõtu- ja analüüsimeetodeid.
- (2) Nõukogu 23. novembri 1970. aasta direktiiv 70/524/EMÜ loomasöödas kasutatavate lisaiinete kohta, ⁽³⁾ viimati muudetud komisjoni 17. novembri 1999. aasta määrusega (EÜ) nr 2439/1999, ⁽⁴⁾ sätestab, et A-vitamiini ja E-vitamiini sisaldus peab olema märgistuses näidatud, kui neid on lisatud eelsegudele ja loomasöötadele.
- (3) Nõukogu 2. aprilli 1979. aasta direktiiv 79/373/EMÜ segasööda turustamise kohta, ⁽⁵⁾ viimati muudetud komisjoni direktiiviga 2000/16/EÜ, ⁽⁶⁾ ja nõukogu 13. septembri 1993. aasta direktiiv 93/74/EMÜ eritoitmiseks mõeldud söötade kohta, ⁽⁷⁾ viimati muudetud direktiiviga 96/25/EÜ, ⁽⁸⁾ sätestavad, et loomasööda märgistuses tuleb näidata ära aminohapped.
- (4) Nende ainete kontrollimiseks tuleb kehtestada ühenduse analüüsimeetodid.
- (5) Käesolevas direktiivis ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid sätestavad, et loomasöötade ja eelsegude A-vitamiini, E-vitamiini ja trüptofaani sisalduse ametlikuks kontrollimiseks tehtavad analüüsid viiakse läbi käesoleva direktiivi lisas ettenähtud meetodeid kasutades.

Artikkel 2

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid hiljemalt 31. augustil 2000. aastal. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Nad kohaldavad neid norme alates 1. septembrist 2000.

Kui liikmesriigid need õigusnormid vastu võtavad, lisavad nad nendesse normidesse või nende normide ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv jõustub 20. päeval pärast avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 6. juuli 2000

Komisjoni nimel
komisjoni liige
David BYRNE

⁽¹⁾ EÜT L 170, 3.8.1970, lk 2.

⁽²⁾ EÜT C 241, 29.8.1994, lk 1.

⁽³⁾ EÜT L 270, 14.12.1970, lk 1.

⁽⁴⁾ EÜT L 297, 18.11.1999, lk 8.

⁽⁵⁾ EÜT L 86, 6.4.1979, lk 30.

⁽⁶⁾ EÜT L 105, 3.5.2000, lk 36.

⁽⁷⁾ EÜT L 237, 22.9.1993, lk 23.

⁽⁸⁾ EÜT L 125, 23.5.1996, lk 35.

LISA

A OSA

A-VITAMIINI MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja kasutusala

Käesolev meetod on A-vitamiini (retinooli) määramiseks loomasöödas 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.

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

2. Põhimõte

Proov hüdrolüüsitakse kaaliumhüdrosiidi etanoolilahusega ja A-vitamiin ekstraheeritakse petrooleetrisse. Lahusti aurustatakse ja jääk lahustatakse metanoolis ja vajadusel lahjendatakse nõutud kontsentratsioonini. A-vitamiini sisaldus määratakse pööratud faasi kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (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. Kaaliumhüdrosiidi lahus, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Naatriumaskorbaadi lahus, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (vt märkus 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 märkus 7.8)
- 3.7. Fenoolftaleiini lilahus, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 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. Lämmastik, hapnikuvaba
- 3.11. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini atsetaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega, näit $2,80 \times 10^6 \text{ RÜ/g}$
- 3.11.1. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini atsetaadi põhilahus: 100milliliitrisesse mõõtkolbi kaalutakse 0,1 mg täpsusega 50 mg A-vitamiini atsetaati (3.11). Lahustatakse 2-propanoolis (3.8) ja täiendatakse sama lahustiga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 1 400 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktile 5.6.3.1.
- 3.12. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega, näit $1,80 \times 10^6 \text{ RÜ/g}$
- 3.12.1. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaadi põhilahus: 100milliliitrisesse mõõtkolbi kaalutakse 0,1 mg täpsusega 80 mg A-vitamiini palmitaati (3.12). Lahustatakse 2-propanoolis (3.8) ja täiendatakse sama lahustiga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 1 400 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktile 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butüül-4-metüülfenool (BHT) (vt märkus 7.5)

4. Seadmed

- 4.1. Vaakumrotaatoraurusti
- 4.2. Pruunist klaasist nõud

- 4.2.1. Lihvavaga lamedapõhjalised või Erlenmeyeri kolvid, 500 ml
- 4.2.2. Lihvkorgiga kitsakaelalised mõõtkolvid 10, 25, 100 and 500 ml
- 4.2.3. Lihvkorgiga koonilised jaotuslehtid, 1 000 ml
- 4.2.4. Lihviga 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 ½)
- 4.5. HPLC-seadmed sissepritsesüsteemiga
- 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 HPLC antud tingimustel)
- 4.5.2. Muudetava lainepikkusega UV- või fluorestsentsdetektor
- 4.6. Spektrofotomeeter 10millimeetriste kvartsküvetidega
- 4.7. Magnetsegajaga vesivann
- 4.8. Ekstraktsiooniseade (vt joonis 1), mis koosneb:
 - 4.8.1. 1-liitrisest lihvava ja lihvkorgiga klaasilindrist,
 - 4.8.2. lihviga klaasotsikust, mis on varustatud kõrvaltoru ja keskelt läbi mineva üles-alla nihutatava toruga. Nihutataval torul peaks olema U-kujuline alumine ots ja teises otsas düüs, nii et silindris oleva vedeliku ülemist kihti oleks võimalik viia üle jaotuslehtrisse.

