

I

(EÜ asutamislepingu / Euratomi asutamislepingu kohaselt vastu võetud aktid, mille avaldamine on kohustuslik)

MÄÄRUSED

KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 152/2009,

27. jaanuar 2009,

milles sätestatakse proovivõtu- ja analüüsimeetodid sööda ametlikuks kontrolliks

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 29. aprilli 2004. aasta määrust (EÜ) nr 882/2004 ametlike kontrollide kohta, mida tehakse sööda- ja toidualaste õigusnormide ning loomateravishoidu ja loomade heaolu käsitlevate eeskirjade täitmise kontrollimise tagamiseks, ⁽¹⁾ eriti selle artikli 11 lõike 4 punkte a, b ja c,

ning arvestades järgmist:

(1) Direktiivi 70/373/EMÜ rakendamiseks on võetud vastu järgmised õigusaktid, mis jäävad jõusse kooskõlas määruse (EÜ) nr 882/2004 artikli 61 lõikega 2:

- komisjoni 15. juuni 1971. aasta esimene direktiiv 71/250/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽²⁾;
- komisjoni 18. novembri 1971. aasta teine direktiiv 71/393/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽³⁾;
- komisjoni 27. aprilli 1972. aasta kolmas direktiiv 72/199/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽⁴⁾;

— komisjoni 5. detsembri 1972. aasta neljas direktiiv 73/46/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽⁵⁾;

— komisjoni 1. märtsi 1976. aasta esimene direktiiv 76/371/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse proovivõtumeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽⁶⁾;

— komisjoni 1. märtsi 1976. aasta seitsmes direktiiv 76/372/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽⁷⁾;

— komisjoni 15. juuni 1978. aasta kaheksas direktiiv 78/633/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽⁸⁾;

— komisjoni 31. juuli 1981. aasta üheksas direktiiv 81/715/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽⁹⁾;

— komisjoni 25. juuli 1984. aasta kümnes direktiiv 84/425/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽¹⁰⁾;

— komisjoni 9. aprilli 1986. aasta direktiiv 86/174/EMÜ, millega määratakse kindlaks kodulindude segasööda energiasalduse arvutamise meetod ⁽¹¹⁾;

⁽¹⁾ ELT L 165, 30.4.2004, lk 1. Parandatud väljaandes ELT L 191, 28.5.2004, lk 1.

⁽²⁾ EÜT L 155, 12.7.1971, lk 13.

⁽³⁾ EÜT L 279, 20.12.1971, lk 7.

⁽⁴⁾ EÜT L 123, 29.5.1972, lk 6.

⁽⁵⁾ EÜT L 83, 30.3.1973, lk 21.

⁽⁶⁾ EÜT L 102, 15.4.1976, lk 1.

⁽⁷⁾ EÜT L 102, 15.4.1976, lk 8.

⁽⁸⁾ EÜT L 206, 29.7.1978, lk 43.

⁽⁹⁾ EÜT L 257, 10.9.1981, lk 38.

⁽¹⁰⁾ EÜT L 238, 6.9.1984, lk 34.

⁽¹¹⁾ EÜT L 130, 16.5.1986, lk 53.

- komisjoni 28. juuli 1993. aasta üheteistkümnese direktiiv 93/70/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽¹⁾;
- komisjoni 17. detsembri 1993. aasta kaheistkümnese direktiiv 93/117/EÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks ⁽²⁾;
- komisjoni 3. septembri 1998. aasta direktiiv 98/64/EÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid aminohapete, toorõli ja -rasva ja olakvindoksi määramiseks söödas ning muudetakse direktiivi 71/393/EMÜ ⁽³⁾;
- komisjoni 20. aprilli 1999. aasta direktiiv 1999/27/EÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid amprooliumi, diklasuriili ja karbadoksi määramiseks söötades ning muudetakse direktiive 71/250/EMÜ ja 73/46/EMÜ ja tunnistatakse kehtetuks direktiiv 74/203/EMÜ ⁽⁴⁾;
- komisjoni 23. juuli 1999. aasta direktiiv 1999/76/EÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid naatriumlasalotsiidi määramiseks söötades ⁽⁵⁾;
- komisjoni 6. juuli 2000. aasta direktiiv 2000/45/EÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid A-vitamiini, E-vitamiini ja trüptofaani sisalduse määramiseks loomasöödas ⁽⁶⁾;
- komisjoni 26. juuli 2002. aasta direktiiv 2002/70/EÜ, millega kehtestatakse nõuded dioksiinide ja dioksiini-taoliste PCBde taseme määramiseks söödas ⁽⁷⁾;
- komisjoni 23. detsembri 2003. aasta direktiiv 2003/126/EÜ loomse päritoluga osiste määramise analüüsimeetodi kohta söötade ametlikul kontrollimisel ⁽⁸⁾.
- (2) Et direktiiv 70/373/EMÜ asendati määrusega (EÜ) nr 882/2004, on asjakohane asendada kõnealuse direktiivi rakendusaktid ühe määrusega. Samas tuleks ka kohendada meetodeid, võttes arvesse arenguid teadus- ja tehnikaalaste teadmiste vallas. Kavandatud eesmärkide saavutamiseks enam mitte sobivad meetodid tuleks välja jätta. Proovivõtu sätteid kavatakse õigeaegselt ajakohastada, et võtta arvesse viimaseid arenguid sööda tootmise, ladustamise, transportimise ja turustamise vallas, kuid siiski on asjakohane jätta seniks jõusse kehtivad proovivõtu sätted.
- (3) 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 tuleks seetõttu kehtetuks tunnistada.
- (4) Käesoleva määrusega ette nähtud meetmed on kooskõlas toiduahela ja loomatervishoiu alalise komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Sööda ametlikul kontrollimisel võetakse proovid sööda komponentide ja lisandite ning soovimatute ainete, välja arvatud pestitsiidijääkide ja mikroorganismide määramiseks kooskõlas I lisas sätestatud meetoditega.

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 eba-seadusliku sisalduse kontrollimiseks, mida ei ole enam lubatud söödas kasutada, kasutatakse kinnituse saamiseks.

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.

⁽¹⁾ EÜT L 234, 17.9.1993, lk 17.

⁽²⁾ EÜT L 329, 30.12.1993, lk 54.

⁽³⁾ EÜT L 257, 19.9.1998, lk 14.

⁽⁴⁾ EÜT L 118, 6.5.1999, lk 36.

⁽⁵⁾ EÜT L 207, 6.8.1999, lk 13.

⁽⁶⁾ EÜT L 174, 13.7.2000, lk 32.

⁽⁷⁾ EÜT L 209, 6.8.2002, lk 15.

⁽⁸⁾ ELT L 339, 24.12.2003, lk 78.

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.

Brüssel, 27. jaanuar 2009

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Androulla VASSILIOU

I LISA

PROOVIVÕTUMEETODID

1. EESMÄRK JA RAKENDUSALA

Sööda ametlikuks kontrolliks ettenähtud proovid võetakse allpool kirjeldatud meetodite kohaselt. Selliselt saadud proovi käsitatakse representatiivsena proovipartii suhtes.

2. PROOVIVÕTU PERSONAL

Proove võtavad liikmesriikide poolt selleks volitatud isikud.

3. MÕISTED

Proovipartii: toote kogus, mida käsitatakse tervikuna ning mille omadusi võib pidada ühtseteks.

Osaproov: partii ühest punktist võetud kogus.

Koondproov: samast proovipartiist võetud osaproovide kogum.

Vähendatud proovid: koondproovi representatiivne osa, mis on saadud vähendamise teel.

Lõpp-proov: vähendatud proovi või homogeenitud koondproovi osa.

4. SEADMED

- 4.1. Proovivõtuseadmed peavad olema materjalist, mis ei saasta tooteid, millest proove võetakse. Liikmesriigid võivad proovivõtuseadmed ametlikult heaks kiita.

4.2. Soovitavad seadmed proovide võtmiseks tahkest söödast

4.2.1. Käsitsi proovivõtmine

- 4.2.1.1. Lamedapõhjaline vertikaalsete äärtega kühvel.

- 4.2.1.2. Proovivõtupuur pika lõhe või lahtritega. Proovivõtupuuri mõõtmed peavad vastama proovipartii omadustele (mahuti sügavus, koti mõõtmed jms) ja söödajahu osakeste suurusele.

4.2.2. Mehaaniline proovivõtmine

Ümberlaaditavast söödast proovide võtmiseks võib kasutada heakskiidetud mehaanilisi proovivõtuseadmeid.

4.2.3. Jagaja

Osaproovide võtmisel ning vähendatud proovide ja lõpp-proovide ettevalmistamisel võib kasutada seadet, mis on mõeldud proovi jagamiseks ligikaudu võrdseteks osadeks.

5. KVANTITATIIVSED NÕUDED

5.A.	Söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimisel
5.A.1.	Proovipartii Proovipartii suurus peab olema selline, et proove oleks võimalik võtta kõikidest proovipartii osadest.

5.A.2.	Osaproovid	
5.A.2.1.	Lahtine sööt:	Minimaalne osaproovide arv:
5.A.2.1.1.	proovipartiid massiga kuni 2,5 tonni	seitse
5.A.2.1.2.	proovipartiid massiga üle 2,5 tonni	√ 20 korda proovipartii moodustavate tonnide arv (*), maksimaalselt 40 osaproovi
5.A.2.2.	Pakendatud sööt:	Minimaalne pakendite arv proovivõtuks (**):
5.A.2.2.1.	Pakendid massiga üle ühe kilo:	
5.A.2.2.1.1.	ühest kuni neljast pakendist koosnevad proovipartiid	kõik pakendid
5.A.2.2.1.2.	viiest kuni kuueteistkümnest pakendist koosnevad proovipartiid	neli
5.A.2.2.1.3.	rohkem kui kuueteistkümnest pakendist koosnevad proovipartiid	√ proovipartii moodustavate pakendite arv (*), maksimaalselt 20 pakendit
5.A.2.2.2.	pakendid massiga kuni 1 kg	neli
5.A.2.3.	Vedel või poolvedel sööt:	Minimaalne pakendite arv proovivõtuks (**):
5.A.2.3.1.	mahutid mahuga üle ühe liitri:	
5.A.2.3.1.1.	ühest kuni neljast mahutist koosnevad proovipartiid	kõik mahutid
5.A.2.3.1.2.	viiest kuni kuueteistkümnest mahutist koosnevad proovipartiid	neli
5.A.2.3.1.3.	rohkem kui kuueteistkümnest mahutist koosnevad proovipartiid	√ proovipartii moodustavate mahutite arv (*), maksimaalselt 20 mahutit
5.A.2.3.2.	Kuni üheliitrised mahutid	neli
5.A.2.4.	Söödabriketid ja lakukivid	Minimaalne brikettide või kivide arv proovivõtuks (**): üks brikett või kivi 25 ühikust koosneva proovipartii kohta, maksimaalselt neli briketti või kivi
5.A.3.	Koondproov Nõutav on üks koondproov proovipartii kohta. Koondproovi moodustavate osaproovide üldkogus ei tohi olla väiksem järgmistest kogustest:	
5.A.3.1.	Lahtine sööt	4 kg
5.A.3.2.	Pakendatud sööt:	
5.A.3.2.1.	pakendid massiga üle 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	pakendid massiga kuni 1 kg	nelja originaalpakendi sisu kaal
5.A.3.3.	Vedel või poolvedel sööt:	
5.A.3.3.1.	mahutid mahuga üle ühe liitri:	neli liitrit
5.A.3.3.2.	kuni üheliitrised mahutid	nelja originaalmahuti sisu maht
5.A.3.4.	Söödabriketid või lakukivid:	
5.A.3.4.1.	igäüks kaaluga üle 1 kg	4 kg
5.A.3.4.2.	igäüks kaaluga kuni 1 kg	nelja originaalbriketi või -kivi kaal

5.A.4.	Lõpp-proovid Lõpp-proovid saadakse vajaduse korral koondproovi vähendamise teel. Nõutav on vähemalt ühe lõpp-proovi analüüs. Analüüsitava lõpp-proovis sisalduv kogus ei tohi olla väiksem järgmistest näitajatest:	
	tahke sööt	500 g
	Vedel või poolvedel sööt:	500 ml
5.B.	söödas tõenäoliselt ebaühtlaselt jaotunud soovimatute ainete või toodete, näiteks aflatoksiinide, hariliku tungaltera, riitsinuse ja krotalaaria kontrollimisel söödatooraines (***)	
5.B.1.	Proovipartii: vt 5.A.1.	
5.B.2.	Osaproovid	
5.B.2.1.	Lahtine sööt: vt 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Pakendatud sööt:	Minimaalne pakendite arv proovivõtuks:
5.B.2.2.1.	ühest kuni neljast pakendist koosnevad proovipartiid	kõik pakendid
5.B.2.2.2.	viiest kuni kuueteistkümnest pakendist koosnevad proovipartiid	neli
5.B.2.2.3.	rohkem kui kuueteistkümnest pakendist koosnevad proovipartiid	√ proovipartii moodustavate pakendite arv (*), maksimaalselt 40 pakendit
5.B.3.	Koondproovid Koondproovide arv varieerub vastavalt proovipartii suurusele. Koondproovide minimaalne arv proovipartii kohta on esitatud allpool. Koondproovi moodustavate osaproovide kogukaal ei tohi olla alla 4 kg.	
5.B.3.1.	Lahtine sööt	
	Proovipartii kaal tonnides:	Koondproovide minimaalne arv proovipartii kohta:
	kuni 1	1
	rohkem kui 1 ja kuni 10	2
	rohkem kui 10 ja kuni 40	3
	rohkem kui 40	4
5.B.3.2.	Pakendatud sööt	
	Proovipartii suurus pakendite arvuna:	Koondproovide minimaalne arv proovipartii kohta:
	1 kuni 16	1
	17 kuni 200	2
	201 kuni 800	3
	rohkem kui 800	4
5.B.4.	Lõpp-proovid Lõpp-proovid saadakse koondproovi vähendamise teel. Nõutav on vähemalt ühe lõpp-proovi analüüs koondproovi kohta. Analüüsitava lõpp-proovi kaal ei tohi olla alla 500 g.	

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

(**) Pakendite või konteinerite puhul, mille sisu ei ületa 1 kilo või 1 liitrit, ja brikettide või kivide puhul, mis kaaluvad kuni 1 kilo tükk, loetakse osapartiiks ühe originaalpakendi või -konteineri sisu, üks brikett või üks kivi.

(***) Punktis 5.A ette nähtud meetodeid kasutatakse aflatoksiinide, hariliku tungaltera, riitsinuse ja krotalaaria kontrollimisel täis- ja täiendsöödas.

6. PROOVIDE VÕTMISE, ETTEVALMISTAMISE JA PAKENDAMISE JUHISED

6.1. Üldsätted

Proovid tuleb võtta ja ette valmistada võimalikult kiiresti, võttes vajalikud ettevaatusabinõud toote muutumise ja saastumise vältimiseks. Töövahendid ja tööpinnad ning proovide hoidmiseks ettenähtud anumad peavad olema puhtad ja kuivad.

6.2. Osaproovid

6.2.A. Söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimisel

Osaproovid võetakse juhuvaliku abil kogu proovipartii ulatuses ja need peavad olema ligikaudu võrdse suurusega.

6.2.A.1. Lahtine sööt

Proovipartii jagatakse mõtteliselt teatavaks arvuks ligikaudu võrdseteks osadeks. Osade arv, mis vastab punkti 5.A.2 kohaselt nõutud osapartiide arvule, valitakse juhuslikult ning igast asjaomasest osast võetakse vähemalt üks proov.

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

6.2.A.2. Pakendatud sööt

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on punkti 5.A.2 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. Kõik klombid purustatakse (vajaduse korral võetakse need proovist välja ja pannakse pärast purustamist tagasi) igas koondproovis eraldi.

6.2.A.3. Homogeenne või homogeenitav vedel või poolvedel sööt

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on punkti 5.A.2 kohaselt vajalik arv mahuteid välja valitud, homogeenitakse vajaduse korral nende sisu ja võetakse osa igast mahutist.

Osaproove võib võtta mahutite tühjendamise ajal.

6.2.A.4. Mittehomogeenitav vedel või poolvedel sööt

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on punkti 5.A.2 kohaselt vajalik arv mahuteid välja valitud, võetakse proovid eri tasanditelt.

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

Mõlemal juhul peab võetav kogus olema vähemalt 10 liitrit.

6.2.A.5. Söödabriketid ja lakukivid

Pärast seda, kui proovivõtmiseks on punkti 5.A.2 kohaselt vajalik arv brikette või kive välja valitud, võetakse osa igast briketist või kivist.

6.2.B. Söödas tõenäoliselt ebahühtlaselt jaotunud soovimatute ainete või toodete, näiteks aflatoksiinide, hariliku tungaltera, riitsinuse ja krotalaaria kontrollimisel söödatooraines

Partii jagatakse mõtteliselt ligikaudu võrdseteks osadeks vastavalt punktis 5.B.3 ette nähtud koondpartiide arvule. Kui see arv on suurem kui üks, jaotatakse punktis 5.B.2 ette nähtud osapartiide koguarv ligikaudu võrdselt erinevate osade vahel. Seejärel võetakse ligikaudu võrdse suurusega proovid, ⁽¹⁾ nii et igast osast võetud proovide koguhulk ei oleks väiksem kui iga koondproovi jaoks nõutud 4 kg. Eri osadest võetud osapartiisid ei koondata ühte koondproovi.

