

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

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

Muudetud:

		Euroopa Liidu Teataja		
		nr	lehekülg	kuupäev
► <u>M1</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 278/2012, 28. märts 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 51/2013, 16. jaanuar 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 691/2013, 19. juuli 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 709/2014, 20. juuni 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Komisjoni määrus (EL) 2017/645, 5. aprill 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Komisjoni määrus (EL) 2017/771, 3. mai 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Komisjoni rakendusmäärus (EL) 2020/1560, 26. oktoober 2020	L 357	17	27.10.2020
► <u>M8</u>	Komisjoni rakendusmäärus (EL) 2022/893, 7. juuni 2022	L 155	24	8.6.2022
► <u>M9</u>	Komisjoni rakendusmäärus (EL) 2024/771, 29. veebruar 2024	L 771	1	15.3.2024

▼B**KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 152/2009,****27. jaanuar 2009,****milles sätestatakse proovivõtu- ja analüüsimeetodid sööda ametlikuks kontrolliks****(EMPs kohaldatav tekst)****▼M3***Artikkel 1***▼M9**

Sööda ametlikuks kontrolliks (välja arvatud mikrobioloogilise saastumise kontrolliks), eriti sööda koostisosade määramiseks, sealhulgas geneetiliselt muundatud organisme (GMO) sisaldavate või neist toodetud koostisosade, Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruses (EÜ) nr 1831/2003 ⁽¹⁾ määratletud söödalisandite ning Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivis 2002/32/EÜ ⁽²⁾ määratletud soovimatute ainete määramiseks, tuleb proove võtta I lisas esitatud meetoditega.

▼M3

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

▼B*Artikkel 2*

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

Artikkel 3

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

Artikkel 4

Kodulindude segasööda energiasisaldus arvutatakse vastavalt VII lisale.

⁽¹⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2003. aasta määrus (EÜ) nr 1831/2003 loomasöötades kasutatavate söödalisandite kohta (ELT L 268, 18.10.2003, lk 29).

⁽²⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 7. mai 2002. aasta direktiiv 2002/32/EÜ, loomasöötades sisalduvate ebasoovitavate ainete kohta (EÜT L 140, 30.5.2002, lk 10).

⁽³⁾ EÜT L 70, 16.03.2005, lk 1.

*Artikkel 5*

Analüüsimetodeid selliste VIII lisas sätestatud lisandite ebaseadusliku 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.

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.

▼ **M9***I LISA***PROOVIVÕTUMEETODID****1. EESMÄRK JA KOHALDAMISALA**

Sööda ametlikuks kontrolliks ettenähtud proovid võetakse allpool kirjeldatud meetodite kohaselt. Selliselt saadud proove käsitatakse proovipartiid esindava proovina.

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

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

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

Proovivõtt võib hõlmata ka sööta, mida söödakäitlejad pakuvad müügiks sidevahendite kaudu vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EÜ) nr 767/2009 ⁽¹⁾ artikli 11 lõikele 3. Sidevahendite kaudu müügiks pakutavast söödast võetakse proove põhimõtteliselt vastavalt käesolevas lisas esitatud punktidele. Konkreetseid kaugmüügitoodetest proovi võtmise aspekte kirjeldatakse 11. punktis.

2. MÕISTED

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

— Proovipartii: partii või identifitseeritav osa partiist või alampartiist.

— Pitseeritud proov: proov, mis on pitseeritud niimoodi, et on välistatud juurdepääs proovile ilma pitserit purustamata või eemaldamata.

⁽¹⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 13. juuli 2009. aasta määrus (EÜ) nr 767/2009 sööda turuleviimise ja kasutamise kohta, millega muudetakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrust (EÜ) nr 1831/2003 ning tunnistatakse kehtetuks nõukogu direktiivid 79/373/EMÜ, 82/471/EMÜ, 83/228/EMÜ, 93/74/EMÜ, 93/113/EÜ ja 96/25/EÜ, komisjoni direktiiv 80/511/EMÜ ning komisjoni otsus 2004/217/EÜ (ELT L 229, 1.9.2009, lk 1).

▼M9

- Üksikproov: proovipartii ühest punktist võetud kogus.
- Koondproov: ühe ja sama proovipartii üksikproovidest kogutud proov.
- Vähendatud proov: koondproovi osa, mis on saadud koondproovi esindava vähendamise teel.
- Lõpp-proov: (segatud) koondproovi, vähendatud proovi või homogeenitud koondproovi osa, sõltuvalt kontrolli liigist (vt punkt 9.4).
- Laboratoorne proov: laboris kasutamiseks ettenähtud proov (mis on toimetatud laborisse), mis võib olla lõpp-proov, vähendatud proov või koondproov.
- Kaugmüügitoote proov: sidevahendite kaudu müügiks pakutava sööda partiist võetud proov.

3. ÜLDSÄTTED

- Proove peavad võtma isikud, keda on selleks volitanud pädev asutus.
- Kaugmüügitoote proovi jaoks palub pädev asutus söödakäitlejalt sidevahendite kaudu teatavat söödakogust.
- Proov tuleb pitseerida niimoodi, et oleks välistatud juurdepääs proovile ilma pitserit purustamata või eemaldamata.

Pitser peab olema selgelt identifitseeritav ja hästi nähtav.

- Proovi tunnusandmed: proov tuleb kustumatult märgistada ja niimoodi identifitseerida, et see oleks selgelt seostatav proovivõtuaruandega.
- Igast koondproovist või vähendatud proovist tuleb võtta vähemalt järgmised lõpp-proovid: üks proov kontrollimiseks (täitemenetluseks) ja üks söödakäitlejale (apellatsiooniks). Lisaks võib võtta veel ühe võrdlusproovi. Kui kogu koondproov homogeenitakse, võetakse lõpp-proovid homogeenitud koondproovist, välja arvatud juhul, kui see on vastuolus liikmesriikides söödakäitleja õiguste kohta kehtivate eeskirjadega.
- Määruse (EL) 2017/625 artikli 15 lõigete 1 ja 2 kohaselt teevad söödakäitlejad juhul, kui see on ametliku proovivõtu jaoks vajalik, pädevate asutuste nõudmisel järgmist:
 - võimaldavad pädevate asutuste töötajatele juurdepääsu nende kontrolli all olevatele seadmetele, tehes sealhulgas vajaduse korral kättesaadavaks nõuetekohased proovivõtuseadmed ja isikukaitsevahendid;
 - abistavad pädevate asutuste töötajaid ja teevad nendega koostööd, et võimaldada proovide võtmist, sealhulgas tagades pädevate asutuste töötajatele juurdepääsu söödale.

▼ **M9**

4. SEADMED

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

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

4.2.1.1. Lamedapõhjaline püstiste servadega proovivõtukühvel.

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

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

4.2.2. *Mehaaniline proovivõtmine*

Laaditavast sõõdast proovide võtmiseks võib kasutada asjakohaseid mehaanilisi proovivõtuseadmeid. Mehaanilisi proovivõtuseadmeid loetakse sobivaks, kui proove võetakse kogu sõõdavoo läbilõikest.

Suure kiirusega liikuvast sõõdast võib proove võtta automaatse seadmega.

4.2.3. *Jaotur*

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

5. ÜKSIKPROOVIDE ARVU NÕUDED

— Punktides 5.1 ja 5.2 üksikproovide arvu kohta kehtestatud nõudeid kohaldatakse selliste kuni 500-tonniste proovipartiide suhtes, millest on võimalik võtta esindavaid proove. Kirjeldatud proovivõtmemenetlus kehtib ka osutatud suurimast proovipartiist suuremate koguste puhul, kui ei järgita punktide 5.1.1, 5.1.3 ja 5.1.5 tabelites esitatud suurimat üksikproovide arvu, vaid üksikproovide arv määratakse ruutjuurevalemiga, mis on esitatud menetluse kirjelduse asjaomases kohas (vt punkt 5.3), ning vähima koondproovi suurust suurendatakse võrdeliselt. See ei takista suurte partiide jagamist väiksemateks alampartiideks, nii et igast alampartiist võetakse proove punktides 5.1 ja 5.2 kirjeldatud menetluse kohaselt.

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

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

▼M9

- Kaugmüügitoodete proovide puhul ei tea pädev asutus harilikult selle partii suurust, millest ta teatavat kogust nõuab. Seepärast ei ole võimalik punktides 5.1 ja 5.2 osutatud menetlust kasutada. Sel juhul kohaldatakse 11. punktis kirjeldatud menetlust.
- Kui söödakäitleja peab kehtivate õigusaktide kohaselt täitma käesoleva määruse nõudeid seoses kohustusliku seirega, võib ta kalduda kõrvale käesolevas punktis esitatud koguselistest nõuetest, et võtta arvesse tegevuse iseloomulikke näitajaid, tingimusel et söödakäitleja on pädevale asutusele rahuldavalt tõendanud, et kõnealune proovivõtumenetlus on sama esindav, ja kui ta on saanud pädevalt asutuselt sellekohase loa.
- Kui koguselisi nõudeid silmas pidades ei ole võimalik kasutada kirjeldatud proovivõtumeetodit, kuna partii kahjustamise tõttu kaasnaksid sellega vastuvõetamatud kaubanduslikud tagajärjed (seoses pakkimisviisiga, veovahendiga, ladustamisviisiga vms), võib erandjuhul kohaldada teistsugust proovivõtumeetodit, kui see on sama esindav ning kui kogu menetlust täpselt kirjeldatakse ja dokumenteeritakse.

5.1. Söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimiseks võetavate üksikproovide arvu nõuded

5.1.1. Lahtine tahke sööt

Proovipartii suurus	Vähim üksikproovide arv
≤ 2,5 tonni	7
> 2,5 tonni	√ (20 korda proovipartii suurus tonnides) (*), kuid kuni 40 üksikproovi

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

5.1.2. Lahtine vedel sööt

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

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

5.1.3. Pakendatud sööt

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

Proovipartii suurus	Vähim pakkeühikute arv, millest tuleb võtta (vähemalt) üks üksikproov (*)
1–20 pakkeühikut	1 pakkeühik (**)
21–150 pakkeühikut	3 pakkeühikut (**)

▼ **M9**

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

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

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

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

5.1.4. *Söödabriketid ja lakukivid*

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

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

5.1.5. *Koresööt*

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

(*) Märgitakse, et teatavatel juhtudel (nt silo korral) ei ole võimalik võtta nõutavat arvu üksikproove, ilma et sellega ei tekitataks partiile vastuvõetamatut kahju. Sel juhul võib kasutada muud proovivõtumeetodit ning juhised sellistest partiidest proovide võtmiseks on välja töötatud ning kättesaadavad järgmisel veebiaadressil: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

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

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

Kõnealused üksikproovide proovide arvu nõuded kehtivad järgmistel kontrollijuhtudel:

— aflatoksiinide, hariliku tungaltera ning muude mükotoksiinide ja ohtlike botaaniliste lisandite sisaldus söödamaterjalis;

— ristsaastumine, mille on põhjustanud koostisosa, sealhulgas geneetiliselt muundatud materjal, või aine, mis eeldatavasti võib olla söödas ebaühtlaselt jaotunud.

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

▼ **M9**

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

5.3. **Proovide arvu nõuded väga suurte partiide üksikproovide korral**

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

6. **KOONDPROOVI KOGUSELISED NÕUDED**

Nõutav on üks koondproov proovipartii kohta.

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

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

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

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

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

▼M9

7. LÕPP-PROOVI KOGUSELISED NÕUDED

Lõpp-proovid

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

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

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

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

(***) Pestitsiidijääkide määramiseks kaunviljas, teraviljas ja pähklipuu viljades peab lõpp-proovi miinimumkogus olema komisjoni 11. juuli 2002. aasta direktiivi 2002/63/EÜ (millega kehtestatakse ühenduse proovivõtumeetodid taimsetes ja loomsetes saadustes sisalduvate ja nende pinnal esinevate pestitsiidide jääkide ametlikuks kontrollimiseks ning tunnistatakse kehtetuks direktiiv 79/700/EMÜ (EÜT L 187, 16.7.2002, lk 30)) sätete kohaselt 1 kg.

(****) (****) Vaatluse teel või mikroskoobi abil kontrollimisel on lõpp-proovi kogus 1 kg.

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

8.1. Üldpõhimõtted

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

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

Kui proove võetakse käesolevas punktis kirjeldatud viisil, tuleb sõodakäitlejat või tema esindajat teavitada proovivõtumenetlusest. Kui sõodakäitleja või tema esindaja seab kahtluse alla kõnealuse proovivõtumeetodi, peab sõodakäitleja või tema esindaja lubama pädeval asutusel võtta proove kogu partiist sõodakäitleja kulul.

8.2. Laevaga transporditavad suured partiid

8.2.1. Laevaga transporditavast partiist liikuvast tootest proovide võtmine

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

Proove võetakse igast lastiruumi osast, mida on võimalik füüsiliselt eraldada. Selliseid lastiruumi osi aga tühjendatakse osaliselt üksteise järel nii, et hoidlasse laadimisel kaob partii osade algne füüsiline eraldatus. Proove võib võtta kas algse füüsilise eraldatuse olukorras või pärast lattu viimist.

▼ **M9**

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

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

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

8.2.2. *Laevaga transporditavast partiist liikumatust tootest proovide võtmine*

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

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

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

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

8.4. **Proovide võtmine hoidlatest (tornhoidlad)**

8.4.1. *Proovide võtmine ülalt (kergesti) ligipääsetavatest mahutitest*

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

▼ **M9**

8.4.2. *Proovide võtmine hoidlatest, millele puudub juurdepääs ülalt (suletud mahutid)*

8.4.2.1. Hoidlad, millele puudub juurdepääs ülalt (suletud mahutid), mahuga > 100 tonni

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

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

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

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

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

9. **PROOVIDE VÕTMISE, ETTEVALMISTAMISE JA PAKENDAMISE JUHISED**

9.1. **Üldsätted**

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

9.2. **Üksikproovid**

Üksikproove tuleb võtta pisteliselt ja ühtlaselt kogu proovipartii ulatuses ja need peavad olema ligikaudu võrdse suurusega.

Üksikproov peab olema vähemalt 100 g või madala eritihedusega kore-sööda puhul 25 g.

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

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

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

▼ **M9**

Kaugmüügitoodete proovide puhul sõltub üksikproovi suurus pakendi suurusest ning võib üksikjuhtudel olla ka väiksem kui 100 g või 100 ml.

9.2.1. *Lahtine sõöt*

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

9.2.2. *Pakendatud sõöt*

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

9.2.3. *Homogeenne või homogeenitav vedel või poolvedel sõöt*

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

Üksikproove võib võtta mahutite tühjendamise ajal.

9.2.4. *Mittehomogeenitav vedel või poolvedel sõöt*

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

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

Mõlemal juhul peab võetav kogus olema vähemalt 10 liitrit.

9.2.5. *Söödabriketid ja lakukivid*

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

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

9.3. **Koondproovide ettevalmistamine**

Ühtne koondproov saadakse üksikproovide kokkusegamise abil.

9.4. **Lõpp-proovide ettevalmistamine**

Koondproovi materjal segatakse hoolega ⁽¹⁾.

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

9.4.1. *Ühtlaselt jaotunud ained*

Kui kontrollitakse sõõta, milles koostisosad või ained on ühtlaselt jaotunud, võib koguda esindava vähendatud koondproovi, mille suurus on vähemalt 2,0 kg või 2,0 l (vähendatud proov), ⁽²⁾ kasutades eelistatult mehaanilist või automaatjaoturit. Et kontrollida pestitsiidide jääke kaunviljades, teravilja terades ja päiklipuu viljades, peab vähendatud

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

⁽²⁾ Välja arvatud madala eritihedusega kuiv- ja koresõõd.

▼ **M9**

proovi suurus olema vähemalt 3 kg. Kui sööda olemus ei võimalda jaoturit kasutada või kui jaoturit ei ole, tuleb proovi vähendada kvarteerimismeetodil.

Koondproovist või vähendatud proovidest võetakse enam-vähem ühesuurused ja 7. punkti koguselistele nõuetele vastavad lõpp-proovid (kontrollproov, apellatsiooniproov ja võimalik võrdlusproov).

9.4.2. *Ebaühtlaselt jaotunud ained*

Kui kontrollitakse koostisosi, sealhulgas geneetiliselt muundatud materjali, või aineid, mis võivad olla söödas ebaühtlaselt jaotunud, peab koondproov olema:

- i) täielikult homogeenitud. Seejärel võetakse homogeenitud koondproovidest enam-vähem ühesuurused ja 7. punkti koguselistele nõuetele vastavad lõpp-proovid (kontrollproov, apellatsiooniproov ja võimalik võrdlusproov); või
- ii) vähendatud suuruseni vähemalt 2 kg või 2 l⁽¹⁾ mehaanilise või automaatjaoturiga; kui sööda olemuse tõttu ei ole võimalik jaoturit kasutada, võib proovi vähendada ka kvarteerimismeetodil. Et kindlaks teha geneetiliselt muundatud materjali olemasolu vastavalt määrusele (EL) nr 619/2011, peab vähendatud proovis olema vähemalt 35 000 seemet/tera, et sellest saaks vähemalt 10 000 seemet/tera sisaldava kontrollproovi, apellatsiooniproovi ja võimaliku võrdlusproovi (vt 6. punkti allmärkus (**)) ja 7. punkti allmärkus (**)).

Vähendatud proovist võetakse enam-vähem ühesuurused ja 7. punkti koguselistele nõuetele vastavad lõpp-proovid.

9.5. **Proovi pakendamine**

Mahutid ja pakendid peavad olema pitseeritud niimoodi, et ilma pitserit lõhkumata ei oleks võimalik neid avada. Pitser peab hõlmama kogu märgist. Teine võimalus on, et pitser pannakse sellisesse anumasse või mahutisse, mille saab sulgeda nii, et seda ei ole võimalik purustamata avada, ja millega välditakse mahuti/anuma korduvat kasutamist.

9.6. **Proovide saatmine laborisse**

Proov koos analüüsiks vajaliku teabega tuleb viivitamata saata kindlaksmääratud laborisse analüüsimiseks.

10. **PROOVIVÕTUAUANNE**

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

Aruandesse tuleb kanda ka kõik kõrvalekalded käesolevas määruuses sätestatud proovivõtumenetlustest.

Aruanne tuleb teha kättesaadavaks nii ametlikule kontrollilaborile kui ka söödakäitlejale ja/või söödakäitleja määratud laborile.

⁽¹⁾ Välja arvatud madala eritihedusega kuiv- ja koresööt.

▼ M9

11. KAUGMÜÜGITOOTE PROOV

- Kaugmüügitoote proovi jaoks palutakse söödakäitlejalt sõota sidevahendite kaudu. Sel juhul ei pea pädev asutus sõota küsides end söödakäitleja jaoks ametlikult identifitseerima ning võib esineda variisikuna.
- Kaugmüügitoote koondproovi ja lõpp-proovid peavad võtma selleks volitatud isikud kohe pärast saadetise kättesaamist. Koondproovi moodustamiseks tuleb kogu saadud kogusest juhuslikult ja ühtlaselt võtta sobiv arv üksikproove ja hoolikalt segada/homogeenida, järgides nii palju kui võimalik punktis 5 ning punktides 9.2 ja 9.3 esitatud põhimõtteid. Kui sõöt on üksikpakendites, tuleks saada vähemalt neli pakendit, millest tuleb võtta vähemalt üks üksikproov. Kui mõnel juhul peaks selguma, et saadud pakendid on pärit eri partiidest, tuleb prooviks valitavate pakendite arvu vähendada ja piirduda nende pakenditega, mis on pärit samast partiist. Kui kaugmüügitoote proovi analüüsitakse söödas ebaühtlaselt jaotunud koostisosade või ainete suhtes, peab üksikproovide arv olema vähemalt 2,5 korda suurem söödas ühtlaselt jaotunud ainete suhtes analüüsitavate proovide arvust.

Koondproovist võetakse vastavad lõpp-proovid (kontrollproov, apellatsiooniproov ja võimalik võrdlusproov), järgides nii palju kui võimalik punktis 9.4 esitatud põhimõtteid, ning proovivõtuaruandes märgitakse, et tegemist on kaugmüügitoote prooviga. Seejärel teavitab pädev asutus söödakäitlejat kohe proovide võtmisest. Söödakäitlejat teavitatakse ka sellest, et pädev asutus säilitab kindlaksmääratud kohas võimaluse korral ühe proovi (apellatsiooniproov) apellatsiooniks või saadab selle söödakäitlejale või söödakäitleja määratud laborile vastavalt kehtivatele siseriiklikele õigusnormidele.

Kui proov saadetakse otse ametlikku laborisse, peavad lõpp-proovi laboris ette valmistama ja pitseerima selleks volitatud isikud või tuleb seda teha selliste isikute juuresolekul. Kaugmüügitoodeid käsitlev proovivõtuaruanne tuleb saata kohe pärast lõpp-proovi moodustamist pädevale asutusele, kes teavitab söödakäitlejat proovide võtmisest.

Ollakse seisukohal, et söödakäitleja poolt pädevale asutusele tarnitud kogus kujutab endast sama tooteklassi või -liigi söödast koosneva partii osa. Vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EÜ) nr 178/2002 ⁽¹⁾ artiklile 15 eeldatakse ka kaugmüügitoote proovi puhul, et kui söödaohutusnõuetele mittevastavaks tunnistatud sõöt on sama tooteklassi või -liigi söödast koosneva partii või kaubasaadetise osa, siis ei vasta kogu selle partii või kaubasaadetise sõöt nõuetele, välja arvatud juhul, kui üksikasjaliku hindamise järel puuduvad tõendid selle kohta, et ülejäänud osa partiist või saadetisest ei vasta söödaohutusnõuetele.

⁽¹⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 28. jaanuari 2002. aasta määrus (EÜ) nr 178/2002, millega sätestatakse toidualaste õigusnormide üldised põhimõtted ja nõuded, asutatakse Euroopa Toiduohutusamet ja kehtestatakse toidu ohutusega seotud menetlused (EÜT L 31, 1.2.2002, lk 1).

▼ M9*II LISA***SÖÖDA ANALÜÜSIMEETODITE ÜLDSÄTTED****A. PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE ANALÜÜSIKS****1. Eesmärk**

Käesolevas lisas kirjeldatud menetlused on ette nähtud kontrollilaboritesse saadetud proovide ettevalmistamiseks analüüsiks pärast proovi võtmist kooskõlas I lisa sätetega.

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

Lisaks käesolevas lisas kirjeldatud menetlustele järgitakse standardiga EN ISO 6498 ette nähtud proovide ettevalmistamise suuniseid.

2. Ettevaatusabinõud

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

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

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

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

Proovi homogeneenimine viisil, mil sellest valmistatakse suurel nihkekiiirusel koos veega puderjas mass, on teatavatel juhtudel, eriti ebaühtlaselt jaotunud keemiliste ainete korral, andnud homogeensemaid osaproove kui kuivhomogeneenimine/jahvatamine. Ka piisava kuivjahvatamise teel homogeneenimine võib anda homogeenseid osaproove.

Teatavatel juhtudel, nt hariliku tungaltera ja ohtlike botaaniliste lisandite jms määramisel, ei tohi proovi homogeneenida jahvatamise teel, vaid seda tuleb piisavalt segada.

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

3. Töö käik**3.1. Üldmenetlus**

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

▼M9**3.1.1. Sööd, mida saab kohe jahvatada**

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

3.1.2. Sööd, mida saab jahvatada pärast kuivatamist

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

3.1.3. Vedel või poolvedel sööt

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

3.1.4. Muu sööt

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

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

- Vaatluse teel (kui ei kasutata mikroskoopi) uuritakse kogu koondproovi või lõpp-proovi.
- Mikroskoobiga uurimiseks võib labor vähendada koondproovi või vähendatud proovi. Lõpp-proovid apellatsiooniks ja võimalikuks võrdluseks võetakse sama menetlusega kui lõpp-proov kontrollimiseks.
- Kui homogeneenitakse kogu koondproov, võetakse lõpp-proovid homogeneenitud koondproovist.
- Hariliku tungaltera ja ohtlike botaaniliste lisandite määramiseks tuleb lõpp-proov jagada kaheks võrdseks umbes 500 g massiga osaprooviks. Üht osaproovi uuritakse. Kui osaprooviga saadud tulemus on kuni 50 % piirnormist (analüütiline künnis), vastab proov piirnormist tulenevatele nõuetele. Kui tulemus on üle 50 % piirnormist, tuleb uurida teist osaproovi ning piirnormile vastavuse kontrollimiseks kasutatakse kahe osaprooviga saadud tulemuste keskmist.

4. Proovide hoidmine

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

▼ **M9****B. SÄTTED ANALÜÜSIMEETODITES KASUTATAVATE REAKTIIVIDE JA SEADMETE KOHTA**

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

C. ANALÜÜSIMEETODITE KASUTAMINE JA TULEMUSTE ESITAMINE**1. Ekstraktsioonimenetlus**

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

2. Puhastusmenetlus

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

3. Määramiste arv

Kui soovimatute ainete analüüsimisel on esimese määramise tulemus oluliselt ($> 50\%$) väiksem kui kontrollitavas tootekirjelduses, ei ole vaja teha enam täiendavaid määramisi, juhul kui kasutatakse asjakohaseid kvaliteedimenetlusi. Muudel juhtudel on vajalik kordusanalüüs (teistkordne määramine), et välistada sisemise ristsaastumise ja juhusliku proovide segunemise võimalust. Kahe määramise keskmist kasutatakse edasiseks hindamiseks.

Kui söödalisandite miinimum- või maksimumsisalduse kontrollimisel on esimese määramise tulemus üle maksimaalse või alla minimaalse, ei ole vaja teha enam täiendavaid määramisi, juhul kui kasutatakse asjakohaseid kvaliteedimenetlusi. Muudel juhtudel on vajalik kordusanalüüs (teistkordne määramine), et välistada sisemise ristsaastumise ja juhusliku proovide segunemise võimalust. Kahe määramise keskmist kasutatakse edasiseks hindamiseks.

Kui aine või koostisosa deklareeritud sisalduse kontrollimisel kinnitab esimese määramise tulemus deklareeritud sisaldust, st analüüsitulemus jääb deklareeritud sisalduse lubatud kõrvalekalde piiresse, ei ole vaja teha enam täiendavaid määramisi, juhul kui kasutatakse asjakohaseid

▼M9

kvaliteedimenetlusi. Muudel juhtudel on vajalik kordusanalüüs (teistkordne määramine), et välistada sisemise ristsaastumise ja juhusliku proovide segunemise võimalust. Kahe määramise keskmist kasutatakse edasiseks hindamiseks (keskmine analüüsitulemus jääb või ei jää deklaritud sisalduse lubatud kõrvalekalde piiresse).

Teatavatel juhtudel on lubatud kõrvalekalde vahemik kindlaks määratud õigusaktis, näiteks määruses (EÜ) nr 767/2009 ja Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruses (EL) 2019/4 ⁽¹⁾.

4. Kasutatavast analüüsimeetodist teatamine

Analüüsiaruandes peab olema nimetatud, millist analüüsimeetodit kasutatakse.

5. Aruandlus analüüsitulemuste kohta

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

Enamik ELi loomasöödaalaste õigusaktide regulatiivseid tasemeid (nt maksimumsisaldus, miinimumsisaldus) on kehtestatud 12 % niiskusesisaldusega sööda suhtes. Seepärast tuleb neil juhtudel proovi analüüsimise tulemuste hindamiseks võrrelduna regulatiivse tasemega kõigepealt jagada analüüsi tulemus proovi kuivainesisaldusega (%) ja korrutada 88ga, nagu on esitatud järgmises valemis:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

kus:

Mc : proovi niiskusesisaldus (%). $100 - Mc$ näitab seega proovi kuivainesisaldust (%).

R_{ana} : proovi analüüsimisel mõõdetud tulemus

$R_{12\%}$: tulemus 12 % niiskusesisaldusega sööda puhul; hinnata võrreldes regulatiivse tasemega.

Kui täidetud on järgmised tingimused:

— analüüsi tulemus on oluliselt ($> 50\%$) väiksem või suurem kui kontrollitavas märgistusteabes/spetsifikatsioonis (sõltuvalt sellest, kas märgistusteave/spetsifikatsioon käib maksimaalse või minimaalse sisalduse kohta);

— proovivõtu objektiks oleva sööda niiskusesisaldus on teada ja on võimalik kindlaks teha, et niiskusesisalduse korrigeerimine ei muuda hinnangut,

võib tingimusel, et kasutatakse asjakohaseid kvaliteedimenetlusi ning analüüsi eesmärk on vaid kontrollida vastavust õigusnormidele, niiskusesisalduse korrigeerimise ära jätta (nt juhul, kui puudub spetsifikatsioon või regulatiivne tase), v.a juhul, kui seda vajatakse tõlgendamiseks.

Kui analüüsitulemust korrigeeritakse niiskusesisalduse osas, tuleb sama menetluse käigus korrigeerida ka vastavat mõõtemääramatust.

⁽¹⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 11. detsembri 2018. aasta määrus (EL) 2019/4, mis käsitleb ravimisööda tootmist, turuleviimist ja kasutamist, millega muudetakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrust (EÜ) nr 183/2005 ning tunnistatakse kehtetuks nõukogu direktiiv 90/167/EMÜ (ELT L 4, 7.1.2019, lk 1).

▼ **M9**

Hariliku tungaltera või ohtlike botaaniliste lisandite määramisel vaatluse/mikroskoobiga uurimise teel ei ole niiskusesisaldust vaja korrigeerida.

6. Analüütiline mõõtemääramatus ja saagis soovimatute ainete analüüsil

Silmas pidades direktiivi 2002/32/EÜ tähenduses soovimatuid aineid, loetakse söödaks ettenähtud tooted kehtestatud piirnormile mittevastavaks, kui 12 % niiskusesisaldusele, vastav kahe sõltumatu määramise keskmine analüüsitulemus ületab piirmäära, võttes arvesse laiendatud analüütilist mõõtemääramatust, mille arvutamiseks kasutatakse usaldusnivoole umbes 95 % vastavat kattetegurit 2, ja saagise parandit. See tähendab, et vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud ja saagise parandiga parandatud sisaldust, millest on lahutatud laiendatud analüütiline mõõtemääramatus. Seda menetlust võib kasutada vaid juhul, kui analüüsimeetod võimaldab hinnata laiendatud analüütilist mõõtemääramatust ja saagise parandit (nt ei ole vaja vaatluse/mikroskoobiga uurimise korral).

Kui apellatsiooniks võetud proovi analüüsi tulemus ületab maksimumsisaldust (võtmata arvesse laiendatud analüütilist mõõtemääramatust), kinnitab see kontrollproovi puhul kindlakstehtud mittevastavust nõuetele, kui konkreetsed siseriiklikud õigusnormid selle kohta puuduvad.

Analüüsitulemus esitatakse järgmiselt (kuivõrd kasutatud analüüsimeetod võimaldab hinnata laiendatud analüütilist mõõtemääramatust):

- a) saagise suhtes korrigeerituna, kui see on vajalik ja asjakohane; paranduse kohaldamise korral tuleb teha sellekohane märge. Tuleb märkida saagise määr, välja arvatud juhul, kui süstemaatilise hälbe suhtes korrigeerimine on meetodi osa, kusjuures hälve on mõõdetud väärtuse ja võrdluskontsentratsiooni vahe. Saagise parandit ei ole vaja, kui saagis on 90–110 %;
- b) kujul „ $x \pm U$ “, kus x on analüüsitulemus ja U on laiendatud analüütiline mõõtemääramatus, kui kasutatakse kattetegurit 2, ⁽¹⁾ millele vastab usaldusväarsuse tase 95 %.

Kui analüüsitulemus on oluliselt (> 50 %) väiksem kui kontrollitava näitaja väärtus ja kui kasutatakse asjakohaseid kvaliteedimenetlusi ning analüüsi eesmärk on vaid kontrollida vastavust õigusnormidele, ei ole vaja esitada saagise määra ega laiendatud analüütilist mõõtemääramatust (nt juhtudel, kui puudub spetsifikatsioon või regulatiivne tase), v.a juhul, kui mõõtemääramatust vajatakse tõlgendamiseks.

7. Mõõtemääramatus ja saagis söödalisandite sisalduse analüüsil

Selleks et kontrollida vastavust söödalisandite lubatud miinimum- ja maksimumsisaldusele, tuleb söödalisandi esinemist käsitada kehtestatud miinimum- ja maksimumsisaldusele mittevastavana, kui leitakse, et 12 % niiskusesisaldusega söödale vastav analüüsitulemus, mis on saadud kahe sõltumatu määramise keskmisena:

— on maksimumsisaldusest suurem, võttes arvesse laiendatud analüütilist mõõtemääramatust ja saagise parandit. See tähendab, et vastavuse

⁽¹⁾ Usaldusväarsusvahemik 95 % on võimalik saavutada teisi tegureid, nt t-tegurit kasutades.

▼ **M9**

hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud (st ka määramise keskmist) ja saagise parandiga parandatud sisaldust, millest on lahutatud laiendatud analüütiline mõõtemääramatus;

- on miinimumsisaldusest väiksem, võttes arvesse laiendatud analüütilist mõõtemääramatust ja saagise parandit. See tähendab, et vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud ja saagise parandiga parandatud sisaldust, millele on liidetud laiendatud analüütiline mõõtemääramatus.

Kui apellatsiooniks võetud proovi analüüsi tulemus ületab maksimumsisaldust (võtmata arvesse laiendatud analüütilist mõõtemääramatust), kinnitab see kontrollproovi puhul kindlakstehtud mittevastavust nõuetele, kui konkreetsed siseriiklikud õigusnormid selle kohta puuduvad.

Analüüsitulemus esitatakse järgmiselt (kuivõrd kasutatud analüüsimeetod võimaldab hinnata laiendatud analüütilist mõõtemääramatust):

- a) saagise suhtes korrigeerituna, kui see on vajalik ja asjakohane; paranduse kohaldamise korral tuleb teha sellekohane märge. Tuleb märkida saagise määr, välja arvatud juhul, kui süstemaatilise hälbe suhtes korrigeerimine on meetodi osa, kusjuures hälve on mõõdetud väärtuse ja võrdluskontsentratsiooni vahe. Saagise parandit ei ole vaja, kui saagis on 90–110 %;
- b) kujul „ $x \pm U$ “, kus x on analüüsitulemus (kahe määramise keskmine) ja U on laiendatud analüütiline mõõtemääramatus, kui kasutatakse kattetegurit 2,⁽¹⁾ millele vastab usaldusväärsuse tase 95 %.

⁽¹⁾ Usaldusväärsusvahemik 95 % on võimalik saavutada teisi tegureid, nt t-tegurit kasutades.

▼ **M9***III LISA***SÖÖDAMATERJALI JA SEGASÖÖDA KOOSTISE KONTROLLIMISE
ANALÜÜSIMETODID****A. NIISKUSESISALDUSE MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja kohaldamisala**

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 söödamaterjali ja valdavalt piimatoodetest koosneva segasööda analüüsi, loomsete ja taimsete rasvade ja õlide analüüsi ega õliseemnete ja -viljade analüüsi.

Õliseemnete niiskusesisaldus määratakse vastavalt meetodile, mis on esitatud standardis EN ISO 665 „Niiskusesisalduse ja lenduvate ainete sisalduse määramine“, võttes arvesse, et sojaoad tuleb enne niiskusesisalduse määramist jahvatada.

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 $0,3 \text{ g/cm}^3$.
- 3.4. Reguleeritava temperatuuriga ($\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) 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.

⁽¹⁾ Teravilja, jahu, tangude ja manna kuivatamisel peab kuivatuskapi soojusmahutavus olema selline, et seatuna temperatuurile $131 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 arvil pehme nisu proove, kui kapp neid mahutab, erinevad saadud tulemused neljatunnise kuivatamise tulemustest vähem kui 0,15 %.

▼ **M9****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 tükideks, et vältida niiskusesisalduse kõikumist (vt punkt 6).

4.1.2. Teravili ja tangud

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

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

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

4.2. Kuivatamine

Kaanega anum (punkt 3.3) kuivatatakse 103 °C kuivatuskapis 30 +/- 1 minuti jooksul. Võetakse ahjust ja lastakse eksikaatoris (punkt 3.6) ümbritseva õhu temperatuurini jahtuda.

4.2.1. Muu sööt kui punktides 4.2.2 ja 4.2.3 nimetatud sööt

Kaanega anum kaalutakse 1 mg täpsusega. 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. Kuivatuskapp avatakse, kaas asetatakse kohe anumale, anum võetakse kapist välja, lastakse jahtuda eksikaatoris (punkt 3.6) 30–45 minutit ja kaalutakse 1 mg täpsusega.

Peamiselt (> 50 %) loomsetest ja taimsetest õlidest ja rasvadest koosneva sööda puhul kuivatatakse proovi kuivatuskapis temperatuuril 103 °C veel 30 minutit. Kahe kaalumistulemuse erinevus ei tohi olla suurem kui 0,1 % niiskust.

4.2.2. Teravili, jahu, tangud ja manna

Kaanega anum kaalutakse 0,5 mg täpsusega. 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. Kuivatuskapp avatakse, kaas asetatakse kohe anumale, anum võetakse kapist välja, lastakse jahtuda eksikaatoris (punkt 3.6) 30–45 minutit ja kaalutakse 1 mg täpsusega.

▼ **M9**

- 4.2.3. Segasöött, mis sisaldab üle 4 % sahharoosi või laktoosi: söödatooraine, nt jaanikaunad, hüdro-lüüsitud teraviljasaadused, linnaseseemned, kuivatatud peediliistakud, kalast ja suhkrust valmistatud lahustuvssöött

Kaanega anum kaalutakse 0,5 mg täpsusega. 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 (punkt 3.5). Anum asetatakse kuivatuskappi võimalikult kiiresti, et vältida kuivatuskapi jahtumist.

Rõhk tõstetakse 100 torrini ja proovil lastakse sellise rõhu all kas kuumas ja kuivas õhus 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 (punkt 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. *(Osaline) eelkuivatamine*

Alla 85 massiprotsendise kuivainesisaldusega „märga“ sööta (nt haljassöött, täisratsiooniline segasöött, tahkesöött, vedelsöött) on vaja enne peenjahvatamist osaliselt eelkuivatada, et nende stabiilseid aineid analüüsida; ebastabiilsete ainete osaline kuivatamine ei ole võimalik.

Osaline kuivatamine võib toimuda kas sundõhuringlusega kuivatuskapis või mikrolaineahjus või külmuivatamise teel. Muude meetodite kui külmuivatamise puhul on osalise kuivatamise eesmärk kuivatada sööta, hoides selle temperatuuri alla 60 °C, nii et selle keemiline koostis võimalikult vähe muutuks. Üle 60 °C kuivatamine põhjustab söödas keemilisi muutusi (nt valkude lagunemist). Kuivatatud söödal lastakse enne osalise kuivainesisalduse mõõtmist umbes 15 minutit toatemperatuuril seista, et minimeerida jahvatamise ja ladustamise ajal toimuda võivat niiskusesisalduse võimalikku muutumist. Alla 60 °C kuivatamine ei kõrvalda söödast kogu vett; seepärast ei näita (esialgne) osaline kuivatamine sööda kogu kuivainesisaldust. Pärast kuivatamist osaproov jahvatatakse ja analüüsitakse osaliselt kuivanud (järelejäänud 3–15 % niiskust) proovi (lõplikku) kuivainesisaldust, kui muud keemilised koostisosad on määratud.

Seepärast soovitatakse kuivainesisalduse määramiseks kaheastmelist menetlust. Kõigepealt määratakse osaline kuivainesisaldus (kui kuivainet on vähem kui 85 %), seejärel määratakse proovi põhjal järelejäänud kuivainesisaldus ja korrutatakse osaline kuivainesisaldus järelejäänud kuivainesisaldusega, et määrata kogu kuivainesisaldus.

