

31998L0064

L 257/14

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

19.9.1998

KOMISJONI DIREKTIIV 98/64/EÜ,**3. september 1998,****millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid aminohapete, toorõli ja -rasva ja olakvindoksi määramiseks söödas ning muudetakse direktiivi 71/393/EMÜ****(EMPs kohaldatav tekst)**

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

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

ning arvestades, et:

direktiivis 70/373/EMÜ on ette nähtud, et söötade ametlik kontroll selle kindlakstegemiseks, kas need vastavad söötade kvaliteeti ja koostist reguleerivate õigusnormide nõuetele, tuleb läbi viia ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite abil;

nõukogu 2. aprilli 1979. aasta direktiivis 79/373/EMÜ (sega-sööda turustamise kohta, ⁽²⁾ viimati muudetud komisjoni direktiiviga 97/47/EÜ ⁽³⁾) ning nõukogu 13. septembri 1993. aasta direktiivis 93/74/EMÜ (eritoitmiseks ettenähtud söötade kohta, ⁽⁴⁾ viimati muudetud direktiiviga 96/25/EÜ ⁽⁵⁾) nähakse ette, et aminohapped ning toorõlid ja -rasvad tuleb märkida sööda etiketile;

nõukogu 23. novembri 1970. aasta direktiivis 70/524/EMÜ söödalisandite kohta, ⁽⁶⁾ viimati muudetud komisjoni direktiiviga 98/19/EÜ, ⁽⁷⁾ nähakse ette, et kui segasöödale on lisatud olakvindoksit, peab kõnealuse aine sisaldus olema märgitud etiketile;

komisjoni 18. novembri 1971. aasta teise direktiiviga 71/393/EMÜ, millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks, ⁽⁸⁾ viimati muudetud komisjoni direktiiviga 84/4/EMÜ, ⁽⁹⁾ sätestatakse analüüsimeetodid muu hulgas ka toorõlide ja -rasvade määramiseks; on asjakohane kõnealust meetodit muuta;

kõnealuste ainete kontrollimiseks tuleb kehtestada ühenduse analüüsimeetodid;

käesolevas direktiivis ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid sätestavad, et analüüsid aminohapete, toorõlide ja -rasvade ning olakvindoksi sisalduse ametlikuks kontrollimiseks söötades tehakse käesoleva direktiivi lisas ettenähtud meetodeid kasutades.

Artikkel 2

Komisjoni direktiivi 71/393/EMÜ lisa punkt "4. Toorõli ja -rasva määramine" asendatakse käesoleva direktiivi lisa B osaga.

Artikkel 3

1. Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid 31. detsembriks 1998. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Liikmesriigid kohaldavad sätestatud meetmeid alates 1. jaanuarist 1999.

Kui liikmesriigid need meetmed vastu võtavad, lisavad nad nendesse meetmetesse või nende ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Kõnealuse viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

⁽¹⁾ EÜT L 170, 3.8.1970, lk 2.

⁽²⁾ EÜT L 86, 6.4.1979, lk 30.

⁽³⁾ EÜT L 211, 5.8.1997, lk 45.

⁽⁴⁾ EÜT L 237, 22.9.1993, lk 23.

⁽⁵⁾ EÜT L 125, 23.5.1996, lk 35.

⁽⁶⁾ EÜT L 270, 14.12.1970, lk 1.

⁽⁷⁾ EÜT L 96, 28.3.1998, lk 39.

⁽⁸⁾ EÜT L 279, 20.12.1971, lk 7.

⁽⁹⁾ EÜT L 15, 18.1.1984, lk 28.

2. Liikmesriigid edastavad komisjonile käesoleva direktiiviga reguleeritavas valdkonnas nende poolt vastuvõetud põhiliste siseriiklike õigusnormide teksti.

Artikkel 5

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 3. september 1998

Artikkel 4

Käesolev direktiiv jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Franz FISCHLER

LISA

A OSA

AMINOHAPETE MÄÄRAMINE**1. Eesmärk ja rakendusala**

Käesolev meetod võimaldab aminohappeanalüsaatoriga määrata söödas vabu aminohappeid (sünteesilisi ja looduslikke) ning üldaminohappeid (peptiidsidemetega ja vabu). Seda saab kasutada järgmiste aminohapete puhul: tsüst(e)iin, metioniin, lüsiin, treoniin,alaniin, arginiin, asparagiinhape, glutamiinhape, glütsiin, histidiin, isoleutsiin, leutsiin, fenüülalaniin, proliin, seriin, türosiin ja valiin.