⁽¹⁾ Pakendatud sööda puhul võetakse osa proovivõtmiseks mõeldud pakendite sisust puuri või kühvliga pärast seda, kui pakendid on vajaduse korral ükshaaval tühjendatud.

6.3. Koondproovide ettevalmistamine**6.3.A. Söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimisel**

Ühtne koondproov saadakse osaproovide kokkusegamise abil.

6.3.B. Söödas tõenäoliselt ebahühtlaselt jaotunud soovimatute ainete või toodete, näiteks aflatoksiinide, hariliku tungaltera, riitsinuse ja krotalaaria kontrollimisel söödatooraines

Partii igast osast võetud osaproovid segatakse ja valmistatakse punktis 5.B.3 osutatud arv koondproove, märkides hoolikalt üles iga koondproovi päritolu.

6.4. Lõpp-proovide ettevalmistamine

Iga koondproovi materjal segatakse hoolikalt, et moodustuks homogeenne proov⁽¹⁾. Vajaduse korral vähendatakse koondproov esmalt vähemalt 2 kg või 2 liitrini (vähendatud proov), kasutades mehaanilist või automaatset jagajat või kvarteerimismeetodit.

Valmistatakse ette vähemalt kolm ligikaudu ühesuurust lõpp-proovi, mis vastavad punktis 5.A.4 või 5.B.4 esitatud kvantitatiivsetele nõuetele. Iga proov pannakse sobivasse mahutisse. Vältimaks muutusi proovi koostises, saastumist või võltsimist, mis võivad tekkida veo või ladustamise ajal, võetakse kõik vajalikud ettevaatusabinõud.

6.5. Lõpp-proovide pakendamine

Mahutid või pakendid pitseeritakse ja märgistatakse (kogu etikett peab olema pitseri sees) selliselt, et neid ei oleks võimalik avada pitserit rikkumata.

7. PROOVIVÕTUPROTOKOLL

Iga proovivõtmise kohta tuleb täita protokoll, mis võimaldab iga proovipartiid üheselt identifitseerida.

8. PROOVIDE SIHTKOHT

Iga koondproovi kohta saadetakse vähemalt üks lõpp-proov ning analüüsiks vajalik teave võimalikult kiiresti volitatud analüüsilaborisse.

⁽¹⁾ Kõik klombid purustatakse (vajaduse korral võetakse need proovist välja ja pannakse pärast purustamist tagasi) igas koondproovis eraldi.

II LISA

SÖÖDA ANALÜÜSIMETODITE ÜLDSÄTTED

A. PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE ANALÜÜSIKS

1. Eesmärk

Allpool kirjeldatud protseduurid käsitlevad kontroll-laboratooriumidesse saadetud lõpp-proovide ettevalmistamist analüüsiks pärast proovi võtmist vastavalt I lisa sätetele.

Kõnealused proovid tuleb ette valmistada nii, et analüüsimeetodites sätestatud viisil kaalutud kogused oleksid ühtlased ja vastaksid lõpp-proovidele.

2. Ettevaatusabinõud

Rakendatav proovi ettevalmistamise protseduur sõltub kasutatavast analüüsimeetodist. Seepärast on väga oluline tagada, et rakendatav proovi ettevalmistamise protseduur sobiks kasutatava analüüsimeetodiga.

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

Jahvatamine, segamine ja sõelumine tuleb teostada nii kiiresti kui võimalik, et proovi kokkupuude õhu ja valgusega oleks minimaalne. Kasutada ei tohi veskeid ja jahvatajaid, mis proovi märgatavalt kuumendavad.

Kuumuse suhtes eriti tundliku sööda puhul soovitatakse kasutada käsitsijahvatamist. Samuti tuleb tagada, et aparaat ise ei oleks mikroelementide saastumise allikas.

Kui ettevalmistamine ilma oluliste muutusteta proovi niiskusesisalduses ei ole võimalik, määratakse niiskusesisaldus enne ja pärast ettevalmistamist vastavalt III lisa A osas sätestatud meetodile.

3. Töö käik

Proov jaotatakse analüüsiks ja standardprooviks sobivateks alamproovideks, kasutades sobivaid jaotustehnikaid, näiteks vahelduv kühveldamine, statsionaarne või pöördrihveldamine. Koonilist valamist ja neljaks jaotamist ei soovitata, sest sellega võib kaasnedä suur veaosakaal alamproovide jaotuses. Standardproovi hoitakse sobivas puhtas ja kuivas õhukindlalt suletavas mahutis ja analüüsitavad alamproovid, vähemalt 100 g, valmistatakse ette järgmiselt.

3.1. Sööt, mida saab kohe jahvatada

Kui analüüsimeetodites ei ole teisiti kindlaks määratud, sõelutakse kogu proov pärast jahvatamist vajaduse korral läbi 1 mm kandiliste avadega sõela (vastavalt soovitusel ISO R565). Vältida liigset jahvatamist.

Sõelutud proov segatakse ja kogutakse sobivasse puhtasse ja kuiva õhukindlalt suletavasse nõusse. Vahetult enne analüüsiks vajaliku koguse kaalumist segatakse proovi uuesti.

3.2. Sööt, mida saab jahvatada pärast kuivatamist

Kui analüüsimeetodites ei ole teisiti kindlaks määratud, kuivatatakse proovi vastavalt III lisa A osas nimetatud niiskuse määramise meetodi punktis 4.3 kirjeldatud esialgsele kuivatamisviisile niiskusesisalduseni 8–12 %. Jätkatakse punktis 3.1 osutatud viisil.

3.3. Vedel või poolvedel sööt

Proov kogutakse sobivasse puhtasse ja kuiva õhukindlalt suletavasse nõusse. Vahetult enne analüüsiks vajaliku koguse kaalumist segatakse proovi hoolikalt.

3.4. Muu sööt

Selliseid proove, mida ei saa ette valmistada mõnel eespool nimetatud viisil, tuleb töödelda mis tahes muul viisil, mis tagab analüüsiks kaalutud koguste homogeensuse ja vastavuse lõpp-proovidele.

4. Proovide hoidmine

Proove tuleb hoida temperatuuril, mis ei muuda nende koostist. Vitamiinide või eriti valgustundlike ainete analüüsiks ettenähtud proove tuleb hoida tumedast klaasist nõudes.

B. SÄTTED ANALÜÜSIMEETODITES KASUTATAVATE REAKTIIVIDE JA SEADMETE KOHTA

1. Kui analüüsimeetodites ei ole teisiti kindlaks määratud, peavad kõik analüütilised reaktiivid olema analüütiliselt puhtad. Mikroelementide määramisel tuleb reaktiivide puhtust kontrollida pimekatsega. Sõltuvalt saadud tulemustest võib olla vaja reaktiive täiendavalt puhastada.
2. Iga lahuste valmistamist, lahjendamist, loputamist või pesemist hõlmav toiming, mida on analüüsimeetodites nimetatud ilma kasutatud lahusti või lahjendi laadile viitamata, eeldab vee kasutamist. Üldjuhul peab vesi olema demineraliseeritud või destilleeritud. Teatavatel juhtudel, millele analüüsimeetodites viidatakse, tuleb veega läbi viia erilised puhastusprotseduurid.
3. Kontroll-laboratooriumides tavaliselt leiduvaid seadmeid silmas pidades viidatakse analüüsimeetodites ainult nendele instrumentidele ja vahenditele, mis on erilised või nõuavad konkreetset kasutamiskiisi. Need seadmed peavad olema puhtad, eriti väga väikeste ainekoguste määramisel.

C. ANALÜÜSIMEETODITE RAKENDAMINE JA TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

1. Ekstraktsioonimenetlus

Mitmete meetodite puhul on määratud konkreetne ekstraktsioonimenetlus. Üldjuhul võib peale meetodis viidatud menetluse teisi ekstraktsioonimenetlusi rakendada juhul, kui on tõestatud, et kasutatav ekstraktsioonimenetlus on põhiline analüüsiks sama tõhus kui meetodis mainitud menetlus.

2. Puhastusmenetlus

Mitmete meetodite puhul on määratud konkreetne puhastusmenetlus. Üldjuhul võib peale meetodis viidatud menetluse teisi puhastusmenetlusi rakendada juhul, kui on tõestatud, et kasutataval puhastusmenetlusel on põhiline analüüsiks meetodis mainitud menetlusega samaväärsed analüütilised tulemused.

3. Kasutatavast analüüsimeetodist teavitamine

Tavaliselt kehtestatakse iga söödas esineva aine määramiseks üks analüüsimeetod. Kui esitatud on mitu meetodit, tuleb analüüsiaruandes märkida kontroll-laboratooriumi kasutatud meetod.

4. Määramiste arv

Analüüsiaruandes esitatud tulemus on keskmine väärtus, mis on saadud vähemalt kahe proovi erinevate osade ja rahuldava korratavusega läbiviidud määramisega.

Kui soovimatute ainete analüüsil on esimese määramise tulemus oluliselt ($> 50\%$) väiksem kui kontrollitav spetsifikatsioon, ei ole siiski vaja teha enam täiendavaid määramisi, juhul kui rakendatakse sobivat kvaliteedimenetlust.

Kui aine või koostisosa deklareeritud sisalduse kontrollimisel kinnitab esimese määramise tulemus deklareeritud sisaldust, s.t analüütiline tulemus jääb deklareeritud sisalduse lubatud hälbe piiresse, ei ole vaja teha enam täiendavaid määramisi, juhul kui rakendatakse sobivat kvaliteedimenetlust.

Mõnel juhul on lubatud hälve sätestatud õigusaktides, näiteks nõukogu direktiivis 79/373/EMÜ⁽¹⁾.

5. Aruandlus analüüsitulemuste kohta

Analüüsitulemus väljendatakse analüüsimeetodis kehtestatud viisil sobiva arvu tüvenumbritega ja vajaduse korral korrigeeritakse seda vastavalt lõpp-proovi niiskusesisaldusele enne ettevalmistamist.

⁽¹⁾ EÜT L 86, 6.4.1979, lk 30.

6. Mõõtemääramatus ja saagise määr soovimatute ainete analüüsil

Soovimatute ainete puhul Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivi 2002/32/EÜ tähenduses, kaasa arvatud dioksiinide ja dioksiinitaoliste PCBde puhul, ei vasta loomatoiduks ettenähtud tooted kehtestatud piirnormile, kui analüüsitulemust loetakse piirnormi ületavaks, võttes arvesse laiendatud mõõtemääramatust ja saagise korrektsiooni. Vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsitud kontsentratsiooni, mida on korrigeeritud saagise suhtes ja millest on maha arvatud laiendatud mõõtemääramatus. Seda menetlust võib kohaldada vaid juhtudel, kus analüüsimeetod võimaldab hinnata mõõtemääramatust ja saagise parandust (nt pole võimalik mikroskoopilise analüüsi puhul).

Analüüsitulemus esitatakse järgmiselt (niivõrd kui kasutatud analüüsimeetod võimaldab hinnata mõõtemääramatust ja saagise määra):

- a) saagise korrektsiooniga, saagise määr peab olema märgitud. Saagise korrektsioon ei ole vajalik juhul, kui saagise määr jääb vahemikku 90–110 %.
- b) kujul „x +/- U”, kus x on analüüsitulemus ja U on laiendatud mõõtemääramatus, kusjuures kasutatakse kattuvuskoeffitsienti 2, mis annab usaldusvärsuse taseme ligikaudu 95 %.

Kui analüüsi tulemus on oluliselt (> 50 %) väiksem kui kontrollitav spetsifikatsioon ja kui rakendatakse sobivat kvaliteedimenetlust ning analüüsi eesmärk on vaid kontrollida vastavust õigusnormidele, ei ole analüüsitulemuses siiski vaja esitada saagise korrektsiooni ning saagise määra ja mõõtemääramatuse võib nendel juhtudel ära jätta.

III LISA

SÖÖDATOORAINE JA SEGAJÕUSÖÖDA KOOSTISE KONTROLLIMISE ANALÜÜSIMEETODID

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 analüüsivat proovi laotada tihedusega 0,3 g/cm³.

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.

4.1. 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 %.

⁽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 %.

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

Kaane 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

Kaane 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, linnasesemned, kuivatatud peediliistakud, kalast ja suhkrust valmistatud lahustuvsööt; segajõusööt, mis sisaldab rohkem kui 25 % mineraalsooli, sh kristallisatsioonivesi.

Kaane 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, ühendatakse vaakumpump pärast ettenähtud rõhu saavutamist lahti. Kuivamisega arvestatakse alates hetkest, mil kuivatuskapi temperatuur on jälle 80–85 °C. Ettevaatlikult taastatakse kuivatuskapis atmosfäärirõhk. 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 sööt, mille purustamist suur niiskusesisaldus raskendab, tuleb järgmisel viisil eelnevalt kuivatada:

50 g *purustamata* proovi (pressitud või aglomeeritud sööda võib vajaduse korral tükideks 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.

5.3. 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 ülaosas 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:

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

kus:

m = analüüsitava proovi mass grammides;

m₁ = anuma ja selle sisu mass grammides enne kuumutamist;

m₂ = 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 lämmastiksisalduse 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Granuleeritud tsink.
- 3.4. Väävelhape, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Väävelhape, standardne tiitrimislahus, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Väävelhape, standardne tiitrimislahus, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Väävelhape, standardne tiitrimislahus, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Metüülpunane indikaator: 300 mg metüülpunast lahustatakse 100 ml etanoolis, $\sigma = 95\text{--}96 \text{ \% (v/v)}$.
- 3.9. Naatriumhüdrosiidi lahus (võib kasutada tehnilise puhtusega reaktiivi) $\beta = 40 \text{ g / 100 ml (m/v: 40 \%)}$.
- 3.10. Naatriumhüdrosiid, standardne tiitrimislahus, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Naatriumhüdrosiid, standardne tiitrimislahus, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Soolhappes pestud ja läbikuumutatud pimsskivigraanulid.
- 3.13. Atseetaniliid (sulamistemperatuur = 114°C ; $N = 10,36 \text{ \%}$).
- 3.14. Sahharoos (lämmastikuvaba).
- 3.15. Boorhape (H_3BO_3).
- 3.16. Metüülpunase indikaatorlahus: 100 mg metüülpunast lahustatakse 100 ml etanoolis või metanoolis.
- 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 lahus (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. Soolhape, 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 keev hape 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 lämmastiksisaldusest. Lisatakse mõni tilk metüülpunast indikaatorit (3.8).

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 destilleerimiseseade on täisautomaatne ning hõlmab ka destillaadi ammoniaagisisalduse tiitrimist, siis järgitakse tootja koostatud destilleerimiseseadme kasutusjuhendit.

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

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

5.3. Tiitrimine

Toimida vastavalt punktidele 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 valgusmõõduri 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).

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

Sel juhul kasutatakse pH mõõtmise 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 punktile 6.1 või 6.2.

6.1. Tiitrimise arvutamine vastavalt punktile 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 punktile 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:

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

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 toorvalguisaldus on väiksem kui 20 %;
- 1,0 % suuremast väärtusest, kui toorvalguisaldus on 20–40 %;
- absoluutväärtusena väljendatult 0,4 %, kui toorvalguisaldus on suurem kui 40 %.

7.2. Täpsus

Analüüs (lagundamine, destilleerimine ja tiitrimine) viiakse läbi 1,5–2,0 g atseetaniliidiga (3.13) 1 g sahharoosi (3.14) manulusel; 1 g atseetaniliidi 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 destillatsiooniparaadi kolb ei ole varustatud tilklehtriga, lisatakse naatriumhüdrokksiid 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 lämmastikisisaldusega toodete puhul võib kogumiskolbi viidava väävelhappe (3.7) mahtu vajadusel vähendada 10–15 ml-ni ja täiendada veega 25 ml-ni.
- 8.4. Tavapäraste analüüside 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.

2. Põhimõte

Proov suspendeeritakse vees selitava ainega. Suspensioon filtreeritakse. Filtraadi karbamiidisaldus 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 ($p_{20} = 1,19$ 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 milliliitrit.
- 3.3. Carrezi lahus II: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumferrotsüaniidi $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Täidetakse veega 100 milliliitrit.
- 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 aktiivsöega (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. Viieteistkümne minuti 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 % karbamiidisalduse puhul vähendatakse proovi 1 grammini või lahjendatakse esialgset lahust, nii et 500 ml-s ei oleks karbamiidi üle 50 mg.

7.2. Väikese karbamiidisalduse 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: üheliitrises 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 naatriumhüdroksiidi 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 kurdfiltr.

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 horisontaaltasandis 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.