5. **Tulemuste arvutamine**

Niiskusesisaldus (X) arvutatakse protsendimäärana proovist järgmiste valemite abil.

▼ M95.1. *Kuivatamine ilma eelkuivatamiseta*

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

kus:

m = analüüsitava proovi esialgne mass grammides,

m₀ = kuiva analüüsitava proovi mass grammides.5.2. *Kuivatamine koos eelkuivatamisega ⁽¹⁾*

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

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. *Korduvus*

Sama prooviga tehtud kahe samaaegse määramise tulemuste erinevus ei tohi olla suurem kui 0,2 % niiskuse absoluutväärtusest, välja arvatud lemmikloomade märgtoit ja koerte närimiskondid, mille puhul ei tohi erinevus olla suurem kui 0,5 % niiskuse absoluutväärtusest.

6. **Tähelepanek**

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

B. LOOMSETE JA TAIMSETE RASVADE JA ÕLIDE NIISKUSESISALDUSE MÄÄRAMINE

1. **Eesmärk ja kohaldamisala**

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

2. **Põhimõte**

Proov kuivatatakse temperatuuril 103 °C püsivastini (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 ülas osas 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.

⁽¹⁾ Üksikasjad arvutamise kohta on kättesaadavad standardis EN ISO 6498 „Loomasööt – Proovi ettevalmistamise suunised“.

▼ M9

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 (punkt 3.1), milles on termomeeter (punkt 3.2). Kuumutatakse liivavannil või kuumutusplaadil (punkt 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 (punkt 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;

m_1 = anuma ja selle sisu mass grammides enne kuumutamist;

m_2 = anuma ja selle sisu mass grammides pärast kuumutamist.

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

Korduvus

Sama prooviga tehtud kahel paralleelsel määramisel saadud niiskusesisalduste erinevus ei tohi ületada absoluutväärtuses 0,1 %.

C. LÄMMASTIKUSISALDUSE MÄÄRAMINE JA TOORVALGUSISALDUSE ARVUTAMINE

1. **Eesmärk ja kohaldamisala**

See meetod võimaldab määrata toorvalgusisaldust söödas lämmastikusisalduse alusel, mis määratakse Kjeldahli meetodiga ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Lämmastikusisaldust saab määrata kõigis söötades, kuid toorvalgu arvutamise teisendustegurit 6,25 ei pruugi olla võimalik kohaldada putuksööda (väiksem teisendustegur) ja teatava lemmikloomatoidu ning vereplasma valkude (suurem teisendustegur) suhtes.

▼ **M9****2. Põhimõte**

Proov lagundatakse väävelhappega katalüsaatori manulusel. Hapelahtus leelistatakse naatriumhüdrosiidi lahusega. Ammoniaak destilleeritakse ja kogutakse mõõdetud väävelhappekogusesse, mille ülejääk tiitritakse naatriumhüdrosiidi 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 = $114 \text{ }^\circ\text{C}$; N = 10,36 %).

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 (punkt 3.16) ja 10 ml bromokresoolroheline lahust (punkt 3.17).

Olenevalt sellest, millist vett kasutatakse, võib boorhappe lahuse pH-tase olla eri partiides erinev. Boorhappe lahuse pH peab olema 4,3–4,7. Sageli on positiivse tulemuse saamiseks vaja korrigeerida väikse leelisekogusega.

▼ **M9**

Märkus: umbes 3–4 ml NaOH (punkt 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 (punktid 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 (punkt 3.1), sobiv kogus katalüsaatorit (punkt 3.2) (0,3–0,4 g vask(II)oksiidi või 0,9–1,2 g vask(II)sulfaadi pentahüdraati), 25 ml väävelhapet (punkt 3.4) ja vajaduse korral mõned pimsskivigraanulid (punkt 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 (punkt 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 (punkt 3.5) või (punkt 3.7), sõltuvalt eeldatavast lämmastikusisaldusest. Lisatakse mõni tilk metüülpunast indikaatorit (punkt 3.8).

Mineraliseerimiskolb ühendatakse destilleerimisaparaadi jahutiga ja jahuti ots viiakse kogumiskolvis olevasse vedelikku vähemalt 1 cm sügavusele (vt tähelepanekute punkt 8.3). Mineraliseerimiskolbi valatakse aeglaselt 100 ml naatriumhüdroksiidi lahust (punkt 3.9), vältides ammoniaagi kadu (vt tähelepanekute punkt 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.

▼ **M9**

Kogumiskolb, mis sisaldab 25–30 ml boorhappe lahust (punkt 3.18), pannakse jahuti väljalaskeava alla selliselt, et sissevoolutoru jääb alla-poole boorhappe lahuse ülejäägi pinda. Destilleerimisseade korrigeeritakse 50 ml naatriumhüdroksiidi lahuse (punkt 3.9) väljastamiseks. Destilleerimisseadet 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 destilleerimisseadmes toimuvad naatriumhüdroksiidi ülejäägi lisamine ja veeaurdestillatsioon automaatselt.

5.3. *Tiitrimine*

Edasi toimida vastavalt punktidele 5.3.1 või 5.3.2.

5.3.1. *V ä ä v e l h a p e*

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

5.3.2. *B o o r h a p e*

Kogumiskolvi sisu tiitritakse soolhappe standardse tiitrimislahusega (punkt 3.19) või väävelhappe standardse tiitrimislahusega (punkt 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 magnetseuri plaadi või valgusmõõtu 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 (punkt 3.18).

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

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

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 (punkt 3.14).

▼ M9**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 (punkt 3.10 või 3.11) maht (ml),

V_1 = proovi tiitrimisel kasutatud NaOH (punkt 3.10 või 3.11) maht (ml),

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

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

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

▼M9**7. Meetodi kontrollimine****7.1. Korduvus**

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

— absoluutväärtusena väljendatult 0,4 %, kui toorvalgusisaldus on väiksem kui 20 %.

— 2,0 % suuremast väärtusest, kui toorvalgusisaldus on 20–40 %;

— absoluutväärtusena väljendatult 0,8 %, kui toorvalgusisaldus on suurem kui 40 %.

7.2. Korratavus

Sama prooviga eri laborites tehtud kahe määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— absoluutväärtusena väljendatult 1,8 %, kui toorvalgusisaldus on väiksem kui 20 %.

— 9,0 % suuremast väärtusest, kui toorvalgusisaldus on 20–40 %;

— absoluutväärtusena väljendatult 3,6 %, kui toorvalgusisaldus on suurem kui 40 %.

7.3. Täpsus

Analüüs (lagundamine, destilleerimine ja tiitrimine) tehakse sobiva koguse (nt 0,2–0,3 g) atsetaniliidiga (punkt 3.13) 1 g sahharoosi (punkt 3.14) manulusel; 1 g atsetaniliidi tarbib 14,80 ml väävelhapet (punkt 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 naatriumhüdrosiid vahetult enne kolvi ühendamist jahutiga, valades vedelikku aeglaselt mööda kolvi külge.

8.2. Kui proov lagundamisel tahkestub, alustatakse määramist uuesti, kasutades punktis 5.1 näidatust suuremat väävelhappekogust (punkt 3.4).

8.3. Väikese lämmastiksisaldusega toodete puhul võib kogumiskolbi viidava väävelhappe (punkt 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.

▼ **M9****D. KARBAMIIDI MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja kohaldamisala**

Selle meetodiga on võimalik määrata mäletsejaliste söödas lisandina kasutatava karbamiidi sisaldust.

2. Põhimõte

Proov suspendeeritakse vees selitava ainega. Suspensioon filtritakse. Filtraadi karbamiidisaldus määratakse pärast 4-dimetüülaminobensaldehüüdi (punkt 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 (ρ_{20} 1,19 g/ml). See reaktiiv säilib maksimaalselt kaks nädalat.

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-äädikhapet. 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. Karbamiidi mitte absorbeeriv aktiivsüsi (kontrollida).

3.5. Karbamiidi 0,1 % lahus (w/v).

4. Seadmed

4.1. Segisti (trummel): ligikaudu 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 (punkt 3.4) 500 ml mõõtekolbi. Lisatakse 400 ml vett ja 5 ml Carrezi lahust I (punkt 3.2), segatakse umbes 30 sekundit ja lisatakse 5 ml Carrezi lahust II (punkt 3.3). Segatakse trumlis kolmkümmend minutit. Täidetakse veega kuni märgini, loksutatakse ja filtritakse.

Eemaldatakse 5 ml läbipaistvat värvitut filtraati, pannakse see lihvkorgiga katseklaasidesse, lisatakse 5 ml 4-DMAB lahust (punkt 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 (punkt 3.5), pannakse 100 ml mõõtekolbidesse ja täidetakse veega kuni märgini. Igast lahusest võetakse ära 5 ml, lisatakse 5 ml 4-DMAB lahust (punkt 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.

▼ M9**6. Tulemuste arvutamine**

Proovis sisalduv karbamiidikogus määratakse kalibreerimiskõvera abil.

Tulemust väljendatakse karbamiidisaldusena milligrammides ühe kilogrammi proovi kohta.

7. Meetodi hindamine**7.1. Korduvus**

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

— 420 nm

— 50 % suuremast tulemusest karbamiidisalduse vahemikus 3 000 mg/kg kuni alla 5 000 mg/kg;

— 25 % suuremast tulemusest karbamiidisalduse vahemikus 5 000 mg/kg kuni alla 7 000 mg/kg;

— 20 % suuremast tulemusest, kui karbamiidisaldus on üle 7 000 mg/kg;

— 435 nm

— 40 % suuremast tulemusest karbamiidisalduse vahemikus 3 000 mg/kg kuni alla 5 000 mg/kg;

— 25 % suuremast tulemusest karbamiidisalduse vahemikus 5 000 mg/kg kuni alla 9 000 mg/kg;

— 5 % suuremast tulemusest, kui karbamiidisaldus on üle 9 000 mg/kg.

7.2. Korratavus

Sama prooviga eri laborites ja/või eri analüüsijate poolt tehtud kahe määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

— 420 nm

— 3 000 mg/kg absoluutväärtusena karbamiidisalduse vahemikus 3 000 mg/kg kuni alla 12 000 mg/kg;

— 4 500 mg/kg absoluutväärtusena, kui karbamiidisaldus on üle 12 000 mg/kg.

— 435 nm

— 50 % suuremast tulemusest karbamiidisalduse vahemikus 3 000 mg/kg kuni alla 8 000 mg/kg;

— 25 % suuremast tulemusest, kui karbamiidisaldus on üle 8 000 mg/kg.

8. Võrdlusuuringu tulemused

Toimus ELi laboritevaheline võrdluskatse, millest võttis osa 18 laborit. Analüüsiti (üks analüüs) viit positiivset mäletsejaliste segasöödamaterjali proovi (tabelites 1 ja 2 tähistatud kui MAT) pimedate kordusproovidena ja üks kord üht võrdlussöödaks olevat mäletsejaliste segasööta.

Rahvusvaheliste suuniste kohaselt määratletud korduvuse (r) ja korratavuse (R) piirnormide arvutused tehti pärast võõrväärtuste väljajätmist, kasutades kehtivate väärtuste variatsioonanalüüsi.

▼ **M9**

Arvutatud analüütilise toimivuse näitajad (korduvus, korratavus) on esitatud järgmistes tabelites. Ükski analüüsitud proov, sh võrdlusmaterjal, ei olnud valepositiivne ega valenegatiivne.

Tabel 1

Analüütilise toimivuse näitajad karbamiidi puhul, mõõdetuna $\lambda = 420$ nm juures kõigis materjalides

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Lambad	Veised	Lambad	Lambad	Veised
Sihtmassiprotsent (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Keskmine massiprotsent (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Korratavuse standardhälve s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Korduvuse standardhälve s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Korduvuse suhteline standardhälve RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Korratavuse piinorm, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Korduvuse piinorm, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabel 2

Analüütilise toimivuse näitajad karbamiidi puhul, mõõdetuna $\lambda = 435$ nm juures kõigis materjalides

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Lambad	Veised	Lambad	Lambad	Veised
Sihtmassiprotsent (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Keskmine massiprotsent (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Korratavuse standardhälve s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Korduvuse standardhälve s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Korratavuse suhteline standardhälve RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Korduvuse suhteline standardhälve RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Korratavuse piinorm, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Korduvuse piinorm, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ M9**9. Tähelepanekud**

- 9.1. Üle 3 % karbamiidisalduse puhul vähendatakse proovi 1 grammini või lahjendatakse esialgset lahust, nii et 500 ml-s ei oleks karbamiidi üle 50 mg.
- 9.2. Väikese karbamiidisalduse puhul võetakse suurem proov, tingimusel et filtraat jääb läbipaistvaks ja värvituks.
- 9.3. Eespool esitatud võrdlusuuringutulemused ei näita olulist täpsuse erinevust 420 nm või 435 nm juures mõõdetud karbamiidi puhul.

E. AMINOHAPETE (VÄLJA ARVATUD TRÜPTOFAAN) MÄÄRAMINE

Aminohapete (välja arvatud trüptofaan) määramiseks kasutatavad analüüsimeetodid on järgmised.

— EN ISO 13903 Loomasööt – Aminohapete sisalduse määramine

— EN ISO 17180 Loomasööt – Lüsiini, metioniini ja treoniini määramine kaubanduslikes aminohappetoodetes ja eelsegudes ⁽¹⁾

— Analüüsimeetodit kirjeldatakse järgnevalt punktides 1–10.

1. Eesmärk ja kohaldamisala

See meetod võimaldab aminohappeanalüsaatoriga määrata vabade aminohapete (sünteesilisi ja looduslikke) sisaldust ning aminohapete (peptiidsidemetega ja vabade) üldsisaldust söödamaterjalis, segasöödas ja eelsegudes, mis sisaldavad iga aminohapet vähem kui 10 % ⁽²⁾. 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 eri 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 filtrimise teel. Filtritud lahuse pH korrigeeritakse 2,20-le. Aminohapped eraldatakse ioonvahetuskromatograafia teel ning määratakse fotomeetrilise määramise teel reaktsioonis ninhüdriniga lainepikkusel 570 nm.

2.2. Aminohapete üldsisaldus

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

⁽¹⁾ Standardis EN 17180 esitatud analüüsimeetodile viidatakse kui alternatiivmeetodile, mida kasutatakse ametlikuks kontrolliks, kui määratakse aminohappeid söödas, mis sisaldab üle 10 % aminohappeid.

⁽²⁾ Seda meetodit ei ole võrdlusuuringuga valideeritud eelsegude puhul, mis sisaldavad üle 10 % söödalisandeid. Asjakohaste väikeste kohandustega saab seda siiski kohaldada ka nende maatriksite suhtes, eeldusel et meetod seejärel laborisiseselt valideeritakse. Täiendava teabe jaoks vaadake <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

Oksüdeerimine viiakse läbi persipelghappe ja fenooli seguga 0 °C juures. Ülemäärane oksüdatsioonireaktiiv lagundatakse naatriumdisulfitiga. Oksüdeeritud või oksüdeerimata proovi hüdrolüüsitakse soolhappega (punkt 3.20) 23 tundi. Hüdrolüsaadi pH korrigeeritakse 2,20-le. Aminohapped eraldatakse ioonvahetuskromatograafia teel ning määratakse fotomeetriliselt reaktsioonis ninhüdriniga 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. Trinaatriumsitraadi dihüdraat
- 3.9. 2,2'-tiodietanool (tiodiglükool)
- 3.10. Naatriumkloriid
- 3.11. Ninhüdrin
- 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. Aminohapete standardained, mis on loetletud punktis 1 (Eesmärk ja kohaldamisala). Kristallisatsioonivett mitte sisaldavad puhtad ühendid. Kuivatakse vaakumis P₂O₅ või H₂SO₄ kohal ühe nädala jooksul enne kasutamist.
 - 3.16.2. Tsüsteiinhape
 - 3.16.3. Metioniinsulfoon
- 3.17. Naatriumhüdroksiidi lahus, c = 7,5 mol/l:

300 g NaOH (punkt 3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.18. Naatriumhüdroksiidi lahus, c = 1 mol/l:

40 g NaOH (punkt 3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega 1 liitrini.
- 3.19. Sipelghappe-fenoolilahus:

889 g sipelghapet (punkt 3.2) segatakse 111 g veega ja lisatakse 4,73 g fenooli (punkt 3.3).

▼ **M9**

- 3.20. Hüdrolüüsisegu, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, mis sisaldab 1 g fenooli/l:

1 g fenooli (punkt 3.3) lisatakse 492 ml HCl-le (punkt 3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.

- 3.21. Ekstraheerimisegu, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, mis sisaldab 2 % tiodiglükooli. Võetakse 8,2 ml HCl (punkt 3.7), lahjendatakse umbes 900 ml veega, lisatakse 20 ml tiodiglükooli (punkt 3.9) ja täidetakse veega 1 liitrini (punkt 3.7 ja 3.9 mitte segada otse omavahel).

- 3.22. 5-sulfosalitsüülhape, $\beta = 6 \%$:

60 g 5-sulfosalitsüülhapet (punkt 3.6) lahustatakse vees ja täidetakse veega 1 liitrini.

- 3.23. Oksüdatsioonisegu (persipelghape – fenool):

0,5 ml vesinikperoksiidi (punkt 3.1) segatakse 4,5 ml sipelghappe ja fenooli lahusega (punkt 3.19) väikses keeduklaasis. Inkubeeritakse 20–30 °C juures ühe tunni jooksul, et moodustuks persipelghape, seejärel jahutatakse jääveevanni kohal (15 min) enne proovile lisamist.

Ettevaatust: vältida kokkupuudet nahaga ja kanda kaitserõivaid.

- 3.24. Tsitraatpuhver, $c = 0,2 \text{ mol } ^{\text{Na+}}/\text{l}$, pH 2,20:

19,61 g naatriumtsitraati (punkt 3.8), 5 ml tiodiglükooli (punkt 3.9), 1 g fenooli (punkt 3.3) ja 16,50 ml HCl (punkt 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 (punkt 4.9).

- 3.26. Ninhüdrini reaktiiv, mis on valmistatud vastavalt kasutatud analüsaatori tingimustele (punkt 4.9).

- 3.27. Aminohapete standardlahused. Neid lahuseid tuleks hoida temperatuuril alla 5 °C.

- 3.27.1. Aminohapete põhistandardlahus (punkt 3.16.1).

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

On võimalik osta.

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

0,2115 g tsüsteiinhapet (punkt 3.16.2) ja 0,2265 g metioniinsulfooni (punkt 3.16.3) lahustatakse tsitraatpuhvrts (punkt 3.24) 1 l mõõtekolbis ning täidetakse kolb tsitraatpuhvrtsiga märgini. Säilitatakse temperatuuril alla 5 °C mitte üle 12 kuu. Seda lahust ei kasutata, kui põhistandardlahus (punkt 3.27.1) sisaldab tsüsteiinhapet ja metioniinsulfooni.

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

0,6560 g norleutsiini (punkt 3.13) lahustatakse tsitraatpuhvrts (punkt 3.24) mõõtekolbis ning kolb täidetakse tsitraatpuhvrtsiga 250 ml-ni. Säilitatakse temperatuuril alla 5 °C mitte üle 6 kuu.

▼ **M9**

3.27.4. Standardaminohapete kalibreerimislahus, mis on mõeldud kasutamiseks hüdroolüsaatidega, tsüsteiinihappe 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 (punkt 3.10) lahustatakse 100 ml keeduklaasis 30 ml tsitraatpuhvriga (punkt 3.24). Lisatakse 4,00 ml aminohapete põhistandardlahust (punkt 3.27.1), 4,00 ml tsüsteiinihappe ja metioniinsulfooni põhistandardlahust (punkt 3.27.2) ja 0,50 ml sisestandardi põhistandardlahust (punkt 3.27.3), kui seda kasutatakse. Naatriumhüdrosiidi (punkt 3.18) abil korrigeeritakse pH 2,20-le.

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

Säilitatakse temperatuuril alla 5°C mitte üle 3 kuu.

Vaata ka punkti 9.1 tähelepanekuid.

3.27.5. Standardaminohapete kalibreerimislahus, mis on mõeldud kasutamiseks vastavalt punktile 5.3.3.1 valmistatud hüdroolüsaatidega ja ekstraktidega (punkt 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. Püstjahutiga varustatud 100 või 250 ml ümarkolb
- 4.2. 100 ml boorsilikaatklaasist pudel kummist/teflonist tihendiga keermes-
tatud 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. Vaakumrotaatoraurusti
- 4.8. Mehaaniline loksuti või magnetsegur
- 4.9. Aminohappe analüsaator või HPLC-seade ionvahetuskolonn, ninhü-
driini kolonnijärgse derivatiseerimise seadme ja valgusmõõturiga.

Kolonn täidetakse sulfoneeritud polüstireenivaikudega, mis on võime-
lised eraldama aminohappeid üksteisest ja teistest ninhüdriinpositiivse-
test materjalidest. Puhvri ja ninhüdriini jadas tekitatakse vool pumpa-
dega, mille vooluühitus on $\pm 0,5\%$ nii standardkalibreerimise kui
proovi analüüsi ajal.

Mõnede aminohapete analüsaatoritega võib kasutada hüdrolüüsimenet-
lusi, mille puhul on hüdrolüsaadi naatriumikontsentratsioon $c = 0,8 \text{ mol/l}$ ja mis sisaldab oksüdatsioonietapi kõiki sipelghappe jääke. Teised analüsaatorid ei võimalda teatavaid aminohappeid rahuldaval
määral eraldada, kui hüdrolüsaat sisaldab liigselt sipelghapet ja/või
kui naatriumioonide kontsentratsioon on kõrge. Sellisel juhul vähenda-
takse pärast hüdrolüüsi ja enne pH korrigeerimist happe mahtu aurus-
tamisega kuni umbes 5 milliliitrit. Aurustamine peab toimuma vaaku-
mitingimustes temperatuuril kuni 40°C .

▼ **M9****5. Töö käik****5.1. Proovi ettevalmistamine**

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

5.2. Vabade aminohapete määramine

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

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

Kui kasutatakse sisestandardit, lisatakse 1,00 ml sisestandardit (punkt 3.27.3) igasse 100 ml valmis lahusesse ja täidetakse puhverlahusega (punkt 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. Aminohapete üldsisalduse määramine**5.3.1. Oksüdeerimine**

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

- 100 ml ümarkolbi (punkt 4.1) lahtise hüdrolüüsi (punkt 5.3.2.3) puhul või
- 250 ml ümarkolbi (punkt 4.1), kui on nõutav madal naatriumikontsentratsioon (punkt 5.3.3.1), või
- 100 ml keermestatud korgiga pudelisse (punkt 4.2) (suletud hüdrolüüsi, punkt 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 oksüdatsioonisegu (punkt 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 (punkt 3.4).

Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.2.1.

▼ **M9**

5.3.2. Hüdrolüüs

5.3.2.1. Oksüdeeritud proovide hüdrolüüs

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

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

5.3.2.2. Oksüdeerimata proovide hüdrolüüs

100 ml või 250 ml ümarkolbi (punkt 4.1) või 100 ml keermestatud korgiga pudelisse (punkt 4.2) kaalutakse 0,2 mg täpsusega 0,1–1 g ettevalmistatud proovi (punkt 5.1). Kaalutud proovipartii lämmastikusiisaldus peab olema umbes 10 mg. Lisatakse hoolikalt 25 ml hüdrolüüsisegu (punkt 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 klaashelmest ja keedetakse püstjahutiga kolvis 23 tundi pideval mullidega keemisel. Pärast hüdrolüüsi teostamist pestakse jahuti maha 5 ml tsitraatpuhvriga (punkt 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 (punkt 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 (punkt 4.3). Pärast hüdrolüüsi lõpuleviimist võetakse pudel kuivatuskapist välja, avatakse ettevaatlikult pudelikork ja asetatakse pudel jääveevanni. Jahutatakse.

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

Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.3.

5.3.3. pH korrigeerimine

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

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

Soovitav on kasutada sisestandardi põhistandardlahust (punkt 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 (punkt 3.27.3).

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

▼ **M9**

Hüdrolüsaadi kogust vähendatakse vaakumrotaatoraurusti (punkt 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 naatriumhüdrokksiidi lahusega (punkt 3.18) ja jätkatakse vastavalt punktile 5.3.4.

5.3.3.2. Kõik teised aminohappe analüsaatorid (punkt 4.9)

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

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

5.3.4. Proovilahus kromatograafia jaoks

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

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

Seejärel alustatakse kromatograafiat (punkt 5.4).

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

5.4. Kromatograafia

Enne kromatograafiat viiakse ekstrakt (punkt 5.2) või hüdrolüsaat (punkt 5.3.4) toatemperatuurile. Segu loksutatakse ja filtritakse sobiv kogus läbi 0,22 µm membraanfiltrit (punkt 4.5). Saadud selge lahusega tehakse ioonvahetuskromatograafia, kasutades aminohappe analüsaatorit (punkt 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 vahekord standard- ja proovilahustes oleks võimalikult sarnane.

Üldiselt sõltub kalibreerimiskatsete sagedus ninhüdroiini reaktiivi stabiilsusest ja analüütilisest süsteemist. Standard või proov lahjendatakse tsitraatpuhvriga (punkt 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 ninhüdroinpositiivsetest 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 (punkt 4.9) abil.

▼ M9

Treoniini-seriini eraldamiseks ei tohi kahest kattuvast aminohappest madalama aminohappe miinimumtaseme ja piigi kõrguse vahekord 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.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000}$$

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

A = piigipindala, hüdro-lüsaat või ekstrakt

B = piigipindala, kalibreerimisstandardlahus

C = piigipindala, sisestandard hüdro-lüsaadis või ekstraktis

D = piigipindala, sisestandard, kalibreerimisstandardlahus

M = määratava aminohappe molaarmass

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

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

V = hüdro-lüsaat (punkt 5.3.4) kokku milliliitrites või ekstrakti (punkt 6.1) lahjenduse koguruumala milliliitrites

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

Metioniin määratakse metioniinsulfoonina oksüdeeritud proovi hüdro-lüsaatides, 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 (punkt 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 võrdlusuuringus 1990. aastal, kasutades nelja erinevat sööta (sigade segasöööt, broilerite segasöööt, valgukontsentraat, eelsegu).

▼ **M9**

Märkus: Meetodit katsetati teise rahvusvahelise võrdlusuuringu käigus 2003. aastal, kasutades broilerite lõppfaasi sööda, broilerite algfaasi sööda, maisi, kalajahu ja kodulindude tapajäätmehahu pimedaid kordusproove. Üksikasjalik teave standardis EN ISO 13903.

1990. aasta võrdlusuuringu tulemuste keskväärtused ja standardhälbed pärast võõrväärtuste elimineerimist on esitatud käesoleva punkti tabelis.

Keskväärtused g/kg

Viide Materjal	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. *Korduvus*

Eelmises tabelis esitatud võrdluskatse korduvus on väljendatud labori-sisese standardhällbena ja esitatud järgmistes tabelites: n = osalenud laborite arv

Korduvuse variatsioonikordaja (CV_r)(%)

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

n = osalenud laborite arv

7.2. *Korratavus*

Eespool nimetatud võrdluskatse laboritevahelise standardhällbe tule-mused on esitatud järgmises tabelis:

▼ **M9****Korratavuse variatsioonikordaja (CV_R)(%)**

Viide Materjal	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 standardamino-
hapete kalibreerimislahuste (vt punktid 3.27.4 ja 3.27.5) ja hüdrolüsaadi
(vt punkt 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 segasööda või eelsegude suhtes, mille kloriidisisaldus on suurem kui 1 % (kontsentraadid, mineraalsöödad, täiend-söödad), võib analüüs näidata tegelikust väiksemat metioniinisaldust ning tuleb kasutada eritõtlust.

10. Tulemuslikkuse näitajad

Kahest võrdlusuuringust (eespool punktis 7 esitatud 1990. aasta uuring ning standardis EN/ISO 13903 esitatud 2005. aasta uuring) saadud tulemuste (v.a türosiini kohta) koondamine annab järgmised korduvuse ja korratavuse kriteeriumid. Need kahest laboritevahelisest katsest saadud väärtused ei pruugi olla kohaldatavad muude kui esitatud kontsentratsioonivahemike ja maatriksite suhtes.

10.1. Korduvus

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

- 6 % suuremast väärtusest aminohapete üldsisalduse puhul, kui tegemist on glütsiini,alaniini, lüsiini, proliini, glutaamhappe, isoleutsiini ja histidiiniga;
- 8 % suuremast väärtusest aminohapete üldsisalduse puhul, kui tegemist on treoniini, fenüülalaniini, metioniini, asparagiinhappe ja leutsiiniga;

▼ M9

- 10 % suuremast väärtusest aminohapete üldsisalduse puhul, kui tegemist on arginiini ja valiiniga;
- 12 % suuremast väärtusest aminohappe seriini üldsisalduse puhul;
- 15 % suuremast väärtusest aminohappe tsüst(e)iini üldsisalduse puhul.

10.2. Korratavus

Sama prooviga eri laborites ja/või eri analüüsijate poolt tehtud kahe määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

- 15 % suuremast väärtusest aminohapete üldsisalduse puhul, kui tegemist on glütsiini,alaniini ja treoniiniga;
- 20 % suuremast väärtusest aminohapete üldsisalduse puhul, kui tegemist on lüsiini, proliini, fenüülalaniini, metioniini ja asparagiinhaptega;
- 22 % suuremast väärtusest aminohapete üldsisalduse puhul, kui tegemist on glutaanhappe ja leutsiiniga;
- 27 % suuremast väärtusest aminohappe arginiini üldsisalduse puhul;
- 32 % suuremast väärtusest aminohappe isoleutsiini üldsisalduse puhul;
- 35 % suuremast väärtusest aminohapete üldsisalduse puhul, kui tegemist on valiini ja seriiniga;
- 40 % suuremast väärtusest aminohappe histidiini üldsisalduse puhul;
- 50 % suuremast väärtusest aminohappe tsüst(e)iini üldsisalduse puhul.

F. TRÜPTOFAANI MÄÄRAMINE

Trüptofaani määramiseks kasutatavad analüüsimeetodid on järgmised.

- EN ISO 13904 Loomasööt – Trüptofaanisisalduse määramine
- Analüüsimeetodit kirjeldatakse järgnevalt punktides 1–9.

1. Eesmärk ja kohaldamisala

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

2. Põhimõte

Trüptofaani üldsisalduse määramiseks hüdrolüüsitakse proovi leelises keskkonnas küllastunud baariumhüdrosiidi lahusega ja kuumutatakse 110 °C juures 20 tundi. Pärast hüdrolüüsimist lisatakse sisestandard.

Vaba trüptofaani määramiseks ekstraheeritakse proovi nõrgalt happelistes tingimustes sisestandardi juuresolekul.

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

3. Reaktiivid

- 3.1. Tuleb kasutada bidestilleeritud või samaväärse kvaliteediga vett (juhtivus < 10 µS/cm).

▼ **M9**

- 3.2. Standardaine: trüptofaan (puhtus/sisaldus $\geq 99\%$), mis on kuivatatud vaakumis fosforpentoksiidi kohal.
- 3.3. Sisestandardaine: α -metüültrüptofaan (puhtus/sisaldus $\geq 99\%$), mis on kuivatatud vaakumis fosforpentoksiidi kohal.
- 3.4. Baariumhüdroksiidi oktahüdraat (vältida $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ ülemäärast kontakti õhuga, kuna see võib viia BaCO_3 moodustumiseni, mis võib määramist segada) (vt tähelepanek, punkt 9.3).

3.5. Naatriumhüdroksiid

3.6. Ortofosforhape, $w(w/w) = 85\%$

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

3.8. HPLC-puhtusastmega metanool

3.9. Petrooleeter, keemisivahemik $40\text{--}60^\circ\text{C}$

3.10. Naatriumhüdroksiidi lahus, $c = 1 \text{ mol/l}$

40,0 g NaOH (punkt 3.5) lahustatakse vees ja täidetakse veega (punkt 3.1) 1 liitrini.

3.11. Soolhape, $c = 6 \text{ mol/l}$

Võetakse 492 ml HCl (punkt 3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.

3.12. Soolhape, $c = 1 \text{ mol/l}$

Võetakse 82 ml HCl (punkt 3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.

3.13. Soolhape, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

Võetakse 8,2 ml HCl (punkt 3.7) ja täidetakse veega 1 liitrini.

3.14. Ortofosforhape, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:

Võetakse 34 ml ortofosforhapet (punkt 3.6) ja täidetakse veega (punkt 3.1) 1 liitrini.

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

500 ml mõõtkolvis lahustatakse 0,2553 g trüptofaani (punkt 3.2) soolhappes (punkt 3.13) ja täidetakse soolhappega (punkt 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 (punkt 3.3) soolhappes (punkt 3.13) ja täidetakse soolhappega (punkt 3.13) märgini. Säilitatakse temperatuuril -18°C kuni neli nädalat.

3.17. Trüptofaani ja sisestandardi kalibreerimisstandardlahus:

Võetakse 2,00 ml trüptofaani kontsentreeritud lahust (punkt 3.15) ja 2,00 ml sisestandardi (α -metüültrüptofaani) kontsentreeritud lahust (punkt 3.16). Lahjendatakse veega (punkt 3.1) ja metanooliga (punkt 3.8) umbes sama ruumalani ja umbes sama metanooli kontsentratsioonini (10–30 %), nagu on valmis hüdroolüsaadil.

Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

Valmistamise ajal vältida otsest päikesevalgust.

▼M9

- 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 (punkt 3.19) lahust 100 ml metanoolis (punkt 3.8).
- 3.22. HPLC liikuv faas: 3,00 g äädikhapet (punkt 3.18) + 900 ml vett (punkt 3.1) + 50,0 ml 1,1,1-trikloro-2-metüül-2-propanooli (punkt 3.19) lahust (punkt 3.21) 1 g/100 ml metanoolis (punkt 3.8). Etanoolamiini (punkt 3.20) abil korrigeeritakse pH 5,00-le. Täidetakse veega (punkt 3.1) 1 000 ml-ni.

4. Seadmed

- 4.1. HPLC-seadmed spektrof fluorimeetrilise detektoriga
- 4.2. Vedelikkromatograafia kolonn, 125 mm × 4 mm, C₁₈, 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) °C, 1,4 (± 0,1) bar
- 4.7. Mehaaniline loksuti või magnetsegur
- 4.8. Pöörisegaja

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

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

5.2. Vaba trüptofaani määramine (ekstrakt)

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

Enne HPLC-kolonne süstimist filtritakse mõned milliliitrid lahust läbi 0,45 µm membraanfiltrit (punkt 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.

▼ **M9**5.3. *Trüptofaani üldsisalduse määramine (hüdrolüsaat).*

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

Enne autoklaavi avamist langetatakse temperatuur natuke alla 100 °C kraadi. Ba(OH)₂·8 H₂O kristalliseerumise vältimiseks lisatakse soojale segule 30 ml toatemperatuuril olevat vett. Raputatakse või segatakse kergelt. Lisatakse 2,00 ml sisestandardi (α -metüültrüptofaani) kontsentratsioonid lahust (punkt 3.16). Nõusid jahutatakse vee-/jäävannis 15 minutit.

Seejärel lisatakse 5 ml ortofosforhapet (punkt 3.14). Nõu hoitakse jahutusvannis ja neutraliseeritakse segamisel HCl-iga (punkt 3.11) ning pH korrigeeritakse 3,0-ni HCl (punkt 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 süstimist filtritakse mõned milliliitrid lahust läbi 0,45 µm membraanfiltriga (punkt 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 tähelepanekute punkte 9.1 ja 9.2):

Vedelikkromatograafia kolonn või kolonn (punkt 4.2): 125 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 3 µm samaväärne

Koloni temperatuur: Ruumitemperatuur

Liikuv faas (punkt 3.22): 3,00 g äädikhapet (punkt 3.18) + 900 ml vett (punkt 3.1) + 50,0 ml 1,1,1-trikloro-2-metüül-2-propanooli (punkt 3.19) lahust (punkt 3.21) 1 g/100 ml metanoolis (punkt 3.8). Etanoolamiini (punkt 3.20) abil korrigeeritakse pH 5,00-le. Täidetakse veega (punkt 3.1) 1 000 ml-ni.

Voolukiirus: 1 ml/min

Summaarne voolutamisaeg: umbes 34 min

Avastamise lainepikkus: ergastamine: 280 nm, emissioon: 356 nm.

Sissesüstitava ruumala 20 µl

▼ **M9****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 (punkt 3.17)

B = trüptofaani piigipindala, ekstrakt (punkt 5.2) või hüdroolüsaat (punkt 5.3)

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

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

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

C = sisestandardi piigipindala, ekstrakt (punkt 5.2) või hüdroolüsaat (punkt 5.3)

D = trüptofaani piigipindala, kalibreerimisstandardlahus (punkt 3.17)

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

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

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

7. Korduvus

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

8. Võrdlusuuringu tulemused

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

	Proov 1 Seasõõt	Proov 2 L-trüptofaaniga rikastatud seasõõt	Proov 3 Seasõodakontse- ntraat
L	12	12	12
n	50	55	50
Keskväärts 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

▼ **M9**

	Proov 1 Seasööt	Proov 2 L-trüptofaaniga rikastatud seasööt	Proov 3 Seasöödakontse- ntraat
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-Dixon'i võõrväärtuste testi alusel)
 s_r = korduvust iseloomustav standardhälve
 S_R = korratavust iseloomustav standardhälve
 r = korduvus
 R = korratavus
 CV_r = korduvuse variatsioonikordaja, %
 CV_R = korratavuse variatsioonikordaja, %

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

	Proov 4 Nisu ja soja segu	Proov 5 Nisu ja soja segu (= proov 4), millele on lisatud trüptofaani (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Keskväärtes 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-Dixon'i võõrväärtuste testi alusel)
 s_r = korduvust iseloomustav standardhälve
 S_R = korratavust iseloomustav standardhälve
 r = korduvus
 R = korratavus
 CV_r = korduvuse variatsioonikordaja, %
 CV_R = korratavuse variatsioonikordaja, %

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

▼ **M9**

	Proov 1 Sigade segasõöt (CRM 117)	Proov 2 Väikese rasvasi- saldusega kala- jahu (CRM 118)	Proov 3 Sojajahu (CRM 119)	Proov 4 Lössipulber (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Keskväärtus 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 = korduvust iseloomustav standardhälve

S_R = korratavust iseloomustav standardhälve

r = korduvus

R = korratavus

CV_r = korduvuse variatsioonikordaja, %

CV_R = korratavuse variatsioonikordaja, %

9. Tähelepanekud

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

Isokraatiline elueerimine, millele järgneb kolonni gradientpuhastus:

Vedelikchromatograafia kolonn: 125 mm × 4 mm, C_{18} , täidise tera-
suurus 5 μ m või samaväärne

Kolonni temperatuur: 32 °C

Liikuv faas: A: 0,01 mol/l KH_2PO_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 hüdrolüsaate ilma sisestandardita, kontrollimaks, et sisestandardi piigi kohal ei moonutaks alusjoont lisandite

▼ **M9**

väljumine. On oluline, et voolutamisaeg oleks piisavalt pikk kõigi lagunemisproduktide elueerimiseks, vastasel juhul võivad hiljem elueeruvad piigid segada järgnevaid kromatograafilisi määramisi.

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

9.3. *Baariumhüdroksiid*

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

G. TOORÕLI JA -RASVA MÄÄRAMINE

1. **Eesmärk ja kohaldamisala**

See meetod võimaldab määrata toorõli ja -rasva sisaldust söödas.