5. Analüüsi käik

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

5.1. Proovi ettevalmistamine

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

5.2. Seebistamine

500milliliitrisesse lamedapõhjalise või koonilise kolvi (4.2.1) kaalutakse 0,01 g 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 tagasivoolujahutiga (4.3) ja kolb pannakse magnetsegajaga vesivanni (4.7). Kuumutatakse keemiseni ja keedetakse tagasivoolujahuti all 5 minutit. Seejärel lisatakse läbi jahuti (4.3) 25 ml kaaliumhüdroksiidi 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 000milliliitrisesse jaotuslehtrisse (4.2.3) või ekstraktsiooniseadmesse (4.8), loputades kokku 250 ml veega. Seebistamiskolvi loputatakse järjest 25 ml etanooli (3.1) ja 100 ml petrooleetriga (3.2) ning viiakse ka need vedelikukogused üle jaotuslehtrisse või ekstraktsiooniseadmesse. Vee ja etanooli vahekorrd ühendatud lahuses peaks olema umbes 2:1. Raputatakse tugevasti kaks minutit ja lastakse kaks minutit selgineda.

5.3.1. Ekstraheerimine jaotuslehtriega (4.2.3)

Kui kihid on eraldunud (vt märkus 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 kergel pööritamisel (et vältida emulsiooni tekkimist) kaks korda 100milliliitriste veekogustega ja seejärel korduval raputamisel veel 100milliliitriste veekogustega, kuni vesi ei muuda enam värvust fenoolftaleiini lahuse (3.7) lisamisel (tavaliselt piisab neljakordsest pesemisest). Emulgeerunud vee kõrvaldamiseks filtritakse pestud ekstrakt läbi kuiva faasialdusfiltri (4.4) 500milliliitrisesse mõõtkolbi (4.2.2). Jaotuslehtrit ja filtrit loputatakse 50 ml petrooleetriga (3.2), lahust täiendatakse petrooleetriga (3.2) margini ja segatakse hästi.

5.3.2. Ekstraheerimine ekstraktsiooniseadmega (4.8)

Kui kihid on eraldunud (vt märkus 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 eralduspinnal kohal. Tõstes gaasivooliku kaudu kõrvaltorusse juhitava lämmastiku rõhku, viiakse ülemine petrooleetri kiht üle 1 000 milliliitrisse jaotuslehtrisse (4.2.3). Klaasilindrisse lisatakse 100 ml petrooleetrit (3.2), suletakse korgiga ja raputatakse tugevasti segi. Kihitud lastakse eralduda ja ülemine kiht viiakse üle jaotuslehtrisse nagu ennegi. Ekstraheerimist korratakse järgmise 100 ml petrooleetriga (3.2), siis kaks korda 50 milliliitrisse 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 milliliitrisse pirkolbi (4.2.4). Vaakumrotaatoriga (4.1) aurustatakse lahusti vaakumis peaaegu kuivaks vesivanni temperatuuril mitte üle 40 °C. Kolbi lastakse lämmastik (3.10) kuni atmosfäärirõhuni ja kolb eemaldatakse vaakumrotaatorilt. Järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (3.10) voolutades ja jääk lahustatakse kohe kindla koguse (10–100 ml) metanooliga (3.3) (A-vitamiini kontsentratsioon peaks jääma vahemikku 5–30 RÜ/ml).

5.5. Määramine HPLC-ga

A-vitamiin eraldatakse C_{18} pööratud faasi kolonnil (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 kaliibrimislahuste (5.6.2) mitme süsti keskmised piigi kõrgused (pindalad).

HPLC tingimused

Alljärgnevad tingimused on toodud orienteerumiseks; võib kasutada ka teistsuguseid tingimusi, kui need annavad samasuguseid tulemusi.

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

5.6. Kaliibrimine

5.6.1. Standardtöölahuste ettevalmistamine

20 ml A-vitamiini atsetaadi põhilahust (3.11.1) või 20 ml A-vitamiini palmitaadi põhilahust (3.12.1) pipeteeritakse 500-milliliitrisse lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (4.2.1) ja hüdrolüüsitakse vastavalt punktis 5.2 kirjeldatule, kuid ilma BHT lisamata. Seejärel ekstraheeritakse petrooleetriga (3.2) vastavalt punktis 5.3 kirjeldatule ja täiendatakse kuni 500 ml-ni petrooleetriga (3.2). 100 ml seda ekstrakti aurustatakse vaakumrotaatoril (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 ml kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktile 5.6.3.3. Standardtöölahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

2,0 ml seda standardtöölahust pipeteeritakse 20 milliliitrisse mõõtkolbi, täiendatakse metanooliga (3.3) kuni märgini ja segatakse. Selle lahendatud standardtöölahuse nominaalne kontsentratsioon on 56 RÜ A-vitamiini ml kohta.

5.6.2. Kaliibrimislahuste tegemine ja kaliibrimisgraafiku koostamine

1,0, 2,0, 5,0 ja 10,0 ml lahjendatud standardtöölahust viiakse üle 20milliliitrisse mõõtkolbidesse, täiendatakse 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 kaliibrimislahusest süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse keskmised piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kaliibrimisgraafik, kasutades keskmisi piigi kõrgusi (pindalaid) ja arvestades UV-kontrolli (5.6.3.3) tulemusi.