6. Tulemuste arvutamine

1 ml H₂SO₄ 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:

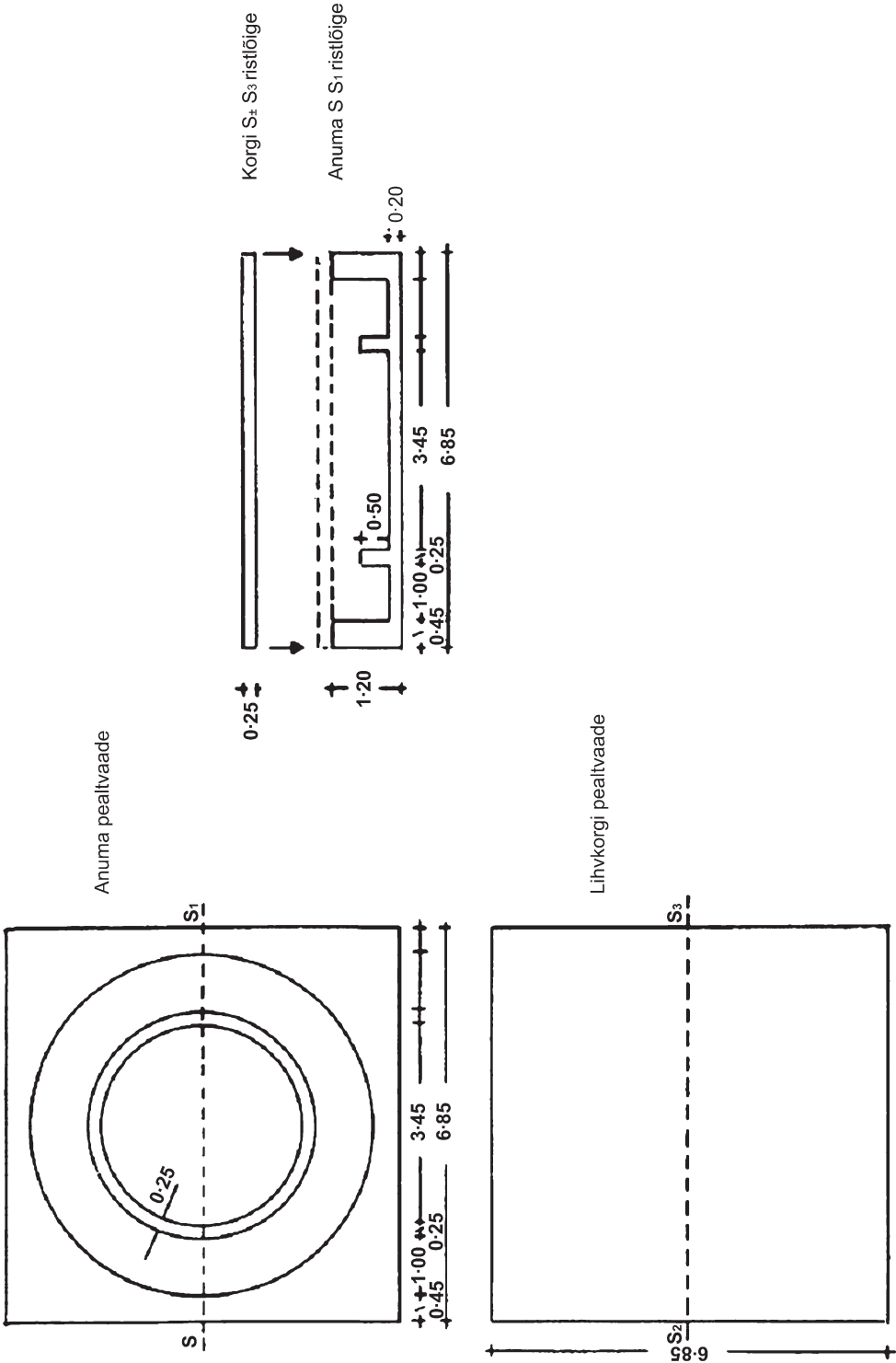
- suhtelise väärtusena väljendatult 10 % ammoniaagisisalduse puhul, mis on väiksem kui 1,0 %;
- absoluutväärtusena väljendatult 0,1 % ammoniaagisisalduse puhul, mis on vähemalt 1,0 %.

7. Tähelepanek

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

CONWAY CELL

Scale 1/1



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 kurdifiltri.

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 (peptiidsidemetega ja vabu). Meetodit saab kasutada järgmiste aminohapete

puhul: 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 eraldatakse ioonvahetuskromatograafia teel ning määratakse fotomeetrilise määramise teel reaktsioonis ninhüdriiniga lainepikkusel 570 nm.

2.2. Üldaminohapped

Valitav protseduur sõltub uuritavatest aminohapetest. Tsüst(e)iin ja metioniin tuleb enne hüdrolüüsi oksüdeerida vastavalt tsüsteinhappeks ja metioniinsulfooniks. Türosiin tuleb määrata oksüdeerimata proovide hüdrolüsaatides. 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 hüdrolüüsitakse soolhappega (3.20) 23 tundi. Hüdrolüsaadi pH korrigeeritakse 2,20-le. Aminohapped eraldatakse ioonvahetuskromatograafia teel ning määratakse fotomeetriliselt reaktsioonis ninhüdriiniga lainepikkusel 570 nm (proliini puhul 440 nm).

3. Reaktiivid

Tuleb kasutada bidestilleeritud või samaväärsel 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. Trinaatriumtsitraadi dihüdraat
- 3.9. 2,2'-tiodietanool (tiodiglükool)
- 3.10. Naatriumkloriid
- 3.11. Ninhüdriin
- 3.12. Petrooleeter, keemisivahemik 40–60 °C
- 3.13. Norleutsiin või muu sisestandardina kasutamiseks sobiv ühend
- 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 P_2O_5 või H_2SO_4 kohal ühe nädala jooksul enne kasutamist.
- 3.16.2. Tsüsteiinhape
- 3.16.3. Metioniinsulfoon
- 3.17. Naatriumhüdrosiidi lahus, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
- 300 g NaOH (3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.18. Naatriumhüdrosiidi lahus, $c = 1 \text{ mol/l}$:
- 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, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, 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. Ekstraheerimisegu, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, mis sisaldab 2 % tioglükooli. Võetakse 8,2 ml HCl (3.7), lahjendatakse umbes 900 ml veega, lisatakse 20 ml tioglükooli (3.9) ja täidetakse veega 1 liitrini (3.7 ja 3.9 mitte segada otse omavahel).
- 3.22. 5-sulfosalitsüülhape, $\beta = 6 \%$:
- 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) väikeses 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, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
- 19,61 g naatriumtsitraati (3.8), 5 ml tioglükooli (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. Ninhüdrini reaktiiv, mis on valmistatud vastavalt kasutatud analüsaatori tingimustele (4.9).
- 3.27. Aminohapete standardlahused. Neid lahuseid tuleks hoida temperatuuril alla 5 °C.
- 3.27.1. Aminohapete põhistandardlahus (3.16.1).
- $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ iga lahuse kohta soolhappes.
- On võimalik osta.
- 3.27.2. Tsüsteiinhape ja metioniinsulfooni põhistandardlahus, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
- 0,2115 g tsüsteiinhapet (3.16.2) ja 0,2265 g metioniinsulfooni (3.16.3) lahustatakse tsitraatpuhvrts (3.24) üheliitrises mõõtekolbis ning täidetakse kolb tsitraatpuhvriga margini. Säilitatakse temperatuuril alla 5 °C mitte üle 12 kuu. Seda lahust ei kasutata, kui põhistandardlahus (3.27.1) sisaldab tsüsteiinhapet 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 hüdroolüsaatidega, tsüsteinhappe 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 tsüsteinhappe ja metioniinsulfooni põhistandardlahust (3.27.2) ja 0,50 ml sisestandardi põhistandardlahust (3.27.3), kui seda kasutatakse. Naatriumhüdrosiidi (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 hüdroolüsaatidega 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 ($0,22 \mu\text{m}$)
- 4.6. Tsentrifuug
- 4.7. Vaakumpöördaurusti
- 4.8. Mehaaniline loksuti või magnetsegur
- 4.9. Aminohappe analüsaator või HPLC-seade ioonvahetuskolonni, ninhütriini kolonnijärgse derivatiseerimise seadme ja valgusmõõturiga.

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

Mõnede aminohapete analüsaatoritega võib kasutada hüdroolüüsimenetlusi, mille puhul on hüdroolüsaadi naatriumikontsentratsioon $c = 0,8 \text{ mol/l}$ ja mis sisaldab oksüdatsioonietapi kõiki sipelghappe jääke. Teised analüsaatorid ei võimalda teatavaid aminohappeid rahuldaval määral eraldada, kui hüdroolüsaat sisaldab liigselt sipelghapet ja/või kui naatriumioonide kontsentratsioon on kõrge. Sellisel juhul vähendatakse pärast hüdroolüüsi ja enne pH korrigeerimist happe mahtu aurustamisega kuni umbes 5 milliliitriini. Aurustamine peab toimuma vaakumitingimustes 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 külmkuivatada. 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 punktile 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 ümarapõhjalise kolbi (4.1) lahtise hüdrolüüsi (5.3.2.3) puhul või
- 250 ml ümarapõhjalise 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 lämmastiksisaldus 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 proovijägid.

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 ümarapõhjalise 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 lämmastiksisaldus 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.

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-oktanolit (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 praakida 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 tehakse ioonvahetuskromatograafia, 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 vahekorrd standard- ja proovilahustes oleks võimalikult sarnane.

Üldiselt sõltub kalibreerimiskatsete sagedus ninhüdroiini 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 ninhüdroiini positiivsetest 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 vahetõrge 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 µmol/ml

m = proovi mass grammides (korrigeeritud 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 tsüsteiinhappena oksüdeeritud proovide hüdrolüsaatides, kuid arvutatakse tsüstiiniks ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, 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.

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.

Keskvärtused 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 laborisese standardhālbenä ja esitatud järgmistes tabelites.

Laborisisesed standardhālbed (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

Laborisese standardhālbe (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

Etalonaine	Aminohape			
	Treoniin	Tsüst(e)iin	Metioniin	Lüsiin
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

8. Etalonainete kasutamine

Meetodi õige rakendamise kontrollimiseks tehakse korduvaid mõõtmisi sertifitseeritud etalonainetega, kui need ained on kättesaadavad. Soovitav 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 % (kontsentraadid, 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 hüdrolyüsitakse proovi leeliselises keskkonnas küllastunud baariumhüdroksiidi lahusega ja kuumutatakse 110 °C juures 20 tundi. Pärast hüdrolyüsimist 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 ülemäära 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, keemisivahemik 40–60 °C
- 3.10. Naatriumhüdroksiidi lahus, c = 1 mol/l:
- 40,0 g NaOH (3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega (3.1) 1 liitrini.
- 3.11. Soolhape, c = 6 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 soolhappega (3.13) märgini. Säilitatakse temperatuuril -18°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 soolhappega (3.13) märgini. Säilitatakse temperatuuril -18°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 hüdrolüsaadil.

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. Vedelikukromatograafia 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 (± 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) 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 külmkuivatada. 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), $c = 0,1 \text{ mol/l}$, ja 5,00 ml kontsenteeritud 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 süstist 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 lämmastiksisaldus peab olema umbes 10 mg. Lisatakse 8,4 g baariumhüdrosiidi oktahüdraati (3.4) ja 10 ml vett. Segatakse pöörisevaga (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 auras 30–60 minutit. Autoklaav suletakse ja kuumutatakse 20 tundi 110 (±2) °C juures.

Enne autoklaavi avamist langetatakse temperatuur natuke alla 100 °C kraadi. $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ 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 (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.

Enne HPLC-koloni süstist filtreeritakse mõned milliliitrid lahust läbi 0,45 µm membraanfiltrit (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):

Vedelikkromatograafia 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 hüdroolüsaat (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 hüdroolüsaadile (5.3) (= 2,00 ml)

C = sisestandardi piigipindala, ekstrakt (5.2) või hüdroolüsaat (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 (korrigeeritud 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.

8. **Ühisuuringu tulemused**

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

	Proov 1 Seasööt	Proov 2 L-trüptofaaniga rikastatud seasööt	Proov 3 Seasöödakontsentratsioon
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 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, %

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
Keskväärtaus 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 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, %

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

	Proov 1 Sigade söödasegu (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
Keskväärtaus 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, C ₁₈ , täidise terasuurus 5 µm või samaväärne		
Kolonni temperatuur:	32 °C		
Liikuv faas:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /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 oluline, et lagunemisproduktid eralduksid hästi trüptofaanist ja sisestandardist. Kolonni tuleb süstida hüdrofüsaate 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. Baariumhüdrokksiid

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

H. TOORÖLI 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 hüdrofüüsita 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.

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, $c = 3 \text{ mol/l}$

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 $75 \pm 3 \text{ °C}$, või õhkuivatuskapp, mis on seatud temperatuurile $100 \pm 3 \text{ °C}$.

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.

Jahutatakse 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.

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

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

Kahekordne filterpaber koos kuivjäägiga 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 ekstraheerimisjäägist 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 (aliquootne 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 lemmikloomatoote 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.
- 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 uuritavas proovis sisalduvale kogukiule.

3. Reaktiivid

3.1. Väävelhape, $c = 0,13 \text{ mol/l}$

3.2. Vahutamisvastane aine (nt n-oktanol)

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 filtri tiigliga (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 filtri tiigel, 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 filtri tiigliga (4.2) tugiplaadist ja väljalasketorust, millel on klapp vaakumi ja vedeliku väljavoolu peatamiseks.

4.7. Ühendusrõngad kuumutusseadme (4.1), tiigliga (4.2) ja silindri (4.3) ühendamiseks ning külmeekstraheerimisseadme (4.6) ja tiigliga 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 filterainet (3.3).

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

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

Väljalasketoru (4.1) klapp avatakse, väävelhappe filtreeritakse vaakumitingimustel läbi filtertiigli 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.

Tiigel kuivatakse püsikaaluni kuivatuskapis temperatuuril 130 °C. Pärast iga kuivatamist jahutatakse tiiglit eksikaatoris ja kaalutakse kiiresti. Tiigel 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. Filtertiigel (4.2) ja selle sisu ühendatakse külmekstraheerimiseseadmega (4.6) ja pestakse jääki vaakumitingimustel kolm korda järjest 30 ml petrooleetriga, tagades, et jääk oleks kuiv. Tiigel ja selle sisu ühendatakse kuumutuseseadmega (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 külmekstraheerimiseseadmega (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 kaaliumhüdroksiidiga.

- 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 klaasfiltritiiglite eluaega. Tuleb jälgida, et kuumutus- ja jahutussüklite 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 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ja 3 g jää-äädikat. Täidetakse veega 100 milliliitrit.
- 3.3. 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 milliliitrit.
- 3.4. Metüüloranž, 0,1 % lahus (w/v)
- 3.5. Soolhape, 4 mol/l
- 3.6. Soolhape, 0,1 mol/l.
- 3.7. Naatriumhüdroksiidi 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 ja täidetakse veega 1 liitrit. Lastakse öö läbi settida ja filtreeritakse.

Sellisel saadud reaktiivi kontsentratsiooni (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 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 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) lahustatakse 100 ml vees.

- 3.8.2. Sidrunhappe lahus: 50 g sidrunhapat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) lahustatakse 50 ml vees.
- 3.8.3. Naatriumkarbonaadi lahus: 143,8 g veevaba naatriumkarbonaati lahustatakse umbes 300 ml sooja 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 hoolikalt ja samal ajal pidevalt segades soolhapat (3.5), kuni vedelik värvub selgelt punaseks. Lisatakse 15 ml soolhapat (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 glükoosisisalduse 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 üheliitrisesse 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).

Homogeenitakse 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, homogeenitakse ja filtreeritakse. Üldsuhkru hulga määramiseks jätkatakse vastavalt punktile 5.3.

8. Tähelepanekud

- 8.1. Vahutamise vältimiseks on soovitatav lisada (proovi kogusest sõltumatult) umbes 1 ml 3-metiülbutaan-1-ooli (3.14) enne keetmist Luff-Schoorli reaktiiviga.
- 8.2. Sahharoosisisalduse protsendimäär on glükoosina väljendatud inversioonijärgse 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 invert- suhkrud 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
	mg	vahe	mg	vahe	mg	vahe	
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

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 pärmil suspendeeritakse 100 ml vees. Suspensioon säilib külmikus kõige rohkem ühe nädala.
- 3.2. Carrezi lahus I: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati Zn(CH₃ COO)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. Luff-Schoorli reaktiiv

Ettevaatlikult segades valatakse sidrunhappe lahus (3.4.2) naatriumkarbonaadi lahusesse (3.4.3). Lisatakse vasksulfaadi lahus (3.4.1) ja täidetakse veega 1 liitriini. Lastakse öö läbi settida ja filtreeritakse. Selliselt saadud reaktiivi kontsentratsiooni (Cu 0,05 mol/l; Na₂ CO₃ 2 mol/l). Lahuse pH on umbes 9,4.

- 3.4.1. Vasksulfaadi lahus: 25 g rauavaba vasksulfaati ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) lahustatakse 100 ml vees.
- 3.4.2. Sidrunhappe lahus: 50 g sidrunhapat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) lahustatakse 50 ml vees.
- 3.4.3. Naatriumkarbonaadi lahus: 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 lahus, 30 % (w/v)
- 3.7. Väävelhape, 3 mol/l.
- 3.8. Naatriumtiosulfaadi lahus, 0,1 mol/l.
- 3.9. Tärkliselahus: 1 liitrile 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 pärmissuspensiooni (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 milliliitriini, segatakse ja filtreeritakse. Pipetiga eemaldatakse filtraadikogus, mis ei ületa 25 ml ja mis soovitatavalt sisaldab 40–80 mg laktoosi, ning kantakse see 300 ml Erlenmeyeri kolbi. Vajaduse korral täidetakse veega 25 ml-ni.

5 ml pärmissuspensiooniga (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 asbestkatttega 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 väävelhapat (3.7). Tiitritakse naatriumtiosulfaadi lahusega (3.8) kuni kahvatukollase värvuse tekkimiseni, lisatakse tärkliseindikaator (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 väävelhapat (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 pärmissuspensiooni (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 invert- suhkrud 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
	mg	vahe	mg	vahe	mg	vahe	
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

L. TÄRKLISE MÄÄRAMINE

POLARIMEETRILINE MEETOD

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodi abil on võimalik kindlaks määrata tärklise ja suure molekulmassiga tärklise lagunemisproduktide taset söödas, et kontrollida deklareeritud energiasisalduse (VII lisa sätteid) 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 tärkliisisaldus saadakse nimetatud kahe määramise vahe korrutamisel teadaoleva koefitsiendiga.