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

Toorõli ja -rasva määramiseks õliseemnetes ja -viljades ning üle 15 % toorõli-/toorrasvasisaldusega söödas tuleks ekstraheerimine teha menetluse A kohaselt ja uuesti ekstraheerimine menetluse B kohaselt (punkt 5.3).

1.1. Meetod A – otse ekstraheeritav toorõli ja -rasv

Seda meetodit kohaldatakse taimse söödamaterjali puhul, välja arvatud meetodiga B hõlmatud ainete puhul.

1.2. Meetod B – kogu toorõli ja -rasv

Seda meetodit kohaldatakse loomse söödamaterjali ja kõigi segasöötade puhul. Seda kasutatakse kõigi ainete puhul, millest ei ole ilma eelneva hüdrolüüsita võimalik õli ja rasva ekstraheerida (nt gluteen, 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 filtritakse. Jääk pestakse, kuivatatakse ja määratakse vastavalt meetodile A.

▼ **M9****3. Reaktiivid**

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

4. Seadmed

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

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

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

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

Solvent destilleeritakse välja. Jääk koos kolviga asetatakse poolteiseks tunniks kuivatuskappi (punkt 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 (punkt 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 (punkt 3.4), mis on piisav õli- ja rasvakao vältimiseks filtrimisel. Lahus filtritakse läbi niisutatud rasvavaba kahekordse filterpaberi. Jääki pestakse külmas vees kuni filtraadi neutraalse reaktsioonini. Kontrollitakse, et filtraat ei sisalda õli ega rasva. Kui filtraat sisaldab õli või rasva, tuleb proov enne hüdrolüüsi petrooleetriga ekstraheerida, kasutades meetodit A.

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

⁽¹⁾ Kui hiljem tuleb kontrollida õli või rasva kvaliteeti, asendatakse pimsskivitükid klaas-helmestega.

▼ **M9**

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

5.3. *Menetlus A ja uuesti ekstraheerimine menetluse B kohaselt.*

Toorõli ja -rasva määramiseks oliseemnetes ja -viljades ning üle 15 % toorõli-/toorrasvasisaldusega söödas tuleks ekstraheerimine teha menetluse A kohaselt ja uuesti ekstraheerimine menetluse B kohaselt.

See tähendab, et pärast petrooleetriga ekstraheerimist (menetlus A) ekstraheeritakse jääki või osa jäägist uuesti soolhappega (menetlus B). Toorõli- ja toorrasvasisaldus on menetluste A ja B tulemuste summa.

6. **Tulemuste väljendamine**

Jäägi mass väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. **Korduvus**

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, toimatakse järgmiselt.

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

Hülssi jäänud ekstraheerimisjääd 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 (alikvootne osa ekstraktist),

m_2 = jäägi mass grammides pärast teist ekstraheerimist.

▼ **M9**

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

H. KOGUKIU MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja kohaldamisala**

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

Meetodit ei kasutata lignotselluloosi ja taimse söe puhul (liiga väikesed osakesed).

2. Põhimõte

Proovi, mis on vajaduse korral rasvatustatud, töödeldakse mitu korda järjest teatava kontsentratsiooniga väävelhappe ja kaaliumhüdrokksiidi keevate lahustega. Jääk eraldatakse filtrimisega läbi paagutatud klaasfiltrit ning pestakse, kuivatatakse, kaalutakse ja tuhistatakse 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-oktanool)
- 3.3. Filteraine (Celite 545 või samaväärne toode), mida soojendatakse temperatuuril 500 °C neli tundi (punkt 8.6)
- 3.4. Atsetoon.
- 3.5. Petrooleeter, keemistemperatuur 40–60 °C
- 3.6. Soolhape, $c = 0,5 \text{ mol/l}$
- 3.7. Kaaliumhüdrokksiidi lahus, $c = 0,23 \text{ mol/l}$

4. Seadmed

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

▼M9

- 4.7. Ühendusrõngad kuumutusseadme (punkt 4.1), tiigli (punkt 4.2) ja silindri (punkt 4.3) ühendamiseks ning külmekestraheerimisseadme (punkt 4.6) ja tiigli ühendamiseks.

5. **Töö käik**

1 g ettevalmistatud proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ja pannakse see tiiglisse (punkt 4.2) (vt tähelepanekute punkte 9.1, 9.2 ja 9.3) ning lisatakse 1 g filterainet (punkt 3.3).

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

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

Väljalasketoru (punkt 4.1) klapp avatakse, väävelhape filtritakse vaakumitingimustel läbi filtertiigli ning jääki pestakse kolm korda järjest 30 ml keeva veega, tagades, et pärast iga pesemist filtritakse jääk kuivaks.

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

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

▼M9**7. Korduvus**

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. Korratavus

Sama prooviga eri laborites tehtud kahe määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

- absoluutväärtuses väljendatult 1,0 %, kui kogukiu sisaldus on alla 10 %;
- 10 % suuremast tulemusest, kui kogukiu sisaldus on 10 % või suurem.

9. Tähelepanekud

- 9.1. Sööt, mis sisaldab üle 10 % rasva, tuleb enne analüüsimist petrooleetriga (punkt 3.5) rasvatustada. Filtritiigel (punkt 4.2) ja selle sisu ühendatakse külmekstraheerimiseseadmega (punkt 4.6) ja pestakse jääki vaakumitingimustel kolm korda järjest 30 ml petrooleetriga, tagades, et jääk oleks kuiv. Tiigel ja selle sisu ühendatakse kuumutuseseadmega (punkt 4.1) ja jätkatakse vastavalt punktile 5.
- 9.2. Sööt, mis sisaldab rasva ja mida ei saa ekstraheerida petrooleetriga (punkt 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 (punkt 4.6) ja pestakse jääki kolm korda järjest 30 ml atsetooniga ning seejärel veel kolm korda 30 ml petrooleetriga. Filtritakse vaakumitingimustel kuivaks ja jätkatakse analüüsi vastavalt punktile 5, alustades töötlemisest kaaliumhüdroksiidiga.
- 9.3. Kui sööt sisaldab üle 5 % karbonaati, mis on väljendatud kaltsiumkarbonaadina, ühendatakse tiigel (punkt 4.2) kaalutud prooviga kuumutuseseadme (punkt 4.1) külge. Proovi pestakse kolm korda 30 ml soolhappega (punkt 3.6). Pärast iga lisamist lastakse proovil enne filtrimist umbes üks minut seista. Pestakse üks kord 30 ml veega ja jätkatakse seejärel vastavalt punktile 5.
- 9.4. Kui kasutatakse statiivitaolist seadet (mitu tiiglit on kinnitatud sama kuumutuseseadme külge), ei või sama analüüsitava proovi suhtes teostada kahte üksikut määramist samas sarjas.
- 9.5. Kui pärast keetmist on happelisi ja aluselisi lahuseid raske filtrida, kasutatakse kuumutuseseadme väljalasketoru kaudu lastavat suruõhku ja jätkatakse seejärel filtrimist.
- 9.6. Tuhastamistemperatuur ei tohi olla üle 500 °C, et pikendada klaasfiltritiiglite eluaega. Tuleb jälgida, et kuumutus- ja jahutussüklite ajal ei tekiks liigset termolööki.

▼ **M9****I. SUHKRU MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja kohaldamisala**

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 segasöödade puhul. Muude söötade puhul on sätestatud erimeetodid. Vajaduse korral tuleb laktoosi hulk mõõta eraldi ja tulemuste arvutamisel seda arvesse võtta.

Seda meetodit tuleb kasutada suhkruisalduse määramiseks sööda energiväärtuse arvutamisel.

Kui suhkruisaldust määratakse muudel eesmärkidel, võib kasutada muid analüüsimetodeid.

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, fenoollftaleiini 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-äädikhapet. Täidetakse veega 100 milliliitriini.

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 milliliitriini.

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 (punkt 3.8.2) naatriumkarbonaadi lahusesse (punkt 3.8.3). Lisatakse vasksulfaadi lahus (punkt 3.8.1) ja täidetakse veega 1 liitriini. Lastakse öö läbi settida ja filtritakse.

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 sidrunhapet ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) lahustatakse 50 ml vees.

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

3.9. Naatriumtiosulfaadilahus, 0,1 mol/l

3.10. 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.

▼ **M9**

- 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): ligikaudu 35–40 p/min

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

2,5 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ja pannakse 250 ml mõõtekolbi. Lisatakse 200 ml etanooli (punkt 3.1) ning segatakse trumlis tund aega. Lisatakse 5 ml Carrezi lahust I (punkt 3.2) ja segatakse umbes 30 sekundit. Lisatakse 5 ml Carrezi lahust II (punkt 3.3) ja segatakse veel üks minut. Täidetakse etanooliga (punkt 3.1) märgini, homogeneenitakse ja filtritakse. Eemaldatakse 200 ml filtraati ja aurustatakse ligikaudu poole mahuni, et vabaneda enamikust etanoolist. Aurustamise jäák kantakse sooja vett kasutades kvantitatiivselt 200 ml mõõtekolbi, jahutatakse, täidetakse veega kuni märgini, homogeneenitakse ja vajaduse korral filtritakse. 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 (punkt 3.4) ning seejärel lisatakse hoolikalt ja samal ajal pidevalt segades soolhapet (punkt 3.5), kuni vedelik värvub selgelt punaseks. Lisatakse 15 ml soolhapet (punkt 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 (punkt 3.7). Täidetakse veega 100 ml-ni ja homogeneenitakse. Eemaldatakse kuni 25 ml lahust, mis sisaldab alla 60 mg redutseerivaid suhkruid, mis on väljendatud glükoosina. Vajaduse korral täidetakse destilleeritud veega 25 ml-ni ja määratakse redutseerivate suhkrute hulk Luff-Schoorli meetodi abil. Tulemus väljendatakse glükoosi protsendimäärana või sõltuvalt olukorrast sahharoosi protsendimäärana, korrutades tulemuse teguriga 0,95.

5.4. Tiitrimine Luff-Schoorli meetodi järgi

Pipetiga võetakse 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi (punkt 3.8) ja kantakse see 300 ml koonilisse kolbi; lisatakse täpselt 25 ml selitatud suhkrulahust. Lisatakse 2 pimsskivigraanulit (punkt 3.13), kuumutatakse käsitsi segades keskmise kõrgusega lahtise leegi kohal ja segu kuumutatakse keemiseni umbes kahe minuti jooksul. Kooniline 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 koonilise kolvi põhja. Koonilise kolvi külge pannakse püstjahuti. Keedetakse täpselt kümme minutit. Jahutatakse kohe külmas vees ja umbes viie minuti möödudes tiitritakse järgmiselt.

▼ **M9**

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

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

6. Tulemuste arvutamine

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

7. Erimenetlused

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

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

- 7.2. Suhkrurikaste, kuid praktiliselt tärglisevabade melasside ja söödamaterjalide 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 (punkt 3.2) ja II (punkt 3.3) punkti 5.1 kohaselt. Täidetakse külma veega kuni märgini, homogeenitakse ja filtritakse. Üldsuhkru hulga määramiseks jätkatakse vastavalt punktile 5.3.

8. Tähelepanekud

- 8.1. Vahutamise vältimiseks on soovitatav lisada (proovi kogusest sõltumata) umbes 1 ml 3-metüülbutaan-1-ooli (punkt 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).

▼ **M9**

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

Näide

Võetud kogused vastavad mõlema määramise puhul 250 mg massiga proovile.

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

Vahe on 16,6 mg glükoosi.

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

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

Väärtuste tabel 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi jaoks

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

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

J. LAKTOOSI MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja kohaldamisala**

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

2. Põhimõte

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

▼M9**3. Reaktiivid**

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

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-äädikhapet. 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. Luff-Schoorli reaktiiv

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

3.4.1. Vasksulfaadi lahus: 25 g rauavaba vasksulfaati ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) lahustatakse 100 ml vees.

3.4.2. Sidrunhappe lahus: 50 g sidrunhapet ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 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 1 mg täpsusega ja pannakse selline kogus proovi 100 ml mõõtekolbi. Lisatakse 25–30 ml vett. Kolb asetatakse kolmekümneks minutiks keeva vee vanni ning jahutatakse seejärel umbes 35 °C-ni. Lisatakse 5 ml pärmisuspensiooni (punkt 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 (punkt 3.2) ja segatakse kolmkümmend sekundit, seejärel lisatakse 2,5 ml Carrezi lahust II (punkt 3.3) ja segatakse veel kolmkümmend sekundit. Täidetakse veega 100 milliliitrit, segatakse ja filtritakse. Pipetiga eemaldatakse filtraadikogus, mis ei ületa 25 ml ja mis soovitatavalt sisaldab 40–80 mg laktoosi, ning kantakse see 300 ml koonilisse kolbi. Vajaduse korral täidetakse veega 25 ml-ni.

▼ **M9**

5 ml pärmisuspensiooniga (punkt 3.1) tehakse samal viisil pimekatse. Laktoosisisaldus määratakse Luff-Schoorli meetodi abil järgmiselt: lisatakse täpselt 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi (punkt 3.4) ja kaks pimsski-vigraanulit (punkt 3.5). Segatakse käsitsi keskmise kõrgusega lahtise leegi kohal ja segu kuumutatakse keemiseni umbes kahe minuti jooksul. Kooniline 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 koonilise kolvi põhja. Koonilise kolvi külge pannakse püstjahuti. Keedetakse täpselt kümme minutit. Jahutatakse kohe külmas vees ja umbes viie minuti möödudes tiitritakse järgmiselt.

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

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

6. **Tulemuste arvutamine**

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

Veevabale laktoosile vastav tulemus väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. **Tähelepanek**

- Toodete puhul, mis sisaldavad üle 40 % fermenteeritavat suhkrut, kasutatakse rohkem kui 5 ml pärmisuspensiooni (punkt 3.1).
- Vähendatud laktoosisisaldusega söödas (nt kassipiim) muundatakse laktoos fruktoosiks, mis ei fermenteeru täielikult kahe tunni jooksul ja mille tulemusena saadakse suuremad näitajad või valepositiivsed tulemused (sest ekstrakti jäävad fruktoosijäägid).

Väärtuste tabel 25 ml Luff-Schoorli reaktiivi jaoks

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

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glükoos, fruktoos invertsuhkrud C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoos C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	vahe	mg	vahe	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14

▼ **M9**

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glükoos, fruktoos invertsuhkrud C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoos C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	vahe	mg	vahe	ml
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. TÄRKLISE MÄÄRAMINE**POLARIMEETRILINE MEETOD****1. Eesmärk ja kohaldamisala**

Selle meetodi abil on võimalik kindlaks määrata tärklise ja suure molekulmassiga tärklise lagunemisproduktide sisaldust söödas, et kontrollida deklareeritud energiasisalduse (VII lisa sätted) ja määrase (EÜ) nr 767/2009 järgimist.

Seda meetodit tuleb kasutada tärklisesisalduse määramiseks sööda energiaväärtuse arvutamisel.

Kui tärklisesisaldust määratakse muudel eesmärkidel, võib kasutada muid analüüsimetodeid.

2. Põhimõte

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

Teisel määramisel ekstraheeritakse proovi 40 % etanooliga. Pärast filtraadi hapestamist soolhappega, selitamist ja filtrimist mõõdetakse lahuse optiline pöörang esimese määramisega analoogsel viisil.

Proovi tärklisesisaldus saadakse nimetatud kahe määramise vahe korrumisele teadaoleva koefitsiendiga.

3. Reaktiivid

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

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

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

3.3. Carrezi lahus I: vees lahustatakse 21,9 g tsinkatsetaati Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O ja 3 g jää-äädikhapet. Täidetakse veega 100 milliliitri.

▼M9

3.4. Carrezi lahus II: vees lahustatakse 10,6 g kaaliumferrotsüaniidi $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$. 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 kooniline 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, punkt 7.1)

2,5 g peenestatud proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ning pannakse see 100 ml mõõtekolbi. Lisatakse 25 ml soolhapet (punkt 3.2), loksutatakse proovi ühtlase jaotumise saavutamiseks ning lisatakse veel 25 ml soolhapet (punkt 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 (punkt 3.3) ja loksutatakse umbes 30 sekundit. Seejärel lisatakse 5 ml Carrezi II lahust (punkt 3.4) ja jätkatakse loksutamist veel 30 sekundi jooksul. Täidetakse veega märgini, segatakse ja filtritakse. 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. 40 % 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 (punkt 3.5) (vt tähelepanekute punkt 7.2). Kolb jäetakse üheks tunniks toatemperatuurile seisma; selle aja jooksul loksutatakse kolbi kuus korda tugevasti, nii et proov seguneks põhjalikult etanooliga. Täidetakse etanooliga (punkt 3.5) märgini, segatakse ja filtritakse.

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

▼M9

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

6. **Tulemuste arvutamine**

Tärglisesisaldus (%) arvutatakse järgmiselt:

6.1. *Mõõtmine polarimeetriga*

$$\text{Tärglisesisaldus (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = optiline kogupöörang kraadides

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

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

+ 185,9°: riisitärglis

+ 185,7°: kartulitärglis

+ 184,6°: maisitärglis

+ 182,7°: nisutärglis

+ 181,5°: odratärglis

+ 181,3°: kaeratärglis

+ 184,0°: muud tärglisesiigid ja tärglisesegud segasöödas

6.2. *Mõõtmine sahharimeetriga*

$$\text{Tärglisesisaldus (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2 N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6 N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

S = optiline kogupöörang sahharimeetri kraadides

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

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

16,29 g prantsuse sahharimeetrite puhul;

26,00 g saksa sahharimeetrite puhul;

20,00 g muude sahharimeetrite puhul;

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

▼ **M9**6.3. *Korduvus*

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

7. **Tähelepanekud**

7.1. Kui proov sisaldab üle 6 % karbonaate, arvutatuna kaltsiumkarbonaadi, tuleb need enne optilise kogupöörangu määramist täpselt sobiva koguse lahjendatud väävelhappega töödeldes lagundada.

7.2. Suure laktoosisisaldusega toodete, näiteks pulbrilise piimavadaku või lõssipulbri puhul tuleb pärast 80 ml etanooli (punkt 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 söödamaterjalid võivad juhul, kui neid sisaldub loomasöödas märkimisväärses koguses, polarimeetrilise meetodiga tärglisesisalduse määramisel esile kutsuda häireid, mis võivad viia ebaõigetele tulemustele:

— (suhkru)peedisaadused, näiteks (suhkru)peedipulp, (suhkru)peedimelass, melasseeritud (suhkru)peedipulp, (suhkru)peedimelassiraba, (peedi)suhkur;

— tsitruspulp;

— linaseeme; linakook; linasrott;

— rapsiseeme; rapsikook; rapsisrott; rapsiseemnekestad;

— päevalillesemned; päevalillesrott; osaliselt kooritud päevalillesrott;

— koprakook; koprasrott;

— kartulipulp;

— veetustatud pärm;

— inuliinirikkad tooted (nt maapirniliistakud või -jahu);

— rasvakõrned;

— sojatooted.

Neil juhtudel võib kohaldada komisjoni määruses (EÜ) nr 121/2008 ⁽¹⁾ esitatud analüüsimeetodit. Seda meetodit võib kasutada ka alla 1 % tärglisesisaldusega sööda puhul.

⁽¹⁾ Komisjoni 11. veebruari 2008. aasta määrus (EÜ) nr 121/2008, millega sätestatakse loomasöödana kasutatavate toodete (valmististe) (CN-kood 2309) tärglisesisalduse määramisemeetod (ELT L 37, 12.2.2008, lk 3).

▼ **M9****L. KOGUTUHA MÄÄRAMINE**

1. **Eesmärk ja kohaldamisala**
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 tuhas- tamiseks.
5. **Töö käik**
Umbes 5 g proovi (toodete puhul, millel on kalduvus paisuda, 2,5 g) kaalutakse 1 mg täpsusega, pannakse tuhastamistiiglisse, mis on eelne- valt kuumutatud temperatuurini 550 °C, maha jahutatud ja tareeritud. Tiigel asetatakse kuumutusplaadile ja kuumutatakse järk-järgult kuni aine söestumiseni. Tuhastatakse vastavalt punktide 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 eksikaato- risse, 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 % ammoonium- nitraadi lahust või vett (ettevaatlikult, et vältida tuha hajumist ja tompude tekkimist). Pärast kuivatuskapis kuivatamist jätkatakse kaltsi- neerimist. Korratatakse seni, kuni aine on täielikult tuhastunud.
 - 7.2. *Ainetega, mille puhul punktis 7.1 kirjeldatud meetod ei anna tulemust,* toimitakse järgmiselt: pärast kolmetunnist tuhastamist pannakse tuhk sooja vette ja filtritakse läbi väikese tuhavaba filtri. Filter ja selle sisu tuhastatakse esialgses tiiglis. Filtraat pannakse jahtunud tiiglisse, aurus- tatakse kuivaks, tuhastatakse ja kaalutakse.
 - 7.3. *Õlide ja rasvade* puhul pannakse sobiva suurusega tiiglisse 25 g suurune täpselt kaalutud proov. Aine süüdatakse tuhavaba filterpaberi ribaga ja söestatakse. Pärast põlemist niisutatakse võimalikult vähese veega. Kuivatatakse ja tuhastatakse punkti 5 kohaselt.

▼ **M9****M. SOOLHAPPES LAHUSTUMATU TUHA MÄÄRAMINE****1. Eesmärk ja kohaldamisala**

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

1.1. *Meetod A:* kasutatakse orgaanilise söödamaterjali ja enamuse segasööda 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 filtritakse ja kaalutakse.

2.2. *Meetod B:* proovi töödeldakse soolhappega. Lahus filtritakse, 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 $60 \times 40 \times 25$ mm) või ümmargused (läbimõõt: 60–75 mm, kõrgus: 20–40 mm) kvarts-, portselan- või platinatiigid tuhas- tamiseks.

4.4. Tuhavabad filtrid

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 (punkt 3.1). Segu aetakse aeglaselt keema ja keedetakse vaikselt viisteist minutit. Soe lahus filtritakse 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 1 mg täpsusega ja pannakse 250–400 ml keeduklaasi. Lisatakse üksteise järel 25 ml vett ja 25 ml soolhapet (punkt 3.1), segatakse ning oodatakse, kuni kihisemine on lõppenud. Lisatakse veel 50 ml soolhapet (punkt 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 hüdrolyüsiks. Filtritakse soojalt läbi tuhavaba filtri ning filter pestakse 50 ml sooja vees (vt tähelepanekute

▼ **M9**

punkt 7). Filter jäägiga asetatakse tuhastamiseks ettenähtud tiiglisse, kuivatatakse ja tuhastatakse temperatuuril mitte alla 550 °C ja mitte üle 700 °C. Tuhk pannakse 250–400 ml keeduklaasi, kasutades 75 ml soolhapet (punkt 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 filtrimine osutub raskeks, tehakse analüüs uuesti, sealjuures asendatakse 50 ml soolhapet (punkt 3.1) 50 ml trikloroäädikhappe 20 % lahusega (w/v) (punkt 3.2) ja pestakse filter soojas 1 % trikloroäädikhappe lahuses (punkt 3.3).

N. ÜLDFOSFORI MÄÄRAMINE

Üldfosfori sisaldus määratakse

— standardis EN 15510 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Kaltsiumi, naatriumi, fosfori, magneesiumi, kaaliumi, raua, tsingi, vase, mangaani, koobalti, molübdeeni ja plii määramine induktiivsidesunud plasma aatomiemissioonspektromeetria (ICP-AES) abil“ esitatud analüüsimeetodiga või

— standardis EN 15621 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Kaltsiumi, naatriumi, fosfori, magneesiumi, kaaliumi, väävl, raua, tsingi, vase, mangaani ja koobalti määramine pärast rõhu all lagundamist induktiivsidesunud plasma aatomiemissioonspektromeetria (ICP-AES) abil“ esitatud analüüsimeetodiga või

— järgnevalt kirjeldatud fotomeetrilise meetodi abil.

FOTOMEETRILINE MEETOD1. **Eesmärk ja kohaldamisala**

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

2. **Põhimõte**

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

3. **Reaktiivid**

3.1. Kaltsiumkarbonaat.

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

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

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

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

3.6. Molübdovanadaatrektiiv: 1 l mõtekolvis segatakse 200 ml ammoooniumheptamolübdadi lahust (punkt 3.6.1), 200 ml ammoniummonovanadaadi lahust (punkt 3.6.2) ja 134 ml lämmastikhapet (punkt 3.4). Kolb täidetakse veega margini.

▼ **M9**

- 3.6.1. Ammooniumheptamolübdadi lahus: 100 g ammooniumheptamolübdadi ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) lahustatakse soojas vees. Lisatakse 10 ml ammooniumhüdrosiidi (tihedus: 0,91 g/ml) ja täidetakse veega kuni 1 liitrini.
- 3.6.2. Ammooniummonovanadaadi lahus: 2,35 g ammooniummonovanadaadi NH_4VO_3 lahustatakse 400 ml kuumas vees. Pidevalt segades lisatakse aeglaselt 20 ml lahjendatud lämmastikhapet (7 ml HNO_3 (punkt 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 käik5.1. *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 1 mg täpsusega. Uuritav proov pannakse Kjeldahli kolbi, lisatakse 20 ml väävelhapet (punkt 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 (punkt 3.4), kuumutatakse kergelt, lastakse veidi jahtuda, lisatakse veel veidi lämmastikhapet (punkt 3.4) ja viiakse tagasi keemistemperatuurile. Menetluse korratakse värvusetu lahuse saamiseni. Jahutatakse, lisatakse veidi vett, vedelik dekanteeritakse 500 ml mõõtekolbi, loputades Kjeldahli kolbi sooja veega. Lastakse jahtuda, täidetakse kuni määrgini veega, homogeneeritakse ja filtritakse.

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 1 g kaltsiumkarbonaadiga (punkt 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 (punkt 3.2) kuni kihisemise lakkamiseni. Lisatakse veel 10 ml soolhapet (punkt 3.2). Keeduklaas pannakse liivavannile ja aurustatakse kuivaks, et silikaadid muutuksid lahustumatuks. Jääk lahustatakse uuesti 10 ml lämmastikhappes (punkt 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 määrgini veega, homogeneeritakse ja filtritakse.

▼ M9**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 (punkt 4.6) ja lisatakse 10 ml molübdovanadaatreaktiivi (punkt 3.6). Homogeenitakse ja lastakse seista temperatuuril 20 °C vähemalt 10 minutit. Saadud lahuse optilist tihedust mõõdetakse spektrofotomeetriga lainepikkusel 430 nm, lisades 10 ml molübdovanadaatreaktiivi (punkt 3.6) 10 ml veele.

5.3. Kalibreerimiskõver

Standardlahusest (punkt 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 (punkt 3.6). Homogeenitakse 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.

Korduvus

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 %.

O. KLORIIDIDEST PÄRIT KLOORI MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja kohaldamisala**

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

2. Põhimõte

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

3. Reaktiivid

- 3.1. Ammooniumtiotsüanaadi lahus, 0,1 mol/l.
- 3.2. Hõbenitraadi lahus, 0,1 mol/l.
- 3.3. Ammooniumraudsulfaadi (NH₄)Fe(SO₄)₂ küllastunud lahus.
- 3.4. Lämmastikhape, tihedus: 1,38 g/ml.

▼ **M9**

- 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-äädikhapet. 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): ligikaudu 35–40 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 1 mg täpsusega. See pannakse 400 ml veega 500 ml mõõtekolbi temperatuuril ligikaudu 20 °C. Segatakse trumlis kolmkümmend minutit, täidetakse veega kuni märgini, homogeneeritakse ja filtritakse.

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

Umbes 5 g proovi kaalutakse 1 mg täpsusega ja pannakse 1 g aktiivsööga 500 ml mõõtekolbi. Lisatakse 400 ml vett temperatuuriga ligikaudu 20 °C ja 5 ml Carrezi lahust I (punkt 3.7), segatakse 30 sekundit ning lisatakse 5 ml Carrezi lahust II (punkt 3.8). Segatakse trumlis kolmkümmend 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 filtrita. Dekanteeritakse (vajaduse korral tsentrifuugitakse), eemaldatakse 100 ml supernatanti ja kantakse 200 ml mõõtekolbi. Segatakse atsetooniga (punkt 3.6), täidetakse lahustiga kuni märgini, homogeneeritakse ja filtritakse.

5.2. Tiitrimine

Sõltuvalt arvatavast kloorisisaldusest kantakse pipeti abil koonilisse 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 (punkt 3.4), 2 ml ammoniumraudsulfaadi küllastunud lahust (punkt 3.3) ja nullmärgini täidetud büreti abil kaks tilka ammoniumtiotsüanaadi lahust (punkt 3.1). Büreti abil lisatakse hõbenitraadi lahust (punkt 3.2), nii et saadakse ülekogus 5 ml. Lisatakse 5 ml dietüületrit (punkt 3.5) ja loksutatakse tugevalt sademe koaguleerimiseks. Hõbenitraadi ülekogus tiitritakse ammoniumtiotsüanaadi lahusega (punkt 3.1), kuni punakaspruun värvus püsib ühe minuti.

▼ M9**6. Tulemuste arvutamine**

Kloriini (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 grammides alikvoodis.

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

▼M9

IV LISA

SÖÖDAS LUBATUD SÖÖDALISANDITE SISALDUSE
KONTROLLIMISE ANALÜÜSIMETODID

A. A-VITAMIINI SISALDUSE MÄÄRAMINE

A-vitamiini sisaldus määratakse

- standardis EN 17547 „Loomasööd: proovivõtu- ja analüüsimetodid – A-, E- ja D-vitamiini ⁽¹⁾ sisalduse määramine – Tahke faasi ekstraheerimisega (SPE) puhastamist ja kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (HPLC) kasutav meetod“ esitatud analüüsimetodiga või
- kõrgefektiivse pöördfaasilise vedelikkromatograafia (RP-HPLC) abil, kasutades UV- või fluorestsentsdetektorit, nagu on kirjeldatud järgnevatel punktides 1–9.

1. Eesmärk ja kohaldamisala

Selle meetodiga on võimalik määrata A-vitamiini (retinooli) kogust söödas. 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 kontsentratsiooni. 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 tähelepanekute punkt 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 tähelepanekute punkt 7.8).
- 3.7. Fenooltaleiini lahus, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ etanoolis (punkt 3.1).

⁽¹⁾ Standardis EN 17547 esitatud analüüsimetodile viidatakse kui alternatiivsele meetodile, mida kasutatakse A- ja E-vitamiini sisalduse määramiseks tehtava ametliku kontrolli käigus A-vitamiini sisalduse määramiseks käesoleva lisa A osas kirjeldatud meetodi asemel ja E-vitamiini sisalduse määramiseks käesoleva lisa B osas kirjeldatud meetodi asemel.

▼ **M9**

- 3.8. 2-propanool.
- 3.9. HPLC liikuv faas: metanooli (punkt 3.3) ja vee segu, nt $980 + 20$ ($v + v$). Täpne vahetamine määratakse kasutatava kolonni parameetrite järgi.
- 3.10. Hapnikuvaba lämmastik.
- 3.11. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini atsetaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega, nt $2,80 \times 10^6$ RÜ/g.
- 3.11.1. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini atsetaadi põhilahus: 50 mg A-vitamiini atsetaati (punkt 3.11) kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja pannakse see 100 ml mõõtekolbi. Lahustatakse 2-propanoolis (punkt 3.8) ja täidetakse sama lahustiga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 1 400 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktidele 5.6.3.1.
- 3.12. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaat, eriti puhas, kontrollitud aktiivsusega, nt $1,80 \times 10^6$ RÜ/g.
- 3.12.1. Täielikult *trans*-konfiguratsioonis A-vitamiini palmitaadi põhilahus: 80 mg A-vitamiini palmitaati (punkt 3.12) kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja pannakse see 100 ml mõõtekolbi. Lahustatakse 2-propanoolis (punkt 3.8) ja täidetakse sama lahustiga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 1 400 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Täpne sisaldus määratakse vastavalt punktidele 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-di-*tert*-butüül-4-metüülfenool (BHT) (vt tähelepanekute punkt 7.5).

4. **Seadmed**

- 4.1. Vaakumrotaatoraurusti.
- 4.2. Tumedast klaasist nõud.
- 4.2.1. Lihvavaga lamedapõhjalised või koonilised kolvid, 500 ml.
- 4.2.2. Lihvkorgiga kitsakaelalised mõõtkolvid 10, 25, 100 ja 500 ml.
- 4.2.3. Lihvkorgiga koonilised jaotuslehtid, 1 000 ml.
- 4.2.4. Lihvavaga pirnkolvid, 250 ml.
- 4.3. Lihvühendusega Allihni tagasivoolujahuti, ümbrise pikkus 300 mm, gaasitoru adapteriga.
- 4.4. Kurdfilterpaber faaside eraldamiseks, diameeter 185 mm (nt Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. HPLC-seadmed sissepritsestüsteemiga.
- 4.5.1. Vedelikkromatograafia kolonn, 250 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , täidise terasuurus 5 või 10 μ m 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. Ekstraktsiooniseade (vt joonis 1), mis koosneb:

▼ **M9**

4.8.1. 1-liitrisest lihvava ja lihvborgiga 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. Proovi (proove) ei jahvatata, kui osakeste suurusjaotus on sobiv (nt eelsegud ja söödalisandid).

5.2. *Seebistamine*

500 ml lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (punkt 4.2.1) kaalutakse 1 mg täpsusega 2–25 g proovi, sõltuvalt A-vitamiini sisaldusest. Väikese kontsentratsiooni korral võib proovi massi suurendada, et kaalutises oleks piisavalt osakesi. Seejärel lisatakse ringliigutustega segades 130 ml etanooli (punkt 3.1), umbes 100 mg BHT (punkt 3.13), 2 ml naatriumaskorbaadi lahust (punkt 3.5) ja 2 ml naatriumsulfiidi lahust (punkt 3.6). Kolvi otsa ühendatakse tagasivoolujahuti (punkt 4.3) ja kolb pannakse magnetseguriga veevanni (punkt 4.7). Kuumutatakse keemiseni ja keedetakse tagasivoolujahuti all 5 minutit. Seejärel lisatakse läbi jahuti (punkt 4.3) 25 ml kaaliumhüdroksiidi lahust (punkt 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 (punkt 4.2.3) või ekstraktsiooniseadmesse (punkt 4.8), loputades kokku 250 ml veega. Seebistamiskolbi loputatakse järjest 25 ml etanooli (punkt 3.1) ja 100 ml petrooleetriga (punkt 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 jaotuslehtriiga (punkt 4.2.3)*

Kui kihid on eraldunud (vt tähelepanekute punkt 7.3), kantakse petrooleetri kiht üle teise jaotuslehtrisse (punkt 4.2.3). Seda ekstraheerimist korratakse kaks korda 100 ml petrooleetriga (punkt 3.2) ja kaks korda 50 ml petrooleetriga (punkt 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 (punkt 3.7) lisamisel (tavaliselt piisab neljakordsest pesemisest). Emulgeerunud vee kõrvaldamiseks

▼ **M9**

filtritakse pestud ekstrakt läbi kuiva faasieraldusfiltri (punkt 4.4) 500 ml mõõtekolbi (punkt 4.2.2). Jaotusletrit ja filtrit loputatakse 50 ml petrooleetriga (punkt 3.2), täidetakse petrooleetriga (punkt 3.2) märgini ja segatakse hästi.

5.3.2. Ekstraheerimine ekstraktsiooniseadmega (punkt 4.8)

Kui kihid on eraldunud (vt tähelepanekute punkt 7.3), pannakse klaassilindri (punkt 4.8.1) korgi asemele lihviga klaasotsak (punkt 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 jaotusletrisse (punkt 4.2.3). Klaassilindrisse lisatakse 100 ml petrooleetrit (punkt 3.2), suletakse korgiga ja raputatakse tugevasti. Kihtidel lastakse eralduda ja ülemine kiht viiakse üle jaotusletrisse nagu ennegi. Ekstraheerimist korratakse järgmise 100 ml petrooleetriga (punkt 3.2), siis kaks korda 50 ml petrooleetri (punkt 3.2) kogustega ja viiakse petrooleetri kihid üle jaotusletrisse.

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

5.4. Proovilahuse valmistamine HPLC jaoks

Petrooleetri lahuse (punktist 5.3.1 või 5.3.2) alikvoot viiakse pipetiga 250 ml pirnkolbi (punkt 4.2.4). Vaakumrotaatoraurustiga (punkt 4.1) aurustatakse lahusti vaakumis peaaegu kuivaks veevanni temperatuuril mitte üle 40 °C. Kolbi lastakse lämmastik (punkt 3.10) kuni atmosfäärirõhuni ja kolb eemaldatakse vaakumrotaatoraurustist. Järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (punkt 3.10) voolutades ja jääk lahustatakse kohe teadaoleva koguse (10–100 ml) metanooliga (punkt 3.3) (A-vitamiini kontsentratsioon peab jääma vahemikku 5–30 RÜ/ml).

5.5. Määramine HPLC-ga

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

Punktis 5.4 saadud metanoolilahuse alikvoot (nt 20 µl) süstitakse kolonni ja elueeritakse liikuva faasiga (punkt 3.9). Arvutatakse sama proovilahuse erinevate süstide keskmine piigi kõrgus (pindala) ja kalibreerimislahuste (punkt 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	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 5 või 10 µm
(punkt 4.5.1):		või samaväärne

Liikuv faas (punkt 3.9):	Metanooli (punkt 3.3) ja vee segu, nt 980 + 20 (v + v).
--------------------------	---

Voolukiirus:	1–2 ml/min
--------------	------------

Detektor (punkt 4.5.2):	UV-detektor (325 nm) või fluorestsentsdetektor (ergastamine: 325 nm/emissioon: 475 nm)
-------------------------	--

▼ **M9**5.6. *Kalibreerimine*

5.6.1. Standardtöölahuste ettevalmistamine

20 ml A-vitamiini atsetaadi põhilahust (punkt 3.11.1) või 20 ml A-vitamiini palmitaadi põhilahust (punkt 3.12.1) pipetatakse 500 ml lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (punkt 4.2.1) ja hüdrolüüsitakse vastavalt punktile 5.2, kuid ilma BHT-d lisamata. Seejärel ekstraheeritakse petrooleetriga (punkt 3.2) vastavalt punktile 5.3 ja täidetakse kuni 500 ml-ni petrooleetriga (punkt 3.2). 100 ml seda ekstrakti aurustatakse vaakumrotaatoraurustil (vt punkt 5.4) peaaegu kuivaks, järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (punkt 3.10) voolutades ja jääk lahustatakse uuesti 10,0 ml metanooliga (punkt 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 (punkt 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 (punkt 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 calibreerimislahusest süstitakse 20 µl mitu korda kolonni ja määratakse keskmised piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kalibreerimisgraafik, kasutades keskmisi piigi kõrgusi (pindalasid) ja arvestades UV-kontrolli (punkt 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 (punkt 3.11.1) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi (punkt 4.2.2) ja täidetakse 2-propanooliga (punkt 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 (punkt 3.8) märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Spektrofotomeetriga (punkt 4.6) mõõdetakse selle lahuse UV-spekter 2-propanooli (punkt 3.8) suhtes vahemikus 300–400 nm. Ekstinktsioonimaksimum peab olema vahemikus 325–327 nm.

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

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

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ A – vitamiini atsetaadi puhul} = 1530 \text{ lainepikkusel } 326 \text{ nm } 2 - \text{propanoolis})$$

5.6.3.2. A-vitamiini palmitaadi põhilahus

2,0 ml A-vitamiini palmitaadi põhilahust (punkt 3.12.1) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi (punkt 4.2.2) ja täidetakse 2-propanooliga (punkt 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 (punkt 3.8)

▼ M9

märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 6,72 RÜ A-vitamiini milliliitri kohta. Spektrofotomeetriga (punkt 4.6) mõõdetakse selle lahuse UV-spekter 2-propanooli (punkt 3.8) suhtes vahemikus 300–400 nm. Ekstinktsioonimaksimum peab olema vahemikus 325–327 nm.