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

2. Põhimõte**2.1. Vabad aminohapped**

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

2.2. Üldaminohapped

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

Oksüdeerimine viiakse läbi persipelghappe ja fenooli seguga 0 °C juures. Ülemäärane oksüdatsioonireaktiiv lagundatakse naatriumdisulfitiga. Oksüdeeritud või oksüdeerimata proovi hüdrolüüsitakse soolhappega ($c = 6 \text{ mol/l}$) 23 tundi. Hüdrolüsaadi pH reguleeritakse 2,20-le. Aminohapped eraldatakseioonivahetuskromatograafia teel ning määratakse fotomeetrilise määramise teel reaktsioonis ninhüdriniga lainepikkusel 570 nm (440 nm proliini puhul).

3. Reaktiivid

Kasutada tuleb bidestillleeritud vett või samaväärse kvaliteediga vett (elektrijuhtivus $< 10 \mu\text{S}$).

- 3.1. Vesinikperoksiid, $w = 30 \%$.
- 3.2. Sipelghape, $w = 98\text{--}100 \%$.
- 3.3. Fenool.
- 3.4. Naatriumdisulfit.
- 3.5. Naatriumhüdroksiid.
- 3.6. 5-sulfosalitsüülhappe dihüdraat.
- 3.7. Soolhape, tihedus ligikaudu 1,18 g/ml.
- 3.8. Trinaatriumtsitraatdihüdraat.
- 3.9. 2,2'-tiodietanool (tiodiglükool).
- 3.10. Naatriumkloriid.
- 3.11. Ninhüdrin.
- 3.12. Petrooleeter, keemistemperatuur 40–60 °C.
- 3.13. Norleutsiin või muu sisestandardina kasutamiseks sobiv ühend.
- 3.14. Gaasiline lämmastik ($< 10 \text{ ppm}$ hapnikku).

- 3.15. 1-oktanool.
- 3.16. Aminohapped.
- 3.16.1. Lõikes 1 loetletud standardühendid. Kasutada võib üksnes puhtaid ühendeid ilma kristallisatsiooniveeta. Kuivatatakse vaakumis P_2O_5 või H_2SO_4 kohal nädal aega enne kasutamist.
- 3.16.2. Tsüsteiinhape.
- 3.16.3. Metioniinsulfoon.
- 3.17. Naatriumhüdrosiidi lahus, $c = 7,5$ mol/l:
lahustatakse 300 g NaOH (3.5) vees ja täiendatakse 1 liitrini.
- 3.18. Naatriumhüdrosiidi lahus, $c = 1$ mol/l:
lahustatakse 40 g NaOH (3.5) vees ja täiendatakse 1 liitrini.
- 3.19. Sipelghappe-fenoolilahus:
segatakse 889 g sipelghapet (3.2) 111 g veega ja lisatakse 4,73 g fenooli (3.3).
- 3.20. Hüdrolüüsisegu, $c = 6$ mol HCl/l, mis sisaldab 1 g fenooli liitri kohta:
492 ml HCl-le (3.7) lisatakse 1 g fenooli (3.3) ja täiendatakse veega 1 liitrini.
- 3.21. Ekstraheerimisegu, $c = 0,1$ mol HCl/l, mis sisaldab 2 % tiodiglükooli:
8,2 ml HCl (3.7) lahustatakse ligikaudu 900 ml veega, lisatakse 20 ml tiodiglükooli (3.9) ja täiendatakse veega 1 liitrini (ei segata vahetult 3.7 ja 3.9).
- 3.22. 5-sulfosalitsüülhape, $\beta = 6$ %:
lahustatakse 60 g 5-sulfosalitsüülhapet (3.6) vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.
- 3.23. Oksüdatsioonisegu (persipelghappe-fenool):
väikeses keeduklaasis segatakse 0,5 ml vesinikperoksiidi (3.1) ja 4,5 ml sipelghappe-fenoolilahust (3.19). Inkubeeritakse persipelghappe saamiseks 20–30 °C juures tund aega, seejärel jahutatakse jääveevannis (15 min) ning lisatakse proovile.
Ettevaatust:
vältige kokkupuudet nahaga ning kandke kaitseriietust.
- 3.24. Tsitraadi puhverlahus, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, pH = 2,20:
lahustatakse 19,61 g naatriumtsitraati (3.8), 5 ml tiodiglükooli (3.9), 1 g fenooli (3.3) ja 16,50 ml HCl (3.7) ligikaudu 800 ml vees. Reguleeritakse pH 2,20-le. Täiendatakse veega 1 liitrini.
- 3.25. Elutsiooni puhverlahused, valmistatakse vastavalt kasutatava analüsaatori (4.9) tingimustele.
- 3.26. Ninhüdrinreaktiiv, valmistatakse vastavalt kasutatava analüsaatori (4.9) tingimustele.
- 3.27. Aminohapete standardlahused. Lahuseid tuleks hoida temperatuuril alla 5 °C.
- 3.27.1. Aminohapete põhistandardlahused (3.16.1), $c = 2,5$ µmol/ml iga aminohapet soolhappes. Lahuseid on võimalik osta.
- 3.27.2. Tsüsteiinhape ja metioniinsulfooni põhistandardlahused, $c = 1,25$ µmol/ml.
1-liitrisel mõõtekolbis lahustatakse tsitraadi puhverlahuses (3.24) 0,2115 g tsüsteiinhapet (3.16.2) ja 0,2265 g metioniinsulfooni (3.16.3) ning täiendatakse tsitraadi puhverlahusega kuni tähtsini. Hoitakse temperatuuril alla 5 °C mitte kauem kui 12 kuud. Seda lahust ei kasutata, kui põhistandardlahus (3.27.1) sisaldab tsüsteiinhapet ja metioniinsulfooni.
- 3.27.3. Sisestandardi põhistandardlahus, nt norleutsiin, $c = 20$ µmol/ml.
Mõõtekolbis lahustatakse tsitraadi puhverlahuses (3.24) 0,6560 g norleutsiini (3.13) ja täiendatakse tsitraadi puhverlahusega 250 ml-ni. Hoitakse temperatuuril alla 5 °C mitte kauem kui 6 kuud.
- 3.27.4. Standardaminohapete kalibreerimislahus kasutamiseks hüdrolüsaatidega, $c = 5$ nmol/50 µl tsüsteiinhape ja metioniinsulfooni puhul ning $c = 10$ nmol/50 µl teiste aminohapete puhul.