3. Reaktiivid

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

⁽¹⁾ EÜT L 125, 23.5.1996, lk 35.

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

Kontsentratsiooni tuleb kontrollida tiitrimise teel, kasutades 0,1 mol/l naatriumhüdroksiidi 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 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ja 3 g jää-äädikat. Täidetakse veega 100 milliliitrit.3.4. 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 milliliitrit.

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

4. **Seadmed**

4.1. Standardse lihvhenduse 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 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) pipetatakse 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. *Mõõtmise 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;

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

- + 185,9°: riisitärklis
- + 185,7°: kartulitärklis
- + 184,6°: maisitärklis
- + 182,7°: nisutärklis
- + 181,5°: odratarklis
- + 181,3°: kaeratarklis
- + 184,0°: muud tärkliseliigid ja tärklisesegud segajäätis

6.2. Mõõtmise saharimeetriga

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

S = optiline kogupöörang saharimeetri kraadides

S' = 40 % etanoolis (v/v) lahustuvate ainete optiline pöörang saharimeetri kraadides

N = sahharoosi mass (grammides) 100 ml vees, mis annab optiliseks pööranguks 100 saharimeetri kraadi, kui mõõtmisel kasutatakse 200 mm toru:

- 16,29 g prantsuse saharimeetrite puhul;
- 26,00 g saksa saharimeetrite puhul;
- 20,00 g muude saharimeetrite puhul;

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = puhta tärklise optiline eripöörang (vt punkt 6.1).

6.3. Korratavus

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

7. Tähelepanekud

7.1. Kui proov sisaldab üle 6 % karbonaate, arvutatuna kaltsiumkarbonaadina, tuleb need enne optilise kogupöörangu määramist täpselt sobiva koguse lahjendatud värvilistega 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 tärklisesisalduse määramisel esile kutsuda häireid, mis võivad viia ebaõigete tulemustele:

- (suhkru)peedisaadused, näiteks (suhkru)peedipulp, (suhkru)peedimelass, melasseeritud (suhkru)peedipulp, (suhkru)peedimelassi 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);
- rasvakõrned

M. KOGUTUHA MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata sööda kogutuha sisaldust.

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 plaatinatiiglid 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 punktidele 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. Korraldatakse 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 väheses veega. Kuivatatakse ja tuhastatakse punkti 5 kohaselt.

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 tärklise täielikuks hüdrolüüsiks.

Filtreeritakse soojalt läbi tuhavaba filtri ning filter pestakse 50 ml sooja vees (vt tähelepanek 7). Filter jäägiga asetatakse tuhastamiseks ettenähtud tiigilisse, 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 aparaadi spetsiaalsesse kolbi (4), mille küljes on väike purunematust materjalist toru ja mis sisaldab 10 ml soolhapet (3.1), ning kolb ühendatakse aparaadiga. Kraan (5) keeratakse nii, et toru (1) oleks ühenduses välisõhuga. Kasutades tõstetavat toru (2), mis on täidetud värvitud 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).

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;

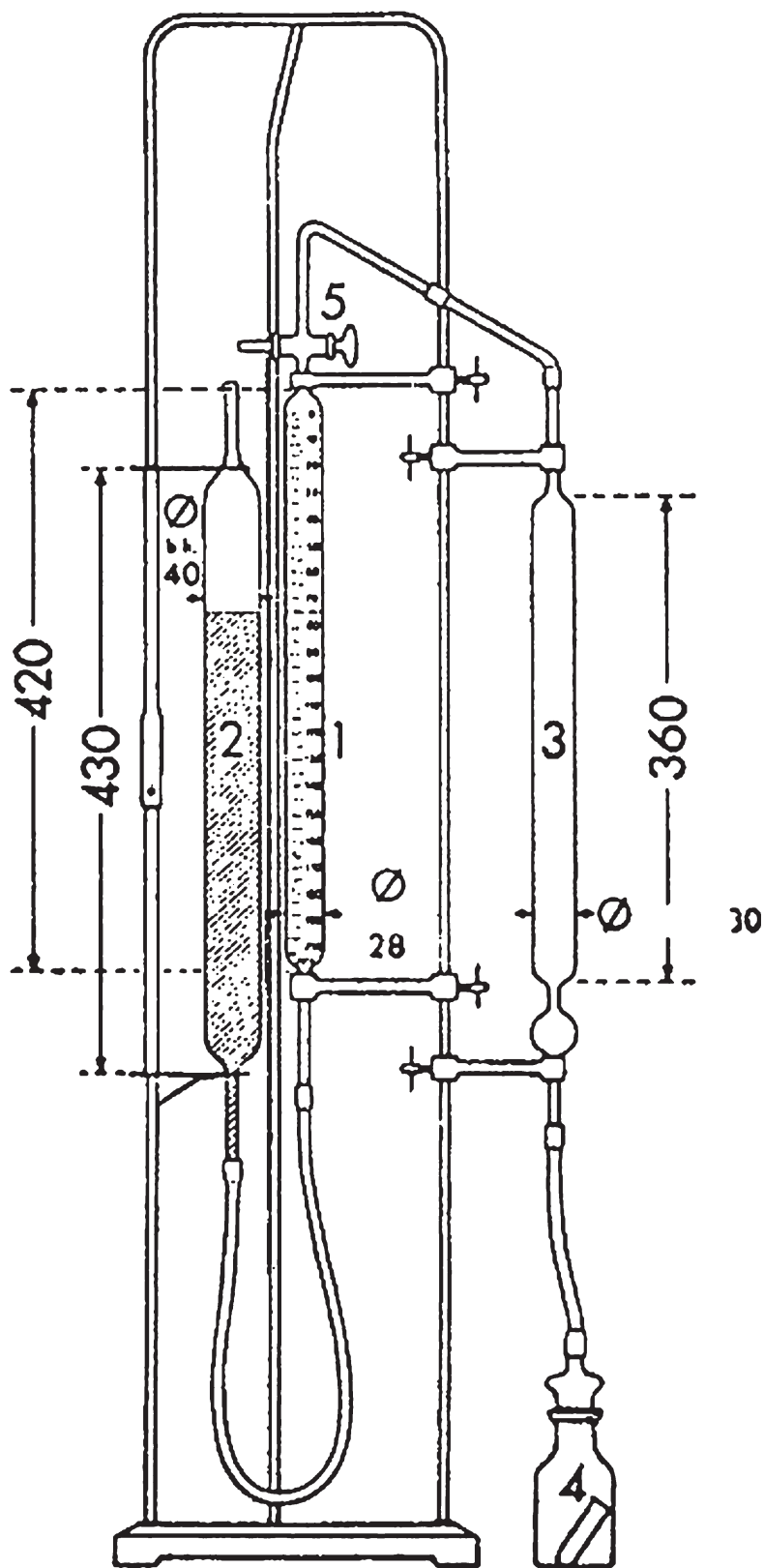
V₁ = 0,5 g CaCO₃-st saadud CO₂ milliliitrites;

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 aparaaadi maht erineb Scheibler-Dietrichi aparaaadi mahust, tuleb proovist ja kontrollainest võetud osasid ning tulemuste arvutamist vastavalt kohandada.

SCHEIBLER-DIETRICH APARAAT CO₂ MÄÄRAMISEKS

(mõõtmekeskused millimeetrites)

P. ÜLDFOSFORI MÄÄRAMINE

FOTOMEETRILINE MEETOD

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata üldfosfori sisaldust söötades. 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 molübdovanadaatreaktiiviga. 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. Molübdovanadaatreaktiiv: liitises 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 ammooniumheptamolübdadaati $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 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 ammooniummonovanadaati 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 plaatinatiiglid 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, 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, homogeneeritakse ja filtreeritakse.

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

Tuhastustiigliselt 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, homogeneeritakse 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). Homogeneeritakse 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). Homogeneeritakse 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 %.

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 lämmastikhapetega 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. Höbenitraadi 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 milliliitrit.
- 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 milliliitrit.
- 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 aktiivsöega 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.

5.1.3. Kuumtöödeldud söödad, linakoogid ja -jahu, linajahurikkad tooted ja muud taimeliimi- või kolloidaineterikkad tooted (näiteks dekstriinitud tärklis)

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 ammooniumraudsulfaadi küllastunud lahust (3.3) ja nullmärgini täidetud büreti abil kaks tilka ammooniumtiotsüanaadi lahust (3.1). Büreti abil lisatakse höbenitraadi lahust (3.2), nii et saadakse ülekogus 5 ml. Lisatakse 5 ml dietüüleetrit (3.5) ja loksutatakse tugevalt sademe koaguleerimiseks. Höbenitraadi ülekogus tiitritakse ammooniumtiotsüanaadi 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 ammooniumtiotsüanaadi 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 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, 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, $c = 0,5\text{ mol/l}$ glütseroolis, $\beta = 120\text{ g/l}$ (kui $x = 9$) (vt tähelepanek 7.8)

3.7. Fenoolftaleiini lahus, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ 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. 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 punktile 5.6.3.1.

3.12. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega, nt $1,80 \times 10^6\text{ RÜ/g}$

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 punktile 5.6.3.2.

3.1.3. 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 jaotuslehtrid, 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 (lahutuskriteerium: ainult üks piik kõigi retinooli isomeeride jaoks antud HPLC tingimustel)

4.5.2. Muudetava lainepikkusega UV- või fluorestsentsdetektor

4.6. Spektrofotomeeter 10 mm kvartsküvettidega

4.7. Magnetseguriga veevann

4.8. Ekstraksiooniseade (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: 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 (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 A-vitamiini kadusid.

5.2. 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). Kuumatatakse 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 1 000 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 jaotuslehtriga (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 eralduspinnal 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 (3.10) kuni atmosfäärirõhuni ja kolb eemaldatakse vaakumpöördaurustist. Järelejäänud lahusti eemaldatakse 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 C_{18} 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).

Vedelikkromatograafia 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. Standardtöölahuste 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 hüdrolüüsatakse 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 lammastikuga (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 (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) 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. Ekstinktsiooni-maksimum peab olema vahemikus 325–327 nm.

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

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

$$(E_1^{1\%} \text{ A-vitamiini atsetaadi puhul} = 1\,530 \text{ lainepikkusel } 326 \text{ nm } 2\text{-propanoolis})$$

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. Ekstinktsiooni-maksimum peab olema vahemikus 325–327 nm.

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

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

$$(E_1^{1\%} \text{ A-vitamiini palmitaadi puhul} = 957 \text{ lainepikkusel } 326 \text{ nm } 2\text{-propanoolis})$$

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:

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

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

6. Tulemuste arvutamine

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

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;

V₁ = proovilahuse (5.4) kogus milliliitrites;

V₂ = vastavalt punktidele 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 põhiaiaine (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.

9. Ühisuuringu tulemused ⁽¹⁾

	Eelsegu	Sööda eelsegu	Mineraalkonsentrat	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 standardhälveS_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

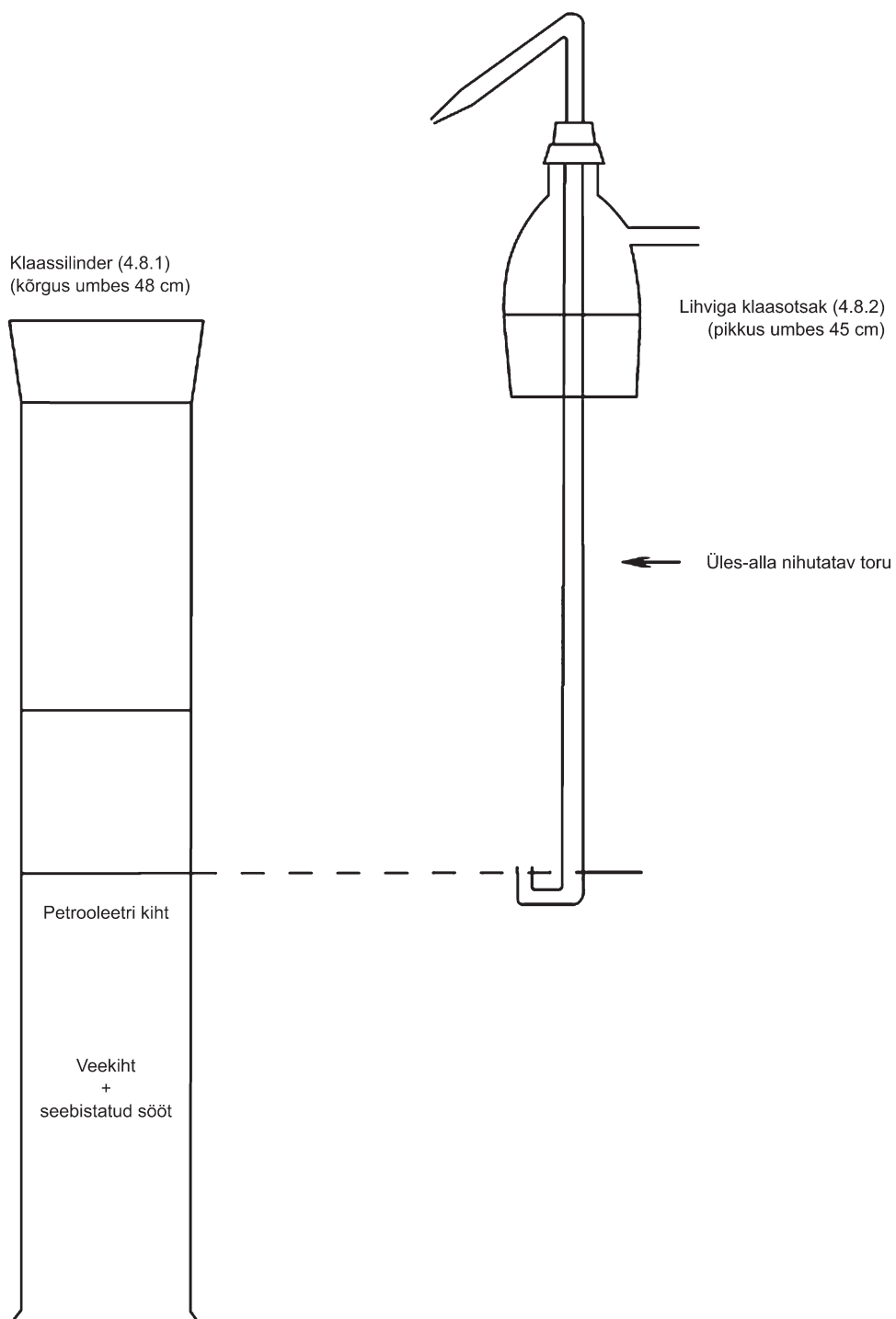
r = korratavus

R = reprodutseeritavus

CV_r = korratavuse variatsioonikordajaCV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

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

Joonis 1: Ekstraktsiooniseade (4.8)



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 kaaliumhüdrokksiidi 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. Kaaliumhüdrokksiidi 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, $c = 0,5\text{ mol/l}$ glütseroolis, $\beta = 120\text{ g/l}$ (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
- 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 jaotuslehtrid, 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 sissepitsesüsteemiga
- 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 kvartsküvettidega
- 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 kõrvaltoriga 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 (3.1.2), 2 ml naatriummaskorbaadi 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.

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 vahetamine ühendatud lahuses peab olema umbes 2:1. Raputatakse tugevasti kaks minutit ja lastakse kaks minutit selgineda.

5.3.1. Ekstraheerimine jaotuslehtriga (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 jaotuslehtis 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 klaassilindri (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 ml jaotuslehtisse (4.2.3). Klaassilindrisse lisatakse 100 ml petrooleetrit (3.2), suletakse korgiga ja raputatakse tugevasti. Kihtidel lastakse eralduda ja ülemine kiht viiakse üle jaotuslehtisse nagu ennegi. Ekstraheerimist korratakse järgmise 100 ml petrooleetriga (3.2), siis kaks korda 50 ml 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 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 µg/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).

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 juhinduda 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 -tokoferoolatsetaat või DL- α -tokoferool)

5.6.1. DL- α -tokoferoolatsetaadi standard

5.6.1.1. 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 milliliitriini. 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 -tokoferoolatsetaadiga 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-milliliitristesse mõõtkolbidesse, täidetakse metanooliga (3.3) määrgini ja segatakse. Nende lahuste nominaalsed kontsentratsioonid on 2,5, 5,0, 10,0 ja 25,0 µg/ml DL-α-tokoferoolatsetaati, 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 (pindalasid), 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 milliliitrini ja mõõdetakse spektrofotomeetriga (4.6) selle lahuse UV-spekter vahemikus 250–320 nm etanooli (3.1) suhtes.