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

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

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

5.6.3.3. A-vitamiini standardtöölalus

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

A-vitamiini sisalduse arvutamine:

$$\text{RÜ A – vitamiini milliliitri kohta} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ A – vitamiini alkoholi puhul} = 1821 \text{ lainepikkusel } 325 \text{ nm } 2 - \text{propanoolis})$$

6. Tulemuste arvutamine

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

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

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

kus:

c = A-vitamiini kontsentratsioon proovilahuses (punkt 5.4) RÜ/ml;

V₁ = proovilahuse (punkt 5.4) kogus milliliitrites;

V₂ = vastavalt punktile 5.4 võetud alikvoodi kogus milliliitrites;

m = kaalutise mass grammides.

7. Tähelepanekud

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

▼ **M9**

- 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 (punkt 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. Normaalfaasikolooni kasutamisel on võimalik retinooli isomeeride eraldumine. Kuid sel juhul summeeritakse arvutustes kõigi *cis*- ja *trans*-isomeeride piigi kõrgused (pindalad).
- 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 (punkt 5.2): tulenevalt proovi rasvasisaldusest võib olla vaja suurendada kaaliumhüdroksiidi lahuse kogust (punkt 3.4);
 - ekstraheerimisele (punkt 5.3): tulenevalt emulsioonide sisaldusele võib olla vajalik muuta vee ja etanooli vahekorda 2:1.

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

8. **Korduvus**

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

9. **Võrdlusuuringu tulemused ⁽¹⁾**

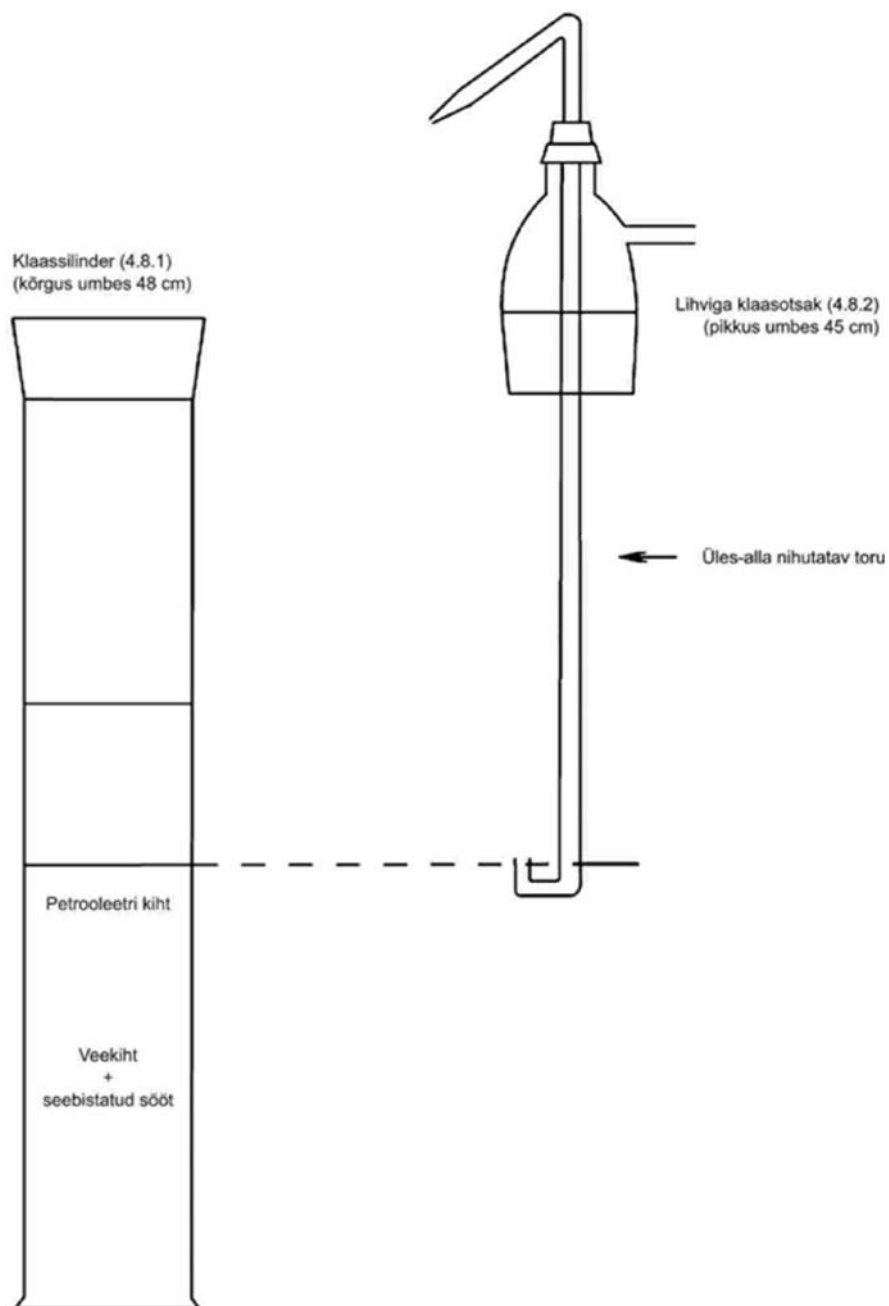
	Eelsegu	Sööda eelsegu	Mineraalkontsentraat	Valgurikas sööt	Pörsasööt
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
keskmine [RÜ/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
sr [RÜ/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [RÜ/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [RÜ/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614

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

▼ **M9**

	Eelsegu	Sööda eelsegu	Mineraal- kontsentraat	Valgurikas sööt	Pörsasööt
R [RÜ/kg]	$3,81 \times 106$	$0,193 \times 106$	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: laborite arv
n: üksikmääramiste arv
sr: korduvust iseloomustav standardhälve
sR: korratavust iseloomustav standardhälve
r: korduvus
R: korratavus
CVr: korduvuse variatsioonikordaja
CVR: korratavuse variatsioonikordaja

▼ M9*Joonis 1***Ekstraktsiooniseade (punkt 4.8)**

▼ **M9****B. E-VITAMIINI SISALDUSE MÄÄRAMINE**

E-vitamiini sisaldus määratakse

- standardis EN 17547 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – A-, E- ja D-vitamiini ⁽¹⁾ sisalduse määramine – Tahke faasi ekstraheerimisega (SPE) puhastamist ja kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (HPLC) kasutav meetod“ esitatud analüüsimetodiga või
- kõrgefektiivse pöördfaasilise vedelikkromatograafia (RP-HPLC) abil, kasutades UV- või fluorestsentsdetektorit, nagu on kirjeldatud järgnevates punktides 1–9.

1. Eesmärk ja kohaldamisala

Selle meetodiga on võimalik määrata E-vitamiini kogust söödas. 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 tähelepanekute punkt 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 tähelepanekute punkt 7.8).
- 3.7. Fenoolftaleiini lahus, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ etanoolis (punkt 3.1).
- 3.8. HPLC liikuv faas: metanooli (punkt 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.

⁽¹⁾ Standardis EN 17547 esitatud analüüsimetodile viidatakse kui alternatiivsele meetodile, mida kasutatakse ametlikuks kontrolliks A- ja E-vitamiini sisalduse määramisel A-vitamiini sisalduse määramiseks käesoleva lisa A osas kirjeldatud meetodi asemel ja E-vitamiini sisalduse määramiseks käesoleva lisa B osas kirjeldatud meetodi asemel.

▼ M9

3.10.1. DL- α -tokoferoolatsetaadi põhilahus: 100 ml mõõtekolbi kaalutakse 0,1 mg täpsusega 100 mg DL- α -tokoferoolatsetaati (punkt 3.10). Lahustatakse etanoolis (punkt 3.1) ja täidetakse sama lahustiga märgini. 1 ml seda lahust sisaldab 1 mg DL- α -tokoferoolatsetaati. (UV-kontrolli kohta vt punkt 5.6.1.3; stabiliseerimise kohta vt tähelepanekute punkt 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 (punkt 3.11). Lahustatakse etanoolis (punkt 3.1) ja täidetakse sama lahustiga märgini. 1 ml seda lahust sisaldab 1 mg DL- α -tokoferooli. (UV-kontrolli kohta vt punkt 5.6.2.3; stabiliseerimise kohta vt tähelepanekute punkt 7.4).

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

4. Seadmed

4.1. Rotaatorkileaurusti

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 $\times$ 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 5 või 10 μ m 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 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.

▼ **M9****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 (punkt 4.2.1) kaalutakse 0,01 g täpsusega 2–25 g proovi, sõltuvalt E-vitamiini sisaldusest. Seejärel lisatakse ringliigutustega segades 130 ml etanooli (punkt 3.1), umbes 100 mg BHT (punkt 3.12), 2 ml naatriumaskorbaadi lahust (punkt 3.5) ja 2 ml naatriumsulfiidi lahust (punkt 3.6). Kolvi otsa ühendatakse jahuti (punkt 4.3) ja kolb pannakse magnetseguriga veevanni (punkt 4.7). Kuumutatakse keemiseni ja keedetakse tagasivoolujahuti all 5 minutit. Seejärel lisatakse läbi jahuti (punkt 4.3) 25 ml kaaliumhüdroksiidi lahust (punkt 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 (punkt 4.2.3) või ekstraktsiooniseadmesse (punkt 4.8), loputades kokku 250 ml veega. Seebistamiskolbi loputatakse järjest 25 ml etanooli (punkt 3.1) ja 100 ml petrooleetriga (punkt 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 jaotuslehtri (punkt 4.2.3)

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

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

5.3.2. Ekstraheerimine ekstraktsiooniseadmega (punkt 4.8)

Kui kihid on eraldunud (vt tähelepanekute punkt 7.3), pannakse klaasilindri (punkt 4.8.1) korgi asemele lihviga klaasotsak (punkt 4.8.2) ja seatakse nihutatava toru U-kujuline alumine ots nii, et see oleks täpselt faaside eralduspinna kohal. Tõstes gaasivooliku kaudu kõrvaltorusse juhitava lämmastiku rõhku, viiakse ülemine petrooleetri kiht üle 1 000 ml jaotuslehtrisse (punkt 4.2.3). Klaasilindrisse lisatakse 100 ml petrooleetrit (punkt 3.2), suletakse korgiga ja raputatakse tugevasti.

▼ **M9**

Kihtidel lastakse eralduda ja ülemine kiht viiakse üle jaotuslehtrisse nagu ennegi. Ekstraheerimist korratakse järgmise 100 ml petrooleetriga (punkt 3.2), siis kaks korda 50 ml petrooleetri (punkt 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 (punkt 4.2.4). Vaakumrotaatoraurustiga (punkt 4.1) aurustatakse lahusti vaakumis peaaegu kuivaks veevanni temperatuuril mitte üle 40 °C. Kolbi lastakse lämmastik (punkt 3.9) kuni atmosfäärirõhuni ja kolb eemaldatakse vaakumrotaatoraurustist. Järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (punkt 3.9) voolutades ja jääk lahustatakse kohe teadaoleva koguse (10–100 ml) metanooliga (punkt 3.3) (DL- α -tokoferooli kontsentratsioon peab jääma vahemikku 5–30 µg/ml).

5.5. *Määramine HPLC-ga*

E-vitamiin eraldatakse C₁₈ pöördfaasikolonnil (punkt 4.5.1) ja mõõdetakse selle kontsentratsioon fluorestsentsdetektori (ergastamine: 295 nm, emissioon: 330 nm) (punkt 4.5.2) abil või UV-detektoriga (292 nm) (punkt 4.5.2).

Punktis 5.4 saadud metanoolilahuse alikvoot (nt 20 µl) süstitakse kolonni ja elueeritakse liikuva faasiga (punkt 3.8). Arvutatakse sama proovilahuse erinevate süstide keskmine piigi kõrgus (pindala) ja kalibreerimislahuste (punkt 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 (punkt 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , täidise terasuurus 5 või 10 µm või samaväärne
Liikuv faas (punkt 3.8):	Metanooli (punkt 3.3) ja vee segu, nt 980 + 20 (v + v).
Voolukiirus:	1–2 ml/min
Detektor (punkt 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. Standardtöölause valmistamine

25 ml DL- α -tokoferoolatsetaadi põhilahust (punkt 3.10.1) viiakse pipetiga 500 ml lamedapõhjalisse või koonilisse kolbi (punkt 4.2.1) ja hüdrolüüsatakse vastavalt punktis 5.2 kirjeldatule. Seejärel ekstraheeritakse petrooleetriga (punkt 3.2) vastavalt punktis 5.3 kirjeldatule ja täidetakse petrooleetriga 500 milliliitriini. 25 ml seda ekstrakti aurustatakse vaakumrotaatoraurustil (vt punkt 5.4) peaaegu kuivaks, järelejäänud lahusti eemaldatakse lämmastikuga (punkt 3.9) voolutades ja jääk lahustatakse uuesti 25,0 ml metanooliga (punkt 3.3). Selle lahuse

▼ **M9**

nominaalne kontsentratsioon on 45,5 µg DL-α-tokoferooli ml kohta, mis on ekvivalentne 50 µg DL-α-tokoferoolatsetaadiga ml kohta. Standardtöölahus valmistatakse 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 ml mõõtkolbidesse, täidetakse metanooliga (punkt 3.3) märgini 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 (punkt 3.10.1) UV-standardiseerimine

5,0 ml DL-α-tokoferoolatsetaadi põhilahust (punkt 3.10.1) lahjendatakse etanooliga 25,0 milliliitrini ja mõõdetakse spektrofotomeetriga (punkt 4.6) selle lahuse UV-spekter vahemikus 250–320 nm etanooli (punkt 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 (punkt 3.11.1) viiakse pipetiga 50 ml mõõtkolbi, lahustatakse metanoolis (punkt 3.3) ja täidetakse metanooliga märgini. Selle lahuse nominaalne kontsentratsioon on 40 µg DL-α-tokoferooli ml kohta, mis on ekvivalentne 44,0 µg DL-α-tokoferoolatsetaadiga ml kohta. Standardtöölahus valmistatakse 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 ml mõõtkolbidesse, täidetakse metanooliga (punkt 3.3) märgini 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 (punkt 3.11.1) UV-standardiseerimine

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

▼ **M9**

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

Sellisel lahjendusel peab ekstinktsiooni väärtus olema 0,6.

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse E-vitamiini piikide keskmisest kõrgusest (pindalast) määratakse kalibreerimisgraafiku (punkt 5.6.1.2 või 5.6.2.2) järgi proovilahuse kontsentratsioon μg -des milliliitri kohta (arvutatuna DL- 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 (DL- α -tokoferoolatsetaadina) kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) proovilahuses (punkt 5.4);

V_1 = proovilahuse (punkt 5.4) kogus milliliitrites;

V_2 = vastavalt punktile 5.4 võetud alikvoodi kogus 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 (punkt 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 (punkt 3.10.1 või 3.10.2) umbes 10 mg BHT-d (punkt 3.12) ja hoitakse lahust külmkapis (kõlblikkusaeg maksimaalselt neli nädalat).
- 7.5. BHT asemel võib kasutada hüdrokinooni.
- 7.6. Normaalfaasikoloni kasutamisel on võimalik α -, β -, γ - ja δ -tokoferooli eraldumine.
- 7.7. Naatriumaskorbaadi lahuse asemel võib kasutada umbes 150 mg askorbiinhapet.
- 7.8. Naatriumsulfiidi lahuse asemel võib kasutada umbes 50 mg etüleendiamiintetraatsetaati.
- 7.9. E-vitamiini atsetaat hüdrolyüsib aluselises keskkonnas väga kiiresti ning on seepärast väga tundlik oksüdeerumise suhtes, eriti selliste mikroelementide nagu raua ja vase olemasolul. Kui eelsgudes 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.

▼ **M9**

8. Korduvus

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

9. Võrdlusuuringu tulemused ⁽¹⁾

	Eelsegu	Sööda eelsegu	Mineraal- kontsentraat	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
sr [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
CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: laborite arv

n: üksikmääramiste arv

s_r: korduvust iseloomustav standardhälve

s_R: korratavust iseloomustav standardhälve

r: korduvus

R: korratavus

CV_r: korduvuse variatsioonikordaja

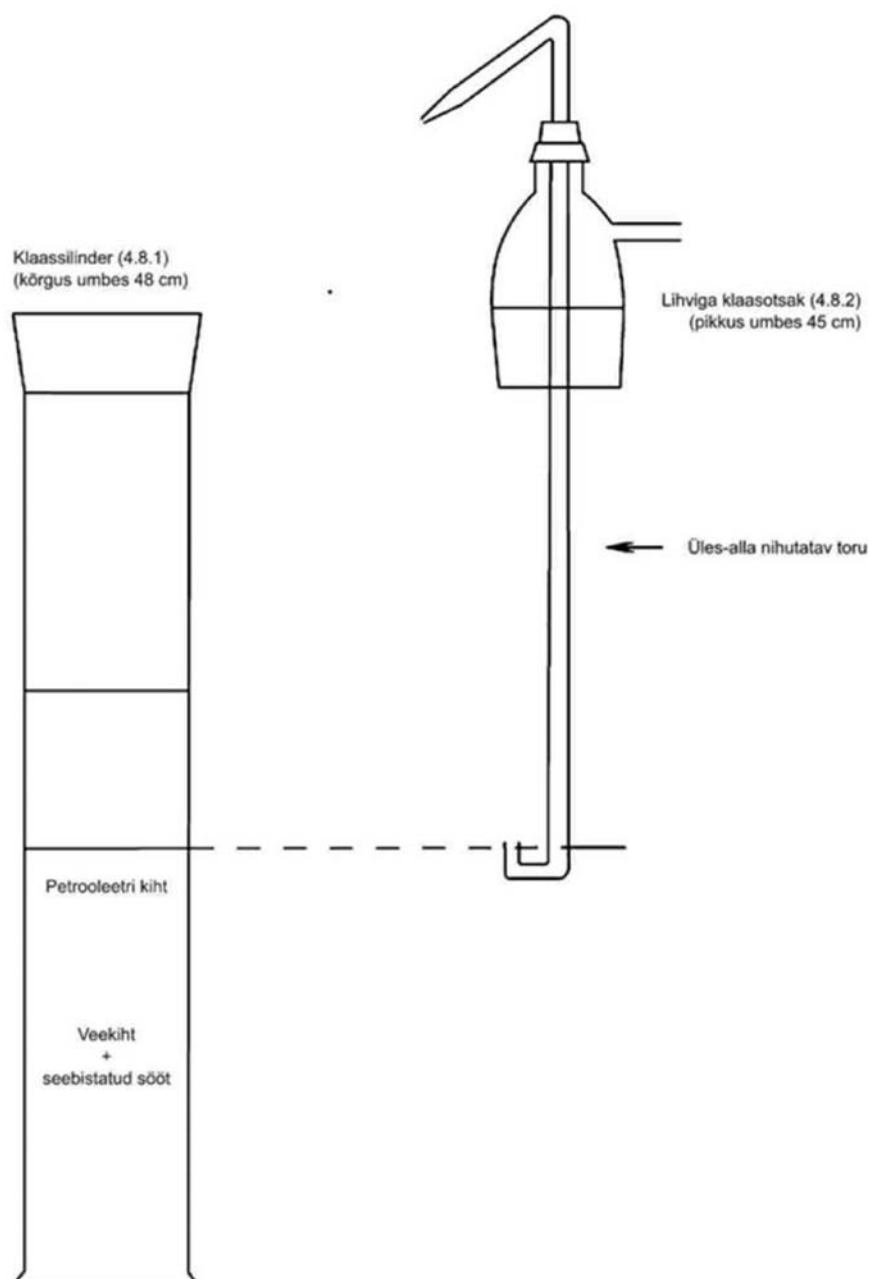
CV_R: korratavuse variatsioonikordaja

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

▼ M9

Joonis 2

Ekstraktsiooniseade (punkt 4.8)



▼ **M9****C. MIKROELEMENTIDE RAUA, VASE, MANGAANI JA TSIINGI MÄÄRAMINE**

Raua-, vase-, mangaani- ja tsiingisisaldus määratakse

- standardis EN 15510 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Kaltsiumi, naatriumi, fosfori, magneesiumi, kaaliumi, raua, tsiingi, vase, mangaani, koobalti, molübdeeni ja plii määramine induktiivsdestunud plasma aatomiemissioonspektromeetria (ICP-AES) abil“ esitatud analüüsimetodiga või
- standardis EN 15621 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Kaltsiumi, naatriumi, fosfori, magneesiumi, kaaliumi, väävl, raua, tsiingi, vase, mangaani ja koobalti määramine pärast rõhu all lagundamist induktiivsdestunud plasma aatomiemissioonspektromeetria (ICP-AES) abil“ esitatud analüüsimetodiga või
- standardis EN 17053 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Mikroelementide, raskmetallide ja muude elementide määramine söödas induktiivsdestunud plasma massispektromeetria (ICP-MS) abil“ (erinevad meetodid) või
- standardis EN 6869 „Loomasööt. Kaltsiumi, vase, raua, magneesiumi, mangaani, kaaliumi, naatriumi ja tsiingi määramine. Aatomiabsorptsioonspektromeetria kasutatav meetod“ analüüsimetodiga või
- leekaatomiabsorptsioonspektromeetria (FAAS) meetodiga, mida on kirjeldatud järgnevates punktides 1–8.

(1) Eesmärk ja kohaldamisala

Selle meetodiga on võimalik määrata söödas mikroelemente: rauda, vaske, mangaani ja tsinki ⁽¹⁾. 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. Elementid raud, vask, mangaan ja tsink määratakse aatomiabsorptsioonspektromeetria järgi pärast asjakohast lahjendamist.

3. Reaktiivid

Sissejuhatavad märkused

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

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

⁽¹⁾ See meetod on valideeritud võrdlusuuringuga mitmesuguste söödamaatriksite puhul. Täiendava teabe jaoks vaadake <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

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 (punkt 3.2), lisatakse 16 ml vesinikperoksiidi (punkt 3.6) ning täidetakse veega ühe liitrini.
 - 3.7.1. Raua standardtöölalus (100 µg Fe/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (punkt 3.7) veega vahekorras 1: 9.
- 3.8. Vase standardlahus (1 000 µg Cu/ml), mis on valmistatud järgmiselt (või kasutatakse samaväärset müügil olevat lahust):
 - 1 g vasepulbrit lahustatakse 25 ml 6 mol/l soolhappes (punkt 3.2), lisatakse 5 ml vesinikperoksiidi (punkt 3.6) ning täidetakse veega ühe liitrini.
- 3.8.1. Vase standardtöölalus (10 µg Cu/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (punkt 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 (punkt 3.2) ning täidetakse veega ühe liitrini.
- 3.9.1. Mangaani standardtöölalus (10 µg Mn/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (punkt 3.9) veega vahekorras 1: 9 ning seejärel lahjendades saadud lahust veega vahekorras 1: 9.
- 3.10. Tsingi standardlahus (1 000 µg Zn/ml), mis on valmistatud järgmiselt (või kasutatakse samaväärset müügil olevat lahust):
 - 1 g riba- või lehttsinki lahustatakse 25 ml 6 mol/l soolhappes (punkt 3.2) ning täidetakse veega ühe liitrini.
- 3.10.1. Tsingi standardtöölalus (10 µg Zn/ml), mis on valmistatud, lahjendades standardlahust (punkt 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 (punkt 3.2) ning täidetakse veega ühe liitrini.

▼ **M9****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. Aatomiabsorptsioonispektrofotomeeter, 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. 0,2 mg täpsusega kaalutakse 5–10 g proovi, asetatakse kvarts- või platinatiiglis (vt märkus b), kuivatatakse kuivatuskapis 105 °C juures ning tiigel asetatakse külma muhvelahju (punkt 4.1). Ahi suletakse (vt märkus c) ning järk-järgult tõstetakse ligikaudu 90 minuti jooksul temperatuur 450–475 °C-ni. Kõnealust temperatuuri hoitakse 4–16 tundi (nt öö jooksul), et eemaldada söeosakesed, ning seejärel ahi avatakse ning lastakse jahtuda (vt märkus d).

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

Järgmisena lisatakse jäägile 15 ml 6 mol/l soolhapet (punkt 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. Filtritakse läbi tuhavaba filterpaberi ning filtraat kogutakse 250 ml mõõtekolbi. Keeduklaas ja filter pestakse 5 ml kuuma 6 mol/l soolhappega (punkt 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 (punkt 3.1), aurustatakse kuivaks ning sellele lisatakse 5 ml 6 mol/l

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

⁽²⁾ Haljassööt (värsked 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 filtrimiseni. Lahustumatut jääki sisaldav filterpaber pestakse kaks korda keeva veega ning asetatakse kvarts- või platinatiiglis. Põletatakse muhvelahjus (punkt 4.1) temperatuuril alla 550 °C, kuni kõik söeosakesed on täielikult kadunud. Lastakse jahtuda, lisatakse mõned tilgad vett ning 10–15 ml vesinikfluoriidhapet (punkt 3.4) ning aurustatakse kuivaks ligikaudu 150 °C juures. Kui jääkides on siiski räni, lahustatakse see uuesti paaris milliliitris vesinikfluoriidhappes (punkt 3.4) ning aurustatakse kuivaks. Lisatakse viis tilka väävelhapet (punkt 3.5) ning kuumutatakse, kuni enam ei eraldu valget auru. Pärast 5 ml 6 mol/l soolhappe (punkt 3.2) ja ligikaudu 30 ml vee lisamist kuumutatakse, lahus filtritakse 250 ml mõõtekolbi ning täidetakse kuni märgini veega (HCl kontsentratsioon ligikaudu 0,5 mol/l). Mikroelementide määramist jätkatakse punktist 5.1.2.

▼ M9

soolhapet (punkt 3.2). Segu kuumutatakse, lahustatakse filtritakse 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, tolm jne.

- b) Tuhastatava proovi mass arvutatakse sööda ligikaudse mikroelementisisalduse põhjal vastavalt kasutatava spektrofotomeetri tundlikkusele. Teatavate väikese mikroelementide sisaldusega söötade puhul alustatakse 10–20 g proovist, mille lõpplahust täidetakse vaid kuni 100 ml lahuse saamiseni.

- c) Tuhastamine peab toimuma suletud ahjus õhu või hapniku juurdepääsuta.

- d) Püromeetri temperatuuri näit ei tohi ületada 475 °C.

5.1.2. Spektrofotomeetriline määramine

5.1.2.1. Kalibreerimislahuste valmistamine

Iga määratava elemendi jaoks valmistatakse punktides 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 ja 3.10.1 osutatud 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 osutuda vajalikuks valida muud kontsentratsioonid.

Raud

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

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

▼ M9**Vask**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml standardtöölahust (punkt 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punkt 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 standardtöölahust (punkt 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punkt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantaankloriidi lahust (punkt 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 standardtöölahust (punkt 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (punkt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantaankloriidi lahust (punkt 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 pipettida 100 ml mõõtekolbi ning täita märgini 0,5 mol/l soolhappega (punkt 3.3).

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

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. Aatomiabsorptsiooni mõõtmine

Kalibreerimislahuste ja analüüsitava lahuse aatomiabsorptsiooni 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.

▼ M9**5.2. Mineraalsööt**

Kui proov ei sisalda orgaanilist ainet, ei ole eelnev tuhastamine vajalik. Toimitakse vastavalt punktile 5.1.1.1, alustades teisest lõigust. Vesi-nikfluoriidhappega aurustamise võib ära jätta.

6. Tulemuste arvutamine

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

7. Korduvus

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. Tähelepanek

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

D. HALOFUGINOONI MÄÄRAMINE

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

Halofuginoonisisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subaditiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandem-massispektrometriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- kõrgefektiivse pöördfaasilise vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit, nagu on kirjeldatud järgnevates punktides 1–8.

1. Eesmärk ja kohaldamisala

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.

▼ **M9****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-(3 *H*)-oon-vesinikbromiid, E 764).

3.6.1. Halofuginooni põhistandardlahus, 100 µg/ml

50 mg halofuginooni (punkt 3.6) kaalutakse 0,1 mg täpsusega 500 ml mõõtekolbi, lahustatakse ammooniumatsetaadi puhverlahuses (punkt 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 (punkt 3.6.1). Täidetakse kuni märgini liikuva faasiga (punkt 3.21) ja segatakse. Lahuste halofuginooni kontsentratsioonid on vastavalt 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 and 6,0 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.7. Soolhape (ρ_{20} umbes 1,16 g/ml).

3.8. Metanool.

3.9. Hõbenitraat.

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 (punkt 3.11) lahustatakse vees, lahjendatakse 1 liitrini ja lisatakse kuni lahuse küllastumiseni naatriumkloriidi (punkt 3.12).

3.17. Soolhape, umbes 0,1 mol/l

10 ml soolhapet (punkt 3.7) lahjendatakse veega kuni 1 liitrini.

3.18. Ammooniumatsetaadi puhverlahus, umbes 0,25 mol/l

19,3 g ammooniumatsetaati (punkt 3.3) ja 30 ml äädikhapet (punkt 3.5) lahustatakse vees (punkt 3.14) ja lahjendatakse kuni 1 liitrini.

▼M9

3.19. Amberlite XAD-2 vaigu ettevalmistamine

Asjakohane kogus Amberlite'i (punkt 3.2) pestakse veega, kuni äravalatud vesifaasile tehtud hõbenitraadi (punkt 3.20) test näitab, et kõik klooriioonid on eemaldatud. Vaiku pestakse 50 ml metanooliga (punkt 3.8), metanool valatakse ära ja vaik säilitatakse värskes metanoolis.

3.20. Hõbenitraadi lahus, umbes 0,1 mol/l

0,17 g hõbenitraati (punkt 3.9) lahustatakse 10 ml vees.

3.21. HPLC liikuv faas

500 ml atsetonitriili (punkt 3.1) segatakse 300 ml ammooniumatsetaadi puhverlahusega (punkt 3.18) ja 1 200 ml veega (punkt 3.14). Äädikhape (punkt 3.5) abil korrigeeritakse pH 4,3-le. Filtritakse läbi 0,22 µm filtri (punkt 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. Rotaatorkileaurusti.

4.3. Tsentrifuug.

4.4. HPLC-seade muudetava lainepikkusega ultraviolet-detektoriga või diiodireadetektoriga.

4.4.1. Vedelik-kromatograafia kolonn, 300 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm, või samaväärne.

4.5. Klaaskolonn (300 mm × 10 mm), millel on paagutatud klaasfilter ja korkkraan.

4.6. Klaaskiudfiltrid diameetriga 150 mm.

4.7. Membraanfiltrid, 0,45 µm.

4.8. Membraanfiltrid, 0,22 µm.

5. **Töö käik**

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

5.1. *Üldsätted*

5.1.1. Tuleb analüüsida 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 (punkt 3.6.1), segatakse ja oodatakse enne ekstraheerimise (punkt 5.2) alustamist 10 minutit.

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

▼ **M9**5.2. *Ekstraheerimine*

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

Orgaanilist kihti ekstraheeritakse 1 minut 50 ml soolhappega (punkt 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 (punkt 3.4) loksutades umbes 10 sekundit.

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

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 (punkt 3.19) kantakse metanooliga (punkt 3.8) klaaskoloni (punkt 4.5). Vaigukihi peale pannakse väike klaasvillatroppe. 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 (punkt 5.2) kantakse kvantitatiivselt ettevalmistatud Amberlite'i kolonni (punkt 5.3.1), elueeritakse, valades eluaadi ära. Elueerimiskiirus ei tohi ületada 20 ml/min. Ümarkolb loputatakse 20 ml soolhappega (punkt 3.17) ja seda lahust kasutatakse vaigukoloni pesemiseks. Allesjäänud happelahus kõrvaldatakse õhuvoolu abil. Pesulahused valatakse ära. Kolonni lisatakse 100 ml metanooli (punkt 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 rotaatorkileaurusti (punkt 4.2) abil, veevanni temperatuur ei tohi olla üle 40 °C. Jääk kantakse liikuva faasi (punkt 3.21) abil kvantitatiivselt 10 ml mõõtekolbi. Täidetakse liikuva faasiga kuni märgini ja segatakse. Alikvootne osa filtritakse läbi membraanfiltrit (punkt 4.7). See lahus hoitakse HPLC määramise (punkt 5.4) jaoks.

▼ M9**5.4. HPLC määramine****5.4.1. Parameetrid**

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

Vedelikkromatograafia kolonn (punkt 4.4.1)

HPLC liikuv faas (punkt 3.21)

Voolukiirus: 1,5–2 ml/min

Avastamise lainepikkus: 243 nm

Sissesüstitav ruumala: 40–100 µl

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

5.4.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (punkt 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 (punkt 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 (punkt 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 (punkt 3.6.2) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

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

▼M9

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma üksnes halofuginoonipiigi kõrgus. Piigi laius poolal kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsenteerimata prooviekstrakti halofuginoonipiigi 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 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;
- lainepikkustel 225–300 nm ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduvas osas, tipus ja allapoole suunduvas osas registreeritud spektrid erineda üksteisest nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui 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. Korduvus

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

7.3. Saagis

Suurendatud kontsentratsiooniga fooniproovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %.

8. Võrdlusuuringu tulemused

Korraldati võrdlusuuring, ⁽¹⁾ mille käigus kaheksas laboris 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

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

▼ **M9**

	Proov A (võrdlus- proov) Algul	Proov B (jahu)		Proov C (graanulid)	
		Algul	Kahe kuu pärast	Algul	Kahe kuu pärast
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = allpool avastamisläve

S_R = korratavust iseloomustav standardhälve

CV_R = korratavuse variatsioonikordaja (%)

Rec. = saagis: (%)

E. ROBENIDIINI MÄÄRAMINE

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

Robenidiinisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- kõrgefektiivse pöördfaasilise vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit, nagu on kirjeldatud järgnevates punktides 1–8.

1. Eesmärk ja kohaldamisala

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

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse hapestatud metanooliga. Ekstrakt kuivatatakse ja selle alikvootne osa puhastatakse alumiiniumoksiidi kolonnis. 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 (punkt 3.1) ja segatakse. See lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.3. HPLC-puhtusastmega atsetonitriil

3.4. Molekulaarsõel

Tüüp 3A, 8–12 mešši (1,6–2,5 mm osakesed, kristalne alumosilikaat, pooride läbimõõt 0,3 mm)

3.5. Alumiiniumoksiid, happeline aktiivsuseaste 1, kolonnkromatograafia jaoks

▼ M9

100 g alumiiniumoksiidi viiakse sobivasse anumasse ja lisatakse 2,0 ml vett. Suletakse ja loksutatakse ligikaudu 20 minutit. Hoitakse korralikult suletud anumas.

- 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

1 l mõõtekolvis lahustatakse 3,55 g veevaba dinaatriumvesinikfosfaati (või 4,45 g dihüdraati või 8,95 g dodekahüdraati) vees (HPLC-puhtusastmega), kolb täidetakse märgini veega ja segatakse.

- 3.8. HPLC liikuv faas

Segada järgmised reaktiivid:

650 ml atsetonitriili (punkt 3.3),

250 ml vett (HPLC-puhtusastmega),

50 ml kaaliumdivesinikfosfaadi lahust (punkt 3.6),

50 ml kaaliumdivesinikfosfaadi lahust (punkt 3.7).

Filtritakse läbi 0,22 µm filtri (punkt 4.6) ja lahus degaseeritakse (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit).

- 3.9. Standardaine

Puhas robenidiin: 1,3-bis[(4-klorobensülideen) amino]guanidiinhüdrokloriid.

- 3.9.1. Robenidiini põhistandardlahus: 300 µg/ml

30 mg robenidiini standardainet (punkt 3.9) kaalutakse 0,1 mg täpsusega. Lahustatakse hapestatud metanooliga 100 ml mõõtekolvis (punkt 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 (punkt 3.9.1) 250 ml mõõtekolbi, täidetakse see liikuva faasiga (punkt 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 (punkt 3.9.2). Täidetakse kuni märgini liikuva faasiga (punkt 3.8) ja segatakse. Lahuste robenidiinisisaldused 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.

▼ M9

- 4.2. Mehaaniline loksuti või magnetsegur.
- 4.3. Rotaatorkileaurusti.
- 4.4. HPLC-seadmed erinevatel lainepikkustel registreeriva ultraviolettdetektoriga või dioodireadetektoriga, mis töötab vahemikus 250–400 nm
- 4.4.1. Vedelikkromatograafia kolonn: 300 mm × 4 mm, C₁₈, täidise terasuurus 10 µm või samaväärne
- 4.5. Klaaskiudfilterpaber (Whatman GF/A või selle analoog).
- 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 võrdlussõta, veendumaks, et selles ei ole robenidiini ega teisi segavaid aineid.
- 5.1.2. Tuleb teha saagisekatse, analüüsides võrdlussõta (punkt 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 (punkt 3.9.1) 250 ml koonilisse kolbi. Lahus aurustatakse lämmastikuvoolus kuni ligikaudu 0,5 ml-ni. Lisatakse 15 g võrdlussõta, segatakse ja jäetakse enne ekstraheerima (punkt 5.2) asumist 10 minutiks seisma.

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

5.2. Ekstraheerimine

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

5.3. Puhastamine**5.3.1. Alumiiniumoksiidi kolonni ettevalmistamine**

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

▼ M9**5.3.2. Proovi puhastamine**

Koloni pipetatakse 5,0 ml vastavalt punktile 5.2 ettevalmistatud prooviekstrakti. Pipeti ots asetatakse tihedalt kolonni seina vastu ja lastakse lahusel absorbeeruda alumiiniumoksiidi. Robenidiin elueeritakse kolonni, kasutades 100 ml metanooli (punkt 3.1) voolukiirusel 2–3 ml/min, ja eluaat kogutakse 250 ml ümarkolbi. Metanoolilahus aurustatakse rotaatorkileaurusti (punkt 4.3) abil kuivaks vähendatud rõhul, temperatuuril 40 °C. Jääk lahustatakse uuesti 3–4 ml liikuv faasis (punkt 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 filtritakse läbi 0,45 µm membraanfiltrit (punkt 4.7). Seda lahust hoitakse HPLC määramiseks (punkt 5.4).

5.4. HPLC määramine**5.4.1. Parameetrid**

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

Vedelikromatograafia kolonn (punkt 4.4.1)

HPLC liikuv faas (punkt 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 (punkt 3.9.3) mitu korda, kuni saavutatakse konstantsed piigi kõrgused ja retentsiooniajad.

5.4.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (punkt 3.9.3) süstitakse mitu korda 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 (punkt 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 (punkt 5.4.2).

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

▼ **M9**

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

kus:

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

m = kaalutise mass grammides.

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. *Identsus*

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja $6 \mu\text{g/ml}$ sisaldusega kalibreerimislahuse (punkt 3.9.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstrakte lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (punkt 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 karbadoksiipiigi laiusest.

7.1.2. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori puhul on see tavaliselt ligikaudu 2 nm;
- b) lainepikkustel 250–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad proovi ja standardi piigi tipu spektrid kromatogrammil ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 250–400 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. *Korduvus*

Robenidiinisalduse puhul, mis on suurem kui 15 mg/kg , ei tohi sama proovi kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ületada 10 % suuremast tulemusest.

▼M9

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga fooniproovi puhul peab saagis olema vähemalt 85 %.

8. **Võrdlusuuringu tulemused**

Korraldati liidu võrdlusuuring, milles 12 laborit 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 = korduvust iseloomustav standardhälve

CV_r = korduvuse variatsioonikordaja (%)

S_R = korratavust iseloomustav standardhälve

CV_R = korratavuse variatsioonikordaja (%)

F. DIKLASURIILI MÄÄRAMINE

(+)-4-klorofenüül [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahüdرو-3,5-diokso-1,2,4-triasiin-2-üül) fenüül] atsetonitriil

Diklasuriilisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- kõrgefektiivse kolmikgradient pöördfaasilise vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit, nagu on kirjeldatud järgnevates punktides 1–9.