2,2 g naatriumkloriidi (3.10) lahustatakse 30 ml tsitraadi puhverlahusega (3.24) 100 ml keeduklaasis. Lisatakse 4,00 ml aminohapete põhistandardlahust (3.27.1), 4,00 ml tsüsteinhappe ja metioniinsulfooni põhistandardlahust (3.27.2) ja (kui seda kasutatakse) 0,50 ml sisestandardi põhistandardlahust (3.27.3). Naatriumhüdrosiidiga (3.18) reguleeritakse pH 2,20-le.

Kantakse kvantitatiivselt 50 ml mõõtekolbi, täiendatakse tsitraadi puhverlahusega (3.24) kuni tähiseni ja segatakse.

Hoitakse temperatuuril alla 5 °C kuni 3 kuud.

Vaadake ka tähelepanekuid 9.1.

- 3.27.5. Standardaminohapete kalibreerimislahus, kasutamiseks vastavalt punktile 5.3.3.1 valmistatud hüdrolüsaatidega ja ekstraktidega (5.2). Kalibreerimislahus valmistatakse vastavalt punktile 3.27.4, naatriumkloriid jäetakse välja.

Hoitakse temperatuuril alla 5 °C kuni 3 kuud.

4. Seadmed

- 4.1. 100 või 250 ml püstjahutiga ümarkolb.
- 4.2. 100 ml boorsilikaatklaasist pudel, millel on keermega ja kummi- või teflontihendiga kuumakindel kork (nt Duran, Schott).
- 4.3. Sundventilatsiooniga ahi, mille termoregulaatori täpsus on suurem kui ± 2 °C.
- 4.4. pH-meeter (kolm kümnendkohta).
- 4.5. Membraanfilter (0,2 µm).
- 4.6. Tsentrifuug.
- 4.7. Vaakumpöördaurusti.
- 4.8. Mehaaniline loksuti või magnetsegur.
- 4.9. Aminohappeanalüsaator või HPLC-seade, millel on ioonivahetuskolonn, seade kolonnijärgseks ninhüdriniga derivatiseerimiseks ja fotomeetriline detektor.