Neeldumismaksimum peaks olema 284 nm:

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

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

5.6.2. DL-α-tokoferooli standard

5.6.2.1. Standardtöölahuse valmistamine

2 ml DL-α-tokoferooli põhilahust (3.11.1) viiakse pipetiga 50 ml mõõtekolbi, lahustatakse metanoolis (3.3) ja täidetakse 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. Standardtöölahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

5.6.2.2. Kalibreerimislahuste valmistamine ja kalibreerimisgraafiku koostamine

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

Igast kalibreerimislahusest süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse keskmised piigi kõrgused (pindalad). Kasutades keskmisi piigi kõrgusi (pindalasid), 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 milliliitrini 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 lahjendusel 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);

V₁ = proovilahuse (5.4) kogus milliliitrites;

V₂ = 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).
- 7.4. Pärast DL- α -tokoferoolatsetaadi või DL- α -tokoferooli lahuste spektrofotomeetrilist mõõtmist vastavalt punktile 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 hüdrolyüsub 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	Mineraal-kontsentratsioon	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

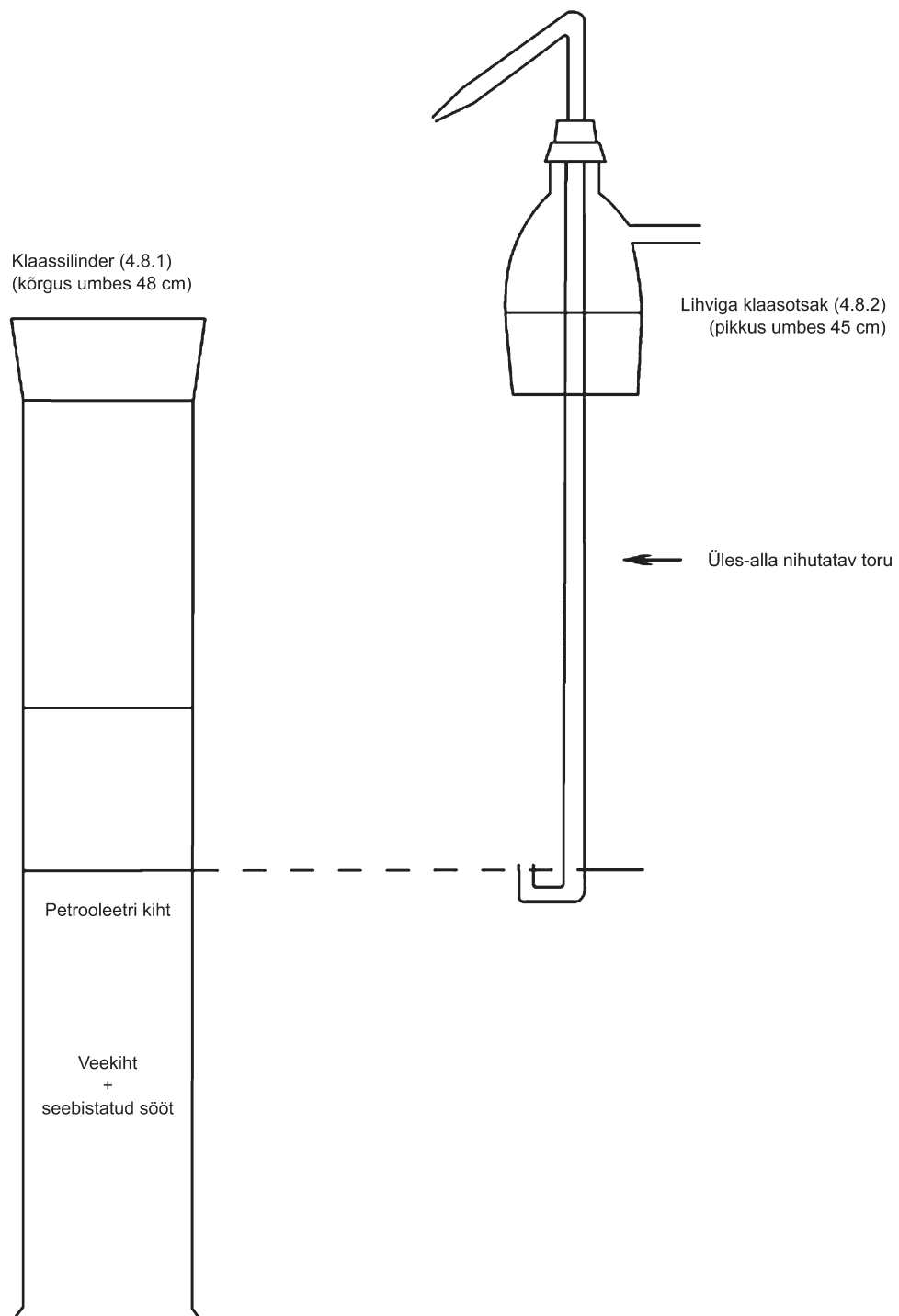
R = reprodutseeritavus

CV_r = korratavuse variatsioonikordaja

CV_R = reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

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

Joonis 1: Ekstraktsiooniseade (4.8)



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 bidestillierimisel 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 vasesulfaat 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.
- 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 liitri.
- 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. Tsiingi 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 liitri.
- 3.10.1. Tsiingi 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 liitri.

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 platinatiiglis (vt märkus b), kuivatatakse kuivatuskapis 105 °C juures ning tiigel asetatakse külma muhvelahju (4.1). Ahi suletakse (vt märkus c) ning järkjärgult tõstetakse ligikaudu 90 minuti jooksul temperatuur 450–475 °C-ni. Kõnealust temperatuuri hoitakse 4–16 tundi (nt öö jooksul), et eemaldada söeosakesed, ning seejärel ahi avatakse ning lastakse jahtuda (vt märkus d).

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

⁽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 platinatiiglis. 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 paaris milliliitris vesinikfluoriidhappes (3.4) ning aurustatakse kuivaks. Lisatakse viis tilka väävelhapet (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, lahustatakse 250 ml mõõtekolbi ning täidetakse kuni märgini veega (HCl kontsentratsioon ligikaudu 0,5 mol/l). Mikroelementide määramist jätkatakse punktist 5.1.2.

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, lahustatakse filtreeritakse mõõtekolbi ning täidetakse kuni märgini veega (HCl kontsentratsioon ligikaudu 0,5 mol/l).

Märkused

- a) Mikroelementide määramisel on oluline pöörata tähelepanu saastamisohule, eriti tsiingi, 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. Tsiingi määramine on eriti tundlik mitmete saasteallikate suhtes, nt klaasnõud, reaktiivid, tolmu jne.

- b) Tuhastatava proovi mass arvutatakse sööda ligikaudse mikroelemendisalduse 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. Spektrofotomeetiline 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 standardtöölahustest kalibreerimislahused, millest iga lahuse HCl kontsentratsioon on ligikaudu 0,5 mol/l ning (raua, mangaani ja tsiingi 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.

Raud

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml standardtöölahust (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 standardtöölahust (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 märgini 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 märgini 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

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 analüüsivas lahuses arvutatakse kalibreerimiskõverat kasutades ning tulemus väljendatakse mikroelementide milligrammides ühe kilogrammi proovi kohta (miljondikud).

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 $\text{Ca} + \text{Mg/P} > 2$, 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 vedelikkromatograafia (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

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 korrigeeritakse pH 4,3-le. Filtreeritakse läbi 0,22 μ m filtri (4,8) ja lahus degaseeritakse (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit). See lahus säilib suletud mahutis pimedas hoituna üks kuu.
4. **Seadmed**
- 4.1. Ultrahelivann
- 4.2. Filter-pöördaurusti
- 4.3. Tsentrifuug
- 4.4. HPLC-seade muudetava lainepikkusega ultraviolet-detektoriga või diodireadetektoriga
- 4.4.1. Vedelikkromatograafia kolonn, 300 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , täidise terasuurus 10 μ m, või samaväärne
- 4.5. Klaaskolonn (300 mm $\times$ 10 mm), millel on paigutatud 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 võrdlussööta, veendumaks, et selles ei ole halofuginooni ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus halofuginooni. Kontsentratsiooni 3 mg/kg saamiseks lisatakse 10 g võrdlussöödale 300 µl põhistandardlahust (3.6.1), segatakse ja oodatakse enne ekstraheerimise (5.2) alustamist 10 minutit.

Märkus: selle meetodi puhul peab võrdlussööt olema prooviga samalaadne 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.

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) klaaskolonni (4.5). Vaigukihi peale pannakse väike klaasvillatropp. 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 vaigukolonni 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 membraanfiltrid (4.7). See lahus hoitakse HPLC määramise (5.4) jaoks.

5.4. HPLC määramine**5.4.1. Parameetrid**

Soovitatakse juhinduda 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

Sissesüstitav 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).

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 (µg/ml).

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

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

kus:

c = proovilahuse halofuginoonikontsentratsioon (µg/ml);

m = kaalutise mass grammides.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll**7.1. Identsus**

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades dioodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja 6,0 µg/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 poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti halofuginoonipiigi laiusest.

7.1.2. Diiodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- (a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diiodireadetektori 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.

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 kuni 3 mg/kg suuruste halofuginoonisalduste 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 analüüsiti kolme proovi.

Tulemused

	Proov A (võrdlusproov) 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.

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

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse hapestatud metanooliga. Ekstrakt kuivatatakse ja selle alikvootne osa puhastatakse alumiiniumoksiidi kolonnis. Robenidiin elueeritakse kolonnist metanooliga, kontsentreeritakse ja viiakse liikuva faasiga sobiva mahuni. Robenidiinisaldus 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.

3.3. HPLC-puhtusastmega atsetonitril**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 aktiivsuseaste 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, $c = 0,025$ mol/l

1 000 ml mõõtekolvis lahustatakse 3,40 g kaaliumdivesinikfosfaati vees (HPLC-puhtusastmega), kolb täidetakse märgini ja segatakse.

3.7. Dinaatriumvesinikfosfaadi lahus, $c = 0,025$ mol/l

Üheliitrisel mõõtekolvis lahustatakse 3,55 g veevaba dinaatriumvesinikfosfaati (või 4,45 g dihidraati või 8,95 g dodekahidraati) vees (HPLC-puhtusastmega), kolb täidetakse märgini veega ja segatakse.

3.8. HPLC liikuv faas

Segada järgmised reaktiivid:

650 ml atsetonitrili (3.3),

250 ml vett (HPLC-puhtusastmega),

50 ml kaaliumdivesinikfosfaadi lahust (3.6),

50 ml kaaliumdivesinikfosfaadi lahust (3.7).

Filtreeritakse läbi 0,22 μ m 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 μ g/ml

30 mg robenidiini standardainet (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 µg/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 robenidiinisaldused on vastavalt 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 ja 6,0 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10. HPLC-puhtusastmega vesi

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 dioodireadetektoriga, mis töötab vahemikus 250–400 nm.

4.4.1. Vedelikchromatograafia 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 võrdlussööta, veendumaks, et selles ei ole robenidiini ega teisi segavaid aineid.

5.1.2. Tuleb teha saagisekatse, analüüsides võrdlussööta (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 lämmastikuvoolumisega kuni ligikaudu 0,5 ml-ni. Lisatakse 15 g võrdlussööta, segatakse ja jäetakse enne ekstraheerimist (5.2) asumist 10 minutiks seisma.

Märkus: selle meetodi puhul peab võrdlussööt 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 metanooli (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 molekulaarsööta (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 kokkupuutumine õhuga oleks selles etapis minimaalne. Koputatakse kergelt vastu kolonni alumist otsa, et alumiiniumoksiid paigutuks ühtlaselt.

5.3.2. Proovi puhastamine

Kolonni pipetatakse 5,0 ml vastavalt punktile 5.2 ettevalmistatud prooviekstrakti. Pipeti ots asetatakse tihedalt kolonni seina vastu ja lastakse lahusel absorbeeruda alumiiniumoksiidi. Robenidiin elueeritakse kolonnist, 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 liikuv 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,

Sissesüstitav ruumala: 20–50 µl.

Kromatograafilise süsteemi stabiilsust kontrollitakse, süstides 3,6 µg/ml sisaldavat kalibreerimislahust (3.9.3) mitu korda, kuni saavutatakse konstantsed 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 pindalasid 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.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. Identsus

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades dioodireadetektorit, 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 % kontsentreerimata prooviekstrakti robenidiinipiigi laiusest.

7.1.2. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- 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;
- 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;
- 250 ja 400 nm vahel 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.

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:

	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-diokso-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. Söödade 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. Diklasuriilisisaldus 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-diokso-1,2,4-triasiin-2-üül) fenüül] atsetonitriil, E771

3.8.1. Diklasuriili põhistandardlahus, 500 µg/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 muutumatuna ühe kuu.

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 -metüül-benseenatsetonitriil

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/1 000 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 $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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)

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. Võrdlussööt

Tuleb analüüsida võrdlussööta, veendumaks, et selles ei ole ei diklasuriili ega segavaid aineid. Võrdlussööt peab olema prooviga samalaadne ja selles tohi leiduda diklasuriili ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatset analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus diklasuriili. Et saada kontsentratsiooni 1 mg/kg, kantakse 50 g võrdlussöödale 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 standardisel lisamismeetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitavale proovile ligikaudu sama suur diklasuriilikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata 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 öö jooksul 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 membraanfiltrit (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 öö 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):

Vedelikkromatograafia 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):	atsetonitril
	Eluent C (3.13.3):	metanool
Elueerimisviis:	— lineaarne gradient — algtiingimused: 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 Bga 10 minutit	
Voolukiirus:	1,5–2 ml/min	
Sissesüstitav 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:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 \text{ V}}{m} [\text{mg/kg}]$$

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 (µg/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:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} [\text{mg/kg}]$$

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 (µg/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 dioodireadetektori, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (5.2.1 või 5.2.2) ja kalibreerimislahuse (3.10) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstraktile (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. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt.

- Proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm.
- 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 kõrgis 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
Nominaalsaldus mg/kg)	100	100	1	1	1

L = laboratooriumide arv
n = üksikmääramiste arv
S_r = korratavust iseloomustav standardhälve
CV_r = korratavuse variatsioonikordaja
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. NAATRIUMLASALOTSIIIDI MÄÄRAMINE

Polüetermonokarboksüülhappe 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 milliliitrini.

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 milliliitrini.

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 $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (polüetermonokarboksüülhappe 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.

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 naatriumlasalotsiidsisaldus 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 sissepritsesüsteemiga, mis võimaldab süstida mahus 20 µl.

4.3.1. Vedelikukromatograafia 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. Võrdlussööt

Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs, veendumaks, et selles ei ole naatriumlasalotsiidi ega segavaid aineid. Võrdlussööt 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 põhstandardlahust (3.10.1) 250 ml koonilisse kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitriini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse põhjalikult ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussööt 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. Sööt

5–10 g proovi kaalutakse täpsusega 0,01 g ja pannakse 250 ml koonilisse korgiga kolbi. Lisatakse pipetiga 100,0 ml hapestatud metanooli (3.8). Korgitakse kinni ja raputatakse segi. Kolb 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 membraanfiltrini (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 membraanfiltrini (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 C₁₈, 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

Sissesüstitava 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 retentsiooniajad.

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).

6.1. 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 (µg/ml) proovilahuses (5.2.1);

V₁ = 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 (µg/ml) proovilahuses (5.2.2);

V₂ = 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

Spektrofluoromeetriselised meetodid on vähem tundlikud kõrvaliste lisandite suhtes kui UV-meetodid. Analüüsitava proovi identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatsel 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 naatriumlasalotsiidi piigi kõrgus. Piigi laius poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui $\pm 10\%$ kontsentreerimata prooviekstrakti naatriumlasalotsiidi 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 naatriumlasalotsiidisaldus 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 %.

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 eel- segu	Proov 3 Kalkunite graanulid	Proov 4 Kanade kuiviku- puru	Proov 5 Kalkuni- sööt	Proov 6 Kodulin- dude sööt A	Proov 7 Kodulindude 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
Nominaalsal- dus [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 segasöötades, 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
- 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 sentimeetristes 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 täidetakse mõlemad kolvid propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) märgini. Segatakse ja jäetakse 10–15 minutiks selginema, seejärel filtreeritakse 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 milliliitrit. Saadud lahuseid kasutatakse võrdluslahustena.

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 milliliitrit, 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:

$$\text{gossüpoli \% : } \frac{E \times 1\,250}{E \frac{1\%}{1\text{cm}} \times p \times a}$$

kus:

E = korregeeritud 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 milliliitrini. Mõlemad seeriad lõpetatakse 25 ml mõõtekolviga, mis sisaldab üksnes 10 ml lahustit A (3.2) (pimekatse).

Esimese seeria kolvid (kaasa arvatud kolb pimekatsega) täidetakse 25 milliliitrini propaan-2-ooli ja heksaani seguga (3.1) (võrdlusseeria).

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) määrgini, 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) määrgini ja homogeneeritakse.

2,0 ml neid lahuseid pannakse kahe kuuest 25 ml mõõtekolvist koosneva seeria igasse kolbi. Esimese seeria kolvid täidetakse määrgini 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) määrgini, 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.

B. DIOKSIINIDE (PCDD/PCDF) JA DIOKSIINILAADSETE PCBDE SISALDUSE MÄÄRAMINE

I. PROOVIVÕTUMEETODID JA ANALÜÜSITULEMUSTE TÕLGENDAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

Proovid, mis on ette nähtud dioksiinide (polüklooritud dibenso-para-dioksiinide (PCDD) ja polüklooritud dibensofuraanide (PCDF)) ning dioksiinitaoliste polüklooritud difenüülide (PCBde) ⁽¹⁾ sisalduse ametlikuks kontrolliks söödas, võetakse vastavalt I lisa sätetele. Kohaldatakse I lisa punktis 5A kehtestatud söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimisega seotud kvantitatiivsed nõudeid. Selliselt võetud koondproove käsitletakse tüüpilisena partiile või osapartiile, kust need on võetud. Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivis 2002/32/EÜ ⁽²⁾ sätestatud piirnormide järgimine tehakse kindlaks laboriproovides määratud sisalduste alusel.

2. Partii või osapartii nõuetekohasus

Partii võetakse vastu, kui ühekordse analüüsi tulemus ei ületa direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud vastavat piirnormi, võttes arvesse mõõtemääramatust.

Partii ei vasta direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piirnormile, kui nn ülemtõkke ⁽³⁾ analüüsitulemus, mida on kinnitanud kordusproovi analüüs, ⁽⁴⁾ ületab kindlalt piirnormi, võttes arvesse mõõtemääramatust.