1. **Eesmärk ja kohaldamisala**

Selle meetodiga on võimalik määrata diklasuriili kogust segasöödas ja eelsegudes⁽¹⁾. Avastamiskiir on 0,1 mg/kg, määramiskiir 0,5 mg/kg. Saavutada võib veel madalamaid määramispiire, aga kasutaja peab selle valideerima.

2. **Põhimõte**

Pärast sisestandardi lisamist ekstraheeritakse proov hapestatud metanooliga. Söödade puhul puhastatakse ekstrakti alikvoot tahkefaasilises C18-ekstraktsioonihülssis. Diklasuriil elueeritakse ekstraheerimishülssist välja hapestatud metanooli ja vee seguga. Pärast lahuse aurustamist lahustatakse jääk *N*, *N*-dimetüülformamiidi vesilahuses. Eelsegude

⁽¹⁾ Meetodit võib kasutada ka diklasuriili määramiseks söödamaterjalis.

▼ **M9**

puhul aurustatakse ekstrakt kohe ja jääk lahustatakse *N*, *N*-dimetüülformamiidi vesilahuses. Diklasuriilisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades kolmekomponendilist gradienti ja UV-detektorit.

3. **Reaktiivid**

3.1. HPLC-puhtusastmega vesi

3.2. Ammooniumatsetaat

3.3. Tetrabutüülammooniumvesiniksulfaat (TBHS)

3.4. HPLC-puhtusastmega atsetonitriil

3.5. HPLC-puhtusastmega metanool

3.6. *N*, *N*-dimetüülformamiid (DMF).3.7. Soolhape, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Standardaine: diklasuriil: garanteeritud puhtusega (+)-4-klorofenüül [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahüdro-3,5-diokso-1,2,4-triasiin-2-üül) fenüül] atsetonitriil

3.8.1. Diklasuriili põhistandardlahus, 500 µg/ml

25 mg diklasuriili standardainet (punkt 3.8) kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja viiakse 50 ml mõõtekolbi. Lahustatakse *N*, *N*-dimetüülformamiidis (punkt 3.6), kolb täidetakse *N*, *N*-dimetüülformamiidiga (punkt 3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril kuni 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu ⁽¹⁾.

3.8.2. Diklasuriili standardlahus, 50 µg/ml

5,00 ml põhistandardlahust (punkt 3.8.1) pannakse 50 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse *N*, *N*-dimetüülformamiidiga (punkt 3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril kuni 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.9. Sisestandardaine: 2,6-dikloro- α -(4-klorofenüül)-4-(4,5-dihüdro-3,5-diokso-1,2,4-triasiin-2(3H)-üül)- α -metüülbenseenatsetonitriil (metüüldiklasuriil)

3.9.1. Sisestandard põhistandardlahus, 500 µg/ml

25 mg sisestandardainet (punkt 3.9) kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja pannakse 50 ml mõõtekolbi. Lahustatakse *N*, *N*-dimetüülformamiidis (punkt 3.6), kolb täidetakse *N*, *N*-dimetüülformamiidiga (punkt 3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril kuni 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.9.2. Sisestandardlahus, 50 µg/ml

5,00 ml sisestandardi põhistandardlahust (punkt 3.9.1) pannakse 50 ml mõõtekolbi, kolb täidetakse *N*, *N*-dimetüülformamiidiga (punkt 3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril kuni 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 0,1 mg täpsusega, pannakse 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse ultrahelivannis (punkt 4.7) *N*, *N*-dimetüülformamiidis (punkt 3.6), kolb täidetakse *N*, *N*-dimetüülformamiidiga kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril kuni 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

⁽¹⁾ Pikaajalisem stabiilsus (kuni üks aasta) on võimalik, kuid konkreetne labor peab seda kinnitama.

▼ **M9**

3.10. Kalibreerimislahused

3.10.1. Kalibreerimislahus, 1 µg/ml (diklasuriil)

1,00 ml diklasuriili standardlahust (punkt 3.8.2) ja 2,00 ml sisestandardlahust (punkt 3.9.2) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 17 ml *N,N*-dimetüülformamiidi (punkt 3.6), täidetakse kolb veega kuni märgini (punkt 3.1) ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10.2. Kalibreerimislahus, 2 µg/ml (diklasuriil)

2,00 ml diklasuriili standardlahust (punkt 3.8.2) ja 2,00 ml sisestandardlahust (punkt 3.9.2) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 16 ml *N,N*-dimetüülformamiidi (punkt 3.6), täidetakse kolb veega kuni märgini (punkt 3.1) ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10.3. Kalibreerimislahus, 3 µg/ml (diklasuriil)

3,00 ml diklasuriili standardlahust (punkt 3.8.2) ja 2,00 ml sisestandardlahust (punkt 3.9.2) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 15 ml *N,N*-dimetüülformamiidi (punkt 3.6), täidetakse kolb veega kuni märgini (punkt 3.1) ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10.4. Kalibreerimislahus, 4 µg/ml (diklasuriil)

4,00 ml diklasuriili standardlahust (punkt 3.8.2) ja 2,00 ml sisestandardlahust (punkt 3.9.2) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 14 ml *N,N*-dimetüülformamiidi (punkt 3.6), täidetakse kolb veega kuni märgini (punkt 3.1) ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10.5. Kalibreerimislahus, 5 µg/ml (diklasuriil)

5,00 ml diklasuriili standardlahust (punkt 3.8.2) ja 2,00 ml sisestandardlahust (punkt 3.9.2) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 13 ml *N,N*-dimetüülformamiidi (punkt 3.6), täidetakse kolb veega kuni märgini (punkt 3.1) ja segatakse. Lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

Märkus: käesoleva protokoll kasutamisel hõlmavad kalibreerimislahused (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) söödas leiduva diklasuriili kontsentratsioone vahemikus 0,5 to 2,5 mg/kg.

3.11. Tahkefaasiline C₁₈-ekstraktsioonihülss (nt Mega Bond Elut), suurus: 20 cm³, sorbendi mass: 5 000 mg (katseseisundisse viimine tarnija juhiste kohaselt).

3.12. Ekstrahent: hapestatud metanool.

5,0 ml soolhapet (punkt 3.7) pipetatakse 1 000 ml metanooli (punkt 3.5) ja segatakse.

3.13. HPLC liikuv faas

3.13.1. Eluent A: ammooniumatsetaadi ja tetrabutüülammooniumvesiniksulfaadi lahus.

5 g ammooniumatsetaati (punkt 3.2) ja 3,4 g tetrabutüülammooniumvesiniksulfaati (punkt 3.3) lahustatakse 1 000 ml vees (punkt 3.1) ja segatakse.

3.13.2. Eluent B: atsetonitriil (punkt 3.4).

3.13.3. Eluent C: metanool (punkt 3.5).

▼ M9**4. Seadmed**

- 4.1. Mehaaniline loksuti.
- 4.2. HPLC seadmed, mis võimaldavad kasutada kolmekomponendilist gradienti:
 - 4.2.1. Vedelikukromatograafia kolonn $100 \times 4,6$ mm, täidis: Hypersil ODS, $3 \mu\text{m}$ või samaväärne.
 - 4.2.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor.
- 4.3. Rotaatorkileaurusti.
- 4.4. Membraanfilter (nt kemikaalikindel nailon), $0,45 \mu\text{m}$.
- 4.5. Ühekorrasüstal, 5 ml.
- 4.6. Vaakumkollektor.
- 4.7. Ultrahelivann.

5. Töö käik**5.1. Üldsätted****5.1.1. Võrdlussöö t**

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

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatses 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 (punkt 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 võrdlussöö t puudub (vt punkt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardsel lisamismeetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitavale proovile ligikaudu sama suur diklasuriilikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine**5.2.1. Segasöö t**

Umbes 50 g proovi kaalutakse 0,01 g täpsusega. See pannakse 500 ml koonilisse kolbi, lisatakse 1,00 ml sisestandardlahust (punkt 3.9.2) ja 200 ml ekstrahenti (punkt 3.12) ning korgitakse kolb kinni. Segu loksutatakse öö jooksul loksutil (punkt 4.1). Lastakse 10 minutit settida. Kantakse 20 ml supernatandi alikvooti sobivasse klaasanumasse ja lahjendatakse 20 ml veega (punkt 3.1). Lahus kantakse ekstraktsioonihülsile (punkt 3.11) ja juhitakse sellest läbi vaakumi abil (punkt 4.6). Hülsist pestakse 25 ml ekstrahendi (punkt 3.12) ja vee (punkt 3.1) seguga, $65 + 35$ (v + v). Kogutud fraktsioonid visatakse ära ning elueeritakse ühendid, kasutades 25 ml ekstrahendi (punkt 3.12) ja vee segu $80 + 20$ (v + v). Seda fraktsiooni aurustatakse 60°C juures pöördaurustil (punkt 4.3), kuni see saab kuivaks. Jääk lahustatakse 1,0 ml N, N-dimetüülformamiidis (punkt 3.6), lisatakse 1,5 ml vett (punkt 3.1) ja segatakse. Filtritakse läbi ühekorrasüstlale (punkt 4.5) kinnitatud membraanfiltri (punkt 4.4). Seejärel alustatakse HPLC määramist (punkt 5.3).

▼ **M9**

5.2.2. E e l s e g u d

Umbes 1 g proovi kaalutakse 0,001 g täpsusega. See pannakse 500 ml koonilisse kolbi, lisatakse 1,00 ml sisestandardlahust (punkt 3.9.3) ja 200 ml ekstrahenti (punkt 3.12) ning korgitakse kolb kinni. Segu loksutatakse õõ jooksul loksutil (punkt 4.1). Lastakse 10 minutit settida. Kantakse 10 000/p ml (p = diklasuriili nominaalsisaldus eelsegus mg/kg) supernatandi alikvooti sobiva suurusega ümarkolbi. Aurustatakse pöördaurustis (punkt 4.3) alandatud rõhu ja 60 °C juures, kuni proov saab kuivaks. Jääk lahustatakse uuesti 10,0 ml N, N-dimeetüülformamiidis (punkt 3.6), lisatakse 15,0 ml vett (punkt 3.1) ja segatakse. Seejärel alustatakse HPLC määramist (punkt 5.3).

5.3. HPLC määramine

5.3.1. P a r a m e e t r i d

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

— Vedelikukromatograafia kolonn (punkt 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, täidise terasuurus 3 µm või samaväärne

— Liikuv faas

— Eluent A (punkt 3.13.1): ammooniumatsetaadi ja tetrabutüül-ammooniumvesiniksulfaadi vesilahus.

— Eluent B (punkt 3.13.2): atsetonitriil.

— Eluent C (punkt 3.13.3): metanool.

— Elueerimisviis – lineaarne gradient

— algtingimused: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ (V + V + V);

— 10 minuti pärast gradientelueerimine 30 minutit: $A + B + C = 45 + 20 + 35$ (V + V + V);

— Elueeritakse 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 (punkt 3.10.2), mis sisaldab 2 µg/ml diklasuriili ja sisestandardlahust, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. K a l i b r e e r i m i s l a h u s t e k r o m a t o g r a a f i l i n e a n a l ü ü s

20 µl iga kalibreerimislahust (punkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) süstitakse kaks korda, tehakse kindlaks ja integreeritakse diklasuriili ja sisestandardi piigid ning koostatakse kalibreerimiskõver, mis põhineb diklasuriili keskmiste piigi kõrguste või pindalade ja sisestandardi keskmiste piigi kõrguste või pindalade suhtel diklasuriili kontsentratsiooni kalibreerimislahustes (µg/ml).

5.3.3. P r o o v i l a h u s t e k r o m a t o g r a a f i l i n e a n a l ü ü s

Proovilahusest (punkt 5.2.1 või 5.2.2) süstitakse 20 µl kaks korda kolonni ja määratakse diklasuriili ning sisestandardi piikide keskmine kõrgus või pindala.

▼ **M9****6. Tulemuste arvutamine****6.1. Segasööt**

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ või } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

kus:

- kõrgus (d,s) on diklasuriili piigi kõrgus proovilahuses (punkt 5.2.1);
- pindala (d,s) on diklasuriili piigi pindala proovilahuses (punkt 5.2.1);
- kõrgus (i,s) on sisestandardi piigi kõrgus proovilahuses (punkt 5.2.1);
- pindala (i,s) on sisestandardi piigi pindala proovilahuses (punkt 5.2.1);
- b on kalibreerimislahuste (punktid 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) põhjal vastavalt punktile 5.3.2 saadud kalibreerimiskõvera vabaliige;
- a on kalibreerimislahuste (punktid 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) põhjal vastavalt punktile 5.3.2 saadud kalibreerimiskõvera tõus;
- m on kaalutise mass grammides;
- V on prooviekstrakti lõplik maht milliliitrites pärast uuesti lahustamist vastavalt punktile 5.2.1 (s.o 2,5 ml).

6.2. Eelsegud

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ või } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

kus:

- kõrgus (d,s) on diklasuriili piigi kõrgus proovilahuses (punkt 5.2.2);
- pindala (d,s) on diklasuriili piigi pindala proovilahuses (punkt 5.2.2);
- kõrgus (i,s) on sisestandardi piigi kõrgus proovilahuses (punkt 5.2.2);
- pindala (i,s) on sisestandardi piigi pindala proovilahuses (punkt 5.2.2);
- b on kalibreerimislahuste (punktid 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) põhjal vastavalt punktile 5.3.2 saadud kalibreerimiskõvera vabaliige;
- a on kalibreerimislahuste (punktid 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) põhjal vastavalt punktile 5.3.2 saadud kalibreerimiskõvera tõus;
- m on kaalutise mass grammides;
- V on prooviekstrakti lõplik maht milliliitrites pärast uuesti lahustamist vastavalt punktile 5.2.2 (s.o 25 ml).
- p on diklasuriili nominaalsaldus eelsegus (mg/kg).

▼ **M9****7. Tulemuste kehtivuse kontroll****7.1. Identsus**

Uuritava aine identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiatse abil või kasutades dioodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (punkt 5.2.1 või 5.2.2) ja kalibreerimislahuse (punkt 3.10.2) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstraktile (punkt 5.2.1 või 5.2.2) lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (punkt 3.10.2). 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 % kontsentreerimata prooviekstrakti diklasuriili piigi või sisestandardi piigi laiusest.

7.1.2. Diodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsideadme lahutusvõime piires ühte langema. Diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;
- b) Lainepikkustel 230–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad proovi ja standardi piigi tipu spektrid kromatogrammil ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 230–320 nm ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduvas osas, tipus ja allapoole suunduvas osas registreeritud spektrid erineda üksteisest nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused 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. Korduvus

Kahe osaprooviga tehtud kahe sõltumatu mõõtmise 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.

▼M9

7.3. Saagis

Suurendatud kontsentratsiooniga (fooni)proovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %.

8. Võrdlusuuringu tulemused

Korraldati kaks võrdlusuuringut. 1994. aastal tegi üks laborite rühm esimese uuringu, mille käigus analüüsis kaht eelsegu proovi (O 100, A 100) ja kolme kodulindude täiendsööda proovi (L1, Z1, K1). Üht eelsegu segati orgaanilise maatriksiga (O 100) ja teist anorgaanilise maatriksiga (A 100). Teoreetiline diklasuriilisaldus on 100 mg/kg. Laboritele tehti ülesandeks iga proovi üks kord või kaks korda analüüsida. (Üksikasjalikum teavet esimese võrdlusuuringu kohta võib leida ajakirjas Journal of AOAC International, köide 77, nr 6, 1994, lk 1359–1361.)

Teise võrdlusuuringu käigus analüüsiti kolme kodulindude segasööta – ühe diklasuriilisaldus oli 0,9 mg/kg (MAT 1), teisel 1,5 mg/kg (MAT 2) ning kolmas oli võrdlussööt (MAT 3). Üksikasjalikum teavet teise uuringu kohta võib leida Teadusuuringute Ühiskeskuse 2016. aasta tehnilises aruandes ja ajakirjas Journal of AOAC International, köide 102, nr 2, 2019, lk 646–652.) Kahe võrdlusuuringu tulemused on esitatud järgmises tabelis.

	Proov 1A 100	Proov 2O 100	Proov 3 L1	Proov 4 Z1	Proov 5 K1	Proov 6 MAT 1	Proov 7 MAT 2	Proov 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Keskmine (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	<Määramispiir
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Nominaalsaldus (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Viide (*)	Esimene uuring (1 994)	Esimene uuring (1 994)	Esimene uuring (1 994)	Esimene uuring (1 994)	Esimene uuring (1 994)	Teine uuring (2 015)	Teine uuring (2 015)	Teine uuring (2 015)

L = laborite arv

n = üksikmääramiste arv

S_r = korduvust iseloomustav standardhälve

CV_r = korduvuse variatsioonikordaja

S_R = korratavust iseloomustav standardhälve

CV_R = korratavuse variatsioonikordaja

LOQ = määramispiir

(*) 1994. aastal tehtud esimene uuring: Journal of AOAC International, köide 77, nr 6, 1994, lk 1359–1361; 2015. aastal tehtud teine uuring: Teadusuuringute Ühiskeskuse tehniline aruanne „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study“ (2016).

▼ **M9****9. Üldised märkused**

Eelnevalt peab olema näidatud, et diklasuriili piigi kõrgus (pindala) on mõõdetavas vahemikus lineaarses sõltuvuses kontsentratsioonist.

Vähemalt suure rasvasisaldusega (antud juhul üle 12 %) segasööda diklasuriilisalduse määramiseks võib analüüsimeetodi asendada mõne muu HPLC-l põhineva meetodiga, nt kõrgefektiivne vedelikkromatograafia koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS), eeldusel et alternatiivmeetodil on samaväärsed tulemuslikkusnäitajad (saagis, täpsus korduvuse ja korratavuse tingimustel).

G. NAATRIUMLASALOTSIIDI MÄÄRAMINE

Polüetermonokarboksüülhappe naatriumsool, saadud Streptomyces lasaliensis'est

Naatriumlasalotsiidisisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- kõrgefektiivse pöördfaasilise vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades spektrofotomeetrilist (fluorestsents)detektorit, nagu on kirjeldatud järgnevates punktides 1–8.

1. Eesmärk ja kohaldamisala

Selle meetodiga on võimalik määrata naatriumlasalotsiidi kogust söödas. Avastamiskünnis on 5 mg/kg, määramispiir 10 mg/kg.

2. Põhimõte

Naatriumlasalotsiid ekstraheeritakse proovist hapestatud metanooliga ja määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades spektrofotomeetrilist (fluorestsents)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 (punkt 3.2) lahjendatakse veega 100 milliliitri.

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 (punkt 3.1) lahustatakse 500 ml vees (punkt 3.11), lisatakse 3,5 ml ortofosforhapet (punkt 3.2) ja 10,0 ml 6-metüül-2-heptüülamiini (punkt 3.4). pH korrigeeritakse ortofosforhappe lahusega (punkt 3.3) 4,0-ni ja lahjendatakse veega (punkt 3.11) 1 000 milliliitri.

▼ M9**3.8. Hapestatud metanool**

5,0 ml soolhapet (punkt 3.6) pannakse 1 000 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb metanooliga (punkt 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 (punkt 3.7) segatakse 95 ml metanooliga (punkt 3.5).

3.10. Garanteeritud puhtusega naatriumlasalotsiidi standardaine $C_{34}H_{53}O_8Na$ (polüeetermonokarboksüülhappe naatriumsool, saadud *Streptomyces lasaliensis*'est), E763**3.10.1. Naatriumlasalotsiidi põhistandardlahus, 500 µg/ml**

50 mg naatriumlasalotsiidi (punkt 3.10) kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja pannakse 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse hapestatud metanoolis (punkt 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 (punkt 3.10.1) pipetatakse 100 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb hapestatud metanooliga (punkt 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 (punkt 3.10.2) 50 ml mõõtekolbidesse. Kolvid täidetakse hapestatud metanooliga (punkt 3.8) kuni märgini ja segatakse. Nende lahuste naatriumlasalotsiidisaldus 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. Vedelikkromatograafia kolonn 125 × 4 mm, pöördfaasiline C_{18} -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. Võrdlussõõt**

Selleks et teha saagisekatset (punkt 5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs, veendumaks, et selles ei ole naatriumlasalotsiidi ega segavaid aineid. Võrdlussõõt peab olema prooviga samalaadne ning selles ei tohi leiduda naatriumlasalotsiidi ega segavaid aineid.

▼ **M9**

5.1.2. Saagisekatsed

Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus naatriumlasalotsiidi. Et saada kontsentratsiooni 100 mg/kg, kantakse 10,0 ml põhistandardlahust (punkt 3.10.1) 250 ml koonilisse kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitrini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse põhjalikult ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerima (punkt 5.2) asumist veel mitu korda.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussööt puudub (vt punkt 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 kontsenteerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine

5.2.1. Sööt

5–10 g proovi kaalutakse 0,01 g täpsusega ja pannakse 250 ml koonilisse korgiga kolbi. Lisatakse pipetiga 100,0 ml hapestatud metanooli (punkt 3.8). Korgitakse kinni ja raputatakse segi. Kolb pannakse 20 minutiks ligikaudu 40 °C ultrahelivanni (punkt 4.1), seejärel võetakse sealt välja ja jahutatakse toatemperatuurini. Lastakse umbes 1 tund seista, kuni heljuv aine on settinud, siis filtritakse alikvoot läbi 0,45 µm membraanfiltrit (punkt 4.2) sobivasse anumasse. Seejärel alustatakse HPLC määramist (punkt 5.3).

5.2.2. Eelsegud

Umbes 2 g jahvatamata eelsegu kaalutakse 0,001 g täpsusega ja pannakse 250 ml mõõtekolbi. Lisatakse 100,0 ml hapestatud metanooli (punkt 3.8) ja raputatakse segi. Kolb koos sisuga pannakse 20 minutiks ligikaudu 40 °C ultrahelivanni (punkt 4.1), seejärel võetakse sealt välja ja jahutatakse toatemperatuurini. Lahjendatakse hapestatud metanooliga (punkt 3.8) kuni märgini ja segatakse hoolikalt. Lastakse tund aega seista, kuni heljuv aine on settinud, siis filtritakse alikvoot läbi 0,45 µm membraanfiltrit (punkt 4.2). Vajalik kogus selginud filtraati lahjendatakse hapestatud metanooliga (punkt 3.8), et saada lõplik katselahus, mis sisaldab umbes 4 µg/ml naatriumlasalotsiidi. Seejärel alustatakse HPLC määramist (punkt 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 (punkt 4.3.1):	125 mm × 4 mm, pöördfaasiline C ₁₈ , täidise terasuurus 5 µm või samaväärne
---	--

Liikuv faas (punkt 3.9):	Fosfaatpuhverlahuse (punkt 3.7) ja metanooli (punkt 3.5) segu, 5 + 95 (V + V)
--------------------------	---

Voolukiirus:	1,2 ml/min
--------------	------------

Avastamise lainepikkused:	Ergastamine: 310 nm
---------------------------	---------------------

Emissioon: 419 nm

Sissesüstitav ruumala:	20 µl
------------------------	-------

▼M9

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides kolonni mitu korda kalibreerimislahust (punkt 3.10.3) kontsentratsiooniga 4,0 µg/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused (pindalad) ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (punkt 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 (punkt 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 (punkt 5.2.1);

V_1 = prooviekstrakti maht milliliitrites vastavalt punktile 5.2.1 (s.o 100);

m = kaalutise mass grammides.

6.2. Eelsegud

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

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

kus:

c = naatriumlasalotsiidi kontsentratsioon (µg/ml) proovilahuses (punkt 5.2.2);

V_2 = prooviekstrakti maht milliliitrites vastavalt punktile 5.2.2 (s.o 250);

f = punkti 5.2.2 kohane lahjendusfaktor;

m = kaalutise mass grammides.

▼M9

7. Tulemuste kehtivuse kontroll

7.1. Identsus

Spektrofluoromeetrilised meetodid on vähem tundlikud kõrvaliste lisandite suhtes kui UV-meetodid. Analüüsitava proovi identsust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstrakte (punkt 5.2.1 või 5.2.2) lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (punkt 3.10.3). Lisatud naatriumlasalotsiidikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud naatriumlasalotsiidi kogus. Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab tõusma üksnes naatriumlasalotsiidipiigi kõrgus. Piigi laius poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui $\pm 10\%$ kontsentreerimata prooviekstrakti naatriumlasalotsiidipiigi laiusest.

7.2. Korduvus

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

— 15 % suuremast tulemusest, kui naatriumlasalotsiidi sisaldus on vahemikus 30–100 mg/kg;

— 15 mg/kg, kui naatriumlasalotsiidi sisaldus on vahemikus 100–200 mg/kg;

— 7,5 % suuremast tulemusest, kui naatriumlasalotsiidisisaldus on suurem kui 200 mg/kg.

7.3. Saagis

Suurendatud kontsentratsiooniga (fooni)söödaproovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %. Suurendatud kontsentratsiooniga eelseguproovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. Võrdlusuuringu tulemused

Korraldati võrdlusuuring (*), mille käigus 12 laboris analüüsiti kahte eelsegu (proovid 1 ja 2) ja viit sööta (proovid 3–7). Iga proovi puhul tehti kaks analüüsi. Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

	Proov 1 Kanasööda eelsegu	Proov 2 Kalkunisööda eelsegu	Proov 3 Kalkunite graanulid	Proov 4 Kanade kuivikupuru	Proov 5 Kalkuni-sööt	Proov 6 Kodulindude sööt A	Proov 7 Kodulin- dude sööt B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Kesk- mine [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

▼ **M9**

	Proov 1 Kanasööda eelsegu	Proov 2 Kalkunisööda eelsegu	Proov 3 Kalkunite graanulid	Proov 4 Kanade kuivikupuru	Proov 5 Kalkuni-sööt	Proov 6 Kodulindude sööt A	Proov 7 Kodulin- dude sööt B
Nominaalsi- saldus [mg/ kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L = laborite arv

n = üksiktulemuste arv

s_r = korduvust iseloomustav standardhälve

s_R: = korratavust iseloomustav standardhälve

CV_r = korduvuse variatsioonikordaja (%)

CV_R = korratavuse variatsioonikordaja (%)

(*) Analyst, 1995, 120, lk 2175-2180

(**) Tootja deklareeritud sisaldus

(+) Laboris valmistatud sööt

H. AMPROOLIUMVESINIKKLORIIDI MÄÄRAMINE

1-[(4-amino-2-propüül-5-pürimidinüül)metüül]-2-metüülpüridiinium kloriid-monovesinikkloriid

1. Eesmärk ja kohaldamisala

Selle meetodiga on võimalik määrata amprooliumi sisaldust söödas. Avastamiskünnis on 1 mg/kg, määramispiir 5 mg/kg.

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse metanooli vesilahuses. Pärast liikuva faasiga lahjendamist ja membraanfiltrimist määratakse amprooliumisisaldus kõrgefektiivse katioonvahetus-vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Metanool

3.2. HPLC-puhtusastmega atsetonitril

3.3. HPLC-puhtusastmega vesi

3.4. Naatriumdivesinikfosfaadi lahus, c = 0,1 mol/l

1 000 ml mõõtekolvis lahustatakse vees (punkt 3.3) 13,80 g naatriumdivesinikfosfaadi monohüdraati, täidetakse kolb veega (punkt 3.3) kuni märgini ja segatakse.

3.5. Naatriumperklooraadi lahus, c = 1,6 mol/l

1 000 ml mõõtekolvis lahustatakse vees (punkt 3.3) 224,74 g naatriumperklooraadi monohüdraati, täidetakse kolb veega (punkt 3.3) kuni märgini ja segatakse.

3.6. HPLC liikuv faas (vt tähelepanekute punkt 9.1).

atsetonitrili (punkt 3.2), naatriumi, divesiniksulfaadi lahuse (punkt 3.4) ja naatriumperklooraadi (punkt 3.5) segu, 450 + 450 + 100 (v+v+v) Enne kasutamist filtritakse lahus läbi 0,22 µm membraanfiltrit (punkt 4.3) ja degaseeritakse (nt ultrahelivannis (punkt 4.4) vähemalt 15 minutit).

3.7. Standardaine: puhas amproolium, 1-[(4-amino-2-propüül-5-pürimidinüül)metüül]-2-metüülpüridiiniumkloriid, E 750 (vt punkt 9.2).

▼ M9**3.7.1. Amprooliumi põhistandardlahus, 500 µg/ml**

50 mg amprooliumi (punkt 3.7) kaalutakse 0,1 mg täpsusega, pannakse see 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse 80 ml metanoolis (punkt 3.1) ja asetatakse kolb 10 minutiks ultrahelivanni (punkt 4.4). Pärast ultraheliga mõjutamist viiakse lahuse temperatuur toatemperatuurini, täidetakse kolb veega kuni märgini ja segatakse. Temperatuuril $\leq 4\text{ °C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.7.2. Amprooliumi vahestandardlahus, 50 µg/ml

5,0 ml põhistandardlahust (punkt 3.7.1) pipetatakse 50 ml mõõtekolbi, täidetakse see ekstrahendiga (punkt 3.8) kuni märgini ja segatakse. Temperatuuril $\leq 4\text{ °C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.7.3. Kalibreerimislahused

0,5, 1,0 ja 2,0 ml vahestandardlahust (punkt 3.7.2) pannakse 50 ml mõõtekolbidesse. Kolvid täidetakse liikuva faasiga (punkt 3.6) märgini ja segatakse. Nende lahuste amprooliumisisaldus on 0,5, 1,0 ja 2,0 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.8. Ekstrahent

Metanooli (punkt 3.1) ja vee segu 2 + 1 (v+v)

4. Seadmed**4.1. HPLC seade koos sissepritsesüsteemiga, mis võimaldab süstida mahus 100 µl.****4.1.1. Vedelikukromatograafia kolonn 125 × 4 mm, katioonvahetaja Nucleosil 10 SA, täidise terasuurus 5 või 10 µm või samaväärne****4.1.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või dioodireadetektor****4.2. Membraanfilter, polütetrafluoroetüleenist, 0,45 µm****4.3. Membraanfilter, 0,22 µm****4.4. Ultrahelivann****4.5. Mehaaniline loksuti või magnetsegur****5. Töö käik****5.1. Üldsätted****5.1.1. Võrdlussõöt**

Selleks et teha saagisekatse (punkt 5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs, veendumaks, et selles ei ole ei amprooliumi ega segavaid aineid. Võrdlussööti 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 (punkt 3.7.1) 250 ml koonilisse kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitrini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerimist (punkt 5.2) asumist veel mitu korda.

▼ **M9**

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussõõt puudub (vt punkt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardisel lisamismeetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitava 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 0,01 g täpsusega, kantakse see 500 ml koonilisse kolbi ja lisatakse 200 ml ekstrahenti (punkt 3.8). Kolb asetatakse ultrahelivanni (punkt 4.4) ja jäetakse 15 minutiks seisma. Kolb võetakse ultrahelivannist välja ja loksutatakse loksutil või segatakse magnetseguril (punkt 4.5) üks tund. Ekstrakti alikvoot lahjendatakse liikuva faasiga (punkt 3.6) amprooliumisisalduseni 0,5–2 µg/ml ja segatakse (vt tähelepanekute punkt 9.3). 5–10 ml lahjendatud lahust filtritakse läbi membraanfiltril (punkt 4.2). Seejärel alustatakse HPLC määramist (punkt 5.3).

5.2.2. Eelsegud (amprooliumisisaldus ≥ 1 %)

Olenevalt amprooliumisisaldusest kaalutakse 1–4 g proovi 0,001 g täpsusega, kantakse see 500 ml koonilisse kolbi ja lisatakse 200 ml ekstrahenti (punkt 3.8). Kolb asetatakse ultrahelivanni (punkt 4.4) ja jäetakse 15 minutiks seisma. Kolb võetakse ultrahelivannist välja ja loksutatakse loksutil või segatakse magnetseguril (punkt 4.5) üks tund. Ekstrakti alikvoot lahjendatakse liikuva faasiga (punkt 3.6) amprooliumisisalduseni 0,5–2 µg/ml ja segatakse. 5–10 ml lahjendatud lahust filtritakse läbi membraanfiltril (punkt 4.2). Seejärel alustatakse HPLC määramist (punkt 5.3).

5.3. *HPLC määramine*

5.3.1. Parameetrid

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

Vedelikromatograafia kolonn (punkt 4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationivahetaja Nucleosil 10 SA, täidise terasuurus 5 või 10 µm või samaväärne
--	---

Liikuv faas (punkt 3.6):	atsetonitrili (punkt 3.2), naatriumi, divesiniksulfaadi lahuse (punkt 3.4) ja naatriumperklooraadi (punkt 3.5) segu, 450 + 450 + 100 (v + v + v)
--------------------------	--

Voolukiirus:	0,7–1 ml/min
--------------	--------------

Avastamise lainepikkus:	264 nm
-------------------------	--------

Sissesüstitav ruumala:	100 µl
------------------------	--------

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides kolonni mitu korda kalibreerimislahust (punkt 3.7.3) kontsentratsiooniga 1,0 µg/ml, kuni saavutatakse konstantsed piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kalibreerimisgraafik

Iga kalibreerimislahust (punkt 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).

▼ M9**5.3.3. Proovilahus**

Prooviekstrakti (punkt 5.2) süstitakse mitu korda, kasutades sama mahtu, mis kalibreerimislahuste puhul, ja määratakse amprooliumiipide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse amprooliumiipide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kalibreerimisgraafiku (punkt 5.3.2) abil proovilahuse kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$).

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 (punkt 3.8) maht milliliitrites (s.o 200 ml);

c = amprooliumi kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) prooviekstraktis (punkt 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 dioodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (punkt 5.2) ja $2,0 \mu\text{g/ml}$ sisaldusega kalibreerimislahuse (punkt 3.7.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafia

Prooviekstraktile (punkt 5.2) lisatakse vajalik kogus kalibreerimislahust (punkt 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 amprooliumiipi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti amprooliumiipi 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 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;

▼ **M9**

- c) lainepikkustel 210–320 nm ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduvast osas, tipus ja allapoole suunduvast 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 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. *Korduvus*

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. **Võrdlusuuringu tulemused**

Korraldati võrdlusuuring, 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: laborite arv

n: üksikmääramiste arv

s_r : korduvust iseloomustav standardhälve

CV_r: korduvuse variatsioonikordaja

s_R : korratavust iseloomustav standardhälve

CV_R: korratavuse variatsioonikordaja

▼ M9**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 (punkt 4.1.1) teineteisest siiski ei eraldu, tuleb kuni 50 % liikuva faasi (punkt 3.6) atsetonitrilist asendada metanooliga.
- 9.2. Briti farmakopöa andmetel on soolhappelahuses ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) amprooliumi lahuse ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) neeldumismaksimumid 246 ja 262 nm juures. Neelduvus on 246 nm juures 0,84 ja 262 nm juures 0,80.
- 9.3. Ekstrakt tuleb iga kord liikuva faasiga lahjendada, sest vastasel korral võib amprooliumipiigi retentsiooniaeg ioontugevuse muutuste tõttu oluliselt nihkuda.

I. NARASIINI MÄÄRAMINE

Narasiinisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- standardis EN ISO 14183 „Loomasööt – Monesiini-, narasiini- ja salinomütsiinisalduse määramine – Kolonnijärgset derivaatimist kasutav vedelikkromatograafia meetod“ esitatud analüüsimeetodiga.

J. NIKARBASIINI MÄÄRAMINE

Nikarbasiinisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- standardis EN 15782 „Loomasööt – Nikarbasiinisalduse määramine – Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia“ esitatud analüüsimeetodiga.

K. DEKOKVINAADI MÄÄRAMINE

Dekokvinaadisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- standardis EN 16162 „Loomasööt – Dekokvinaadisalduse määramine HPLC-ga fluorestsentsdetektori abil“ esitatud analüüsimeetodiga.

▼ **M9****L. MONESIINI MÄÄRAMINE**

Monesiinisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- standardis EN ISO 14183 „Loomasööt – Monesiini-, narasiini- ja salinomütsiinisalduse määramine – Kolonnijärgset derivaatimist kasutav vedelikkromatograafia meetod“ esitatud analüüsimeetodiga.

M. SALINOMÜTSIINI MÄÄRAMINE

Salinomütsiinisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- standardis EN ISO 14183 „Loomasööt – Monesiini-, narasiini- ja salinomütsiinisalduse määramine – Kolonnijärgset derivaatimist kasutav vedelikkromatograafia meetod“ esitatud analüüsimeetodiga.

N. SEMDURAMÜTSIINI MÄÄRAMINE

Semduramütsiinisaldus määratakse

- standardis EN 17299 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Lubatud koktsidiostaatikumide seire ja määramine aditiivsel ja 1 % ja 3 % ristsaastumise tasemel ning registreerimata koktsidiostaatikumide ja ühe antibiootikumi seire ja määramine subadiitiivsel tasandil segasöödas kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos tandemmassispektromeetriaga (LC-MS/MS)“ esitatud analüüsimeetodiga või
- standardis EN 16158 „Loomasööt – Semduramütsiinisalduse määramine – Otsustuspuu põhiste analüütiliste lähenemisviiside kasutav vedelikkromatograafia meetod“ esitatud analüüsimeetodiga.

O. EN STANDARDID

Määruse (EL) 2017/625 artikli 34 lõike 2 punkti a kohaldamisel on asjakohased järgmised EN standardid:

EN ISO 30024 Loomasööt – Fütaasi aktiivsuse määramine

EN 17050 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – Joodi määramine loomasöödas induktiivsidestunud plasma massispektromeetria (ICP-MS) abil

EN 17550 Loomasööt: karotenoidide määramine loomade segasöödas ja eelsegudes kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil koos UV-kiirguse määramisega (HPLC-UV)

EN 15784 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimeetodid – *Bacillus* spp. kindlakstegemine ja loendamine

▼ M9

EN 15785 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – *Bifidobacterium* spp. eraldamine ja loendamine

EN 15786 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – *Pediococcus* spp. kindlakstegemine ja loendamine

EN 15787 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Söödalinsandina kasutatava *Lactobacillus* spp. kindlakstegemine ja loendamine

EN 15788 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Söödalinsandina kasutatava *Enterococcus* (*E. faecium*) sp.p kindlakstegemine ja loendamine

EN 15789 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Söödalinsandina kasutatava *Saccharomyces cerevisiae* kindlakstegemine ja loendamine

EN 15510 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Kaltsiumi, naatriumi, fosfori, magneesiumi, kaaliumi, raua, tsingi, vase, mangaani, koobalti, molübdeeni ja plii määramine induktiivsidesunud plasma aatomiemissioonspektromeetria (ICP-AES) abil (söödalinsandite koobalti ja molübdeeni analüüsimiseks)

EN 15621 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Kaltsiumi, naatriumi, fosfori, magneesiumi, kaaliumi, väävli, raua, tsingi, vase, mangaani ja koobalti määramine pärast rõhu all lagundamist induktiivsidesunud plasma aatomiemissioonspektromeetria (ICP-AES) abil (söödalinsandi koobalti analüüsimiseks)

EN 16159 Loomasööt – Seleen määramine hüdriidide tekitamisega aatomiabsorptsioonspektromeetria (HGAAS) abil pärast mikrolainete toimet lagundamist (lagundamine 65 % lämmastikhappe ja 30 % vesinikperoksiidiga) (söödalinsandi seleeni analüüsimiseks)

EN 17053 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Mikroelementide, raskmetallide ja muude elementide määramine söödas induktiivsidesunud plasma massispektromeetria (ICP-MS) abil (erinevad meetodid) (söödalinsandite koobalti, molübdeeni ja seleeni analüüsimiseks)

▼ M9

V LISA

SÖÖDAS SOOVIMATUTE AINETE SISALDUSE KONTROLLIMISE
ANALÜÜSIMETODID

A) DIOKSIINIDE (PCDD/PCDF) JA PCBde SISALDUSE MÄÄRAMINE

I PEATÜKK

PROOVIVÕTUMETODID JA ANALÜÜSITULEMUSTE
TÕLGENDAMINE

1. Kohaldamisala ja mõisted

Proovid polüklorodibenso-p-dioksiinide (PCDDd), polüklorodibensofuraanide (PCDFid), dioksiinitaoliste polüklooritud bifeniülide (PCBd) ⁽¹⁾ ja mittedioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks söödas võetakse I lisa sätete kohaselt. Söödas ühtlaselt jaotunud ainete või toodete kontrollimise kvantitatiivseid nõudeid kohaldatakse vastavalt I lisa punktile 5.1. Selliselt võetud koondproove käsitatakse selle partii või osapartii suhtes esindavate proovidenäidete, millest need on võetud. Direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piirnormidele vastavust kontrollitakse laboratoorsete proovides määratud sisalduste alusel.