Kolonn täidetakse sulfoonitunud polüstüreenvaikudega, mis on võimelised eraldama aminohappeid üksteisest ning muudest ninhüdriniga reageerivatest materjalidest. Puhverlahuse ja ninhüdrini voolu tagavad pumbad, mille voolustabiilsus on $\pm 0,5$ % nii standardkalibreerimise kui ka proovi analüüsi ajal.

Mõnede aminohappeanalüsaatoritega saab kasutada hüdrolüüsimeetodeid, mille puhul hüdrolüsaadi naatriumisisaldus on $c = 0,8$ mol/l ning hüdrolüsaat sisaldab kõiki oksüdatsioonietapi jääke. Teised analüsaatorid ei suuda teatavaid aminohappeid rahuldavalt eraldada, kui hüdrolüsaadi sipelghappe ja/või naatriumioonide kontsentratsioon on liiga suur. Sel juhul vähendatakse happetegurit pärast hüdrolüüsi ja enne pH reguleerimist aurustamise teel ligikaudu 5 ml-ni. Aurustada tuleks vaakumis maksimaalselt 40 °C juures.

5. Analüüsi käik

5.1. Proovi ettevalmistamine

Proov peenestatakse, nii et see läbib 0,5 mm avadega sõela. Suure niiskusesisaldusega proovid tuleb enne peenestamist õhkkuivatada maksimaalselt 50 °C juures või külmkuivatada. Suure rasvasisaldusega proovid tuleks enne peenestamist ekstraheerida petrooleetriga (3.12).

5.2. Vabade aminohapete määramine söödas ja eelsegudes

Ettevalmistatud proovi (5.1) sobiva koguse (1–5 g) kaalutis 0,2 mg täpsusega pannakse Erlenmeyeri kolbi ja lisatakse 100,0 ml ekstraheerimisegu (3.21). Segu loksutatakse 60 minutit mehhaanilise loksuti või magnetsegaja (4.8) abil. Sademel lastakse settida ning pipetatakse 10,0 ml supernatanti 100 ml keeduklaasi.

Segades lisatakse 5,0 ml sulfosalitsüülhappe lahust (3.22) ning segatakse magnetsegajaga veel 5 minutit. Sademe eraldamiseks supernatant filtreeritakse või tsentrifuugitakse. 10,0 ml saadud lahust pannakse 100 ml keeduklaasi, pH reguleeritakse naatriumhüdroksiidi lahusega (3.18) 2,20-le, lahus kantakse tsitraadi puhverlahust (3.24) kasutades sobiva suurusega mõõtekolbi ning täiendatakse tsitraadi puhverlahusega (3.24) kuni tähiseni.

Kui kasutatakse sisestandardit, lisatakse 1,00 ml sisestandardit (3.27.3) 100 ml lõpplahuse kohta ning täiendatakse puhverlahusega (3.24) kuni tähiseni.

Jätkatakse kromatograafiaetapiga vastavalt punktile 5.4.

Kui ekstrakte ei uurita samal päeval, tuleb neid hoida temperatuuril alla 5 °C.

5.3. Üldaminohapete määramine

5.3.1. Oksüdeerimine

Ligikaudu 0,1–1 g ettevalmistatud proovi (5.1) kaalutis 0,2 mg täpsusega pannakse:

- 100 ml ümarkolbi (4.1) hüdrolüüsiks avatud anumas (5.3.2.3) või
- 250 ml ümarkolbi (4.1), kui on nõutav naatriumi madal kontsentratsioon (5.3.3.1), või
- 100 ml keermega korgiga pudelisse (4.2) hüdrolüüsiks suletud anumas (5.3.2.4).

Kaalutise lämmastikisisaldus peaks olema ligikaudu 10 mg ja niiskusesisaldus kuni 100 mg.

Kolb/pudel asetatakse jääveevanni ja jahutatakse 0 °C-ni, lisatakse 5 ml oksüdatsioonisegu (3.23) ja segatakse painutatud otsaga klaasspaatliga. Kolb/pudel, milles on spaatel, suletakse õhukindla kilega ning jääveevann õhukindlalt suletud nõuga asetatakse 16 tunniks külmikusse temperatuuril 0 °C. 16 tunni möödudes võetakse nõu külmikust ning lagundatakse üleliigne oksüdatsioonireaktiiv, lisades 0,84 g naatriumdisulfitit (3.4).

Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.2.1.