5.6.3. Standardlahuste UV-standardiseerimine

5.6.3.1. A-vitamiini atsetaadi põhilahus

2,0 ml A-vitamiini atsetaadi põhilahust (3.11.1) pipeteeritakse 50milliliitrisse mõõtkolbi (4.2.2) ja täiendatakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 56 RÜ A-vitamiini ml kohta. 3,0 ml selle lahjendatud A-vitamiini atsetaadi lahust pipeteeritakse 25milliliitrisse mõõtkolbi ja täiendatakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini ml 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:

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

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

5.6.3.2. A-vitamiini palmitaadi põhilahus

2,0 ml A-vitamiini palmitaadi põhilahust (3.12.1) pipeteeritakse 50milliliitrisse mõõtkolbi (4.2.2) ja täiendatakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 56 RÜ A-vitamiini ml kohta. 3,0 ml selle lahjendatud A-vitamiini palmitaadi lahust pipeteeritakse 25milliliitrisse mõõtkolbi ja täiendatakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini ml 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:

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

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

5.6.3.3. A-vitamiini standardtöölahus

3,0 ml A-vitamiini lahjendamata standardtöölahust, mis on valmistatud vastavalt punktile 5.6.1, pipeteeritakse 50milliliitrisse mõõtkolbi (4.2.2) ja täiendatakse 2-propanooliga (3.8) märgini. 5,0 ml seda lahust pipeteeritakse 25milliliitrisse mõõtkolbi ja täiendatakse 2-propanooliga (3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini ml 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:

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

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

6. Tulemuste arvutamine

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

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

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1\,000}{V_1 \cdot m} \text{ (IU/kg)}$$

kus:

β = A-vitamiini kontsentratsioon proovilahuses (5.4) RÜ-des milliliitri kohta

V_1 = proovilahuse (5.4) kogus milliliitrites

V_2 = vastavalt punktile 5.4 võetud alikvoodi kogus milliliitrites

m = proovi mass grammides

7. Märkused

- 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 tohiks 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 tuleks seebistamise aega pikendada 45–60 minutini.
- 7.5. BHT asemel võib kasutada hüdrokiinooni.
- 7.6. Normaalfaasikolonne kasutamisel on võimalik retinooli isomeeride eraldumine.
- 7.7. Naatriumaskorbaadi lahuse asemel võib kasutada umbes 150 mg askorbiinhapet.
- 7.8. Naatriumsulfiidi lahuse asemel võib kasutada umbes 50 mg etüleendiamiintetraatsetaati.