⁽¹⁾ TEF (= toksilisuse ekvivalentfaktorid) tabel dioksiinide, furaanide ja dioksiinilaadsete PCBde kohta

Analoog	TEF väärtus	Analoog	TEF väärtus
Polüklooritud dibenso-para-dioksiinid		Dioksiinilaadsed PCBd:	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Mitte-orto-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	0,0001
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	0,01
OCDD	0,0001	Mono-orto-PCBd	
		PCB 105	0,0001
Dibensofuraanid (PCDF)		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Kasutatud lühendid: T = tetra; Pe = penta; Hx = heksa; Hp = hepta; O = okta; CDD = klorodibensodioksiin; CDF = klorodibensofuraan; CB = klorobifenüül.

⁽²⁾ EÜT L 140, 30.5.2002, lk 10.

⁽³⁾ Ülemtõkke põhimõtte kohaselt vastab toksilisuse ekvivalendi (TEQ) arvutamisel iga kvantifitseerimata analoogi väärtus määramispiiri väärtusele.

Alamtõkke põhimõtte kohaselt vastab TEQ arvutamisel iga kvantifitseerimata analoogi väärtus nullile.

Vaheväärtuse põhimõtte kohaselt vastab TEQ arvutamisel iga kvantifitseerimata analoogi väärtus poolele määramispiiri väärtusele.

⁽⁴⁾ Kordusproov on vajalik, et välistada sisemise ristsaastumise ja juhusliku proovide segunemise võimalus. Mõõtemääramatust arvesse võttes kasutatakse esimest analüüsi nõuetele vastavuse hindamiseks.

Juhul, kui analüüsi käigus on toimunud dioksiiniga saastumine, võidakse kinnituseks läbi viia teine analüüs, juhul kui analüüsiks võetud proovide puhul on suudetud kindlaks teha, et need on seotud dioksiiniga saastumise juhtumiga.

Mõõtemääramatust võib võtta arvesse vastavalt ühele järgmistest meetoditest.

- arvutatakse laiendmääramatus, mis annab ligikaudu 95 % usaldusväärsuse, kui kasutatakse kattetegurit väärtusega 2. Partii ei vasta nõuetele, kui mõõdetud väärtus, millest lahutatakse U, ületab piirnormi. Dioksiinide ja dioksiinilaadsete PCBde eraldi määramise korral tuleb dioksiinide ja dioksiinilaadsete PCBde summa jaoks kasutada nende ainete eraldiseisvate analüüsides tulemusena saadud hinnangulise laiendmääramatuse summat;
- tehakse kindlaks määramispiir (CCa) vastavalt komisjoni otsusele 2002/657/EÜ⁽¹⁾ (lisa punkt 3.1.2.5 – ained, mille jaoks lubatud piirnormid on kehtestatud). Partii ei vasta nõuetele, kui mõõdetud väärtus võrdub CCa-ga või on sellest suurem.

Käesolevaid tõlgenduseeskirju kohaldatakse ametlikul kontrollimisel võetud proovidest saadud analüüsitulemuste suhtes. See ei mõjuta liikmesriikide õigust kohaldada siseriiklikke eeskirju kaitse ja võrdlemise eesmärgil.

II. PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE JA NENDE ANALÜÜSIMEETODITE NÕUDED, MIDA KASUTATAKSE DIOKSIINIDE (PCDD/PCDF) JA DIOKSIINILAADSETE PCB-DE SISALDUSE AMETLIKUKS KONTROLLIKS

1. Eesmärk ja rakendusala

Neid nõudeid tuleks kohaldada söödatooraine ja sööda analüüsimisel dioksiinide (polüklooritud dibenso-para-dioksiinide (PCDD) ja polüklooritud dibensofuraanide (PCDF)) ning dioksiinitaoliste polüklooritud difenüülide (PCBde) kindlaksmääramiseks.

Sööda dioksiinisaldust saab kontrollida strateegia abil, mis hõlmab sõelumismeetodit nende proovide valimiseks, milles on vähem kui 25 % vaatlustasemest vähem või rohkem dioksiine ja dioksiinitaolisi PCBsid. Nende proovide dioksiinisaldus tuleb kindlaks määrata/kinnitada kinnitusmeetodi abil.

Sõelumismeetodeid kasutatakse dioksiinide ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse tuvastamiseks vaatlustasemel. Need meetodid on suure tootlikkusega ja neid kasutatakse suure arvu proovide kontrollimiseks positiivsete tulemuste suhtes. Need meetodid on konkreetselt kavandatud väärte negatiivsete tulemuste vältimiseks.

Kinnitusmeetodid on meetodid, mis annavad täielikku või täiendavat teavet dioksiinide ja dioksiinitaoliste PCBde olemasolu üheseks tuvastamiseks ja koguse kindlakstegemiseks vaatlustasemel.

2. Taustateave

Kuna keskkonnast võetud proovid ja bioloogilised proovid (sh söödatooraine/sööda proovid) sisaldavad üldiselt erinevate dioksiini analoogide keerulisi segusid, on riskianalüüsi hõlbustamiseks välja töötatud toksilisuse ekvivalentfaktorite (TEF) mõiste. Need TEFd on kehtestatud väljendamaks 2,3,7,8-asendatud PCDDde ja PCDFde segude kontsentratsioone ning mõndasid mitte-orto ja mono-orto kloor-asendatud PCBsid, millel on dioksiinitaoline toime 2,3,7,8-TCDD toksilisuse ekvivalentides (TEQ). Konkreetse proovi üksikute ainete kontsentratsioonid korrutatakse neile vastava TEFiga ning seejärel liidetakse kokku, et saada TEQdes väljendatud dioksiinitaoliste ühendite üldkontsentratsioon.

Ainult käesolevas määruses on üksiku analoogi vastuvõetav konkreetne kvantifikatsioonipiir uuritava aine kontsentratsioon sellises prooviekstraktis, mis tekitab seadmes signaali kahe erineva iooniga, mida jälgitakse signaali/müra suhtega 3:1 nõrgema signaali puhul, ning mis vastab põhitingimustele, näiteks retentsiooniaeg ja isotoopsuhe vastavalt EPA-meetodi 1613 versioonis B kirjeldatud määramismeetodile.

3. Proovi ettevalmistamise kvaliteedi tagamise nõuded

Proovide analüüsiks ettevalmistamisel kohaldatakse üldsätteid, mis on ette nähtud II lisas.

Lisaks peavad olema täidetud järgmised nõuded:

- proove tuleb säilitada ja vedada klaas-, alumiinium-, polüpropüleen- või polüetüleenõudes. Paberitolmu jäägid tuleb proovinõust eemaldada. Klaasnõusid tuleb loputada dioksiinidesisalduse suhtes eelnevalt kontrollitud lahustitega;

⁽¹⁾ EÜT L 221, 17.8.2002, lk 8.

- tehakse pimekatse, mille puhul läbitakse kõik analüüsi etapid ilma proovita;
- ekstraheeritava proovi mass peab olema piisav, et olla vastavuses mõõtetundlikkuse nõuetega.

4. Nõuded laboritele

- Labor peab näitama meetodi suutlikkust vaatlustaseme piires, näiteks vaatlustaseme 0,5-, 1- ja 2-kordsel tasemel koos nõuetekohase variatsioonikoefitsiendiga korduvalanalüüside puhul. Nõuetekohasuse näitajaid käsitlevad üksikasjad on esitatud punktis 5.
- Kinnitusmeetodi kvantifitseerimispiir peab olema ligikaudu üks viiendik vaatlustasemest, et tagada nõuetekohased variatsioonikordajad vaatlustaseme piires.
- Sisemise kvaliteeditagamise meetmena tuleb regulaarselt teha pimekatseid ja kontroll-rikastusproove või kontrollproovide analüüse (võimaluse korral tuleb eelistada sertifitseeritud etalonaineid).
- Edukas osalemine laboritevahelistes laborite pädevust hindavates uuringutes on parim viis tõestada oma pädevust erianalüüside tegemisel. Edukas osalemine nt laboritevahelistes mulla- või reoveeproovide uuringutes ei pruugi siiski tingimata tõestada labori pädevust ka toiduaine- või söödaproovide valdkonnas, sest kõnealuste proovide saastetase on madalam. Seetõttu on kohustuslik pidev osalemine laboritevahelistes uuringutes, mille eesmärk on dioksiinide ja dioksiinitaaliste PCBde sisalduse kindlaksmääramine vastavates sööda või toiduainete põhiainetes.
- Laborid peavad olema ISO juhendi 58 kohaselt tegutseva tunnustatud asutuse poolt akrediteeritud tagamaks, et nad kohaldavad analüüsimisel kvaliteeditagamissüsteemi. Laborid tuleb akrediteerida vastavalt standardile ISO/IEC/17025.

5. Dioksiinide ja dioksiinitaaliste pcbde analüüsimenetluste nõuded

Analüüsimenetluste põhinõuded:

- **suur tundlikkus ja madalad avastamispiirid.** PCDDde ja PCDFide puhul peavad avastatavad kogused jääma vahemikku TEQ pikogrammi (10^{-12} g) nimetatud ühendite äärmiselt suure toksilisuse tõttu. Teadaolevalt on PCBde sisaldus suurem kui PCDDde ja PCDFide sisaldus. Enamiku PCB analoogide puhul on tundlikkus nanogrammides (10^{-9} g) juba piisav. Kuid toksilisemate dioksiinitaaliste PCB-analoogide (eriti m- ja p-asendatud analoogide) määramisel tuleb saavutada sama tundlikkus nagu PCDDde ja PCDFide puhul;
- **suur selektiivsus (spetsiifilisus).** PCDDsid, PCDFe ja dioksiinilaadseid PCBsid peab saama eristada paljudest teistest võimalikest kaasa ekstraheerunud segavatest ühenditest, mille sisaldused võivad analüüsitava ühendite sisaldusega võrreldes olla mitmekordsed. Gaasikromatograafia/mass-spektromeetria (GC/MS) meetodite puhul on vaja eristada mitmeid eri analooge, nagu näiteks toksilisi (nt seitseteist 2,3,7,8-asendatud PCDDd ja PCDFi ning dioksiinilaadset PCBd) ning muid analooge. Biotestidega peab olema võimalik kindlaks määrata TEQ väärtusi valikuliselt PCDDde, PCDFide ja dioksiinilaadsete PCBde summana;
- **suur mõõtetäpsus (tõesus ja täpsusaste).** Määramine peab andma pädeva ja usaldusväärse hinnangu aine tegeliku sisalduse kohta proovis. Suur mõõtetäpsus (mõõtetäpsus: mõõtmise tulemuse ja mõõtmise tegeliku või talle omistatud väärtuse lähedus) on vajalik, et vältida analüüsitulemuse tagasilükkamist TEQ väärtuse vähesel usaldusväärsuse tõttu. Mõõtetäpsust väljendatakse tõesuse (sertifitseeritud aine analüüsimisel mõõdetud analüüdi keskmise väärtuse ja selle sertifitseeritud väärtuse erinevus väljendatuna protsentides) ja kordustäpsusena (RSD_R , suhteline standardhälve, mis arvutatakse korratavuse tingimustes saadud tulemuste põhjal).

Sõelumismetodid võivad hõlmata bioteste ja GC/MS-meetodeid; kinnitusmeetodid on kõrglahutusgaasikromatograafia/kõrglahutusmass-spektromeetria (HRGC/HRMS) meetodid.

TEQ üldväärtuse puhul tuleb järgida järgmisi kriteeriume:

	Sõelumismeetodid	Kinnitusmeetodid
Valenegatiivsete määr	< 1 %	
Tõesus		-20 % kuni +20 %
RSD _R täpsus	< 30 %	< 15 %

6. Sõelumis- või kinnitusmeetodina kasutatavate gc/ms-meetodite erinõuded

- Analüüsimetodi valideerimiseks tuleb analüüsimise alguses, näiteks enne ekstraheerimist, lisada ¹³C-märgistatud 2,3,7,8-kloorasendatud PCDD/F-ide sisestandardide ja ¹³C-märgistatud dioksiinilaadsete PCBde sisestandardide. Iga tetra- kuni oktakloreeritud PCDD/F-i homoloogilise rühma kohta ning iga dioksiinilaadse PCB homoloogilise rühma kohta tuleb lisada vähemalt üks analoog (alternatiivse võimalusena võib lisada vähemalt ühe analoogi iga mass-spektromeetriliselt selekteeritud iooni registreerimisfunktsiooni kohta, mida kasutatakse PCDD/F-ide ja dioksiinilaadsete PCBde kontrolliks). Meetodite, eriti kinnitusmeetodite puhul, eelistatakse kasutada kõiki seitsmeteist ¹³C-märgistatud 2,3,7,8-asendatud PCDD/F-ide sisestandardit ja dioksiinilaadsete PCBde määramiseks kõiki kahteist ¹³C-märgistatud dioksiinilaadsete PCBde sisestandardit.
- Suhtelised kalibreerimistegurid tuleb asjakohaseid kalibreerimislahuseid kasutades määrata ka neile analoogidele, mille puhul ei lisata ¹³C-märgitud analoogi.
- Taimse ja loomse sööda puhul, mille rasvasisaldus on väiksem kui 10 %, tuleb sisestandardid lisada enne ekstraheerimist. Loomset päritolu sööda puhul, mille rasvasisaldus on üle 10 %, võib sisestandardid lisada enne või pärast rasva ekstraheerimist. Ekstraheerimise tõhusust tuleb asjakohaselt kinnitada, sõltuvalt sisestandardite lisamise etapist ning sellest, kas tulemused registreeritakse toote või rasva alusel.
- Enne GC/MS-analüüsi tuleb lisada 1 või 2 surrogaatsaagist.
- Vajalik on saagise kontroll. Kinnitusmeetodite puhul peavad sisestandardite saagised jääma vahemikku 60–120 %. Üksikute analoogide, eriti mõnede hepta- ja oktakloreeritud dibensodioksiinide ja dibensofuraanide puhul, on väiksemad või suuremad saagised vastuvõetavad üksnes tingimusel, et nende osa TEQ väärtuses ei ületa 10 % TEQ üldväärtusest (PCDD/F-ide ja dioksiinilaadsete PCBde summa alusel). Sõelumismeetodite puhul peavad saagised olema vahemikus 30–140 %.
- Dioksiinid tuleb eraldada segavatest kloreeritud ühenditest, näiteks mittedioksiinilaadsetest PCBdest ja kloreeritud difenüleetritest, sobiva kromatograafilise meetodi abil (eelistada tuleks florisil-, alumiiniumoksiid- või süsinikkolonne).
- Isomeeride gaasikromatograafiline eraldamine peab olema piisav (piikidevahelise oru kõrgus 1,2,3,4,7,8-HxCDF ja 1,2,3,6,7,8-HxCDF vahel < 25 %).
- Määramiseks kasutatakse EPA-meetodi 1613 versiooni B („Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS”) või muud samaväärsete suutlikkusnäitajatega meetodit.
- Suurima ja väikseima väärtuse vahe ei või olla üle 20 % söödas, mille dioksiinisaldus on piirmääraga võrdne või sellest suurem. Söödas, mille saastumise tase on oluliselt allpool piirmäära, võib erinevus olla vahemikus 25–40 %.

7. Sõelanalüüsimetodid

7.1. Sissejuhatus

Sõelumismeetodi kasutamisel võib rakendada erinevaid analüüse, nt ainult sõelumist või kvantitatiivset analüüsi.

Sõelumine

Proovide puhul saadud tulemust võrreldakse vaatlustasemele vastava standardproovi puhul saadud tulemusega. Kui proovi puhul saadud tulemus on standardprooviga võrreldes väiksem, loetakse see proov negatiivseks, suurema tulemuse puhul oletatakse, et proov on positiivne. Nõuded:

- iga katseseeria puhul tuleb kasutada nii fooni- kui ka standardproovi(proove), mis ekstraheeritakse ja analüüsitakse samal ajal ja samadel tingimustel. Standardproovi näit peab olema selgelt suurem fooniproovi näidust;
- et näidata meetodi nõuetekohast toimimist vaatlustaseme piires, tuleb vaatlustaseme kontrollimiseks kasutada lisaks ka 0,5- ja 2-kordsele vaatlustasemele vastavaid standardproove;
- teisi põhiaineid analüüsides tuleb näidata standardproovi(de) sobivust, võttes selleks eelistatavalt proove, mille HRGC/HRMS abil määratud TEQ väärtus on lähedane standardproovi väärtusele, või väärtuselt vastavaks tembitud fooniproovi;
- et biotestide puhul ei saa kasutada sisestandardeid, on eriti oluline teha korratavuskatseid, et saada andmeid ühe katseseeria standardhälbest. Variatsioonikordaja peab olema alla 30 %;
- biotestide puhul tuleb määratleda sihtühendid, võimalikud segavad mõjurid ja maksimaalsed vastuvõetavad foonitasemed.

Kvantitatiivne analüüs

Kvantitatiivne analüüs eeldab standardlahjenduste rida, kahe- või kolmekordset puhastamist ja mõõtmist ning pimekatseid ja saagisekontrolli. Tulemust võib väljendada TEQna, eeldades, et signaali andvad ühendid vastavad TEQ põhimõttele. Seda on võimalik demonstreerida, kasutades TCDDd (või dioksiin/furaan/dioksiinilaadse PCB standardsegu) kalibreerimiskõvera saamiseks, mille põhjal arvutatakse TEQ väärtus ekstraktis ja selle kaudu ka proovis. Tulemust korrigeeritakse fooniproovi jaoks arvutatud TEQ taseme (võttes arvesse kasutatud lahustite ja kemikaalide ebapuhtust) ja saagise (arvutatakse vaatlustaseme kvaliteedikontrolli proovi TEQ tasemest) põhjal. On oluline märkida, et osa ilmest saagisekaost võib tuleneda põhiaine mõjust ja/või biotestide TEF väärtuste ja WHO ametlike TEF väärtuste erinevusest.