⁽¹⁾ PCDDde, PCDFide ja dioksiinitaoliste PCBde toksilisusefaktorite (TEF) tabel Inimestele avalduva riski hindamisel kasutatavad WHO-TEFid põhinevad 2005. aasta juunis Genfis peetud Maailma Terviseorganisatsiooni rahvusvahelise kemikaaliohutuse programmi (IPCS) ekspertkohtumise järeldustel (Martin van den Berg et al., „The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds“, Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Analoog	TEFi väärtus	Analoog	TEFi väärtus
Dibenso-p-dioksiinid (PCDDd) ja dibenso-p-furaanid (PCDFid)		Dioksiinitaolised PCBd ortoasendamata PCBd + orto-monoasendatud PCBd	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ortoasendamata PCBd	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Orto-monoasendatud PCBd	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

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

▼M9

Käesolevas osas kohaldatakse komisjoni rakendusmääruse (EL) 2021/808 ⁽²⁾ I lisas esitatud mõisteid.

Lisaks neile mõistetele kasutatakse käesolevas osas järgmisi mõisteid.

„Sõeluuringumeetodid“ on meetodid selliste proovide tuvastamiseks, mille PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisaldus ületab piinormi või häiretaseme. Need meetodid võimaldavad kulutõhusalt analüüsida suurt arvu proove ning see suurendab võimalusi avastada uusi juhtumeid, mis on tarbijate jaoks suure kokkupuute- ja terviseriskiga. Sõeluuringumeetodid peavad põhinema bioanalüütilistel või GC-MS meetoditel. Proovide tulemusi, mis ületavad piinormile vastavuse kontrolli läviväärtust, tuleb üle kontrollida esialgse proovi täieliku kordusanalüüsiga kinnitaval meetodil.

„Kinnitavad meetodid“ on meetodid, mis annavad täielikku või täiendavat teavet, mis võimaldab PCDD/Fid ja dioksiinitaolised PCBd tuvastada ja määrata üheselt nende sisaldus piinormile või vajaduse korral häiretasemele vastaval läviväärtusel. Nende meetodite puhul kasutatakse gaasikromatograafiat koos kõrglahutus-massispektromeetriaga (GC-HRMS) või gaasikromatograafiat koos tandemmassispektromeetriaga (GC-MS/MS).

2. Partii või osapartii vastavus piinormile

2.1. Mittedioksiinitaoliste PCBde puhul

Partii või osapartii vastab piinormile, kui PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 ja PCB 180 (edaspidi „mittedioksiinitaolised PCBd“) summaarse sisalduse analüüsi tulemus ei ületa direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piinormi, võttes arvesse mõõtmise laiendmääramatust ⁽³⁾. Partii või osapartii ei vasta direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piinormile, kui ülemise tõkke põhimõtte kohase ⁽⁴⁾ kahe analüüsitulemuse põhjal on kordusanalüüsiga ⁽⁵⁾ saadud aritmeetiline keskmine, mis ületab mõõtmise laiendmääramatust arvesse võttes kahtluseta piinormi, st vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud kontsentratsiooni väärtust, millest on lahutatud mõõtmise laiendmääramatus.

⁽²⁾ Komisjoni 22. märtsi 2021. aasta rakendusmäärus (EL) 2021/808, milles käsitletakse toiduloomadel kasutatavate farmakoloogiliste toimeainete jääkide analüüsimise meetodeid ja tulemuste tõlgendamist ning proovivõtumeetodeid ning millega tunnistatakse kehtetuks otsused 2002/657/EÜ ja 98/179/EÜ (ELT L 180, 21.5.2021, lk 84).

⁽³⁾ Vajaduse korral järgitakse dokumendis „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ (Juhend mõõtemääramatuse kohta laboritele, kus tehakse PCDDde/PCDFide ja PCBde analüüsi isotooplahjendusega massispektromeetria abil) (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) kirjeldatud põhimõtteid.

⁽⁴⁾ Ülemise tõkke põhimõtte kohaselt vastab iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus määramispiiri väärtusele. Alumise tõkke põhimõtte kohaselt vastab iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus nullile. Vaheväärtuse põhimõtte kohaselt vastab iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus poolele määramispiiri väärtusest.

⁽⁵⁾ Kordusanalüüs – huvipakkuvate analüütide eraldi analüüs sama homogeniseeritud proovi teise alikvoodi põhjal. Üldiselt kohaldatakse kordusanalüüsi suhtes II lisa C peatüki punktis 3 sätestatud nõudeid. Meetodite puhul, milles kasutatakse asjaomaste analüütide jaoks ¹³C-märgistatud sisestandardit, on kordusanalüüs vajalik ainult siis, kui esimese määramise tulemus ei vasta nõuetele. Kordusanalüüs on vajalik, et välistada sisemise ristastumise või proovide juhusliku segiajamise võimalus. Kui analüüs tehakse seoses saastamisjuhtumiga, võib kinnitava kordusanalüüsi jätta tegemata, kui analüüsiks valitud proovid on jälgitavuse alusel seostatavad asjaomase saastamisjuhtumiga ning tuvastatud saasteainete sisaldus ületab oluliselt piinormi.

▼ M9

Mõõtmise laiendmääramatuse arvutamiseks kasutatakse kattetegurit 2, millega tagatakse umbes 95 % usaldusnivoo. Partii või osapartii ei vasta nõuetele, kui mõõtmistulemuste keskvaartusest laiendmääramatuse lahutamise saadud väärtus ületab piirnормi.

Käesoleva punkti eespool esitatud lõikudes nimetatud eeskirju kohaldatakse ametlikuks kontrolliks ette nähtud proovide analüüsitulemuste suhtes. Teise eksperdiarvamuse saamiseks või vahekohtumenetluse eesmärgil tehtud analüüside suhtes kohaldatakse siseriiklikke eeskirju.

2.2. PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde puhul

Partii või osapartii vastab piirnормile, kui ühe analüüsi tulemus,

- mis on saadud sõeluuringumeetodiga, mille valenegatiivsete tulemuste osakaal on alla 5 %, näitab, et sisaldus ei ületa asjaomast direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud PCDD/Fide piirnормi ega PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa piirnормi;
- mis on saadud kinnitava meetodiga, näitab, et sisaldus ei ületa asjaomast direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud PCDD/Fide piirnормi ega PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa piirnормi, kui võetakse arvesse mõõtmise laiendmääramatust.

Sõeluuringu puhul määratakse läviväärtus, mille alusel otsustatakse, kas proov vastab PCDD/Fide jaoks kehtestatud piirnормile või PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa jaoks kehtestatud piirnормile.

Partii või osapartii ei vasta direktiivis 2002/32/EÜ sätestatud piirnормile, kui kinnitava meetodiga tehtud kordusanalüüsiga ⁽⁶⁾ on ülemise tõkke põhimõtte ⁽⁷⁾ kohase kahe analüüsitulemuse põhjal saadud aritmeetiline keskmine, mis ületab mõõtmise laiendmääramatust arvesse võttes kahtluseta piirnормi, st vastavuse hindamiseks kasutatakse analüüsiga määratud kontsentratsiooni väärtust, millest on lahutatud mõõtmise laiendmääramatus.

Mõõtmise laiendmääramatuse arvutamiseks kasutatakse kattetegurit 2, millega tagatakse umbes 95 % usaldusnivoo. Partii või osapartii ei vasta nõuetele, kui mõõtmistulemuste keskvaartusest laiendmääramatuse lahutamise saadud väärtus ületab piirnормi.

PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa puhul tuleb kasutada PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde eraldi määramise analüüsitulemuste hinnanguliste laiendmääramatuste summat.

⁽⁶⁾ Üldiselt kohaldatakse kordusanalüüsi suhtes II lisa C peatüki punktis 3 sätestatud nõudeid. Kinnitavate meetodite puhul, milles kasutatakse asjaomaste analüütide jaoks ¹³C-märgistatud sisestandardit, on kordusanalüüs vajalik ainult siis, kui esimese määramise tulemus ei vasta nõuetele. Kordusanalüüs on vajalik, et välistada sisemise ristsaastumise või proovide juhusliku segiajamise võimalus. Kui analüüs tehakse seoses saastamisjuhtumiga, võib kinnitava kordusanalüüsi jätta tegemata, kui analüüsiks valitud proovid on jälgitavuse alusel seostatavad asjaomase saastamisjuhtumiga ning tuvastatud saasteainete sisaldus ületab oluliselt piirnормi.

⁽⁷⁾ Ülemise tõkke põhimõtte kohaselt vastab toksilisusekvivalendi (TEQ) arvutamisel iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus määramispiiri väärtusele. Alumise tõkke põhimõtte kohaselt vastab TEQ arvutamisel iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus nullile. Vaheväärtuse põhimõtte kohaselt vastab TEQ arvutamisel iga kvantitatiivselt määramata analoogi panus poolele määramispiiri väärtusest.

▼ **M9**

Käesoleva punkti eespool esitatud lõikudes nimetatud eeskirju kohaldatakse ametlikuks kontrolliks ette nähtud proovide analüüsitulemuste suhtes. Kaitse- või vahekohtumenetluse eesmärgil tehtud analüüsides suhtes kohaldatakse siseriiklikke eeskirju.

3. **Direktiivi 2002/32/EÜ II lisas sätestatud häiretasemeid ületavad tulemused**

Häiretasemeid kasutatakse proovide valimiseks juhul, kui on vaja kindlaks teha saasteallikas ja võtta meetmeid saastumise vähendamiseks või kõrvaldamiseks. Sõeluuringumeetoditega tehakse kindlaks selliste proovide valimiseks sobivad läviväärtused. Kui saasteallika kindlakstegemiseks ja saaste vähendamiseks või kõrvaldamiseks on vaja suuri pingutusi, on asjakohane kontrollida häiretaseme ületamist kinnitaval meetodil kordusanalüüsiga ja võtta seejuures arvesse mõõtmise laiendatavust⁽⁸⁾.

II PEATÜKK

Proovi ettevalmistamine JA NÕUDED analüüsimeetoditele, MIDA KASUTATAKSE DIOKSIINIDE (PCDD/Fide) JA DIOKSIINITAOLISTE PCBde SISALDUSE AMETLIKUKS KONTROLLIKS SÖÖDAS

1. **Kohaldamisala**

Käesolevas peatükis sätestatud nõudeid kohaldatakse sööda analüüsimisel 2,3,7,8-asendatud PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks, samuti seoses proovide ettevalmistamise ja analüüsimisega muul regulatiivsel eesmärgil, sealhulgas kontrollide puhul, mida söödakäitlejad teevad, et tagada vastavus Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EÜ) nr 183/2005⁽⁹⁾ sätetele.

PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde esinemist söödas võib kontrollida kaht liiki analüüsimeetoditega:

a) *Sõeluuringumeetodid*

Sõeluuringumeetoditega tuvastatakse sellised proovid, mille PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisaldus ületab piirnormi või häiretaseme. Sõeluuringumeetodid peavad võimaldama kulutõhusalt analüüsida suurt arvu proove ning see suurendab võimalusi avastada uusi juhtumeid, mis on tarbijate jaoks suure kokkupuute- ja terviseriskiga. Nende kasutamise eesmärk on valenegatiivsete tulemuste vältimine. Nende hulka kuulub bioanalüütilisi ja GC-MS-meetodeid.

Sõeluuringumeetoditega võrreldakse analüüsitulemusi läviväärtusega ning saadakse jaatav või eitav vastus piirnormi või häiretaseme võimaliku ületamise kohta. Piirnormile mittevastavuse kahtlusega proovides tuleb PCDD/Fide kontsentratsioon ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summaarne kontsentratsioon määrata või kinnitada kinnitava meetodi abil.

Peale selle võivad sõeluuringumeetod anda teavet proovis leiduvate PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse kohta. Bioanalüütiliste sõeluuringumeetodite kasutamise korral väljendatakse tulemus bioanalüütilistes ekvivalentides (BEQdes), füüsikalis-keemiliste GC-MS-meetodite kasutamise korral toksilisusekvivalentides (TEQ). Sõeluuringumeetodite numbrilised tulemused sobivad nõuetekohasuse või nõuetele mittevastavuse kahtluse või häiretaseme ületamise tõendamiseks ning kinnitavate meetoditega järelanalüüsi jaoks asjaomase

⁽⁸⁾ Häiretaseme kontrollimise kordusanalüüsi suhtes kehtivad samad selgitused ja nõuded, mis on esitatud joonealuses märkuses 5 piirnormide kohta.

⁽⁹⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 12. jaanuari 2005. aasta määrus (EÜ) nr 183/2005, millega kehtestatakse söödahügieeni nõuded (ELT L 35, 8.2.2005, lk 1).

▼ **M9**

konsentratsioonivahemiku hindamiseks. Need meetodid ei sobi taustsisalduse ja sööda saadavate annuste hindamiseks, sisalduse ajatrendide jälgimiseks ega häiretaseme ja piinormi ümberhindamiseks.

b) *Kinnitavad meetodid*

Kinnitavate meetoditega on võimalik proovis leiduvaid PCDD/Fe ja dioksiinitaolisi PCBsid üheselt tuvastada ja määrata nende sisaldus ning saada täielikud andmed üksikanaloogide sisalduse kohta. Seega saab selliste meetoditega kontrollida piinorme ja häiretasemeid, sealhulgas kinnitada sõeluuringumeetoditega saadud tulemusi. Lisaks võib tulemusi kasutada muudel eesmärkidel, nagu sööda seires väikese taustsisalduse määramine, ajatrendide jälgimine, kokkupuute hindamine ning andmebaasi koostamine häiretasemete ja piinormide võimalikuks ümberhindamiseks. Need meetodid on olulised ka analoogide kombinatsioonide kindlakstegemiseks, et tuvastada võimalik saasteallikas. Nende meetodite puhul kasutatakse GC-HRMSi. Piinormile vastavuse või mittevastavuse kinnitamiseks võib kasutada ka GC-MS/MSi.

2. **Taustteave**

Toksilisusekvivalentides (TEQdes) väljendatud kontsentratsioonide arvutamiseks korrutatakse üksikainete kontsentratsioonid asjaomases proovis vastava toksilisusefaktoriga (TEF) (vt I peatüki allmärkus 1) ja liidetakse seejärel kokku, et saada TEQdes väljendatud dioksiinitaolist ühendite üldkontsentratsioon.

Käesolevas A osas tähendab üksikanaloogi aktsepteeritav määramispiir väikseimat analüüdisisaldust, mida saab mõistliku statistilise usaldusväärsusega mõõta ning mis vastab määramiskriteeriumidele, mis on sätestatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardites, nagu standard EN 16215:2012 „Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS“ (Loomasööd – dioksiinide ja dioksiinitaoliste PCBde sisalduse määramine gaasikromatograafia ja kõrglahutus-massispektromeetria (GC-HRMS) abil ning indikaator-PCBde sisalduse määramine GC-HRMSi abil) ja/või EPA meetodid 1613 ja 1668 (lähivaadatud).

Üksikanaloogi määramispiiri võib määratleda järgmiselt:

- a) prooviekstraktis leiduva analüüdi selline kontsentratsioon, mis annab kahe erineva jälgitava iooni puhul mõõteseadmes mõõtmistulemuse, mille puhul nõrgema töötlemata andmesignaali signaali ja müra suhe on 3: 1 või
- b) väikseima kontsentratsiooni punkt kalibreerimiskõveral, mille puhul saadakse vastuvõetav ($\leq 30\%$) ja järjepidev (mõõdetud vähemalt proovide analüüsiseeria alguses ja lõpus) hälve keskmisest suhtelisest kalibreerimistegurist, mis on arvutatud iga prooviseeria kalibreerimiskõvera kõikide punktide järgi, kui tehnilistel põhjustel signaali ja müra suhte arvutus ei anna usaldusväärset tulemust. Määramispiir LOQ arvutatakse väikseima kontsentratsiooni järgi, võttes arvesse sisestandardite saagist ja proovikogust.

▼ **M9**

Bioanalüütilised sõeluuringumeetodid ei anna tulemusi analoogi tasemel, vaid näitavad ⁽¹⁰⁾ üksnes TEQ väärtust, väljendatuna BEQdes, millega võetakse arvesse asjaolu, et kõik prooviekstraktis leiduvad ühendid, mis katses vastuse annavad, ei tarvitse vastata kõikidele TEQ-põhimõtte nõuetele.

Sõeluuringu- ja kinnitavaid meetodeid võib teatavas maatriksis sisalduse kontrollimiseks kasutada vaid juhul, kui kõnealused meetodid on piisavalt tundlikud, et häiretasemele või piinormile vastavat sisaldust usaldusväärselt määrata.

3. Kvaliteedi tagamise nõuded

- 3.1. Igas proovivõtu- ja analüüsietapis tuleb võtta meetmed ristsaastumise vältimiseks.
- 3.2. Proove tuleb säilitada ja transportida säilitamiseks sobivates klaas-, alumiinium-, polüpropüleen- või polüetüleenõudes, mis ei mõjuta proovide PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde sisaldust. Paberitolmu jäägid tuleb proovinõust eemaldada.
- 3.3. Proove tuleb säilitada ja transportida nii, et söödaproovi koostis ei muutuks.
- 3.4. Vajaduse korral jahvatatakse iga laboratoorne proov peeneks ja segatakse põhjalikult meetodil, mis tagab tõendatult täielikult homogeense proovi (näiteks jahvatatakse proov nii peeneks, et see läbiks 1 mm suuruste avadega sõela). Liiga suure niiskusesisaldusega proove tuleb enne jahvatamist kuivatada.
- 3.5. Oluline on kontrollida, et reaktiivid, klaasnõud ja seadmed ei mõjutaks TEQdes või BEQdes väljendatud tulemusi.
- 3.6. Tuleb teha tühikatse, mille puhul tehakse läbi kõik analüüsietapid ilma proovita.
- 3.7. Bioanalüütiliste meetodite puhul tuleb kontrollida, et ükski analüüsis kasutatav klaasnõu või lahusti ei sisaldaks ühendeid, mis segavad uuritavate ühendite avastamist meetodi töövahemikus. Klaasnõu tuleb loputada lahustiga või kuumutada temperatuuril, mis sobib selle pinnalt PCDD/Fide, dioksiinitaoliste ühendite ja segavate ühendite jääkide eemaldamiseks.
- 3.8. Ekstraheeritava proovi kogus peab olema piisav, et see vastaks nõuetele, mida kohaldatakse piisavalt väikestele kontsentratsioonidele vastavas töövahemikus, sh piinormile ja häiretasemele vastavas kontsentratsioonide vahemikus.
- 3.9. Uuritavatest toodetest võetud proovide ettevalmistamiseks kasutatavate konkreetsete meetodite puhul tuleb järgida rahvusvaheliselt tunnustatud suuniseid, st standardit EN ISO 6498.

⁽¹⁰⁾ Bioanalüütiliste meetodid ei ole spetsiifilised toksilisusfaktori (TEF) süsteemi analoogide suhtes. Prooviekstrakt võib sisaldada muid samase struktuuriga AhR-aktiivseid ühendeid, mis mõjutavad üldist tulemust. Seega ei saa bioanalüütilist tulemust pidada TEQ taseme hinnanguks, pigem viitab see proovi TEQ võimalikule tasemele.

▼ **M9****4. Nõuded laboritele**

4.1. Vastavalt määrusele (EL) 2017/625 peavad laborid olema ISO/IEC juhendi 58 kohaselt tegutseva tunnustatud asutuse poolt akrediteeritud, millega tagatakse, et laborid kohaldavad analüüsimisel kvaliteeditagamisüsteemi. Laborid tuleb akrediteerida standardi EN ISO/IEC 17025 kohaselt. Järgitakse põhimõtteid, mida on kirjeldatud tehnilistes suunistes, milles käsitletakse mõõtemääramatuse ja määramispiiride hinnangulise väärtuse leidmist PCDD/Fide ja PCBde analüüsimisel ⁽¹¹⁾.

4.2. Labori pädevust tuleb tõendada pideva eduka osalemisega laboritevahelistes uuringutes, mida korraldatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde kontsentratsiooni määramiseks asjakohastes söödamaatriksites ja kontsentratsioonivahemikes.

4.3. Laborid, kus kasutatakse proovide tavakontrolliks sõeluuringumeetodeid, peavad tegema nii kvaliteedi kontrollimisel kui ka saastekahtlusega proovide analüüsitulemuste kinnitamisel tihedat koostööd kinnitavat meetodit kasutavate laboritega.

5. Põhinõuded dioksiinide (PCDDde/PCDFide) ja dioksiinitaoliste PCBde analüüsile**5.1. Väikeste kontsentratsioonidega töövahemik ja määramispiirid**

Kuna osa kõnealustest ühenditest on äärmiselt toksilised, peavad tuvastatavad PCDD/Fide kogused olema femtogrammi (10^{-15} g) ülemises vahemikus. Enamiku PCBde analoogide puhul piisab nanogrammi täpsusega (10^{-9} g) määramispiirist. Toksilisemate dioksiinitaoliste PCBde analoogide (eriti ortoasendamata analoogide) sisalduse määramiseks peab töövahemiku alumine osa ulatuma pikogrammi (10^{-12} g) alumiste väärtusteni. Kõigi muude PCBde analoogide puhul piisab nanogrammi (10^{-9} g) täpsusega määramispiirist.

5.2. Suur selektiivsus (spetsiifilisus)

5.2.1. PCDD/Fisid ja dioksiinitaolisi PCBsid peab olema võimalik eristada paljudest muudest kaasa ekstraheeruvatest ja segada võivatest ühenditest, mille kontsentratsioon võib olla mitu suurusjärku suurem kui uuritavate analüütide kontsentratsioon. GC-MS-metodite korral peab olema võimalik eristada eri analooge, näiteks toksilisi analooge (nt seitseteist 2,3,7,8-asendatud PCDD/Fi ning kaksteist dioksiinitaolist PCBd) muudest analoogidest.

5.2.2. Bioanalüütiliste meetoditega peab olema võimalik määrata uuritavaid ühendeid PCDD/Fide ja/või dioksiinitaoliste PCBde summana. Proove tuleb puhastada, et kõrvaldada valepositiivseid tulemusi põhjustavad ühendid ja ühendid, mis võivad signaali vähendada, põhjustades vale-negatiivseid tulemusi.

⁽¹¹⁾ „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ (Juhend mõõtemääramatuse kohta laboritele, kus tehakse PCDDde/PCDFide ja PCBde analüüsi isotooplahjendusega massispektromeetria abil) (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ (Juhend avastamispiiri ja määramispiiri hinnangulise väärtuse määramiseks söödas ja toidus esinevate saasteainete mõõtmisel) (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

▼M9

- 5.3. *Suur mõõdetäpsus (tõesus ja kordustäpsus, bioanalüüsi näiline saagis)*
- 5.3.1. GC-MS-meetodite puhul peab määramine tagama kehtiva hinnangu aine tegeliku kontsentratsiooni kohta proovis. Suur mõõdetäpsus on vajalik, et vältida analüüsitulemuse tagasilükkamist määratud TEQ väärtuse vähese usaldusväärsuse tõttu. Mõõdetäpsust väljendatakse *tõesuse* (sertifitseeritud materjalis sisalduva analüüdi mõõdetud keskmise väärtuse ja analüüdi sertifitseeritud väärtuse erinevus protsentides) ja *kordustäpsusena* (RSD_R on suhteline standardhälve, mis arvutatakse korratavuse tingimustes saadud tulemuste põhjal).
- 5.3.2. Bioanalüütiliste meetodite korral määratakse bioanalüüsi näiline saagis. „Bioanalüüsi näiline saagis“ tähendab BEQ väärtust, mis arvutatakse 2,3,7,8-tetraklorodibenso-p-dioksiini (TCDD) või PCB 126 kalibreerimiskõvera alusel, mida korrigeeritakse tühiprooviga ja jagatakse seejärel kinnitava meetodi abil määratud TEQ väärtusega. Sellega püütakse korrigeerida selliseid tegureid nagu PCDD/Fide ja dioksiinitaaliste ühendite kadu ekstraheerimisel ja puhastamisel, kaasa ekstraheeruvad ühendid, mis suurendavad või vähendavad tulemust (agonistlik ja antagonistlik mõju), kalibreerimiskõvera sobivus ning toksilisusfaktori (TEF) ja suhtelise potentsuse (REP) väärtuste erinevused. Bioanalüüsi näiline saagis arvutatakse sobivate võrdlusproovide alusel, milles analoogide kombinatsioon on esindav ja nende sisaldus vastab ligikaudu huvipakkuvale sisalduste vahemikule.
- 5.4. *Valideerimine piirnормi vahemikus ja kvaliteedikontrolli üldmeetmed*
- 5.4.1. Labor peab tõendama valideerimismenetluse ja tavaanalüüsiga meetodi tulemuslikkust piirnормi hõlmavas vahemikus, nt piirnормi 0,5-, 1- ja 2-kordsele väärtusele vastava sisalduse juures, kordusanalüüsi puhul peab variatsioonikordaja väärtus olema vastuvõetav.
- 5.4.2. Sisemiste kvaliteedikontrolli meetmetena tuleb teha regulaarseid tühiproovidega ja rikastatud proovidega katseid või analüüsida kontrollproove (võimaluse korral tuleb eelistada sertifitseeritud etalonaineid). Tühiproovide ja rikastatud proovidega katsete ning kontrollproovide analüüsi kohta tuleb koostada kvaliteedikontrolli kaardid, mille alusel kontrollitakse, kas analüüsides tulemuslikkus vastab nõuetele.
- 5.5. *Määramispiir*
- 5.5.1. Bioanalüütilise sõeluuringumeetodi puhul ei ole määramispiiri tingimata vaja kindlaks määrata, kuid tuleb tõendada, et meetodiga on võimalik eristada tühiproovi väärtust läviväärtusest. BEQ väärtuse esitamise korral määratakse kindlaks teatamiskünnis, et oleks võimalik eristada proove, mille puhul saadud väärtus on sellest künnisest väiksem. Tuleb tõendada, et teatamiskünnis erineb tühiproovide väärtusest vähemalt kolm korda ja tulemus jääb töövahemikust allapoole. Seejärel arvutatakse see proovide alusel, mis sisaldavad uuritavaid ühendeid ligikaudu nõutud miinimumkoguses, mitte signaali-müra suhte või tühikatse põhjal.
- 5.5.2. Kinnitava meetodi puhul peab määramispiir olema ligikaudu üks viiendik piirnормist.
- 5.6. *Analüüsikriteeriumid*
- Kinnitava meetodi või sõeluuringumeetodi abil usaldusväärsete tulemuste saamiseks peavad piirnормile vastavasse vahemikku jääva TEQ väärtuse ja vastava BEQ väärtuse puhul olema täidetud järgmised kriteeriumid, olenemata sellest, kas TEQ või BEQ määratakse summaarsena (PCDD/Fide ja dioksiinitaaliste PCBde summaarse sisalduse alusel) või PCDD/Fide ja dioksiinitaaliste PCBde kohta eraldi.

▼ M9

	Sõeluuring bioanalüütiliste või füüsikalise- keemiliste meetoditega	Kinnitavad meetodid
Valenegatiivsete tulemuste osakaal (*)	< 5 %	
Tõesus		–20 % kuni +20 %
Korduvus (RSD _r)	< 20 %	
Vahepealne korduvustäpsus (RSD %)	< 25 %	< 15 %

(*) Piirnormide puhul.

5.7. Sõeluuringumeetodi erinõuded

5.7.1. Sõeluuringuks võib kasutada nii GC-MS-meetodeid kui ka bioanalüütilisi meetodeid. GC-MS-meetodite suhtes kohaldatakse punktis 6 sätestatud nõudeid. Rakupõhiste bioanalüütiliste meetodite erinõuded on sätestatud punktis 7.

5.7.2. Laborid, kus proovide tavakontrolliks kasutatakse sõeluuringumeetodeid, peavad tegema tihedat koostööd kinnitavat meetodit kasutavate laboritega.

5.7.3. Tavaanalüüside käigus tuleb kontrollida sõeluuringumeetodi tulemuslikkust analüüsi kvaliteedi kontrollimise ja meetodi pideva valideerimise teel. Nõuetele vastavate tulemuste kontrollimiseks peab olema kehtestatud pidev kava.

5.7.4. Raku reaktsiooni võimaliku pärssimise ja tsütotoksilisuse kontroll

20 % prooviekstraktidest tuleb kontrollida tavapärase sõeluuringuga, lisades neile või jättes lisamata piirnormile või häiretasemele vastavas koguses 2,3,7,8-TCDDd, et kontrollida, kas prooviekstraktis esinevad segavad ained võivad reaktsiooni pärssida. Rikastatud proovis mõõdetud kontsentratsiooni võrreldakse rikastamata ekstraktis määratud kontsentratsiooni ja rikastamisel kasutatud kontsentratsiooni summaga. Kui kõnealune mõõdetud kontsentratsioon on arvutatud (summaarsest) kontsentratsioonist üle 25 % väiksem, viitab see signaali võimalikule pärssimisele ning asjaomast proovi tuleb analüüsida GC-HRMS-meetodil tehtava kinnitava analüüsiga. Tulemusi kontrollitakse kvaliteedikontrolli kaartide põhjal.

5.7.5. Nõuetele vastavate proovide kvaliteedikontroll

Ligikaudu 2–10 % nõuetele vastavate proovide tulemustest tuleb olenevalt proovi maatriksist ja labori kogemustest kinnitada GC-HRMS-meetodiga.

5.7.6. Valenegatiivsete tulemuste osakaalu arvutamine kvaliteedikontrolli andmete põhjal

Määratakse, kui suur on valenegatiivsete tulemuste osakaal, mis on saadud alla- ja ülespoole piirnormi või häiretaset jäävate proovide sõeluuringul. Valenegatiivsete tulemuste tegelik osakaal peab jääma alla 5 %. Kui proovi maatriksi või maatriksite rühma kohta on olemas vähemalt 20 nõuetele vastava proovi kvaliteedikontrolliga kinnitatud tulemused, arvutatakse nende andmete põhjal valenegatiivsete tulemuste osakaal. Valenegatiivsete tulemuste osakaalu hindamiseks vajaliku 20 tulemuse hulka võib arvata ka laboritevahelistes võrdluskatsetes

▼ **M9**

või seoses saastamisjuhtumiga analüüsitud proovide tulemused, milles määratava aine kontsentratsioon ületab piirnõrmi näiteks kuni kaks korda. Proovid peavad hõlmama kõige levinumaid analoogide kombinatsioone, mis esindavad eri allikaid.

Ehkki sõeluuringu esmane eesmärk on teha kindlaks häiretaset ületava sisaldusega proovid, lähtutakse valenegatiivsete tulemuste osakaalu kindlakstegemisel piirnormist ning seejuures võetakse arvesse kinnitava meetodi kohast mõõtmise laiendmääramatust.

- 5.7.7. Sõeluuringuga tuvastatud võimalikke nõuetele mittevastavaid tulemusi tuleb alati kontrollida esialgse proovi täieliku kordusanalüüsiga, kasutades kinnitavat meetodit. Neid proove võib kasutada ka valepositiivsete tulemuste osakaalu hindamiseks. Sõeluuringumeetodite puhul on valepositiivsete tulemuste osakaal selliste tulemuste osakaal, mis tunnistatakse kinnitava analüüsiga nõuetele vastavaks, kuigi varasemal sõeluuringul on proov osutunud nõuetele mittevastavuse kahtlusega prooviks. Sõeluuringumeetodi eeliste hindamisel tuleb valepositiivse tulemuse andnud proovide arvu võrrelda kontrollitud proovide koguarvuga. See osakaal peab olema piisavalt väike, et sõeluuringumeetodit oleks mõtet kasutada.

- 5.7.8. Bioanalüütilised meetodid peavad valideerimistingimustes võimaldama usaldusväärselt, arvutatud ja väljendatud BEQna.

Ka korduvuse tingimustes kasutatavate bioanalüütiliste meetodite puhul peaks laborisisene RSD_r olema üldjuhul väiksem kui korratavuse tingimustes (RSD_R).

6. GC-MS-meetodite erinõuded, mida tuleb täita sõeluuringu või kinnitava analüüsi puhul

- 6.1. *WHO-TEQ tulemuste ülemise tõkke ja alumise tõkke vaheline vastuvõetav erinevus*

Ülemise ja alumise tõkke vaheline erinevus ei tohi piirnõrmi ja vajaduse korral häiretaseme ületamise kinnitamiseks olla suurem kui 20 %.

6.2. Saagiste kontroll

- 6.2.1. Analüüsimeetodi valideerimiseks tuleb ¹³C-märgistatud 2,3,7,8-klooritud PCDD/Fide sisestandardid ja ¹³C-märgistatud dioksiinitaliste PCBde sisestandardid lisada kohe analüüsi alguses, näiteks enne ekstraheerimist. Iga tetra- kuni oktaklooritud PCDD/Fide homoloogilise rühma kohta ning iga dioksiinitaliste PCBde homoloogilise rühma kohta tuleb lisada vähemalt üks analoog (alternatiivina võib lisada vähemalt ühe analoogi iga valitud iooni massispektromeetrilise registreerimise funktsiooni kohta, mida kasutatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaliste PCBde sisalduse kontrolliks). Kinnitavate meetodite puhul tuleb kasutada kõiki seitsetteist ¹³C-märgistatud 2,3,7,8-asendatud PCDD/Fide sisestandardit ja kõiki kahteist ¹³C-märgistatud dioksiinitaliste PCBde sisestandardit.

▼ **M9**

6.2.2. Asjakohaseid kalibreerimislahuseid kasutades tuleb määrata suhtelised kalibreerimistegurid ka neile analoogidele, mille puhul ^{13}C -märgistatud analoogi ei lisata.

6.2.3. Alla 10 % rasvasisaldusega taimse ja loomse sööda puhul tuleb sise-standardid kindlasti lisada enne ekstraheerimist. Üle 10 % rasvasisaldusega loomse sööda puhul tuleb sisestandardid lisada kas enne või pärast rasva ekstraheerimist. Ekstraheerimise tõhusus tuleb valideerida sobival viisil olenevalt sellest, millises etapis sisestandardid lisatakse.

6.2.4. Enne GC-MS-analüüsi tuleb lisada 1 või 2 saagise (surrogaat)standardit.

6.2.5. Saagise kogust tuleb kontrollida. Kinnitava meetodi puhul peavad individuaalsete sisestandardite saagised olema vahemikus 60–120 %. Individuaalsete analoogide, eriti mõne hepta- või oktaklooritud dibenso-p-dioksiini ja dibensofuraani puhul on lubatud väiksemad või suuremad saagised, kui nende panus TEQ väärtusesse ei ületa 10 % TEQ koguväärtusest (PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa alusel). GC-MS-sõeluringumeetodite puhul peavad saagised olema vahemikus 30–140 %.

6.3. *Segavate ainete eemaldamine*

— PCDD/Fid eraldatakse segavatest klooritud ühenditest, näiteks mittedioksiinitaolistest PCBdest ja klooritud difenüleetritest, sobiva kromatograafilise meetodiga (eelistada tuleks florisil-, alumiiniumoksiid- ja/või süsinikkolonne).

— Isomeeride gaasikromatograafiline lahutus peab olema selline, et 1,2,3,4,7,8-HxCDFi ja 1,2,3,6,7,8-HxCDFi piikide kattuvus on alla 25 %.

6.4. *Kalibreerimine standardkõveraga*

Kalibreerimiskõvera vahemik peab hõlmama asjakohast piirnormi või häiretaset.

6.5. *Kinnitavate meetodite erikriteeriumid*

— GC-HRMSi puhul:

HRMSi puhul peab lahutusvõime kogu massivahemikus olema üldjuhul vähemalt 10 000, kui piikidevahelise ala kõrgus jääb alla 10 %;

järgitakse rahvusvaheliselt tunnustatud standardites, näiteks standardis EN 16215:2012 „Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS“ (Loomasööd – dioksiinide ja dioksiinitaoliste PCBde määramine GC-HRMSiga ning indikaator-PCBde määramine GC-HRMSiga) ja/või USA Keskkonnakaitseameti meetodite 1613 ja 1668 läbivaadatud versioonides kirjeldatud tuvastamise ja kinnitamise lisakriteeriume.

— GC-MS/MSi puhul:

▼ **M9**

jälgitakse vähemalt 2 spetsiifilist eellasiooni, millest kummalgi on vastav spetsiifiline ülemineku-järglasioon kõikide märgistatud ja märgistamata analüütide jaoks analüüsitavas vahemikus;

valitud ülemineku-järglasioonide suhteliste signaalitugevuste suurim lubatud hälve võib olla $\pm 15\%$ võrreldes arvutatud või mõõdetud väärtustega (kaliibrimisstandardite keskmine), identsetes MS/MSi tingimustes, eelkõige põrkeenergia ja põrkegaasi rõhu osas, iga analüüdi ülemineku puhul;

iga kvadрупooli lahutusvõime peab olema võrdne ühikmassilahutusvõimega või sellest parem (ühikmassilahutusvõime: lahutusvõime, mis on piisav kahe teineteisest ühe massiühiku kaugusel asuva piigi eristamiseks), et minimeerida võimalikku segavat mõju uuritavatele analüütidele;

järgitakse rahvusvaheliselt tunnustatud standardites, näiteks standardis EN 16215:2012 „Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS“ (Loomasööd – dioksiinide ja dioksiinitaoliste PCBde määramine GC-HRMSiga ning indikaator-PCBde määramine GC-HRMSiga) ja/või USA Keskkonnakaitseameti meetodite 1613 ja 1668 muudetud versioonides kirjeldatud tuvastamise ja kinnitamise lisakriteeriume, välja arvatud kohustust kasutada GC-HRMSi.

7. **BIOANALÜÜTILISTELE MEETODITELE ESITATAVAD ERINÕUDED**

Bioanalüütilised meetodid on bioloogilistele põhimõtetele tuginevad meetodid, nagu rakupõhine, retseptor- ja immuunanalüüs. Käesolevas punktis sätestatakse bioanalüütiliste meetodite üldnõuded.