8. Korratavus

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

9. Paralleelmääramise tulemused ⁽¹⁾

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

L: laborite arv

n: üksikväärtuste arv

s_r : korratavuse standardhälve

s_R : reprodutseeritavuse standardhälve

r: korratavus

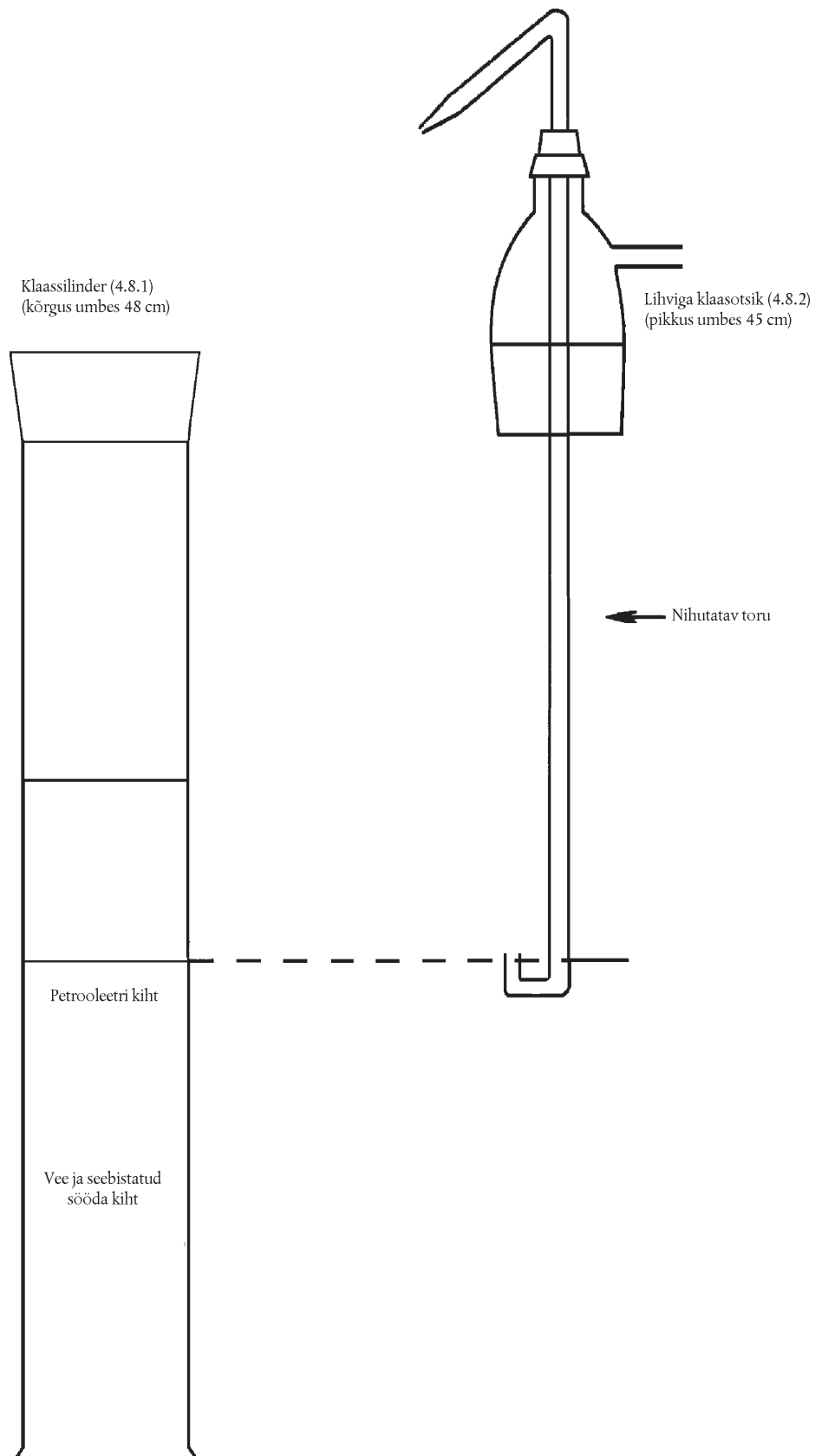
R: reprodutseeritavus

CV_r : korratavuse variatsioonikordaja

CV_R : reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

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

Joonis 1: Ekstraktsiooniseade (4.8)



B OSA**E-VITAMIINI MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja kasutusala**

Käesolev meetod on E-vitamiini määramiseks loomasöödas 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).

Määramise piir on 2 mg E-vitamiini kilogrammi kohta.

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 pööratud faasi 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, $\beta = 50$ g/100 ml
- 3.5. Naatriumaskorbaadi lahus, $\beta = 10$ g/100 ml (vt märkus 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, $c = 0,5$ mol/l glütseroolis, $\beta = 120$ g/l (kui $x = 9$) (vt märkus 7.8)
- 3.7. Fenoolftaleiini lahus, $\beta = 2$ g/100 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. Lämmastik, hapnikuvaba
- 3.10. DL- α -tokoferoolatsetaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega
- 3.10.1. DL- α -tokoferoolatsetaadi põhilahus: 100milliliitrisesse mõõtkolbi kaalutakse 0,1 mg täpsusega 100 mg DL- α -tokoferoolatsetaati (3.10). Lahustatakse etanoolis (3.1) ja täiendatakse sama lahustiga märgini. 1 ml seda lahust sisaldab 1 mg DL- α -tokoferoolatsetaati. (UV-ga kontrollimise kohta vt punkt 5.6.1.3; stabiliseerimise kohta vt märkus 7.4).
- 3.11. DL- α -tokoferool, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega
- 3.11.1. 100milliliitrisesse mõõtkolbi kaalutakse 0,1 mg täpsusega 100 mg DL- α -tokoferooli (3.10). Lahustatakse etanoolis (3.1) ja täiendatakse sama lahustiga märgini. 1 ml seda lahust sisaldab 1 mg DL- α -tokoferooli (UV-ga kontrollimise kohta vt punkt 5.6.2.3; stabiliseerimise kohta vt märkus 7.4).
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butüül-4- metüülfenool (BHT) (vt märkus 7.5).

4. Seadmed

- 4.1. Vaakumrotaatoraurusti
- 4.2. Pruunist 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 jaotuslehid, 1 000 ml
- 4.2.4. Lihviga pirkolvid, 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 ½)
- 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 10millimeetriste kvartsküvetidega
- 4.7. Magnetsegajaga vesivann
- 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 kõrvaltoriga ja keskelt läbi mineva üles-alla nihutatava toruga. Nihutataval torul peaks olema U-kujuline alumine ots ja teises otsas düüs, nii et silindris oleva vedeliku ülemist kihti oleks võimalik viia üle jaotuslehtrisse.

5. Analüüsi käik

Märkus: E-vitamiin on tundlik (UV-) valguse ja oksüdeerumise suhtes. Kõik toimingud tuleks teostada valguse ja hapniku juurdepääsuta (kasutades pruunist 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 1millimeetriste avadega sõela. Jahvatamine peab toimuma vahetult enne kaalumist ja seebistamist, vastasel juhul võib esineda E-vitamiini kadusid.

5.2. Seebistamine

500milliliitrisesse 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 tagasivoolujahuti (4.3) ja kolb pannakse magnetsegajaga vesivanni (4.7). Kuumatatakse 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 000milliliitrisesse 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 peaks 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 märkus 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 jaotuslehtis kergel pööritamisel (et vältida emulsiooni tekkimist) kaks korda 100milliliitriste veekogustega ja seejärel korduval raputamisel veel 100milliliitriste veekogustega, kuni vesi ei muuda enam värvust fenoolftaleiini lahuse (3.7) lisamisel (tavaliselt piisab neljakordsest pesemisest). Emulgeerunud vee kõrvaldamiseks filtritakse pestud ekstrakt läbi kuiva faasialdusfiltri (4.4) 500milliliitrisesse mõõtkolbi (4.2.2). Jaotuslehtit ja filtrit loputatakse 50 ml petrooleetriga (3.2), täiendatakse petrooleetriga (3.2) märgini ja segatakse hästi.