7.2. Sõelanalüüsimetodite nõuded

- Sõelumiseks võib kasutada GC/MS-metodeid ja bioteste. GC/MS-metodite puhul kasutatakse punktis 6 sätestatud nõudeid. Raku biotestide erinõuded on sätestatud punktis 7.3 ja komplekteeritud vormis biotestide erinõuded punktis 7.4.
- Vajalikud on andmed suure hulga proovide valepositiivsete ja valenegatiivsete tulemuste arvu kohta all- ja ülalpool piirnormi või häiretaset, võrreldes analüüsi kinnitusmeetodi abil kindlaksmääratud TEQ väärtusega. Tegelike valenegatiivsete tulemuste hulk peab jääma alla 1 %. Valepositiivsete proovide hulk peab olema nii väike, et sõelumismetodi kasutamisest oleks kasu.
- Positiivsed tulemused tuleb alati kinnitada kinnitusmeetodi (HRGC/HRMS) abil. Lisaks sellele tuleb suure TEQ väärtusega proovid (ligikaudu 2–10 % negatiivsete proovide arvust) kinnitada HRGC/HRMSiga. Teave biotestide ja HRGC/HRMS tulemuste vastavuse kohta tuleb teha kättesaadavaks.

7.3. Raku biotestide erinõuded

- Biotesti läbiviimisel on iga testi puhul nõutav TCDD või dioksiini/furaanisegu standardkontsentratsioonide seeria (täielik doosi ja toime kõver, kus $R^2 > 0,95$). Sõelumisel võib madala tasemega proovide puhul siiski kasutada madalale tasemele vastavat laiendatud kõverat.
- Biotesti tulemuste kontrolliks konstantsel ajavahemikul tuleb kvaliteedikontrolli kaardil kasutada TCDD standardkontsentratsiooni (ligikaudu kolmekordne kvantifikatsioonipiir). Alternatiiviks võib olla standardprooviga TCDD kalibreerimisjoone suhtes saadud tulemus, sest rakkude reaktsioon võib sõltuda paljudest teguritest.
- Tuleb koostada iga tüüpi etalonainete kvaliteedikontrolli kaardid ja neid kontrollida, et teha kindlaks, kas tulemused vastavad antud suunistele.

- Eelkõige kvantitatiivsete arvutuste puhul tuleb kasutada proovilahjendusi reageerimiskõvera lineaarse osa piires. Reageerimiskõvera lineaarset osa ületavad proovid tuleb lahjendada ja uuesti testida. Seetõttu ongi soovitatav testida samal ajal vähemalt kolme või enam lahjendust.
- Standardhälve ei tohi olla üle 15 % iga proovilahjenduse kolmekordsel määramisel ning üle 30 % kolme eri katse vahel.
- Avastamispriiriks võib seada fooninäidu või taustareaktsiooni kolmekordse standardhälbe. Alternatiivse võimalusena võib kasutada taustaväärtusest tugevamat reaktsiooni (induktsioonifaktoriks on fooninäidu viiekordne tase), mis arvutatakse päeva kalibreerimiskõveralt. Määramispriiriks võib seada fooninäidu või taustareaktsiooni viie- kuni kuuekordse standardhälbe või kasutada taustast selgelt tugevamat reaktsiooni (induktsioonifaktoriks on fooninäidu kümnekordne tase), mis arvutatakse päeva kalibreerimiskõveralt.

7.4. Komplekteeritud biotesti erinõuded

- Tuleb tagada, et komplekteeritud biotestid oleksid sööda analüüsimiseks piisavalt tundlikud ja usaldusväärsed.
- Tuleb järgida valmistaja juhtnööre proovide ettevalmistamise ja analüüside kohta.
- Pärast kasutusaja lõppemist ei tohi testikomplekte kasutada.
- Teiste komplektidega kasutamiseks ettenähtud materjale või komponente ei tohi kasutada.
- Testikomplekte tuleb säilitada kindlaksmääratud temperatuuril ja kasutada kindlaksmääratud kasutustemperatuuril.
- Immunoloogilise analüüsi avastamispriir on keskvärtuse ja kümnel pimekatse kordusanalüüsil põhineva standardhälbe kolmekordne summa, mis jagatakse lineaarse regressiooni võrrandi tõusunurgaga.
- Laboritestides tuleb kasutada tugietalone, tagamaks, et standardile vastavus on vastuvõetavates piirides.

8. Aruandlus

Selleks, et tulemuste aruanne sisaldaks võimalikult palju andmeid ja võimaldaks tulemuste tõlgendamist erinõuete kohaselt, peavad analüüsitulemused – kui kasutatud analüüsimetod seda võimaldab – hõlmama üksikute PCDD/F ja PCB analoogide sisaldust ning analüüsitulemused tuleb esitada alam- ja ülemtõkke ning vaheväärtusena.

Aruanne peab hõlmama ka proovide lipiidisisaldust ja lipiidide ekstraheerimiseks kasutatud meetodit.

Eri sisestandardite saagis tuleb teatada juhul, kui saagis jääb väljapoole punktis 6 nimetatud piire, kui on ületatud ülempiiri või kui sellest teatamist nõutakse.

Kuna proovi nõuetele vastavuse otsustamisel tuleb arvestada mõõtemääramatust, tuleb avaldada ka see näitaja. Seega esitatakse analüüsitulemus järgmisel kujul: $x \pm U$, kus x on analüüsitulemus ja U on laiendatud mõõtemääramatus, kusjuures kasutatakse kattetegurit 2, mis annab usaldusväärsuse tasemeks ligikaudu 95 %. Dioksiinide ja dioksiinilaadsete PCBde eraldi määramise korral tuleb dioksiinide ja dioksiinilaadsete PCBde summa jaoks kasutada nende ainete eraldiseisvate analüüside tulemusena saadud hinnangulise laiendmääramatuse summat.

Kui mõõtemääramatust võetakse arvesse CCa kohaldamisega (nagu on kirjeldatud käesoleva B osa I lisa punktis 2), tuleb see näitaja esitada.

VI LISA

**SÖÖDA AMETLIKUL KONTROLLIMISEL LOOMSE PÄRITOLUGA KOMPONENTIDE MÄÄRAMISE
ANALÜÜSIMEETODID****Mikroskoopuurimise tingimused loomse päritoluga osiste avastamiseks, kindlakstegemiseks või määramiseks
söödas****1. Eesmärk ja rakendusala**

Kõnealuseid tingimusi kasutatakse loomse päritoluga osiste (määratletud kui imetajate, kodulindude ja kalade ning nende kehaosade töötlemissaadused) tuvastamisel söödas mikroskoopuurimise teel loomasöödade valdkonna kooskõlastatud kontrolliprogrammi raames vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 882/2004 ⁽¹⁾. Tingimused, et käesolevas lisas toodud meetodeid kasutatakse kõigis ametlikes testides, võib teha ka teise testi variatiivse või alternatiivse meetodiga, et parandada teatavat tüüpi loomsete osiste avastamist või määrata täpsemalt loomsete osiste päritolu. Peale selle võib kasutada variatiivset protokollit teatavate konkreetsete loomsete osiste, näiteks plasma või kontide uurimisel sulatatud rasvas (vt ka punkt 9) tingimused, et kõnealused analüüsid tehakse lisaks kooskõlastatud kontrolliprogrammiga ettenähtud analüüsidele.

2. Tundlikkus

Sõltuvalt loomse päritoluga osistest saab söödas tuvastada väga väikeseid koguseid (< 0,1 %).

3. Põhimõte

Määramiseks kasutatakse I lisa sätete kohaselt võetud ja sobivalt ettevalmistatud representatiivset proovi. Väikese niiskusesisaldusega sööda käitlemiseks sobib järgmine protokoll. Sööta niiskusesisaldusega üle 14 % kuivatatakse (kondenseeritakse) enne käitlemist. Erisööt või söödamaterjalid (nt rasvad, õlid) vajavad eritöötlemist (vt punkt 9). Loomse päritoluga osised tehakse kindlaks tüüpiliste mikroskoobiga tuvastatavate näitajate alusel (nt lihaskiud ja muud lihaosakesed, kõhred, kondid, sarv, karvad, harjased, veri, suled, munakoored, kalaluud, soomused). Määramine peab toimuma nii proovi sõelumisel saadud fraktsioonide (6.1) kui kontsentreeritud sademes (6.2).

4. Reaktiivid**4.1. Fikseeriv reaktiiv****4.1.1. Klooraalhüdraat (60 % w/v)****4.1.2. Leelis (NaOH 2,5 % w/v või KOH 2,5 % w/v) sõelumisel saadud fraktsioonide jaoks****4.1.3. Parafiinõli või glütserool (viskoossus: 68–81) sademe mikroskoopiliseks vaatlemiseks****4.2. Loputusained****4.2.1. Alkohol, 96 %****4.2.2. Atsetoon****4.3. Kontsentreeriv reaktiiv****4.3.1. Tetrakloroetüleen (tihedus 1,62)**

⁽¹⁾ ELT L 165, 30.4.2004, lk 1. Parandatud väljaandes ELT L 191, 28.5.2004, lk 1.

4.4. Värvimiseks kasutatavad reaktiivid

- 4.4.1. Joodi ja kaaliumjodiidi lahus (lahustada 2 g kaaliumjodiidi 100 ml vees ja lisada pidevalt loksutades 1 g joodi)
- 4.4.2. Alisariinpunane (lahjendada 2,5 ml 1 M soolhapet 100 ml vees ja lisada saadud lahusele 200 mg alisariinpunast)
- 4.4.3. Tsüstiini määramise reaktiiv (2 g pliiatsetaati, 10 g NaOH/100 ml H₂O)
- 4.4.4. Joodi/kaaliumjodiidi lahus (lahustatud 70 % etanoolis)

4.5. Pleegitav reaktiiv

- 4.5.1 Tehnilise naatriumhüpokloriidi lahus (9,6 % aktiivkloori)

5. Seadmed ja abiseadmed

- 5.1. Analüütilised kaalud (täpsusaste 0,01 g, välja arvatud kontsentreeritud sademe puhul: 0,001 g)
- 5.2. Jahvatusmaterjal (jahvatusveski või uhmer, eriti sööda puhul, mis sisaldab analüüsil > 15 % rasva)
- 5.3. Kuni 0,50 mm laiuste ruudukujuliste võrguavadega sõel
- 5.4. Jaotuslehter või koonilise põhjaga selitusklaas
- 5.5. Stereomikroskoop (vähemalt 40-kordne suurendus)
- 5.6. Kombineeritud mikroskoop (vähemalt 400-kordne suurendus), mis võimaldab töötada nii läbiva kui ka polariseeritud valgusega
- 5.7. Laborites kasutatavad klaastooted

Kogu varustus puhastatakse põhjalikult. Jaotuslehtreid ja klaasnõusid tuleb pesta pesumasinas. Sõelu tuleb puhastada jäikade harjastega harjaga.

6. Töö käik

Granuleeritud söödad võib eelsõeluda, kui kumbagi fraktsiooni analüüsitakse eraldi proovina.

Vähemalt 50 g proovi töödeldakse (jahvatatakse ettevaatlikult sobiva jahvatusmasinaga (5.2), kui see on vajalik sobiva struktuuri saamiseks). Jahvatatud materjalist võetakse kaks representatiivset osa, üks sõelumisel saadava fraktsiooni jaoks (vähemalt 5 g) (6.1) ja teine kontsentreeritud sademe jaoks (vähemalt 5 g) (6.2). Tuvastamiseks võib täiendavalt kasutada värvimiseks kasutatavaid reaktiive (6.3).

Loomsete valkude ja osakeste päritolu määramiseks võib kasutada otsustamise abisüsteemi, nt ARIES, ja võrdlusproovid võib dokumenteerida.

6.1. Loomset päritolu osiste kindlakstegemine sõelumisel saadud fraktsioonides

Vähemalt 5 g proov sõelutakse sõeltega (5.3) vähemalt kahte fraktsiooni.

Sõelumisel saadud suurte osakeste fraktsioon(id) (või representatiivne osa sellisest fraktsioonist) kantakse õhukese kihina sobivale alusele ja uuritakse kavakindlalt stereomikroskoobiga (5.5) erinevatel suurendustel loomset päritolu osiste avastamiseks.

Sõelumisel saadud fraktsiooni(de)st tehtud peenosakeste objektiklaase uuritakse kavakindlalt kombineeritud mikroskoobiga (5.6) erinevatel suurendustel loomset päritolu osiste avastamiseks.

6.2. Loomset päritolu osiste kindlakstegemine kontsentreeritud sademes

Vähemalt 5 g osa (täpsusaste 0,01 g) proovist viiakse jaotuslehtrisse või koonilise põhjaga selitusklaasi ja töödeldakse vähemalt 50 ml tetrakloroetüleeniga (4.3.1). Segu loksutatakse või segatakse korduvalt.

- Kinnise jaotuslehtri kasutamisel jäetakse sade enne eraldamist piisavaks ajaks (vähemalt kolmeks minutiks) seisma. Loksutamist korratakse ja sademel lastakse uuesti vähemalt kolm minutit seista. Sade eraldatakse uuesti.
- Lahtise keeduklaasi kasutamisel jäetakse sade enne eraldamist vähemalt viieks minutiks seisma.

Kogu sade kuivatatakse ja seejärel kaalutakse (täpsusastmega 0,001 g). Kaalumise on vajalik üksnes juhul, kui nõutakse hinnangut. Kui sade koosneb paljudest suurtest osakestest, võib selle kahes fraktsioonis läbi sõela lasta (5.3). Kuivatatud sadet uuritakse stereomikroskoobi (5.5) ja kombineeritud mikroskoobi (5.6) abil, et leida kondifragmente.

6.3. Fikseerivate reaktiivide ja värvimisreaktiivide kasutamine

Loomse päritoluga osiste mikroskoopilist tuvastamist võib toetada spetsiaalsete fikseerivate reaktiivide ja värvimiseks kasutatavate reaktiividega.

Kloraalhüdraat (4.1.1): ettevaatlikul kuumutamisel on rakustruktuurid paremini näha, kuna tärkliiseterad geelistuvad ja soovimatu rakusisaldis eemaldatakse.

Leelis (4.1.2): naatriumhüdroksiid või kaaliumhüdroksiid puhastab materjali söödast, aidates kaasa lihaskiudude, karvade ja muude keratiinstruktuuride avastamisele.

Parafiinõli või glütserool (4.1.3): selles fikseerivas reaktiivis saab hästi kindlaks teha kondifragmente, kuna enamik lakuunidest püsib õhuga täidetuna ja paistab umbes 5–15 µm mustade aukudena.

Joodi ja kaaliumjodiidi lahus (4.4.1): kasutatakse tärgklise (sinakasvioletne värvus) ja valgu (kollakasoranž värvus) avastamiseks. Lahuseid võib vajaduse korral lahjendada.

Alisariinpunase lahus (4.4.2): kontidele, kalaluudele ja soomustele punase/roosa tooni andmine. Enne sademe kuivatamist (vt punkt 6.2) pannakse kogu sade katseklaasi ja loputatakse kaks korda ligikaudu 5 ml alkoholiga (4.2.1) (kummalgi korral kasutatakse keerist, lahustil lastakse umbes üks minut settida ja kallatakse ära). Enne kõnealuse värvimisreaktiivi kasutamist pleegitatakse sadet, lisades vähemalt 1 ml naatriumhüpokloriti lahust (4.5.1). Reaktsioonil lastakse kesta 10 minutit. Katseklaas täidetakse veega, sademel lastakse kaks kuni kolm minutit settida ning vesi ja suspendeeritud osakesed kallatakse ära. Sadet loputatakse veel kaks korda umbes 10 ml veega (kummalgi korral kasutatakse keerist, lastakse settida ja vesi kallatakse ära). Lisatakse kaks kuni kümme või rohkem tilka (sõltuvalt jäägi kogusest) alisariinpunase lahust. Segu loksutatakse ja reaktsioonil lastakse mõned sekundid toimuda. Värvitud sadet loputatakse kaks korda ligikaudu 5 ml alkoholiga (4.2.1), seejärel üks kord atsetooniga (4.2.2) (iga kord kasutatakse keerist, lahustil lastakse umbes üks minut settida ja kallatakse ära). Seejärel on sade valmis kuivatamiseks.

Tsüstiini määramise reaktiiv (4.4.3): Ettevaatlikul kuumutamisel muutuvad tsüstiini sisaldavad osised (karvad, suled jne) mustjaspruuniks.

6.4. Kalajahu sisaldada võiva sööda uurimine

Vähemalt ühte peensõelumisel saadud fraktsiooniga ja sademe peenfraktsiooniga objektiklaasi uuritakse kombineeritud mikroskoobi abil (vt punktid 6.1 ja 6.2).

Kui sildil on kirjas, et koostisosade hulka kuulub kalajahu, või kui kahtlustatakse või algsel uurimisel tuvastatakse kalajahu olemasolu, uuritakse vähemalt kahte täiendavat objektiklaasi algse proovi peensõelumisel saadud fraktsioonist ja kogu sademefraktsiooni.

7. Arvutused ja hindamine

Liikmesriigid tagavad, et käesolevas punktis kirjeldatud menetlusi kasutatakse ametliku analüüsi läbiviimisel eesmärgiga hinnata loomsete koostisosade kogust (ja mitte üksnes olemasolu).