5.3.2. Hüdrolüüs

5.3.2.1. Oksüdeeritud proovide hüdrolüüs

Punkti 5.3.1 kohaselt ettevalmistatud oksüdeeritud proovile lisatakse 25 ml hüdrolüüsisegu (3.20), pestes ära kõik proovijäägid nõu ja spaatli küljest. Kasutatavast hüdrolüüsimeetodist sõltuvalt jätkatakse vastavalt punktile 5.3.2.3 või 5.3.2.4.

5.3.2.2. Oksüdeerimata proovide hüdrolüüs

Ligikaudu 0,1–1 g ettevalmistatud proovi (5.1) kaalutis 0,2 mg täpsusega pannakse 100 ml või 250 ml ümarkolbi (4.1) või 100 ml keermega korgiga pudelisse (4.2). Kaalutise lämmastikisisaldus peaks olema ligikaudu 10 mg. Ettevaatlikult lisatakse 25 ml hüdrolüüsisegu (3.20) ja segatakse prooviga. Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.2.3 või 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hüdrolüüs avatud anumas

Punkti 5.3.2.1 või 5.3.2.2 kohaselt ettevalmistatud segule kolvis lisatakse 3 klaaskuuli ja keedetakse püstjahuti all katkematult 23 tundi. Pärast hüdrolüüsi lõppu uhutakse kondensaator 5 ml tsitraadi puhverlahusega (3.24). Kolb ühendatakse lahti ja jahutatakse jäävannis. Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.3.

5.3.2.4. Hüdrolüüs suletud anumas

Punkti 5.3.2.1 või 5.3.2.2 kohaselt ettevalmistatud seguga pudel asetatakse ahju (4.3) temperatuuril 110 °C. Rõhu suurenemise takistamiseks (gaaside tekkimise tõttu) ja plahvatuse vältimiseks asetatakse esimeseks tunniks ajaks keermega kork nõu peale. *Nõud ei tohi korgiga sulgeda.* Tunni aja möödudes suletakse nõu korgiga ja jäetakse ahju (4.3) 23 tunniks. Pärast hüdrolüüsi lõppu võetakse pudel ahjust, avatakse ettevaatlikult kork ning asetatakse pudel jääveevanni. Jahutatakse.

Sõltuvalt pH reguleerimise meetodist (5.3.3) kantakse pudeli sisu tsitraadi puhverlahust (3.24) kasutades kvantitatiivselt 250 ml keeduklaasi või 250 ml ümarkolbi.

Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.3.

5.3.3. pH reguleerimine

Sõltuvalt aminohappeanalüsaatori (4.9) naatriumitaluvusest jätkatakse pH reguleerimisega vastavalt punktile 5.3.3.1 või 5.3.3.2.

5.3.3.1. Kromatograafiasüsteemid (4.9), mis nõuavad naatriumi madalat kontsentratsiooni

Naatriumi madalat kontsentratsiooni nõudvate aminohappeanalüsaatorite puhul (kui happekogust tuleb vähendada) on soovitatav kasutada sisestandardi põhistandardlahust (3.27.3).

Sel juhul lisatakse hüdroolüsaadile enne aurustamist 2,00 ml sisestandardi põhistandardlahust (3.27.3).

Punkti 5.3.2.3 või 5.3.2.4 kohaselt saadud hüdroolüsaadile lisatakse 2 tilka 1-oktanooli (3.15).

Vaakumpöördaurustit (4.7) kasutades vähendatakse kogust 40 °C juures 5–10 ml-ni. Kui kogust vähendatakse kogemata vähem kui 5 ml-ni, tuleb hüdroolüsaat ära visata ja analüüs uuesti teha.

Naatriumhüdroksiidi lahusega (3.18) reguleeritakse pH 2,20-le ja jätkatakse vastavalt punktile 5.3.4.

5.3.3.2. Kõik muud aminosahapteenalüsaatorid (4.9)

Punkti 5.3.2.3 või 5.3.2.4 kohaselt saadud hüdroolüsaadid neutraliseeritakse osaliselt, lisades neile ettevaatlikult segades 17 ml naatriumhüdroksiidi lahust (3.17), samal ajal tagades temperatuuri alla 40 °C.

Toatemperatuuril reguleeritakse pH 2,20-le naatriumhüdroksiidi lahusega (3.17) ning lõpuks naatriumhüdroksiidi lahusega (3.18). Jätkatakse vastavalt punktile 5.3.4.

5.3.4. Kromatograafia proovilahus

Reguleeritud pH-ga hüdroolüsaat (5.3.3.1 või 5.3.3.2) kantakse tsitraadi puhverlahusega (3.24) kvantitatiivselt 200 ml mõõtekolbi ning täiendatakse tsitraadi puhverlahusega (3.24) kuni tähtsini.