5.3.2. Ekstraheerimine ekstraktsiooniseadmega (4.8)

Kui kihid on eraldunud (vt märkus 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 000milliliitrisse jaotuslehtisse (4.2.3). Klaasilindrisse lisatakse 100 ml petrooleetrit (3.2), suletakse korgiga ja raputatakse tugevasti segi. Kihtidel lastakse eralduda ja ülemine kiht viiakse üle jaotuslehtisse nagu ennegi. Ekstraheerimist korratakse järgmise 100 ml petrooleetriga (3.2), siis kaks korda 50milliliitriste petrooleetri (3.2) kogustega ja viiakse petrooleetri kihid üle jaotuslehtisse.

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 250milliliitrisse pirkolbi (4.2.4). Lahusti aurustatakse vaakumrotaatoril (4.1) vaakumis peaaegu kuivaks vesivanni temperatuuril mitte üle 40 °C. Kolbi lastakse lämmastik (3.9) kuni atmosfäärirõhuni ja kolb eemaldatakse vaakumrotaatorilt. Järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (3.9) voolutades ja jääk lahustatakse kohe kindla koguse (10–100 ml) metanooliga (3.3) (DL- α -tokoferooli kontsentratsioon peaks jääma vahemikku 5–30 $\mu\text{g/ml}$).

5.5. Määramine HPLC-ga

E-vitamiin eraldatakse C18 pööratud faasi kolonnil (4.5.1) ja mõõdetakse selle kontsentratsioon fluorestsentsdetektori (ergastamine: 295 nm, emissioon: 330 nm) või UV-detektori (292 nm) (4.5.2) abil.

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 kaliibrimislahuste (5.6.2) mitme süsti keskmised piigi kõrgused (pindalad).

HPLC-tingimused

Alljärgnevad tingimused on toodud orienteerumiseks; võib kasutada ka teistsuguseid tingimusi, kui need annavad samasuguseid tulemusi.

Vedelikkromatograafia kolonn (4.5.1):	250 mm \times 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)
Voolutamiskiirus:	1–2 ml/min
Detektor (4.5.2):	Fluorestsentsdetektor (ergastamine: 295 nm/emissioon: 330 nm) või UV-detektor (292 nm)

5.6. Kaliibrimine (DL- α -tokoferoolsetaati või DL- α -tokoferool)

5.6.1. DL- α -tokoferoolsetaadi standard

5.6.1.1. Standardtöölahuse ettevalmistamine

25 ml DL- α -tokoferoolsetaadi põhilahust (3.10.1) viiakse pipetiga 500milliliitrisse 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 täiendatakse petrooleetriga 500 milliliitriini. 25 ml seda ekstrakti aurustatakse vaakumrotaatoril (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 -tokoferoolsetaadiga ml kohta. Standardtöölahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

5.6.1.2. Kaliibrimislahuste tegemine ja kaliibrimisgraafiku koostamine

1,0, 2,0, 4,0 ja 10,0 ml standardtöolahust viiakse üle 20milliliitristesse mõõtkolbidesse, täiendatakse metanooliga (3.3) määrgini ja segatakse. Nende lahuste nominaalsed kontsentratsioonid on 2,5, 5,0, 10,0 ja 25,0 µg DL-α-tokoferoolatsetaati/ml, s.o 2,28, 4,55, 9,10 ja 22,8 µg DL-α-tokoferooli/ml.

Igast kaliibrimislahusest süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse keskmised piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kaliibrimisgraafik, kasutades keskmisi piikide kõrgusi (pindalaid).

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

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

Neeldumismaksimum peaks olema 284 nm:

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

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

5.6.2. DL-α-tokoferooli standard

5.6.2.1. Standardtöolahuse valmistamine

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

5.6.2.2. Kaliibrimislahuste tegemine ja kaliibrimisgraafiku koostamine

1,0, 2,0, 4,0 ja 10,0 ml standardtöolahust viiakse üle 20milliliitristesse mõõtkolbidesse, täiendatakse metanooliga (3.3) määrgini ja segatakse. Nende lahuste nominaalsed kontsentratsioonid on 2,0, 4,0, 8,0 ja 20,0 µg DL-α-tokoferooli/ml, s.o 2,20, 4,40, 8,79 ja 22,0 µg DL-α-tokoferoolatsetaati/ml.

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

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

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

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

Sellisel lahjendusel peaks ekstinktsiooni väärtus olema 0,6.

6. Tulemuste arvutamine

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

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

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

kus:

β = E-vitamiini kontsentratsioon mikrogrammides milliliitri kohta proovilahuses (5.4)

V_1 = proovilahuse (5.4) kogus milliliitrites

V_2 = vastavalt punktidele 5.4 võetud alikvoodi kogus milliliitrites

m = proovi mass grammides

7. Märkused

- 7.1. Madala E-vitamiini kontsentratsiooniga proovides võib olla kasulik ühendada kahe seebistumiseks võetud koguse (kaalutud kogus: 25 g) petrooleetri ekstraktid üheks proovilahuseks, mida määratakse HPLC-ga.
- 7.2. Analüüsiks võetud proov ei tohiks sisaldada üle 2 g rasva.
- 7.3. Faaside halva eraldumise puhul lisatakse emulsiooni lõhkumiseks umbes 10 ml etanooli (3.1).
- 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 (3.12) ja hoitakse lahust külmkapis (kõlblikkusaeg maksimaalselt neli nädalat).
- 7.5. BHT asemel võib kasutada hüdrokiinooni.
- 7.6. Normaalfaasikoloni 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.