Sõeluuringumeetodiga liigitatakse proov põhimõtteliselt nõuetele vastavaks või nõuetele mittevastavuse kahtlusega prooviks. Sel otstarbel võrreldakse arvutatud BEQ väärtust läviväärtusega (vt punkt 7.3). Läviväärtusest allapoole jäävad proovid tunnistatakse nõuetele vastavaks, läviväärtusega võrdsed või seda ületavad proovid loetakse mittevastavuse kahtlusega proovideks ning neid tuleb analüüsida kinnitava meetodiga. Praktikaks võib kõige sobivamaks läviväärtuseks olla BEQ väärtus, mis vastab 2/3 piinormist, eeldusel, et on tagatud valenegatiivsete tulemuste osakaal alla 5 % ja vastuvõetav valepositiivsete tulemuste osakaal. Kui PCDD/Fide piinorm ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa piinorm on erinevad, on proovide nõuetele vastavuse kontrollimiseks ilma fraksioneerimata vaja PCDD/Fide jaoks asjakohaseid bioanalüüsi läviväärtusi. Häiretaset ületavate proovide kontrollimisel on sobivaks läviväärtuseks asjakohane protsent vastavatest häiretasemetest.

Kui hinnangulist sisaldust väljendatakse BEQna, peavad proovi analüüsitulemused jääma töövahemikku ja ületama teatamiskünnise (vt punktid 7.1.1 ja 7.1.6).

7.1. *Analüüsitulemuste hindamine*

7.1.1. Üldised nõuded

— Kui kontsentratsioone arvutatakse TCDD kalibreerimiskõvera alusel, iseloomustab kõvera ülemise osa väärtusi suur hajuvus (variatsioonikordaja CV suur väärtus). Töövahemik on ala, kus CV on alla 15 %. Töövahemiku alumine piir (teatamiskünnis) peab olema vähemalt kolm korda suurem tühikatsete tulemusest. Töövahemiku ülemine piir esitatakse tavaliselt EC₇₀ väärtusena

▼M9

(70 % suurimast efektiivsest kontsentratsioonist), kuid see on väiksem, kui CV on selles vahemikus üle 15 %. Töövahemik määratakse valideerimise käigus. Läviväärtused (vt punkt 7.3) peavad kindlalt jääma töövahemikku.

- Standardlahuste ja prooviekstraktide analüüsimisel tehakse kolm või vähemalt kaks kordusmõõtmist. Kordusanalüüsi korral annab 4–6 üle plaadi jaotatud kannus analüüsiv standardlahus või kontrollekstrakt tulemuse või kontsentratsiooni (võimalik ainult töövahemikus), mis põhineb CV-l, mis on väiksem kui 15 %.

7.1.2. Kalibreerimine

7.1.2.1. Kalibreerimine standardkõveraga

- Proovide dioksiinisisalduse hindamiseks võrreldakse analüüsitulemust TCDD (või PCB 126 või PCDD/PCDFi/dioksiinitaolise PCB standardsegu) kalibreerimiskõveraga, millest arvutatakse ekstrakti ja seejärel proovi BEQ väärtus.

- Kalibreerimiskõver peab hõlmama 8–12 kontsentratsiooni (vähemalt kahe kordusmõõtmisega), nii et kõvera alumises osas (töövahemikus) oleks piisavalt kontsentratsioonipunkte. Erilist tähelepanu tuleb pöörata kõvera sobivusele töövahemikus. Mittelineaarse regressiooni korral ei ole R^2 väärtusest regressiooni sobivuse hindamisel eriti või üldse abi. Parema mudeli sobivus saavutatakse arvutatud sisalduse ja mõõdetud sisalduse vahe (nt ruuthälvete summa) minimeerimisega töövahemikule vastavas kõvera osas.

- Seejärel tuleb korrigeerida prooviekstrakti hinnangulist dioksiinisisaldust uuritava maatriksiga või lahustiga tühiproovi kohta arvutatud BEQ väärtuse põhjal (et võtta arvesse kasutatud lahustites ja kemikaalides esinevaid lisandeid) ning näilise saagise põhjal (arvutatakse sellise sobiva võrdlusproovi BEQ väärtuse alusel, mille esindav analoogide kombinatsioon vastab ligikaudu piinormile või häiretasemele). Saagise korrigeerimiseks peab näiline saagis alati olema nõutavas vahemikus (vt punkt 7.1.4). Saagise korrigeerimiseks kasutatavad võrdlusproovid peavad vastama punktis 7.2 sätestatud nõuetele.

7.1.2.2. Kalibreerimine võrdlusproovide abil

Teise võimalusena võib kasutada vähemalt nelja võrdlusproovi alusel koostatud kalibreerimiskõverat (vt punkt 7.2.4): üks maatriksiga tühiproov ning kolm võrdlusproovi sisaldustega, mis võrduvad 0,5-, 1,0- ja 2,0-kordse piinormi või häiretasemega; kui võrdlusproovide maatriksi omadused kattuvad tundmatute proovide maatriksi omadustega, ei ole vaja arvestada tühikats ja saagise parandit. Sellisel juhul võib otse nende proovide alusel arvutada analüüsitulemuse, mis vastab 2/3 piinormist (vt punkt 7.3), ja kasutada seda läviväärtusena. Häiretaset ületavate proovide kontrollimisel on sobivaks läviväärtuseks asjakohane protsent sellistest häiretasemetest.

▼ **M9****7.1.3. PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde eraldi määramine**

Ekstraktid võib jagada PCDD/Fisid ja dioksiinitaolisi PCBsid sisaldavateks fraktsioonideks, mis võimaldab eraldi määrata PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde TEQ väärtused (väljendatuna BEQna). Dioksiinitaolisi PCBsid sisaldava fraktsiooni analüüsimise tulemuste hindamiseks tuleb eelistatavalt kasutada standardiga PCB 126 saadud kalibreerimiskõverat.

7.1.4. Bioanalüüsi näilised saagised

Bioanalüüsi näiline saagis arvutatakse sobivate võrdlusproovide alusel, mille esindav analoogide kombinatsioon vastab ligikaudu piinormile või häiretasemele, ja seda väljendatakse BEQ väärtuse protsendina TEQ väärtusest. Olenevalt analüüsi liigist ja kasutatud TEFidest⁽¹²⁾ võib dioksiinitaoliste PCBde TEF- ja REP-kordajate erinevuse tõttu dioksiinitaoliste PCBde näiline saagis olla PCDD/Fide näilise saagisega võrreldes väike. Seepärast peab PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde eraldi määramisel bioanalüüsi näiline saagis olema järgmine: dioksiinitaoliste PCBde puhul 20–60 % ja PCDD/Fide puhul 50–130 % (vahemik kehtib TCDD kalibreerimiskõvera kasutamisel). Dioksiinitaoliste PCBde osakaal PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summas võib eri maatriksite ja proovide puhul erineda; need vahemikud kajastavad PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa bioanalüüsi näilises saagises, mis peab olema 30–130 %. Kui liidu õigusaktides muudetakse oluliselt PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde TEFide väärtusi, tuleb need vahemikud läbi vaadata.

7.1.5. Saagiste kontroll puhastamisel

Valideerimise käigus kontrollitakse ühendite kadu puhastamisel. Analoogide seguga rikastatud tühiproov (korduskatsete arv *n* on vähemalt 3) puhastatakse ning saagist ja varieeruvust kontrollitakse kinnitava meetodiga. Saagis peab olema vahemikus 60–120 %, eelkõige selliste analoogide puhul, mis moodustavad eri segude TEQ väärtusest üle 10 %.

7.1.6. Teatamiskünnis

BEQ väärtustest teatamisel tuleb teatamiskünnis kindlaks määrata tüüpilisi analoogide kombinatsioone sisaldavast asjakohasest maatriksist võetud proovide alusel, mitte standarditel põhineva kalibreerimiskõvera alusel, kuna kõvera alumises osas on täpsus väike. Arvestada tuleb ekstraheerimise ja puhastamise mõju. Teatamiskünnis peab olema tühikatsete tulemusest vähemalt kolm korda suurem.

7.2. Võrdlusproovide kasutamine**7.2.1. Võrdlusproovid peavad esindama proovi maatriksit, analoogide kombinatsioone ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde kontsentratsioone vahemikus, mis vastab piinormile või häiretasemele.****7.2.2. Igas katseseerias tuleb kasutada tühikatset, eelistatavalt maatriksiga tühiproovi, ja piinormile või häiretasemele vastava sisaldusega võrdlusproovi. Neid proove tuleb ekstraheerida ja analüüsida samal ajal ja samades tingimustes. Võrdlusprooviga saadud väärtus peab olema selgelt suurem tühiprooviga saadud väärtusest, mis tõendab katsemetodi sobivust. Kõnealuseid proove võib kasutada tühikatset ja saagist arvestava parandi tegemisel.**

⁽¹²⁾ Kehtivad nõuded põhinevad TEFidel, mis on avaldatud artiklis: M. van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ **M9**

7.2.3. Saagist arvestava parandi tegemiseks valitud võrdlusproovid peavad olema analüüsitava proovi suhtes esindavad, st analoogide kombinatsioonid ei tohi põhjustada sisalduse alahindamist.

7.2.4. Et tõendada analüüsi nõuetekohast tulemuslikkust huvipakkuvas sisalduste vahemikus piinormi või häiretaseme kontrollimiseks, võib kasutada täiendavaid võrdlusproove, milles uuritava aine sisaldus vastab näiteks piinormi või häiretaseme 0,5- ja 2-kordsele väärtusele. Üheskoos võib neid proove kasutada analüüsitava proovide BEQ väärtuste arvutamiseks (vt punkt 7.1.2.2).

7.3. Läviväärtuste määramine

Tuleb teha kindlaks BEQ väärtustes väljendatud bioanalüütiliste tulemuste ja TEQ väärtustes väljendatud kinnitava meetodi tulemuste vaheline seos (nt asjakohase maatriksiga tehtud kalibreerimiskatsetega, milles kasutatakse võrdlusproove, mille rikastustasemed on 0, 0,5-, 1- ja 2-kordne piinorm, ja mida korratakse igal tasemel 6 korda ($n = 24$)). Selle seose alusel saab hinnata (tühiproovi ja saagise) parandeid, kuid neid tuleb kontrollida punkti 7.2.2 kohaselt.

Läviväärtused tuleb määrata selleks, et otsustada, kas proov vastab piinormile, või vajaduse korral häiretaseme kontrollimiseks, kusjuures asjaomased piinormid või häiretasemed on kehtestatud kas ainult PCDD/Fide või dioksiinitaoliste PCBde jaoks või PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa jaoks. Läviväärtus on bioanalüüsi tulemuste (mida on parandatud tühikats ja saagise arvestamiseks) jaotuse alumine piir, mis vastab 95 % usaldusnivooga kinnitava meetodi otsustuspiirile (eeldades, et valenegatiivsete tulemuste osakaal on $< 5\%$ ja $RSD_R < 25\%$). Kinnitava meetodi otsustuspiir on piinorm, mille puhul on arvesse võetud mõõtmise laiendmääramatust.

Läviväärtuse (BEQdes) võib arvutada, kasutades üht punktides 7.3.1, 7.3.2 ja 7.3.3 sätestatud lähenemisviisidest (vt joonis 1).

7.3.1. 95 % usaldusnivoole vastava usaldusvahemiku alumise piiri kasutamine, mis vastab kinnitava meetodi otsustuspiirile

$$\text{Läviväärtus} = \text{BEQ}_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f = m - 2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

kus

BEQ_{DL} on BEQ, mis vastab kinnitava meetodi otsustuspiirile, mis on piinorm, mille puhul on arvesse võetud mõõtmise laiendmääramatust,

$s_{y,x}$ on jääkstandardhälve,

$t_{\alpha, f = m - 2}$ on Studenti tegur ($\alpha = 5\%$, $f = \text{vabadusastmete arv, ühepoolse piiranguga}$),

m on kalibreerimispunktide koguarv (indeks j),

n on korduste arv igal tasemel,

x_i on kinnitava meetodiga määratud, TEQna väljendatud kontsentratsioon proovis kalibrimispunktis i ,

$\bar{x}$ on kõikide kalibrimisproovide kontsentratsioonide keskvärtus (TEQdes),

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ on ruutude summa parameeter, i – kalibree-
rimispunkti i indeks.

▼ M9

- 7.3.2. Arvutamine kinnitava meetodi otsustuspiirile vastava saastumisega proovide korduval analüüsimisel ($n \geq 6$) saadud (tühikats ja saagise arvestamiseks parandatud) bioanalüütiliste tulemuste põhjal; see on jaotuse alumine piir vastava keskmise BEQ väärtuse korral:

$$\text{Läviväärtus} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

kus

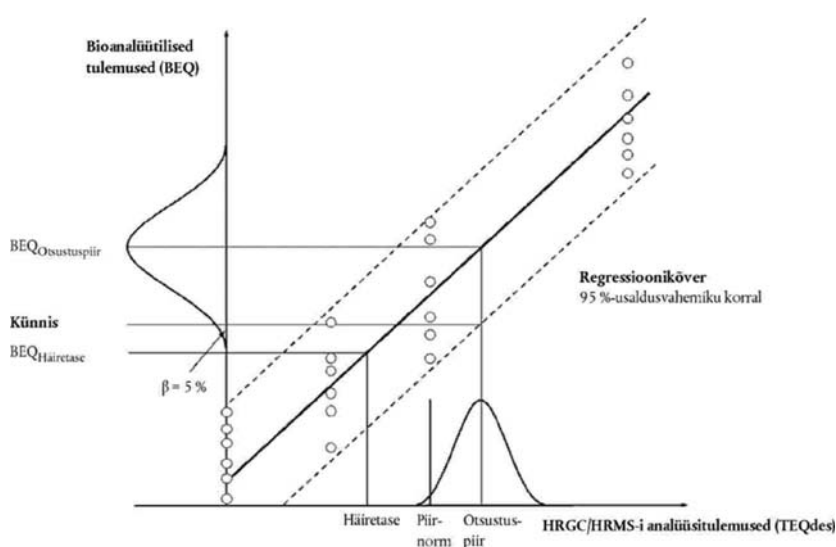
SD_R on bioanalüüsi tulemuste standardhälve BEQ_{DL} korral, mõõdetuna laborisisese korratavuse tingimustes.

- 7.3.3. Arvutamine 2/3 piirnormi või häiretaseme väärtusele (põhineb tähelepanekul, et kõnealune tase vastab umbkaudu punkti 7.3.1 või 7.3.2 alusel kindlaks määratud läviväärtusele) vastava saastumisega proovide korduval analüüsimisel ($n \geq 6$) saadud bioanalüütiliste tulemuste (BEQ_{des} , parandatud tühikats ja saagise arvestamiseks) keskväärtusena:

Läviväärtuste arvutamine 95 % usaldusnivoo korral eeldusel, et valenegatiivsete tulemuste osakaal on $< 5 \%$ ja $\text{RSDR} < 25 \%$:

1. 95 % usaldusnivoole vastava usaldusvahemiku *alumise* piiri alusel, mis vastab kinnitava meetodi otsustuspiirile.
2. kinnitava meetodi otsustuspiirile vastava saastumisega proovide korduval analüüsimisel ($n \geq 6$) alusel saadud tulemuste jaotuse (Joonisel 1 kellukesekujuline kõver) *alumise* piiri järgi sellekohase keskmise BEQ väärtuse juures.

Joonis 1



- 7.3.4. Läviväärtustele kehtestatud piirangud

BEQ-põhised läviväärtused, mis on arvutatud valideerimise käigus saadud RSD_R alusel, kasutades piiratud arvu proove erinevate maatriksite ja analoogide kombinatsiooniga, võivad olla suuremad kui TEQ-põhised piirnormile või häiretasemele vastavad sisaldused, kuna valideerimisel saavutatakse suurem kordustäpsus kui tavaolukorras, kus tuleb kontrollida võimalike analoogide kombinatsioonide tundmatut spektrit. Sellisel juhul võetakse läviväärtuse arvutamisel aluseks kas $\text{RSD}_R = 25 \%$ või eelistatakse sisaldust, mis on 2/3 piirnormi või häiretaseme väärtusest.

▼ **M9**7.4. *Tulemuslikkuse näitajad*

- 7.4.1. Bioanalüütiliste meetodite puhul ei ole võimalik kasutada sisestandardideid, mistõttu tuleb katseseeriasise ja katseseeriavahelise standardhälbe kohta andmete saamiseks teha katsed bioanalüütiliste meetodite korduvuse kohta. Korduvus peab jääma alla 20 % ja laborisisene korratavus alla 25 %. See peab põhinema arvutatud BEQ väärtustel pärast tühikatse- ja saagiseparandi arvessevõtmist.
- 7.4.2. Valideerimise käigus tõendatakse, et analüüs võimaldab eristada tühi-proovi ja läviväärtusele vastavat sisaldust, mis võimaldab kindlaks teha proovid, milles asjaomane läviväärtus on ületatud (vt punkt 7.1.2).
- 7.4.3. Määratakse uuritavad ühendid, võimalikud segavad tegurid ja tühi-proovi suurimad lubatud väärtused.
- 7.4.4. Ühe prooviekstrakti kolmekordsel analüüsimisel ei tohi protsentides väljendatud standardhälve olla suurem kui 15 % analüüsitulemusest või selle alusel arvutatud sisaldusest (võimalik üksnes töövahemikus).
- 7.4.5. Bioanalüütilise meetodi tulemuslikkuse hindamiseks kindlas ajavahe-mikus kasutatakse võrdlusproovi(de) (tühiproov ning piinormile ja häiretasemele vastava sisaldusega proov) korrigeerimata tulemusi, mis on väljendatud BEQdes.
- 7.4.6. Tühiproovide ja iga tüüpi võrdlusproovide kohta tuleb koostada kvali-teedikontrolli kaardid ja kontrollida, kas analüüsi tulemuslikkus vastab nõuetele; eelkõige on nõutav teatava miinimuserinevuse olemasolu tühiproovide ja töövahemiku alumise piiri vahel ning võrdlusproovide puhul on nõutav laborisisene korratavus. Tühikatsed tuleb põhjalikult kontrollida, et vältida valenegatiivsete tulemuste saamist pärast tühi-proovi tulemuse lahutamist.
- 7.4.7. Nõuetele mittevastavuse kahtlusega proovide ja 2–10 % nõuetekohaste proovide (vähemalt 20 proovi iga maatriksi kohta) kinnitava meetodiga saadud tulemused tuleb koondada ning kasutada sõeluuringumeetodi tulemuslikkuse ning BEQ ja TEQ vahelise seose hindamiseks. Neid andmeid võib kasutada asjaomase valideeritud maatriksiga tavaproo-vide suhtes kohaldatavate läviväärtuste ümberhindamiseks.
- 7.4.8. Meetodi tulemuslikkust võib tõendada ka laboritevahelistes võrdluskat-setes osalemisega. Võrdluskatsete käigus analüüsitud proovid hõlmavad nt kuni kahekordse piinormini ulatuvat kontsentratsioonide vahemikku ja nende tulemusi võib kasutada valenegatiivsete tulemuste osakaalu hindamisel, kui labor suudab tõendada meetodi tulemuslikkust asja-omases laboris. Proovid peavad hõlmama kõige levinumaid analoogide kombinatsioone, mis esindavad eri allikaid.
- 7.4.9. Saastumisjuhtumite korral võidakse läviväärtused ümber hinnata, võttes arvesse asjaomase juhtumiga seotud konkreetse maatriksi omadusi ja esinevaid analoogide kombinatsioone.

8. TULEMUSTE ESITAMINE8.1. *Kinnitavad meetodid*

- 8.1.1. Analüüsitulemused peavad hõlmama iga üksiku PCDD/Fi ja dioksiini-taolise PCB analoogi sisaldusi ning TEQ väärtus tuleb esitada nii alumise ja ülemise tõkke kui ka vaheväärtuse põhiseana, et tagada võimalikult suure hulga andmete olemasolu katseprotokollis ja võimal-dada tulemuste tõlgendamist lähtuvalt konkreetsetest nõuetest.

▼ **M9**

- 8.1.2. Protokollis esitatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde ekstraheerimiseks kasutatud meetod.
- 8.1.3. Üksikute sisestandardite saagised tuleb esitada juhul, kui need jäävad väljapoole punktis 6.2.5 nimetatud vahemikku ja kui on ületatud piirnorm (sellisel juhul ühe korduskatse saagised) või kui nõutakse neist teatamist.
- 8.1.4. Kuna proovi nõuetekohasuse hindamisel tuleb arvestada mõõtmise laiendmääramatust, esitatakse ka see näitaja. Analüüsitulemused tuleb seega esitada kujul $x \pm U$, kus x on analüüsitulemus ja U on mõõtmise laiendmääramatus, kusjuures arvutamisel kasutatakse kattetegurit 2, mis annab usaldusnivoo ligikaudu 95 %. Kui PCDD/Fid ja dioksiinitaolised PCBd määratakse eraldi, tuleb PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summa kohta kasutada PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde eraldi saadud analüüsitulemuste hinnanguliste laiendmääramatuste summat.
- 8.1.5. Tulemused tuleb esitada samades ühikutes ja vähemalt sama tüvenumbrite arvuga, nagu on direktiiviga 2002/32/EÜ sätestatud piirnormid.
- 8.2. *Bioanalüütilised sõeluuringumeetodid*
- 8.2.1. Sõeluuringu tulemus esitatakse järgmisel kujul: nõuetele vastav või nõuetele mittevastavuse kahtlusega („kahtlane“).
- 8.2.2. Lisaks sellele võib PCDDde/Fide ja/või dioksiinitaoliste PCBde esialgse sisalduse esitada BEQdes, mitte TEQdes.
- 8.2.3. Allapoole teatamiskünnist jääva tulemusega proovi kohta märgitakse „allpool teatamiskünnist“. Töövahemiku ülempiirist suurema sisaldusega proovi puhul esitatakse tulemus kujul „ületab töövahemiku ülempiiri“ ning märgitakse töövahemiku ülempiirile vastav BEQ väärtus.
- 8.2.4. Katseprotokollis tuleb iga proovimaatriksi tüübi kohta esitada piirnorm või häiretase, millel hindamine põhineb.
- 8.2.5. Protokollis esitatakse kasutatud analüüsimeetodi liik, analüüsimeetodi aluspõhimõtted ja kalibreerimise viis.
- 8.2.6. Protokollis esitatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde ekstraheerimiseks kasutatud meetod.
- 8.2.7. Mittevastavuse kahtlusega proovide puhul tuleb protokolli lisada märkus võetavate meetmete kohta. Suurema sisaldusega proovides tuleb PCDD/Fide kontsentratsioon ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summaarne kontsentratsioon määrata/kinnitada kinnitava meetodi abil.
- 8.2.8. Esitatakse üksnes kinnitava analüüsiga saadud nõuetele mittevastavad tulemused.
- 8.3. *Füüsikalise-keemilised sõeluuringumeetodid*
- 8.3.1. Sõeluuringu tulemus esitatakse järgmisel kujul: nõuetele vastav või nõuetele mittevastavuse kahtlusega („kahtlane“).
- 8.3.2. Katseprotokollis tuleb iga proovimaatriksi tüübi kohta esitada piirnorm või häiretase, millel hindamine põhineb.

▼ **M9**

- 8.3.3. Peale selle võib esitada iga üksiku PCDD/Fi ja dioksiinitaolise PCB analoogi sisalduse ning TEQ väärtuse alumise tõkke, ülemise tõkke ja vahelväärtuse järgi. Tulemused tuleb esitada samades ühikutes ja vähemalt sama tüvenumbrite arvuga, nagu on direktiiviga 2002/32/EÜ sätestatud piirnormid.
- 8.3.4. Üksikute sisestandardite saagised tuleb esitada juhul, kui need jäävad väljapoole punktis 6.2.5 nimetatud vahemikku ja kui on ületatud piirnorm (sellisel juhul ühe korduskatse saagised) või kui nõutakse neist teatamist.
- 8.3.5. Katseprotokollis märgitakse, millist GC-MSi meetodit kasutati.
- 8.3.6. Protokollis esitatakse PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde ekstraheerimiseks kasutatud meetod.
- 8.3.7. Mittevastavuse kahtlusega proovide puhul tuleb protokollis lisada märkus võetavate meetmete kohta. Suurema sisaldusega proovides tuleb PCDD/Fide kontsentratsioon ning PCDD/Fide ja dioksiinitaoliste PCBde summaarne kontsentratsioon määrata/kinnitada kinnitava meetodi abil.
- 8.3.8. Otsuse nõuetele mittevastavuse kohta võib teha üksnes pärast kinnitavat analüüsi.

III PEATÜKK

**PROOVI ETTEVALMISTAMINE JA NÕUDED
ANALÜÜSIMETODITELE, MIDA KASUTATAKSE
MITTEDIOKSHINITAOLISTE PCBDE SISALDUSE AMETLIKUKS
KONTROLLIKS SÕÖDAS**

1. **Kohaldamisala**

Käesolevas peatükis sätestatud nõudeid kohaldatakse sõõda analüüsimisel mittedioksiinitaoliste PCBde sisalduse ametlikuks kontrolliks, samuti seoses proovide ettevalmistamise ja analüüsimisega muul regulatiivsel eesmärgil, sealhulgas kontrollide puhul, mida sõõdakäitlejad teevad määruse (EÜ) nr 183/2005 sätetele vastavuse tagamiseks.

2. **Kasutatavad tuvastamismeetodid**

Gaasikromatograafia koos elektronhaarde detekteerimisega (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS või samaväärsed meetodid.

3. **Uuritavate analüütide määramine ja kinnitamine**

- 3.1. Suhteline retentsiooniaeg vastavalt sisestandarditele või võrdlusstandarditele (lubatud hälve $\pm 0,25\%$).

- 3.2. Mittedioksiinitaoliste PCBde gaasikromatograafiline lahutamine segavatest ainetest, eelkõige nendega koos elueeruvatest PCBdest, eriti juhul, kui sisaldus proovis on ligikaudselt võrreldav kehtiva piirnormiga, ning on vaja kinnitada nõuetele mittevastavust ⁽¹³⁾.

- 3.3. Nõuded GC-MSi meetoditele

Vähemalt järgmise arvu molekulaarioonide või asjaomasesse molekuliühikut kuuluvate iseloomulike ioonide jälgimine:

a) HRMSi puhul kaks spetsiifilist iooni;

b) LRMSi puhul kolm spetsiifilist iooni;

⁽¹³⁾ Sageli koos elueeruvad analoogid on nt PCB 28/31, PCB 52/69 ja PCB 138/163/164. GC-MSi puhul tuleb arvestada ka suuremal määral klooritud analoogide fragmentide võimalikku segavat mõju.

▼ **M9**

- c) MS-MSi puhul kaks spetsiifilist eellasiooni, millest kummalgi on üks neil vastav üleminekul tekkinud spetsiifiline järglasioon.

Valitud massiga fragmentide isotoopsuhte suurimad lubatud hälbed:

valitud massiga fragmentide isotoopsuhte suhteline hälve teoreetilisest isotoopide kogusest või uuritava iooni (kõige levinum jälgitav ioon) ja iseloomuliku iooni (iseloomulike ionide) kalibreerimisstandardist: $\pm 15\%$.

3.4. Nõuded GC-ECD meetoditele

Piirnormi ületavaid tulemusi tuleb kinnitada kahe GC-kolonniga, millel on eri polaarsusega statsionaarne faas.

4. Meetodi tulemuslikkuse tõendamine

Meetodi tulemuslikkus valideeritakse piirnormile vastava sisalduse vahemikus (0,5- kuni 2-kordsele piirnormile vastava sisaldusega); tõendatakse, et korduvanalüüsi variatsioonikordaja on vastuvõetav (vt vahe- täpsuse nõuded, punkt 9).

5. Määramispiir

Mittedioksiinitaalsete PCBde määramispiiride summa ⁽¹⁴⁾ ei tohi ületada ühte kolmandikku piirnormi väärtusest ⁽¹⁵⁾.

6. Kvaliteedikontroll

Korrapärane tühiproovide, rikastatud proovide ja kvaliteedikontrolli proovide analüüsimine, osalemine asjaomaste maatriksitega tehtavates laboritevahelistes uuringutes.

7. Saagiste kontroll

- 7.1. Kasutatakse sobivaid sisestandardeid, mille füüsikalise-keemilised omadused on võrreldavad uuritavate analüütide omadega.

- 7.2. Sisestandardite lisamine:

lisamine toodetele (enne ekstraheerimist ja puhastamist).

- 7.3. Nõuded meetoditele, mille puhul kasutatakse kõiki kuut isotoopmärgistatud mittedioksiinitaalset PCB analoogi:

- a) tulemustesse viiakse sisse sisestandardite saagiseid arvestav parand;
- b) isotoopmärgistatud sisestandardi saagis peab olema 60–120 %;
- c) individuaalsetel analoogidel, mille osatähtsus mittedioksiinitaalsete PCBde summas on alla 10 %, võivad olla väiksemad või suuremad saagised.

- 7.4. Nõuded meetoditele, mille puhul ei kasutata kõiki kuut isotoopmärgistatud sisestandardit või kasutatakse muid sisestandardeid:

- a) kontrollitakse iga proovi sisestandardi(te) saagist;
- b) sisestandardi(te) saagis peab olema 60–120 %;
- c) tulemustesse viiakse sisse sisestandardite saagiseid arvestav parand.

⁽¹⁴⁾ Vajaduse korral järgitakse dokumendis „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ (Juhend avastamispiiri ja määramispiiri hinnangulise väärtuse määramiseks söödas ja toidus esinevate saasteainete mõõtmisel) (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>) kirjeldatud põhimõtteid.

⁽¹⁵⁾ On väga soovitatav, et reaktiiviga tühiproovi tulemus oleks väike võrreldes proovis leiduva saasteaine sisaldusega. Labor on kohustatud kontrollima tühiproovi tulemuste varieeruvust, eriti siis, kui tühiproovi tulemus tuleb lahutada.

▼ **M9**

- 7.5. Märgistamata analoogide saagiseid kontrollitakse rikastatud proovide või kvaliteedikontrolli proovidega, milles uuritava aine kontsentratsioon on piinormi lähedane. Selliste analoogide aktsepteeritavad saagised on 60–120 %.

8. **Nõuded laboritele**

Vastavalt määrusele (EL) 2017/625 peavad laborid olema ISO/IEC juhendi 58 kohaselt tegutseva tunnustatud asutuse poolt akrediteeritud, millega tagatakse, et laborid kohaldavad analüüsimisel kvaliteeditagamisüsteemi. Laborid tuleb akrediteerida standardi EN ISO/IEC 17025 kohaselt. Peale selle järgitakse põhimõtteid, mida on kirjeldatud tehnilistes suunistes, milles käsitletakse mõõtemääramatuse ja määramispiiride hinnangulise väärtuse määramist PCBde analüüsimisel ⁽¹⁶⁾.

9. **Tulemuslikkuse näitajad: piinormile vastava mittedioksiinitaaliste PCBde summaarse sisalduse suhtes kohaldatavad kriteeriumid**

	Isotooplahjendusega massispektrometria (*)	Muud meetodid
Tõesus	–20 kuni +20 %	–30 kuni +30 %
Vahetäpsus (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Ülemise ja alumise tõkke erinevus	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Nõutav on kõigi kuue ¹³C-ga märgistatud analoogi kasutamine sisestandardina.

10. **Tulemuste esitamine**

- 10.1. Selleks et katseprotokoll sisaldaks võimalikult palju andmeid ja võimaldaks tulemuste tõlgendamist konkreetsetest nõuetest lähtuvalt, peavad analüüsitulemused hõlmama iga üksiku mittedioksiinitaalise PCB sisaldust ja nende PCB analoogide summaarset sisaldust ning olema esitatud alumise ja ülemise tõkke ning vaheväärtusena.
- 10.2. Protokollis esitatakse PCBde ekstraheerimiseks kasutatud meetod.
- 10.3. Üksikute sisestandardite saagised tuleb esitada juhul, kui need jäävad väljapoole punktis 7 nimetatud vahemikku, kui on ületatud piinorm või muudel juhtudel, kui nõutakse teatamist.
- 10.4. Kuna proovi nõuetekohasuse hindamisel tuleb arvestada mõõtmise laiendmääramatust, esitatakse ka see näitaja. Analüüsitulemused tuleb seega esitada kujul $x \pm U$, kus x on analüüsitulemus ja U on mõõtmise laiendmääramatus, kusjuures arvutamisel kasutatakse kattetegurit 2, mis annab usaldusnivoo ligikaudu 95 %.
- 10.5. Tulemused tuleb esitada samades ühikutes ja vähemalt sama tüvenumbrite arvuga, nagu on direktiiviga 2002/32/EÜ sätestatud piinormid.

B. EN STANDARDID

Määruse (EL) 2017/625 artikli 34 lõike 2 punkti a kohaldamisel on asjakohased järgmised EN standardid:

⁽¹⁶⁾ Vt joonealune märkus 9.

▼ **M9**

EN 17194 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Desoksünivalenooli, aflatoksiin B1, fumonisiin B1 ja B2, toksiinide T-2 ja HT-2, zearalenooni ja ohratoksiin A määramine söödamaterjalis ja segasöödas LC-MS/MS abil

EN 17270 „Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Teobromiini määramine söödamaterjalis ja segasöödas, sh kakaost saadud koostisainetes, vedelik-kromatograafia abil

EN 17504 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Gossüpoli määramine puuvillaseemnetes ja loomasöödas LC-MS/MS abil

EN 17362 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Pentaklorofenooli (PCP) määramine söödamaterjalis ja segasöödas LCMS/MS abil

EN 16279 Loomasööt – Fluoriidisalduse määramine pärast soolhappega töötlemistioonitundliku elektroodi meetodi (ISE) abil

EN 17053 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Mikroelementide, raskmetallide ja muude elementide määramine söödas ICP-MS abil (erinevad meetodid)

EN 15550 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Kaadmiumi ja plii määramine grafiitahi-aatomiabsorptsioonspektromeetria (GF-AAS) abil pärast rõhu all lagundamist

EN 16206 Loomasööt – Arseeni määramine hüdroiidide tekitamisega aatomiabsorptsioonspektromeetria (HGAAS) abil pärast rõhu all mikrolainete toimel lagundamist (lagundamine 65 % lämmastikhappe ja 30 % vesinikperoksiidiga)

EN 16277 Loomasööt – Elavhõbeda määramine külmauru aatomiabsorptsioonspektromeetria (CVAAS) abil pärast rõhu all mikrolainete toimel lagundamist (lagundamine 65 % lämmastikhappe ja 30 % vesinikperoksiidiga)

EN 16278 Loomasööt – Anorgaanilise arseeni määramine hüdroiidide tekitamisega aatomiabsorptsioonspektromeetria (HG-AAS) abil mikrolainete toimel ekstraheerimist ja tahkefaasilise ekstraktsiooni (SPE) abil eraldamist

EN 17374 Loomasööt: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Anorgaanilise arseeni määramine loomasöödas anioonivahetusega HPLC-ICP-MS abil

▼ **M2**

VI LISA

ANALÜÜSIMETODID LOOMSE PÄRITOLUGA OSAKESTE MÄÄRAMISEKS SÖÖDA AMETLIKUL KONTROLLIMISEL▼ **M8**

1. EESMÄRK JA RAKENDUSALA

Loomse päritoluga koostisosad söödas määratakse valgusmikroskoopia või polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil vastavalt käesolevas lisas esitatud sätetele.

Nende kahe meetodi abil on võimalik tuvastada loomse päritoluga koostisosade sisaldumist eelsegudes, söödamaterjalides ja segasöödas. Nende meetodite abil ei ole siiski võimalik arvutada selliste koostisosade hulka eelsegudes, söödamaterjalides või segasöödas. Mõlema meetodi avastamispiir on alla 0,1 massiprotsendi.

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodi abil on võimalik tuvastada, millisesse taksonoomilisse rühma kuuluvad eelsegudes, söödamaterjalides ja segasöödas esinevad loomse päritoluga koostisosad.

Neid meetodeid kasutatakse Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EÜ) nr 999/2001 ⁽¹⁾ artikli 7 lõikes 1 ja IV lisas ning Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EÜ) nr 1069/2009 ⁽²⁾ artikli 11 lõikes 1 sätestatud keeldude kohaldamise kontrollimiseks.

Olenevalt kontrollitava sööda liigist võib neid meetodeid kasutada ühe katse-eeskirja raames kas eraldi või koos vastavalt ELi referentlabori kehtestatud ja labori veebisaidil ⁽³⁾ avaldatud standardsele töökorrale söödas leiduvate loomsete valkude määramiseks (EURL-AP).

▼ **M2**

2. MEETODID

▼ **M8**2.1. **Valgusmikroskoopia**2.1.1. *Põhimõte*

Loomse päritoluga koostisosad, mis võivad esineda analüüsimeetoditeks saadetud eelsegudes, söödamaterjalides ja segasöödas, tehakse kindlaks tüüpiliste mikroskoobiga nähtavate tunnuste alusel (nt lihaskiud ja muud lihaosakesed, kõhr, luu- või sarveosakesed, karvad, harjased, selgrootute kutiikulaosakesed, putukate trahheosakesed, veresaadused, piima gloobulid, laktoosikristallid, suled, munakoored, kalaluud, soomused).

⁽¹⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. mai 2001. aasta määrus (EÜ) nr 999/2001, millega sätestatakse teatavate transmissiivsete spongioossete entsefalopaatiate vältimise, kontrolli ja likvideerimise eeskirjad (EÜT L 147, 31.5.2001, lk 1).

⁽²⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu 21. oktoobri 2009. aasta määrus (EÜ) nr 1069/2009, milles sätestatakse muuks otstarbeks kui inimeste tarbeks loomsete kõrvalsaaduste ja nendest saadud toodete tervise-eeskirjad ning tunnistatakse kehtetuks määrus (EÜ) nr 1774/2002 (loomsete kõrvalsaaduste määrus) (ELT L 300, 14.11.2009, lk 1).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

▼ **M8**

Pärast proovide ettevalmistamist setitamise teel tehakse mikroskoopilised uuringud.

Proovid tuleb setitada järgmiselt:

- a) niisuguste loomse päritoluga koostisosade tuvastamiseks, mis ei ole pärit maismaaselgrootutest, kasutatakse tetrakloroetüleeniga ühekordse setitamise etappi, mille täpsem kirjeldus on punktis 2.1.3.4.3;
- b) maismaaselgrootutest pärit koostisosade tuvastamiseks kasutatakse petrooleetri ja tetrakloroetüleeniga kahekordse setitamise etappi, mille täpsem kirjeldus on punktis 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Reaktiivid ja seadmed*

2.1.2.1. Reaktiivid

2.1.2.1.1. Kontsentreeriv aine

- Tetrakloroetüleen (suhteline tihedus 1,62)
- Petrooleeter keemispunktiga 40–60 °C (suhteline tihedus 0,65).

2.1.2.1.2. Värvimisreaktiiv

- Alisariinpunase lahus (lahjendada 2,5 ml 1 M soolhapet 100 ml vees ja lisada saadud lahusele 200 mg alisariinpunast).

2.1.2.1.3. Kinnitid

- Leelis (NaOH 2,5 % (w/v) või KOH 2,5 % (w/v)).
- Glütserool (lahjendamata, viskoossus: 1 490 cP) või kinniti, millel on võrdväärsed omadused mittepüsiva vaatluspreparaadi valmistamiseks.
- Norland ® Optical Adhesive 65 (viskoossus: 1 200 cP) või vaik, millel on nimetatud vahendiga võrdväärsed omadused objektklaasil püsipreparaadi valmistamiseks.

2.1.2.1.4. Värvivate omadustega kinnitid

- Lugoli lahus (lahustada 2 g kaaliumjodiidi 100 ml vees ja lisada pidevalt loksutades 1 g joodi).
- Tsüstiini määramise reaktiiv (2 g pliiatsetaati, 10 g NaOH 100 ml vees).
- Fehlingi reaktiiv (valmistatakse enne kasutamist põhilahuste A ja B võrdsetest kogustest (1/1). Lahus A: lahustada 6,9 g vask (II)sulfaatpentahüdraati 100 ml vees. Lahus B: lahustada 34,6 g kaaliumnaatriumtartraattetraahüdraati ja 12 g NaOH 100 ml vees).
- Tetrametüülbensidiin/vesinikperoksiid (lahustada 1 g 3,3',5,5'-tetrametüülbensidiini (TMB) 100 ml jää-äädikhappes ja 150 ml vees. Enne kasutamist segada 4 osa saadud TMB lahust 1 osa 3 % vesinikperoksiidiga).