Arvutusi saab teha ainult sel juhul, kui loomset päritolu komponendid sisaldavad kondifragmente.

Soojavereliste maismaaliikide (s.t imetajate ja lindude) kondifragmentid on mikroskoopslaididel eri liiki kalade luudest eristatavad iseloomulike lakuunide järgi. Loomse päritoluga osiste määramisel proovis võetakse arvesse järgmist:

- kondifragmentide määratud sisaldust (massiprotsenti) kontsentreeritud sademes ja
- loomse päritoluga osiste kondisisaldust (massiprotsenti).

Määrang peab võimaluse korral põhinema vähemalt kolmel slaidil, kusjuures iga slaidi korral võetakse arvesse vähemalt viie vaatevälja andmed. Segasöötadest saadud kontsentreeritud sade sisaldab tavaliselt peale maismaaloomade kondifragmentide ja kalade luufragmentide ka muid suure erikaaluga osakesi: nt mineraalosiid, liiva, puitunud taimeosiid jms.

7.1. Hinnanguline kondifragmentide protsendi arvutamine

Maismaaloomade kondifragmentide % = $(S \times c)/W$

Kalade luu- ja soomusefragmentide % = $(S \times d)/W$

(kus S on sademe kaal (mg); c on parandustegur (%), millega võetakse arvesse maismaaloomade kondifragmentide hinnangulist sisaldust sademes; d on parandustegur (%), millega võetakse arvesse kalade luu- ja soomusefragmentide hinnangulist sisaldust sademes; W on proovi mass (mg), millest sade on saadud).

7.2. Loomse päritoluga osiste hinnanguline sisaldus

Kondisisaldus loomset päritolu toodetes võib tugevasti varieeruda. (Kondisisaldus kondijahus on 50–60 % ja lihajahus 20–30 %; kalajahus varieerub luu- ja soomusesisaldus sõltuvalt kalajahu liigist ja päritolust, tavaliselt 10–20 %).

Kui proovis sisalduva loomset päritolu jahu liik on teada, on võimalik arvutada järgmised sisaldused:

Maismaaloomadest saadud toodete hinnanguline sisaldus (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Kalatoodete hinnanguline sisaldus (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

(kus S on sademe kaal (mg); c on parandustegur (%), millega võetakse arvesse maismaaloomade kondifragmentide hinnangulist sisaldust sademes; d on parandustegur (%), millega võetakse arvesse kalade luu- ja soomusefragmentide hinnangulist sisaldust sademes; f on parandustegur, millega võetakse arvesse uuritava proovi loomse päritoluga osiste kondisisaldust; W on proovi kaal (mg), millest sade on saadud).

8. Uurimistulemuste väljendamine

Aruanne sisaldab vähemalt teavet maismaaloomadest ja kalajahust saadud osiste olemasolu kohta. Uurimistulemused protokollitakse järgmiselt.

8.1. Maismaaloomadest saadud osiste olemasolu korral:

- analüüsimiseks esitatud proov ei sisalda mikroskoopiliselt avastatavaid maismaaloomadest saadud osiseid
või
- analüüsimiseks esitatud proov sisaldab mikroskoopiliselt avastatavaid maismaaloomadest saadud osiseid.

8.2. Kalajahu olemasolu korral:

- analüüsimiseks esitatud proov ei sisalda mikroskoopiliselt avastatavaid kalast saadud osiseid
või
- analüüsimiseks esitatud proov sisaldab mikroskoopiliselt avastatavaid kalast saadud osiseid.

Kalast või maismaaloomadest saadud osiste leidmisel võib uurimistulemuse aruandesse vajaduse korral täiendavalt märkida avastatud osiste hinnangulise koguse ($x\%$, $< 0,1\%$, $0,1-0,5\%$, $0,5-5\%$ või $> 5\%$), võimaluse korral maismaalooma liigi täpsema määratluse ja tuvastatud loomsed koostisosad (lihaskiud, kõhred, kondid, sarv, karvad, harjased, suled, veri, munakoored, kalaluud, soomused).

Loomsete koostisosade koguse hindamisel mainitakse kasutatud parandustegurit f .

Maismaaloomade kondifragmentide tuvastamisel sisaldab aruanne järgmist punkti:

„Ei saa välistada, et mainitud osised pärinevad imetajatelt.”

Seda täiendavat lauset ei ole vaja, kui on kindlaks tehtud, et kõnesolevad maismaaloomade kondifragmendid pärinevad kodulindudel või imetajatelt.

9. Rasva ja õli analüüsimise kohta vabatahtlikult täidetav protokoll

Rasva ja õli analüüsimiseks võib kasutada järgmist protokoll:

- kui rasv on tahke, soojendatakse seda näiteks mikrolaineahjus kuni vedeldumiseni;
- pipeti abil viiakse 40 ml rasva proovi põhjast tsentrifuugiküveti;
- tsentrifuugitakse 10 minutit pöörlemisagedusel 4 000 p/min;
- kui rasv on pärast tsentrifuugimist tahke, soojendatakse seda veel kord ahjus kuni vedeldumiseni. Tsentrifugimist korratakse viis minutit pöörlemisagedusel 4 000 p/min;
- väikese lusika või spaatli abil viiakse pool dekanteeritud lisanditest väikesesse Petri tassi või mikroskoopslaidile, et tuvastada mikroskoobi abil võimalike loomsete osiste (lihaskiud, suled, kondifragmendid) olemasolu. Mikroskoopia fikseeriva reaktiivina soovitatakse kasutada parafiinõli või glütserooli;
- järelejäänud lisandeid kasutatakse sadestamiseks vastavalt punktis 6.2 toodud kirjeldusele.

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 korrigeerituna) megadžaulides (MJ) segasööda kilogrammi kohta:

Ainevahetuses tekkiv energia (MJ/kg) = $0,1551 \times \text{kogu valgu protsent} + 0,3431 \times \text{kogu rasva protsent} + 0,1669 \times \text{tärglise protsent} + 0,1301 \times \text{sahharoosina väljendatud üldsuhkru protsent}$

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 valemit kasutades saadud tulemus tuleb esitada ühe kümnendkoha täpsusega.

4. **Proovivõtu- ja analüüsimetodid**

Proovid tuleb segasöödast võtta ja arvutusmeetodis märgitud analüütiliste koostisosade sisaldus tuleb kindlaks määrata vastavalt sööda ametlikuks kontrolliks ettenähtud ühenduse proovivõtu- ja analüüsimetoditele.

Kasutatakse järgmisi meetodeid:

- kogu rasvasisalduse määramiseks: III lisa H osas sätestatud meetod B toorõli- ja -rasvasisalduse määramiseks;
- tärglisesisalduse määramiseks: III lisa L osas sätestatud polarimeetriline meetod.

VIII LISA

SÖÖDAS MITTE ENAM LUBATUD LISANDITE EBASEADUSLIKU SISALDUSE KONTROLLIMISE
ANALÜÜSIMETODID*Olulised märkused*

Et avastada söödas mitte enam lubatud lisandite ebaseaduslikku sisaldust, võib kasutada käesoleva lisa analüüsimetoditest tundlikumaid analüüsimetodeid.

Käesolevas lisas nimetatud analüüsimetodeid kasutatakse kinnitamiseks.

A. METÜÜLBENSOKAADI MÄÄRAMINE

7-bensüüloksü-6-butiül-3-metoksükarboniül-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 metanoolilahusega. Ekstrakt puhastatakse diklorometaaniga ioonvahetuskromatograafia abil ja seejärel uuesti diklorometaaniga. Metüülbensokaadi sisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (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. Katioonvahetusvaik Amberlite CG-120 (Na-vormis), 100–200 mešši.

Vaiku töödeldakse enne kasutamist 100 g vaiku immutatakse 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 veepartsjonitega 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)
- 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 diodireadetektoriga
- 4.4.1. Vedelik-kromatograafia 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 koonilise 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 ekstraksiooniks (5.3).
- 5.3. *Vedelik-vedelik-ekstraksioon*
- 500 ml jaotuslehtrisse, mis sisaldab 100 ml soolhappe lahust (3.5), viiakse 25,0 ml punktis 5.2 saadud filtraati. Lehtrisse lisatakse 100 ml 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. Katioonvahetuskolonne ettevalmistamine

Klaasvatist tropp asetatakse klaaskolonne (4.3) põhja. 5,0 g töödeldud katioonvahetusvaiku (3.6) immutatakse 50 ml soolhappega (3.5), valatakse klaaskolonne ja lastakse settida. Liigsel happel lastakse läbi kolonne voolata, kuni happe nivoo on jõudnud vaigu ülemise pinnani, ja kolonne pestakse veega, kuni väljavoolav pesuvesi on lakmuse suhtes neutraalne. 50 ml metanooli (3.2) viiakse kolonne ja lastakse läbi kolonne voolata, kuni metanooli nivoo on jõudnud vaigu pinnani.

5.4.2. Kolonnkromatograafia

Pipeti abil viiakse punktis 5.3 saadud ekstrakt ettevaatlikult kolonne. Ümarkolbi loputatakse kahe 5–10 ml metanooli (3.2) portsjoniga ja need pesuvedelikud viiakse kolonne. Ekstraktil lastakse läbi kolonne voolata, kuni ekstrakti nivoo on jõudnud vaigu pinnani, ja kolonne 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 kolonne eluaat kogutakse 250 ml koonilisse kolbi.

5.5. Vedelik-vedelik-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 membraanfiltrit (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;
- sissesüstiv ruumala: 20–50 µl.

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides kolonne 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 abstsissiteljele 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 $\mu\text{g/ml}$;

m = kaalutise mass grammides.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. Identsus

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades dioodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja 10 $\mu\text{g/ml}$ 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 poolaluse kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti metüülbensokaadi piigi laiusest.

7.1.2. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- 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;
- 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;
- vahemikus 220–350 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 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. Ühisuuringu 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

	Võrdlussõöt	Jahu 1	Graanulid 1	Jahu 2	Graanulid 2
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'-(hüdrosüetüül)karbamoiül]-3-metüülkinoksaliin-N¹,N⁴-dioksiid)

1. Eesmärk ja rakendusala

Selle meetodiga on võimalik määrata olakvindoksi taset söödas. Määramispiir on 5 mg/kg.

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse metanooli vesilahuses. Olakvindoksisisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikromatograafia (HPLC) abil, kasutades ultraviolettdetektorit.

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'-(hüdrosüetüül)karbamoiül]-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. Vedelikukromatograafia 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 võrdlussööta, veendumaks, et selles ei ole ei olakvindoksit ega segavaid aineid.
- 5.1.2. Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, 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 koonilisse kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitrini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerima (5.2) asumist veel mitu korda.

Märkus: selle meetodi puhul peab võrdlussööt olema prooviga samalaadne 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 kurdfiltrid. 10,0 ml filtraati kallatakse 20 ml mõõtekolbi, täidetakse veega kuni märgini ja segatakse. Alikvootne osa filtreeritakse läbi membraanfiltrid (4.4). (vt tähelepanek 9). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.3. HPLC määramine**5.3.1. Parameetrid**

Soovitatakse juhinduda 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 olakvindoksiipide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kalibreerimisgraafiku (5.3.2) abil proovilahuse kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$).

Proovi olakvindoksisisaldus w (mg/kg) arvutatakse järgmise valemi alusel:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

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 dioodireadetektorit, 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 olakvindoksiipi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti olakvindoksiipi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine dioodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt $\pm 2 \text{ nm}$;
- 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;
- 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 %.

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati EÜ ühisuuring, mille käigus kuni 13 laborit analüüsisid nelja põrsasööda proovi, millest üks oli võrdlussööt. 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 meetodit ei ole kontrollitud söötade suhtes, mille olakvindiksisisaldus 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 kõrgefektiivse 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. Naatriumperkloraadi lahus, $c = 1,6 \text{ mol/l}$
- 1 000 ml mõõtekolvis lahustatakse vees (3.3) 224,74 g naatriumperkloraadi monohüdraati, täidetakse kolb veega (3.3) kuni märgini ja segatakse.
- 3.6. HPLC liikuv faas (vt tähelepanek 9.1).
- Atsetonitrili (3.2), naatriumdivesinikfosfaadi lahuse (3.4) ja naatriumperkloraadi lahuse (3.5) segu, $450 + 450 + 100 \text{ (v+v+v)}$. Enne kasutamist filtreeritakse lahus läbi $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ membraanfiltrit (4.3) ja degaseeritakse (nt ultrahelivannis (4.4) vähemalt 15 minutit).
- 3.7. Standardaine: puhas amproolium, 1-[(4-amino-2-propüülpirimidiin-5-üül)metüül]-2-metüülpiridiiniumkloriid-hüdrokloriid, E 750 (vt 9.2).
- 3.7.1. Amprooliumi põhistandardlahus, $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$
- 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 $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.
- 3.7.2. Amprooliumi vahestandardlahus, $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$
- 5,0 ml põhistandardlahust (3.7.1) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi, täidetakse see ekstrahendiga (3.8) kuni märgini ja segatakse. Temperatuuril $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ säilib lahus muutumatuna 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 $\mu\text{g/ml}$. 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 $100 \text{ }\mu\text{l}$.
- 4.1.1. Vedelikukromatograafia kolonn $125 \times 4 \text{ mm}$, katioonvahetaja Nucleosil 10 SA, täidise terasuurus 5 või $10 \text{ }\mu\text{m}$ või samaväärne
- 4.1.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor
- 4.2. Membraanfilter, polütetrafluoroetüleenist, $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.
- 4.3. Membraanfilter $0,22 \text{ }\mu\text{m}$.
- 4.4. Ultrahelivann
- 4.5. Mehaaniline loksuti või magnetsegur
5. **Töö käik**
- 5.1. *Üldsätted*
- 5.1.1. Võrdlussööd
- Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs, veendumaks, et selles ei ole ei amprooliumi ega segavaid aineid. Võrdlussööd peab olema prooviga samalaadne ja selles ei tohi leiduda amprooliumi või segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatse

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 lahust ligikaudu 0,5 milliliitri. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerimata (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 membraanfiltril (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 membraanfiltril (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, katioonvahetaja 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

Sissesüstiv ruumala: 100 µl

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 ($\mu\text{g/ml}$) prooviekstraktis (5.2);

f = punkti 5.2 kohane lahjendusfaktor;

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 lahjendust, peab tõusma üksnes amprooliumipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti amprooliumipiigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine diodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;
- 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;
- 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

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 mol/l) amprooliumi lahuse (c = 0,02 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-kinoksaliinüülmetüleen)karbasaat-N¹,N⁴-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 vedelikukromatograafia (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 milliliitrini.
- 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 märgini 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).
- 3.11. Standardaine
- Puhas karbadoks: metüül-3-(2-kinoksalinüülmetüleen)karbasaat- N^1, N^4 -dioksiid, E 850
- 3.11.1. Karbadoksi põhistandardlahus, 100 $\mu\text{g/ml}$ (vt märkus 5. Töö käik).
- 25 mg karbadoksi standardinet (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 $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.
- 3.11.2. Kalibreerimislahused
- 2,0, 5,0 10,0 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 $\mu\text{g/ml}$.
- 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 $\mu\text{g/ml}$.
- 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 klaasfiltriga ja äravooluklapiga.

Märkus: kasutada võib ka sulgemiskraaniga või koonuseks töödeldud otsaga klaaskoloni; sel juhul pannakse koloni alumisse otsa väike klaasvillatrop, mis tambitakse klaaspulgaga tihedaks.

- 4.4. HPLC seade koos sissepritsesüsteemiga, mis võimaldab süstida 20 µl.

- 4.4.1. Vedelikchromatograafia 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

5. Töö käik

Märkus: karbadoks on valgustundlik. Kõik protseduurid tehakse nõrgas valguses või kasutatakse tumedat või alumiiniumfooliumi mähitud anumaid.

5.1. Üldsätted

5.1.1. Võrdlussööt

Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs, veendumaks, et selles ei ole ei karbadoksi ega segavaid aineid. Võrdlussööt peab olema prooviga samalaadne ja selles tohi leiduda karbadoksi ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatset 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 ekstraheerimist (5.2) asumist 10 minutiks seisma.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussööt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatset 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. Sööt

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 atsetonitrili 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 atsetonitrili segu (3.5), korgitakse kinni ja loksutatakse 30 minutit loksutil või segatakse magnetseguril (4.1). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiust filterpaberi (4.2).

Filtraadi alikvoot pipetatakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 15,0 ml vett, täidetakse kolvid metanooli ja atsetonitriili seguga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Lõpplahuse karbadoksikonsentratsioon 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), 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 lõppkonsentratsioon 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. Alumiiniumoksiidikoloni 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 juhinduda järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need annavad samaväärsed tulemused):

Vedelikkromatograafia

kolonn (4.4.1): 300 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm või samaväärne

Liikuv faas (3.10): atsetaathapalahuse (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) preparaate puhul] süstitakse mitu korda ja määratakse karbadoksipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse karbadoksi piikide keskmise kõrguse (pindala) järgi määratakse proovilahuse karbadoksikonsentratsioon µg/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 preparaate puhul);

f = punkti 5.2.2 (eelsegud) või 5.2.3 (preparaadid) 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 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 lahendust, peab tõusma üksnes karbadoksipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti karbadoksipiigi laiusest.

7.1.2. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori puhul on see tavaliselt vahemikus $\pm 2 \text{ nm}$;
- 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;
- 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. (Üksikasjalikumad 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
CV _R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nominaalsisaldus (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

5. **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

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

17. **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