8. Korratavus

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

9. Paralleelmääramise tulemused ⁽¹⁾

	Eelsegu	Eelsegu	Mineraali-kontsentraat	Valgu-kontsentraat	Pörsaste söödasegu
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: laborite arv

n: üksikväärtuste arv

s_r : korratavuse standardhälve

s_R : reprodutseeritavuse standardhälve

r : korratavus

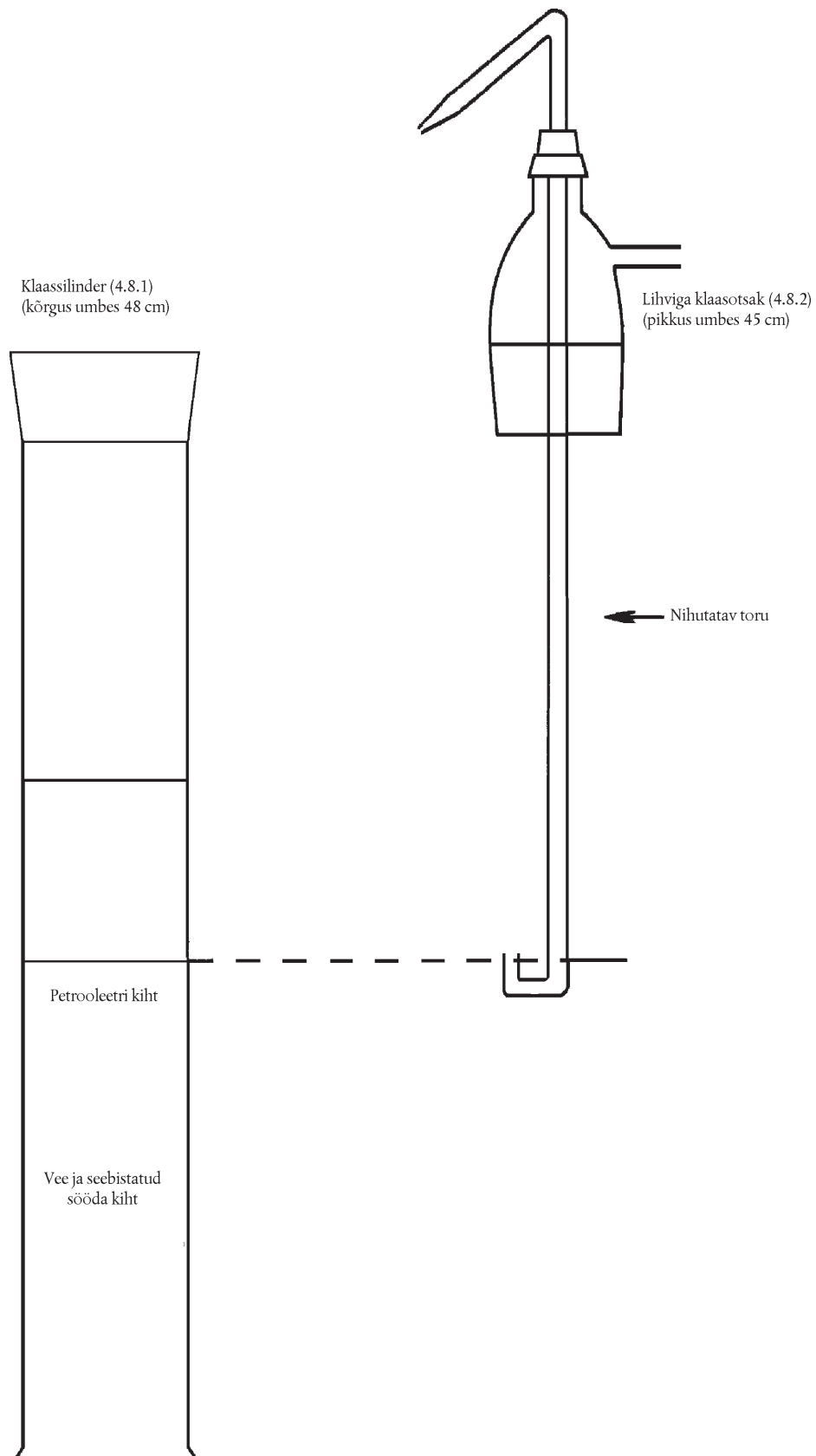
R : reprodutseeritavus

CV_r : korratavuse variatsioonikordaja

CV_R : reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

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

Joonis 1: Ekstraktsiooniseade (4.8)



C OSA

TRÜPTOFAANI MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja kasutusala

Käesolev meetod on trüptofaani üldsisalduse ja vaba trüptofaani sisalduse määramiseks loomasöödas. Meetod ei erista D- ja L-vormi.