2.1.2.1.5. Loputusained

- Etanool ≥ 96 % (tehniline).
- Atsetoon (tehniline).

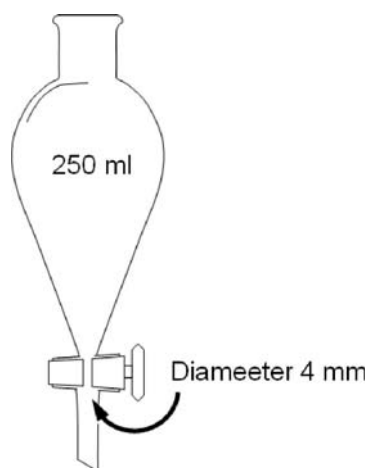
2.1.2.1.6. Pleegitav reaktiiv

- Kaubanduslik naatriumhüpokloriti lahus (9–14 % aktiivkloori).

▼ **M8**

2.1.2.2. Seadmed

- Analüütiline kaal täpsusega 0,001 g.
- Jahvatusseade: löiketeradega või rootorveski. Kui kasutatakse rootorveskit, ei tohi kasutada sõelasid, mille võrguava on $\leq 0,5$ mm.
- 0,25 mm ja 1 mm ruudukujuliste võrguavadega sõelad. Materjalikao vältimiseks ei tohi sõelade diameeter ületada 10 cm, välja arvatud proovi eelsõelumisel. Sõelade kaliibrimine ei ole nõutav.
- 250 ml kooniline klaasist jaotuslehter, mille koonuse põhjas on teflonist või lihvklaasist korkkraan. Korkkraani ava läbimõõt peab olema ≥ 4 mm. Alternatiivina võib üksnes ühekordse tetrakloroetüleeniga setitamise korral kasutada koonilise põhjaga selitusklaasi, kui labor on tõestanud, et avastamiskiir on sama kui koonilise klaasist jaotuslehtri kasutamise puhul.

*Jaotuslehter*

- Vähemalt 6,5–40-kordse suurendusvahemikuga stereomikroskoop.
- Vähemalt 100–400-kordse suurendusvahemikuga kombineeritud mikroskoop, mida saab kasutada vaatluseks läbiva valgusega heledal taustal. Lisaks võib kasutada polariseeritud valgust ja lahutatud interferentskontrasti.
- Tavalised klaasist laborinõud.
- Vaatluspreparaadi valmistamise vahendid: tavalised mikroskoobi objektiklaasid, süvendiga objektiklaasid, katteklaid (20 × 20 mm), pintsetid, õhuke spaatel.
- Laboriahi.
- Tsentrifuug.
- Filterpaber: kvalitatiivseks analüüsiks sobiv tselluloosfilter (poori suurus 4–11 µm).

2.1.3. Proovi võtmine ja ettevalmistamine

2.1.3.1. Proovi võtmine

Määramiseks kasutatakse I lisa kohaselt võetud representatiivset proovi.

▼ **M8**

2.1.3.1.1. Proovide kuivatamine

Proovid niiskusesisaldusega $> 14\%$ kuivatatakse enne käitlemist kooskõlas III lisaga.

2.1.3.1.2. Proovide eelsõelumine

Selleks et koguda teavet sööda võimaliku keskkonnatekkelise saastumise kohta, on soovitatav granuleeritud söötasid ja seemneid läbi 1 mm ava eelsõeluda ja seejärel kaks saadud fraktsiooni, mida tuleb käsitada eraldiseisvate proovidena, ette valmistada, analüüsida ja nende kohta aruanne koostada.

2.1.3.2. Ettevaatusabinõud

Laboratoorse ristsaastumise vältimiseks tuleb kõik taaskasutatavad seadmed enne kasutamist hoolikalt puhastada. Jaotuslehtri osad tuleb enne puhastamist lahti võtta. Jaotuslehtri osad ja klaasnõud pestakse kõigepealt käsitsi ja seejärel pesumasinas. Sõelu tuleb puhastada jäikade harjastega sünteetilise harjaga. Pärast rasvaste materjalide, näiteks kalajahu sõelumist on soovitatav sõelu puhastada atsetooni ja suruõhuga.

2.1.3.3. Rasvast ja õlist koosnevate proovide ettevalmistamine

Rasvast koosnevate proovide ettevalmistamiseks kasutatakse järgmist eeskirja:

- kui rasv on tahke, soojendatakse seda ahjus kuni vedeldumiseni;
- pipeti abil viiakse 40 ml rasva proovi põhjast tsentrifuugitopsi;
- proovi tsentrifuugitakse 10 minuti jooksul kiirusel 4 000 pööret minutis;
- kui rasv on pärast tsentrifuugimist tahke, soojendatakse seda ahjus kuni vedeldumiseni;
- tsentrifuugimist korratakse 5 minuti jooksul kiirusel 4 000 pööret minutis;
- väikese lusika või spaatli abil viiakse pool dekanteeritud lisanditest uurimiseks mikroskoobi objektiklaasile. Kinnitina on soovitatav kasutada glütserooli;
- ülejäänud lisandeid kasutatakse sademe ettevalmistamiseks vastavalt punkti 2.1.3.4.3 esimesele taandele.

Sama eeskirja, välja arvatud selle esimest ja neljandat taanet, kasutatakse õlist koosnevate proovide ettevalmistamiseks.

2.1.3.4. Muude kui rasva- ja õliproovide ettevalmistamine

2.1.3.4.1. Osaproovide võtmine ja peenestamine: vähemalt 50 g proovist võetakse analüüsimiseks ja peenestatakse.

2.1.3.4.2. Lähtematerjali ettevalmistamine: valmistatakse ette vähemalt 5 g suurune jahvatatud osaproov. See sõelutakse 0,25 mm avaga sõelaga ja uuritakse kahte saadud fraktsiooni.

▼M8

- 2.1.3.4.3. Ühekordne tetrakloroetüleeniga setitamine niisuguste loomse päritoluga koostisosade tuvastamiseks, mis ei ole pärit maismaasel-grootutest.

— Sademe ekstraheerimine ja ettevalmistamine

10 g (täpsusega 0,01 g) suurune kogus jahvatatud osaproovist pannakse jaotuslehtrisse või koonilise põhjaga selitusklaasi ja lisatakse 50 ml tetrakloroetüleeni. Lehtrisse viidav kogus on maksimaalselt 3 g, kui tegemist on kalajahu või muu puhtalt loomse saaduse, mineraalse komponendi või eelseguga, mis tekitab rohkem kui 10 % sadet. Segu loksutatakse tugevasti vähemalt 30 sekundit ja seejärel lisatakse ettevaatlikult veel 50 ml tetrakloroetüleeni, loputades sellega lehtri sisepinda, et eemaldada kõik sellele jäänud osakesed. Saadud segul lastakse seista vähemalt 5 minutit, enne kui sade eraldatakse korkkraani avamisega.

Koonilise põhjaga selitusklaasi kasutamisel segatakse segu tugevasti vähemalt 15 sekundit ja pestakse klaasi sisepinnalt vähemalt 10 ml tetrakloroetüleeniga hoolikalt maha kõik kinni jäänud osakesed. Segul lastakse 3 minutit seista ja segatakse uuesti 15 sekundit ning pestakse klaasi sisepinnalt vähemalt 10 ml puhta tetrakloroetüleeniga hoolikalt maha kõik kinni jäänud osakesed. Saadud segul lastakse seista vähemalt 5 minutit ning seejärel vedel osa eemaldatakse ja dekanteeritakse hoolikalt, jälgides, et sade jääks täielikult alles.

Sade kogutakse lehtrisse asetatud filterpaberile, et võimaldada ülejäänud tetrakloroetüleeni eraldamist, vältides samal ajal sademes rasva kogunemist. Sade kuivatatakse. Seejärel on soovitatav sade kaaluda (täpsusega 0,001 g), et sadestamistappi kontrollida. Lõpuks sõelutakse sade 0,25 mm avaga sõelaga ja uuritakse kahte saadud fraktsiooni, välja arvatud juhul, kui sõelumist ei peeta vajalikuks.

— Heljumi ekstraheerimine ja ettevalmistamine

Pärast sademe eraldamist eespool kirjeldatud meetodi abil peab jaotuslehtrisse jääma kaks faasi: vedel faas, mis koosneb tetrakloroetüleenist, ja pinnal ulpiva materjali tahke faas. Tahke faas on heljum ja selle eraldamiseks lastakse tetrakloroetüleen lehtrist täielikult välja korkkraani avamisega. Jaotuslehter pööratakse ümber, heljum valatakse suure Petri tassi ning kuivatatakse õhu käes tõmbe all. See sõelutakse 0,25 mm avaga sõelaga ja uuritakse kahte saadud fraktsiooni.

— Värvimisreaktiivide kasutamine

Selleks et hõlbustada loomset päritolu koostisosade nõuetekohast kindlakstegemist, võib katse tegija kasutada proovide ettevalmistamisel värvimisreaktiive kooskõlas EURL-AP koostatud juhistega, mis on avaldatud labori veebisaidil.

▼M8

Kui sademe värvimiseks kasutatakse alisariinpunase lahust, kasutatakse järgmist eeskirja:

- kuivatatud sade pannakse katseklaasi ja loputatakse kaks korda umbes 5 ml etanooliga (iga kord kasutatakse pöörise-gajat 30 sekundit, lahustil lastakse umbes üks minut ja 30 sekundit selgida ja valatakse ära);
- sade pleegitatakse vähemalt 1 ml naatriumhüpokloriti lahuse lisamisega. Reaktsioonil lastakse kesta 10 minutit. Katseklaas täidetakse veega, sademel lastakse 2–3 minutit settida ning vesi ja suspendeerunud osakesed valatakse ettevaatlikult ära;
- sadet loputatakse veel kaks korda umbes 10 ml veega (kummalgi korral kasutatakse pöörise-gajat 30 sekundit, lastakse settida ja vesi valatakse ära);
- lisatakse 2–10 tilka alisariinpunase lahust ja segu segatakse pöörise-gajaga. Reaktsioonil lastakse kesta 30 sekundit ja värvitud sadet loputatakse kaks korda umbes 5 ml etanoo-liga ja seejärel üks kord atsetooniga (iga kord kasutatakse pöörise-gajat 30 sekundit, lahustil lastakse umbes 1 minut selgida ja valatakse ära);
- värvitud sade kuivatatakse.

2.1.3.4.4. Kahekordne petrooleetri ja tetrakloroetüleeniga setitamine mais-maaselgrootutest pärit loomse päritoluga koostisosade tuvastami-seks.

Kõik etapid viiakse läbi 250 ml koonilises klaasist jaotuslehtris, nagu kirjeldatud punkti 2.1.2.2 neljandas taandes.

- Jahvatatud osaproovist viiakse 10 g (täpsusega 0,01 g) suurune kogus jaotuslehtrisse ja viiakse kõigepealt läbi punktis 2.1.3.4.3 kirjeldatud ühekordne tetrakloroetüleeniga setitamine, sealhulgas sademe eraldamine lehtrisse asetatud filterpaberi abil. Seda sadet võib kasutada nagu punkti 2.1.3.4.3 kohaselt saadud sadet.
- Koos sademega eraldunud väike kogus tetrakloroetüleeni viiakse mõõtsilindrisse. Jaotuslehtri korkkraan avatakse ja mõõtsilindrit täidetakse, kuni selles on 30 ml tetrakloroetü-leeni. Kui see maht on saavutatud, suletakse korkkraan.
- Kogutud tetrakloroetüleen asendatakse, lisades jaotuslehtrisse 30 ml petrooleetrit keemispunktiga 40–60 °C. Jaotuslehtri sisu segatakse põhjalikult, et saada segu, milles on 30 % petroolee-trit ja 70 % tetrakloroetüleeni (segu tihedus on ligikaudu 1,26 g·cm⁻³). Materjalil lastakse 10 minutit settida. Eraldub kaks uut fraktsiooni: teine sade ja lõplik heljum (< 1,26 g·cm⁻³). Teine sade eemaldatakse ja viiakse Petri tassi (või eemaldatakse lehtrisse asetatud filterpaberi abil), avades korkkraani seniks, kuni jaotuslehtrisse jääb ainult pisut lahustisegu ja lõplik heljum. Lehtrisse jäänud vedelik ja lõplik heljum kogutakse eraldi lehtrisse asetatud filterpaberi abil. Jaotuslehtri seinad loputatakse petrooleetriga, et lõplik heljum täielikult kokku koguda. Lõplikul heljumil lastakse kuivada. Lõpuks sõelutakse lõplik heljum 0,25 mm avaga sõelaga ja uuritakse kahte saadud fraktsiooni maismaaselgroo-tutest saadud koostisosade suhtes, välja arvatud juhul, kui sõelumist ei peeta vajalikuks.

▼ **M8**2.1.4. *Mikroskoopiline uurimine*

2.1.4.1. Vaatluspreparaadi valmistamine

Vaatluspreparaadid valmistatakse sademest ja katse tegija valikul kas heljumist või lähteainest. Vajaduse korral valmistatakse vaatluspreparaadid ka punktis 2.1.3.4.4 kirjeldatud viisil saadud lõplikust heljumist, kuid seda üksnes maismaaselgrootutest saadud koostisosade tuvastamiseks. Preparaadid valmistatakse kahest saadud fraktsioonist (peen ja jäme fraktsioon). Objektklaasidele õhukeselt kantud fraktsioonide preparaadid peavad olema terve fraktsiooni suhtes esindavad.

On vaja valmistada piisav arv vaatluspreparaate, et tagada punktis 2.1.4.2 esitatud uurimiseeskirja teostamine täies ulatuses.

Vaatluspreparaadid peavad olema kinnitatud nõuetekohaste kinnitite abil vastavalt EURL-AP standardsele töökorrale, mis on avaldatud labori veebisaidil. Vaatluspreparaadid peavad olema kaetud katteklaasidega.

2.1.4.2. Vaatluse voodiagramm loomse päritoluga osakeste tuvastamiseks segasöödas, söödamaterjalis ja eelsegudes

Mikroskoobiga vaatlemiseks valmistatud preparaate vaadeldakse vastavalt joonistel 1 ja 2 esitatud vaatluse voodiagrammidele.

Sademe mikroskoobiga vaatlemiseks kasutatakse kombineeritud mikroskoopi ja olenevalt katse tegija valikust uuritakse kas heljumit või lähtematerjali. Peale selle võib maismaaselgrootutest saadud koostisosade tuvastamiseks diagrammi 3 kohaseid vaatlusi teha ka punktis 2.1.3.4.4 kirjeldatud viisil saadud lõpliku heljumiga. Jämedama fraktsiooni uurimiseks võib peale kombineeritud mikroskoobi kasutada ka stereomikroskoopi. Kõiki vaatluspreparaate uuritakse põhjalikult, kasutades erinevaid suurendusi. Täpsed selgitused voodiagrammide kasutamise kohta esitatakse standardses töökorras, mille on koostanud ja oma veebisaidil avaldanud loomasöödas sisalduvate loomsete valkude liidu referentlabor.

Vaatluse voodiagrammi igas etapis vaadeldavate vaatluspreparaatide miinimumarvust tuleb rangelt kinni pidada, välja arvatud juhul, kui kogu fraktsiooni materjalist ei ole võimalik saada nõutavat arvu vaatluspreparaate, näiteks juhul, kui sadet ei saadud. Osakeste arvu registreerimiseks vaadeldakse ühe määramise käigus kuni kuut vaatluspreparaati.

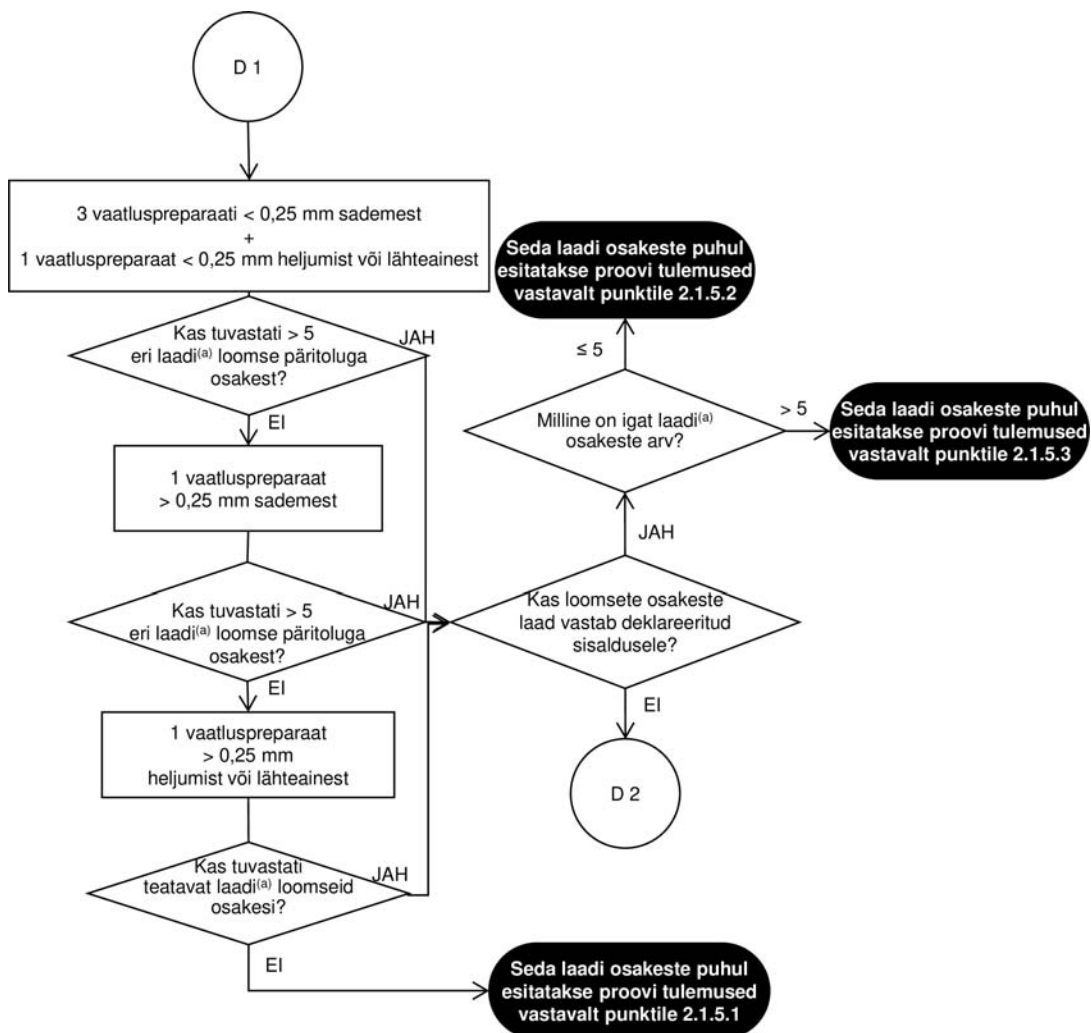
Kui heljumist või lähtematerjalist valmistatakse täiendavad vaatluspreparaadid, kasutades spetsiifilisemat punktis 2.1.2.1.4 nimetatud värvivate omadustega kinnitit, et täpsemalt iseloomustada struktuure (nt suled, karvad, lihaskiud või vereosakesed), mis on avastatud muude punktis 2.1.2.1.3 nimetatud kinnitite abil valmistatud vaatluspreparaatides, loendatakse osakesed, võttes ühe määramise käigus arvesse kuni kuut vaatluspreparaati, mille hulgas on spetsiifilisema kinnitiga täiendavad vaatluspreparaadid. Punktis 2.1.3.4.4 kirjeldatud viisil saadud lõplikust heljumist valmistatud täiendavaid vaatluspreparaate, mida kasutatakse maismaaselgrootutest saadud koostisosade tuvastamiseks, ei kasutata muud laadi osakeste (mis on pärit selgroogsetest maismaaloomadest ja kaladelt) kindlakstegemiseks.

Katse tegija võib osakeste laadi ja päritolu kindlakstegemise hõlbustamiseks kasutada abivahendeid, näiteks otsustamise tugisüsteeme, fotoarhiive ja etalonproove.

▼ **M8**

Joonis 1

Vaatluse voodiagramm tetrakloroetüleeniga ühekordse setitamise järgseks muude kui maismaaselgrootutest pärit loomsete osakeste tuvastamiseks segasöödas, söödamaterjalis ja eelsegudes esimesel määramisel

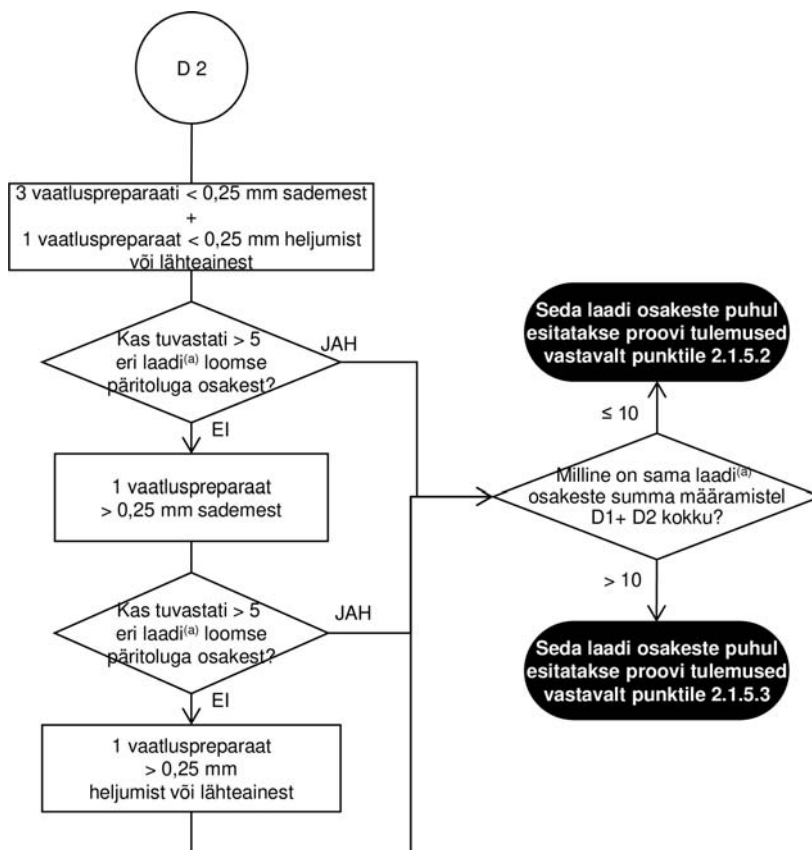


(D1 ja D2 viitavad esimesele ja teisele määramisele; ^(a): selgroogsed maismaaloomad, kalad)

▼ **M8**

Joonis 2

Vaatluse voodiagramm tetrakloroetüleeniga ühekordse setitamise järgseks muude kui maismaaselgrootutest pärit loomsete osakeste tuvastamiseks segasöödas, söödamaterjalis ja eelsegudes teisel määramisel

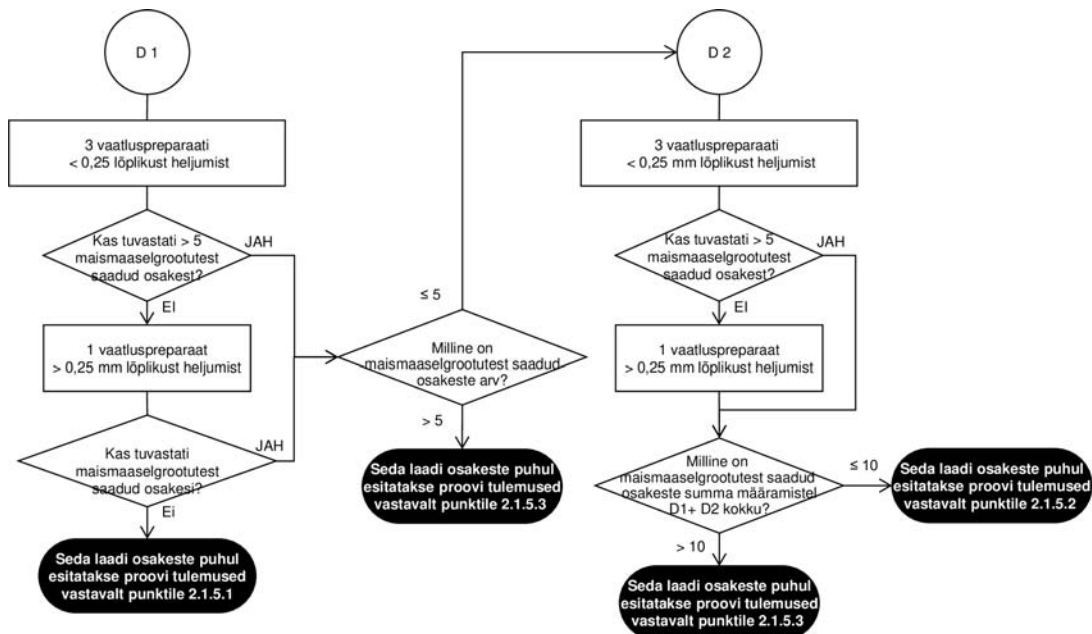


(D1 ja D2 viitavad esimesele ja teisele määramisele; ^(a): selgroogsed maismaaloomad, kalad)

▼M8

Joonis 3

Vaatluse voodiagramm petrooleetri ja tetrakloroetüleeniga kahekordse settimise järgseks maismaaselgrootutest saadud koostisosade tuvastamiseks segasöödas, söödamaterjalis ja eelsegudes



(D1 ja D2 viitavad esimesele ja teisele määramisele)

2.1.4.3. Määramiste arv

Määramised tehakse eri osaproovidega, millest igaüks kaalub 50 g.

Kui joonisel 1 või joonisel 3 esitatud vaatluse voodiagrammi kohaselt tehtud esimese määramise tulemusena ei tuvastata loomse päritoluga osakesi, ei ole täiendav määramine vajalik ning analüüsi tulemus esitatakse, kasutades punkti 2.1.5.1 sõnastust.

Kui joonisel 1 esitatud vaatluse voodiagrammi kohaselt tehtud esimese määramise tulemusena tuvastatakse üks või mitu teatavat laadi loomse päritoluga osakest (st selgroogsetelt maismaaloomadelt või kaladelt pärit osakesed) ning leitud osakeste laad vastab proovi kohta deklareeritud sisaldusele, ei ole teistkordset määramist vaja. Kui teatavat laadi loomse päritoluga osakeste arv on esimesel määramisel suurem kui 5, esitatakse analüüsi tulemus loomse osakese laadi kaupa, kasutades punkti 2.1.5.3 sõnastust. Muudel juhtudel esitatakse analüüsi tulemus, kasutades punkti 2.1.5.2 sõnastust.

Kui joonisel 3 esitatud vaatluse voodiagrammi kohaselt tehtud esimese määramise tulemusena ei tuvastata üle viie maismaaselgrootutelt pärit osakese, ei ole teine määramine vajalik ning analüüsi tulemus esitatakse, kasutades punkti 2.1.5.3 sõnastust seda laadi osakeste kohta.

▼ **M8**

Igal muul juhul, sealhulgas juhul, kui laborile ei ole deklareeritud sisaldust, tehakse uus määramine uue osaprooviga. Kui joonisel 2 või joonisel 3 esitatud vaatluse voodiagrammi kohaselt tehtud teise määramise tulemusena on kahe määramisega tuvastatud vastavat laadi loomse päritoluga osakeste summa suurem kui 10, esitatakse analüüsi tulemus, kasutades punkti 2.1.5.3 sõnastust. Muudel juhtudel esitatakse analüüsi tulemus, kasutades punkti 2.1.5.2 sõnastust.

2.1.5. *Tulemuste esitamine*

Tulemuste esitamisel teatab labor, millist tüüpi materjali analüüsiti (sade, heljum, lõplik heljum või lähteaine). Aruandes näidatakse selgelt, mitu määramist on tehtud ja kas vaatluspreparaatide valmistamisele eelnev fraktsioonide sõelumine vastavalt punkti 2.1.3.4.3 esimese taande kolmandale lõigule või punkti 2.1.3.4.4 kolmandale taandele on ära jäetud.

Labori aruanne peab sisaldama vähemalt teavet selgroogsetest maismaaloomadest ja kalast pärit osakeste leidumise kohta.

Erinevad tulemused esitatakse järgmiselt.

2.1.5.1. Ei tuvastatud ühtki kõnealust laadi loomse päritoluga osakest:

- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovis selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakesi.”
- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovis kalast saadud osakesi.”
- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud analüüsimiseks esitatud proovis maismaaselgrootutest saadud osakesi.”

2.1.5.2. Ühe määramise käigus tuvastatakse 1–5 teatavat laadi loomset osakest või kahe määramise käigus tuvastatakse 1–10 teatavat laadi osakest (tuvastatud osakeste arv on väiksem kui otsustuspiir, mille EURL-AP on standardses töökorras kehtestanud ning oma veebisaidil avaldanud):

kui on tehtud ainult üks määramine:

- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis rohkem kui viis selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv, muu (lisada asjakohane täpsustus)]. Nii väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”
- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis rohkem kui viis kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus, muu (lisada asjakohane täpsustus)]. Nii väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”

▼M8

Kui on teostatud kaks määramist:

- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv, muu (lisada asjakohane täpsustus)]. Nii väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”
- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus, muu (lisada asjakohane täpsustus)]. Nii väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”
- „Valgusmikroskoopia abil ei tuvastatud esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme maismaaselgrootutest saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kutiikulaosakesed, suised, lihaskiud, trahheeosakesed, muu (lisada asjakohane täpsustus)]. Nii väike sisaldus on allpool selle mikroskoopilise meetodi jaoks kehtestatud otsustuspiiri.”

Peale selle:

- proovi eelsõelumise puhul märgib labor, millises fraktsioonis (sõelutud fraktsioon, granuleeritud fraktsioon või seemned) on tuvastatud loomse päritoluga osakesi, kuna ainult sõelutud fraktsioonist tuvastatud loomse päritoluga osakesed võivad tähendada keskkonnatekkelist saastumist.
- Kui tuvastatakse ainult sellised loomsed osakesed, mida ei saa liigitada selgroogsetelt maismaaloomadelt ega kaladelt pärit osakesteks (nt lihaskiud), märgitakse aruandes, et tuvastati ainult sellised loomsed osakesed ja ei saa välistada, et need pärinevad selgroogsetelt maismaaloomadelt.

2.1.5.3. Ühe määramise käigus tuvastatakse rohkem kui viis teatavat laadi loomset osakest või kahe määramise käigus tuvastatakse rohkem kui kümme teatavat laadi osakest:

kui on tehtud ainult üks määramine:

- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis rohkem kui viis selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv, muu (lisada asjakohane täpsustus)].”
- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis rohkem kui viis kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus, muu (lisada asjakohane täpsustus)].”
- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis rohkem kui viis maismaaselgrootutest saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kutiikulaosakesed, suised, lihaskiud, trahheeosakesed, muu (lisada asjakohane täpsustus)].”

▼ M8

Kui on teostatud kaks määramist:

- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme selgroogsetest maismaaloomadest saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kondid, kõhr, lihaskiud, karv, sarv, muu (lisada asjakohane täpsustus)].”
- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme kalast saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kalaluu, kalasoomus, kõhr, lihaskiud, otoliit, lõpus, muu (lisada asjakohane täpsustus)].”
- „Valgusmikroskoopia abil tuvastati esitatud proovis kahe määramise käigus rohkem kui kümme maismaaselgrootutest saadud osakest. Osakesed määratleti kui ... [kutiikulaosakesed, suised, lihaskiud, trahheeosakesed, muu (lisada asjakohane täpsustus)].

Peale selle:

- proovi eelsõelumise puhul märgib labor, millises fraktsioonis (sõelutud fraktsioon, granuleeritud fraktsioon või seemned) on tuvastatud loomse päritoluga osakesi, kuna ainult sõelutud fraktsioonist tuvastatud loomse päritoluga osakesed võivad tähendada keskkonnatekkelist saastumist.
- Kui tuvastatakse ainult sellised loomsed osakesed, mida ei saa liigitada selgroogsetelt maismaaloomadelt ega kaladelt pärit osakesteks (nt lihaskiud), märgitakse aruandes, et tuvastati ainult sellised loomsed osakesed ja ei saa välistada, et need pärinevad selgroogsetelt maismaaloomadelt.

▼ M2

2.2. **Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)**

2.2.1. *Põhimõte*

Loomse päritoluga desoksüribonukleiinhappe (DNA) fragmendid, mis võivad esineda söödamaterjalides ja segajõusöödas, tuvastatakse polümeraasi ahelreaktsiooni abil geeni kordistamise meetodiga, mis on suunatud liigispetsiifilise DNA-järjestuse tuvastamisele.

PCR-meetodi puhul on kõigepealt nõutav DNA eraldamine. Selliselt saadud DNAGA tehakse geeni kordistamine, et tuvastada katsega kontrollitavaid loomaliike.

2.2.2. *Reaktiivid ja seadmed*

2.2.2.1. Reaktiivid

2.2.2.1.1. DNA eraldamise reaktiivid

Kasutatakse ainult EURL-AP labori poolt heaks kiidetud ja labori veebisaidil avaldatud reaktiive.

2.2.2.1.2. Geeni kordistamise reaktiivid

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Primerid ja sondid

Kasutatakse ainult EURL-AP poolt valideeritud oligonukleotiidide järjestusega primereid ja sonde ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Kasutatakse ainult neid Master Mix'i lahuseid, mis ei sisalda reak-tiive, mis loomse DNA juuresoleku tõttu võivad anda vale tule-muse ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Saastusest puhastamise reaktiivid

2.2.2.1.2.3.1. Soolhappe lahus (0,1N).

2.2.2.1.2.3.2. Pleegitav reaktiiv (0,15 % aktiivklooriga naatriumhüpokloriti lahus)

2.2.2.1.2.3.3. Kallite seadmete, nagu analüütiliste kaalude (näiteks MP Biome-dicals DNA EraseTM) saastusest puhastamiseks ettenähtud mitte-söövitavad reaktiivid

2.2.2.2. Seadmed

2.2.2.2.1. Analüütilised kaalud täpsusega 0,001 g

2.2.2.2.2. Jahvatusseadmed

2.2.2.2.3. Reaalajas PCR tegemist võimaldav termotsükler

2.2.2.2.4. Mikrotsentrifuug mikrotsentrifuugitopside jaoks

2.2.2.2.5. 1 µl – 1 000 µl pipeteerimist võimaldavad mikropipetid

2.2.2.2.6. Standardsed plastikust molekulaarbioloogia vahendid: mikrotsen-trifuugitopsid, mikropipettide filtriga plastikotsikud, termotsükleri plaadid.

2.2.2.2.7. Proovide ja reaktiivide hoidmiseks ettenähtud külmikud

2.2.3. *Proovi võtmine ja proovi ettevalmistamine*

2.2.3.1. Proovi võtmine

Määramiseks kasutatakse I lisa kohaselt võetud representatiivset proovi.

2.2.3.2. Proovi ettevalmistamine

Laboriproovide ettevalmistamine kuni DNA eraldamiseni teosta-takse vastavalt II lisas sätestatud nõuetele. Vähemalt 50 g proovist võetakse analüüsimiseks osaproovid ja peenestatakse.

Proovi ettevalmistamine teostatakse muudes ruumides kui DNA eraldamiseks ja geeni kordistamiseks ettenähtud ruumid vastavalt standardile ISO 24276.

Ette valmistatakse kaks proovi suurusega vähemalt 100 mg.

2.2.4. *DNA eraldamine*

Iga proovi DNA eraldatakse vastavalt ELi referentlabori EURL-AP kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökor-rale.

Iga eraldamise puhul tehakse kaks eraldamise kontrollkatset vasta-valt standardile ISO 24276:

— eraldamise tühikatse,

— DNA eraldamise positiivne kontrollkatse.

⁽¹⁾ Iga uuritava loomaliigi jaoks olemasolevate primerite ja sondide loeteluga saab tutvuda EURL-AP veebisaidil.

⁽²⁾ Vajalike Master Mix'i lahuste näited on esitatud EURL-AP veebisaidil.

▼ **M2**2.2.5. *Geeni kordistamine*

Geeni kordistamine teostatakse kõikide kontrollimist vajavate liikide jaoks valideeritud meetodite abil. Need meetodid on esitatud ELi referentlabori EURL-AP poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardses töökorras. Iga eraldatud DNA-proovi analüüsitakse vähemalt kahe erineva lahjendusega, et hinnata inhibeerimist.

Iga sihtliigi kohta tehakse kaks kordistamise kontrollkatset vastavalt standardis ISO 24276 kirjeldatud meetodile:

- igal plaadil või PCR-katsete seerias kasutatakse sihtliigi DNA positiivset kontrolli;
- igal plaadil või PCR-katsete seerias kasutatakse kordistusreaktiivi kontrolli (mida nimetatakse ka matriitsita kontrolliks).

2.2.6. *Tulemuste tõlgendamine ja esitamine*

Tulemuste esitamisel teatab labor vähemalt kasutatud proovide massi, kasutatud ekstraheerimismeetodi, teostatud määramiste arvu ja meetodi avastamiskiirust.

Tulemuse ei tõlgendata ega esitata, kui DNA eraldamise positiivne kontrollproov ja DNA positiivne sihtkontrollproov ei anna katsega kontrollitava sihtliigi puhul positiivseid tulemusi, samas kui kordistamisreaktiivi kontroll on negatiivne.

Kui kahe proovi tulemused ei ole kooskõlas, korratakse vähemalt geeni kordistamist. Kui labor kahtlustab, et nimetatud lahkuminek põhjuseks võib olla DNA eraldamine, tehakse enne tulemuste tõlgendamist uus DNA eraldamine ja seejärel geeni kordistamine.

Tulemuste lõplik väljendamine peab põhinema kahe proovi tulemuste ühendamisel ja tõlgendamisel vastavalt ELi referentlabori EURL-AP poolt kehtestatud ja labori veebisaidil avaldatud standardsele töökorrale.

2.2.6.1. Negatiivne tulemus

Negatiivne tulemus esitatakse järgmiselt:

Analüüsimiseks esitatud proovis ei tuvastatud Xst pärinevat DNAd (X on katsega kontrollitav loomaliik või liikide rühm).

2.2.6.2. Positiivne tulemus

Positiivne tulemus esitatakse järgmiselt:

Analüüsimiseks esitatud proovis tuvastati Xst pärinev DNA (X on katsega kontrollitav loomaliik või liikide rühm).

▼ **M9***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 järgmisele 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 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 liidu proovivõtu- ja analüüsimetoditele.

Kasutatakse järgmisi meetodeid:

— kogu rasvasisalduse määramiseks: III lisa G osas sätestatud meetod B toorõli- ja -rasvasisalduse määramiseks;

— tärglisesisalduse määramiseks: III lisa K osas sätestatud polarimeetriline meetod.

SÖÖDAMATERJALI NING KASSIDE JA KOORTE SEGASÖÖDA ENERGIAVÄÄRTUSE ARVUTAMISE MEETOD

Söödamaterjali ning kasside ja koorte segasööda energiaväärtust tuleb arvutada vastavalt standardile EN 16967 „Loomasööd: proovivõtu- ja analüüsimetodid – Prognostilised võrrandid ainevahetuses tekkiva energia arvutamiseks söödamaterjalis ning kasside ja koorte segasöödas (lemmikloomatoit), sh dieettoidus

▼ M9▼ B*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	—

▼B**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