2. Põhimõte

Trüptofaani üldsisalduse määramiseks hüdrolüüsitakse proovi leeliselises keskkonnas küllastunud baariumhüdrosiidi lahusega ja kuumutatakse 110 °C juures 20 tundi. Pärast hüdrolüüsimist 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 difosforpentoksiidi kohal.
- 3.3. Sisestandardaine: α-metüültrüptofaan (puhtus/sisaldus 99 %), mis on kuivatatud vaakumis difosforpentoksiidi peal.
- 3.4. Baariumhüdrosiidi oktahüdraat (vältida Ba(OH)₂ · 8H₂O ülemäärast kontakti õhuga, kuna see võib viia BaCO₃ moodustumiseni, mis võib määramist segada) (vt märkus 9.3)
- 3.5. Naatriumhüdrosiid
- 3.6. Ortofosforhape, w = 85 %
- 3.7. Soolhape, ρ₂₀ = 1,19 g/ml
- 3.8. Metanool, HPLC jaoks
- 3.9. Petrooleeter, keemivahemik 40–60 °C
- 3.10. Naatriumhüdrosiidi lahus, c = 1 mol/l:
40,0 g NaOH (3.5) lahustatakse vees ja täiendatakse veega (3.1) 1 liitri.
- 3.11. Soolhape, c = 6 mol/l:
Võetakse 492 ml HCl (3.7) ja täiendatakse veega 1 liitri.
- 3.12. Soolhape, c = 1 mol/l:
Võetakse 82 ml HCl (3.7) ja täiendatakse veega 1 liitri.
- 3.13. Soolhape, c = 0,1 mol/l:
Võetakse 8,2 ml HCl (3.7) ja täiendatakse veega 1 liitri.
- 3.14. Ortofosforhape, c = 0,5 mol/l:
Võetakse 34 ml ortofosforhapet (3.6) ja täiendatakse veega (3.1) 1 liitri.

3.15. Trüptofaani (3.2) kontsenteeritud lahus, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:

500milliliitrisel mõõtkolvis lahustatakse 0,2553 g trüptofaani (3.2) soolhappes (3.13) ja täiendatakse soolhappes (3.13) määrgini. Lahust võib hoida temperatuuril $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ kuni neli nädalat.

3.16. Sisestandardi kontsenteeritud lahus, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:

500milliliitrisel mõõtkolvis lahustatakse 0,2728 g α -metüültrüptofaani (3.3) soolhappes (3.13) ja täiendatakse soolhappes (3.13) määrgini. Lahust võib hoida temperatuuril $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ kuni neli nädalat.

3.17. Trüptofaani ja sisestandardi kaliibrimisstandardlahus:

Võetakse 2,00 ml trüptofaani kontsenteeritud lahust (3.15) ja 2,00 ml sisestandardi (α -metüültrüptofaani) kontsenteeritud 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 > 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) metanoolis (3.8) (1 g/100 ml). pH tuleb reguleerida etanoolamiiniga (3.20) 5,00 peale. Täiendatakse 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

4.5. Membraanfilter, 0,45 μm

4.6. Autoklaav, 110 (\pm 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 (\pm 0,1) bar

4.7. Mehaaniline loksuti või magnetsegaja

4.8. Pöörisegaja

5. Analüüsi käik

5.1. Proovide ettevalmistamine

Proov jahvatatakse nii peeneks, et see läheks läbi 0,5millimeetriste avadega sõela. Kõrge niiskusesisaldusega proovid tuleks enne jahvatamist kas kuivatada õhu käes temperatuuril mitte üle 50 $^\circ\text{C}$ või lüofiliseerida. Kõrge rasvasisaldusega proove tuleks 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, $c = 0,1 \text{ mol/l}$, (3.13) ja 5,00 ml kontsenteeritud sisestandardlahust (3.16). Raputatakse või segatakse 60 min, kasutades mehaanilist loksutit või magnetsegajat (4.7). Settel lastakse settida ja 10,0 ml supernatanti viiakse pipetiga üle keeduklaasi. Lisatakse 5 ml ortofosforhapet, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). pH viiakse naatriumhüdrosiidiga, $c = 1,0 \text{ mol/l}$, 3,0 peale (3.10). Lisatakse piisavalt metanooli (3.8), et viia metanooli kontsentratsioon lõpplahuses 10–30 protsendini. Lahus viiakse üle sobiva suurusega mõõtkolbi ja lahjendatakse veega kuni kromatograafiaks sobiva koguseni (umbes sama kogus kui kaliibrimisstandardlahusel (3.17)).

Enne HPLC-koloni süstimist filtritakse paar milliliitrit lahust läbi 0,45 µm membraanfiltrit (4.5). Jätkatakse kromatograafiaga vastavalt lõigule 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).

0,2 mg täpsusega kaalutakse 0,1–1 g ettevalmistatud proovi (5.1) polüpropüleenkolbi (4.4). Kaalutud proovi kogus peaks sisaldama umbes 10 mg lämmastikku. Lisatakse 8,4 g baariumhüdrosiidi oktahüdraati (3.4) ja 10 ml vett. Segatakse pöörisevajaga (4.8) või magnetsegajaga (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 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 · 8H₂O kristalliseerumise vältimiseks lisatakse soojale segule 30 ml toatemperatuuril olevat vett. Raputatakse või segatakse kergelt. Lisatakse 2,00 ml sisestandardi (α-metüültrüptofaani) kontsenteeritud lahust (3.16). Nõusid jahutatakse vee-/jäävannis 15 minutit.

Seejärel lisatakse 5 ml ortofosforhapet, c = 0,5 mol/l (3.14). Nõu hoitakse jahutusvannis ja neutraliseeritakse segamisel HCl-iga, c = 6 mol/l (3.11); pH näit viiakse HCl-ga (3.12), c = 1 mol/l, 3,0 peale. Lisatakse piisavalt metanooli, et viia metanooli kontsentratsioon lõpplahuses 10–30 protsendini. Viiakse üle sobiva suurusega mõõtkolbi ja lahjendatakse veega kindla, kromatograafiaks sobiva ruumalani (näiteks 100 ml). Metanooli lisamine ei tohi tekitada sadenemist.

Enne HPLC-koloni süstimist filtritakse paar milliliitrit lahust läbi 0,45 µm membraanfiltrit (4.5). Jätkatakse kromatograafiaga vastavalt lõigule 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. Määramine HPLC-ga

Soovitatakse juhendada järgmistest isokraatilise elueerimise tingimustest; võib kasutada muid tingimusi, kui need annavad samaväärsed tulemused (vt ka märkused 9.1 ja 9.2):

Vedelikromatograafia kolonn (4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 3 µm või samaväärne
Koloni temperatuur:	toatemperatuur
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 (3.21) metanoolis (3.8) (1 g/100 ml). pH seatakse etanoolamiiniga (3.20) 5,00 peale. Täiendatakse veega (3.1) 1 000 milliliitri.
Voolutamiskiirus:	1 ml/min
Summaarne voolutamisaeg:	umbes 34 min
Detekteerimise lainepikkus:	ergastamine: 280 nm, emissioon: 356 nm
Süstimisruumala:	20 µl

6. Tulemuste arvutamine

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{g trüptofaani 100 g proovi kohta}$$

- A = sisestandardi piigi pindala, kaliibrimisstandardlahus (3.17)
- B = trüptofaani piigi pindala, ekstrakt (5.2) või hüdrolüsaat (5.3)
- C = kaliibrimislahusele (3.17) lisatud kontsentreeritud trüptofaani lahuse (3.15) kogus milliliitrites (2 ml)
- D = kaliibrimislahusele (3.17) lisatud kontsentreeritud trüptofaani lahuse (3.15) kontsentratsioon, $\mu\text{mol/ml}$ (= 2,50)
- E = kontsentreeritud sisestandardlahuse (3.16) kogus milliliitrites, mis lisati ekstraheerimisel (5.2) (= 5,00 ml) või hüdrolüsaadile (5.3) (= 2,00 ml)
- F = sisestandardi piigi pindala, ekstrakt (5.2) või hüdrolüsaat (5.3)
- G = trüptofaani piigi pindala, kaliibrimisstandardlahus (3.17)
- H = kaliibrimisstandardlahusele (3.17) lisatud kontsentreeritud sisestandardlahuse (3.16) kogus milliliitrites (= 2,00 ml)
- W = proovi mass grammides (parandusega esialgsele massile, kui proovi kuivatati ja/või rasvatustati)
- MW = trüptofaani molekulmass (= 204,23)

7. Korratavus

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

8. Paralleelmääramise tulemused

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

	Proov 1 Seasööt	Proov 2 L-trüptofaaniga rikas- tatud seasööt	Proov 3 Sigade söödakontsent- 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 väljaviskamist (Cochrani-Dixoni võõrväärtuste testi alusel)

s_r : korratavuse standardhälve

s_R : reprodutseeritavuse standardhälve

r: korratavus

R: reprodutseeritavus

CV_r : korratavuse variatsioonikordaja, %

CV_R : reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

Teise ühendusesisese paralleelse määramise (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 oli lisatud trüptofaani (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
keskmine [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 väljaviskamist (Cochrani-Dixoni võõrväärtuste testi alusel)

s_r : korratavuse standardhälve

s_R : reprodutseeritavuse standardhälve

r: korratavus

R: reprodutseeritavus

CV_r : korratavuse variatsioonikordaja, %

CV_R : reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

Veel ühe ühendusesisese paralleelse määramise käigus analüüsisid kuni seitse laborit trüptofaani hüdroliüüsi sertifitseerimise eesmärgiga nelja proovi. Tulemused on esitatud allpool. Kõigile proovidele tehti viis kordusanalüüsi.

	Proov 1 Sigade söödasegu (CRM 117)	Proov 2 Madala rasvasisaldusega kalajahu (CRM 118)	Proov 3 Sojajahu (CRM 119)	Proov 4 Lössipulber (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
keskmine [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 väljaviskamist (Cochrani-Dixoni võõrväärtuste testi alusel)

s_r : korratavuse standardhälve

s_R : reprodutseeritavuse standardhälve

r: korratavus

R: reprodutseeritavus

CV_r : korratavuse variatsioonikordaja, %

CV_R : reprodutseeritavuse variatsioonikordaja, %

9. Märkused

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

Isokraatiline elueerimine, millele järgneb kolonni puhastamine gradiendiga:

Vedelikkromatograafia kolonn:	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 5 µm või sama-väärne		
Kolonni temperatuur:	32 °C		
Liikuv faas:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /metanool, 95 + 5 (v + v). B: metanool		
Gradiendiprogramm:	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
Voolutamiskiirus:	1,2 ml/min		
Summaarne voolutamisaeg:	umbes 33 min		

- 9.2. Kromatograafilise määramise läbiviimine oleneb HPLC-tüübist ja kasutatavast kolonnitäidisest. Valitud süsteem peab tagama trüptofaani ja sisestandardi piikide täieliku eraldumise (kuni alusjooneni). Lisaks sellele on oluline, et lagunemisproduktid eralduksid hästi trüptofaanist ja sisestandardist. Kolonni tuleks süstida ilma sisestandardita hüdrolüsaate 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 peaksid 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-/fluoretsentssüsteemi lineaarses alas. Kui trüptofaani või sisestandardi piigid on liiga väikesed või liiga kõrged, siis tuleks analüüsi korrata teistsuguse proovi suurusega ja/või teistsuguse lõppruumalaga.

9.3. Baariumhüdrokksiid

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