Kui sisestandardit ei ole veel kasutatud, lisatakse 2,00 ml sisestandardit (3.27.3) ning täiendatakse tsitraadi puhverlahusega (3.24) kuni tähtsini. Segatakse hoolikalt.

Jätkatakse kromatograafiaetapiga (5.4).

Kui proovilahuseid ei uurita samal päeval, tuleb neid hoida temperatuuril alla 5 °C.

5.4. Kromatograafia

Enne kromatograafiat tuuakse ekstrakt (5.2) või hüdroolüsaat (5.3.4) toatemperatuurile. Segu loksutatakse ja filtreeritakse sobiv kogus läbi 0,2 µm membraanfiltrit (4.5). Saadud selge lahus analüüsitakse aminosahapteenalüsaatorit (4.9) kasutadesioonivahetuskromatograafia abil.

Lahust võib injekeerida käsitsi või automaatselt. On oluline, et kolonni lisataks analüüsiks iga kord sama kogus standard- või proovilahust ± 0,5 %, välja arvatud sisestandardi kasutamisel, ning et standard- ja proovilahuste naatriumi- ja aminosahaptesisalduste suhe oleks võimalikult sarnane.

Üldiselt sõltub kalibriimise sagedus ninhüdroinreaktiiv ja analüsaatorisüsteemi tasakaalustatusest. Standard- või proovilahus lahjendatakse tsitraadi puhverlahusega (3.24), et standardlahuse piigipindala oleks 30–200 % aminosahape proovi piigipindalast.

Aminosahapete kromatograafia varieerub veidi, sõltuvalt kasutatava analüsaatori tüübist ja kasutatavast vaigust. Valitud süsteem peab olema võimeline eraldama aminosahapeid üksteisest ning ninhüdroiniga reageerivatest materjalidest. Töövahemikus peaks kromatograafiasüsteem reageerima lineaarselt kolonni lisatava aminosahapekoguse muutumisele.

Kui analüüsitakse määratavate aminosahapete ekvimolaarset lahust, kohaldatakse kromatograafiaetapis allpool nimetatud suhteid miinimumi ja piigi kõrguse vahel. Kõnealune ekvimolaarne lahus peab sisaldama vähemalt 30 % iga aminosahape maksimumkogusest, mida on võimalik aminosahapeanalüsaatoriga (4.9) täpselt mõõta.

Treoniini ja seriini eraldamisel ei tohiks kahest kromatogrammil kattuvast aminosahapest madalama piigiga happe miinimumi ja piigi kõrguse suhe olla suurem kui 2:10 (üksnes tsüst(e)iini, metioniini, treoniini ja lüsiini määramisel häirib naaberpiikide ebapiisav eraldamine määramist). Kõigi teiste aminosahapete puhul peab eraldumine olema parem kui 1:10.

Süsteem peab võimaldama eraldada lüsiini "lüsiini artefaktidest" ja ornitiinist.

6. Tulemuste arvutamine

Iga aminosahape puhul mõõdetakse proovi- ja standardlahuse piigipindala ning arvutatakse aminosahape kogus grammides proovi kilogrammi kohta:

$$A \times E \times MW \times F = \frac{B \times W \times 1\,000}{\text{aminohape (g) proovi (kg) kohta}}$$

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

A = hüdrolüsaadi või ekstrakti piigi pindala

B = kaliibrimise standardlahuse piigi pindala

C = sisestandardi piigi pindala hüdrolüsaadis või ekstraktis

D = sisestandardi piigi pindala kaliibrimislahuses

MW = määratava aminohappe molekulmass

E = standardi kontsentratsioon (µmol/ml)

W = proovi mass grammides (kohandatakse esialgseks massiks, kui proov on kuivatatud või rasvatustatud)

F = hüdrolüsaadi koguruumala (5.3.4) või ekstrakti lahjenduse arvatud koguruumala (6.1) milliliitrites.

Tsüstiin ja tsüsteiin määratakse mõlemad tsüsteiinina oksüdeeritud proovide hüdrolüsaatides, kuid arvutatakse tsüstiiniks ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MW 240,30), kasutades molekulmassi 120,15 (= $0,5 \times 240,30$).

Metioniin määratakse metioniinsulfoonina oksüdeeritud proovi hüdrolüsaatides, kuid arvutatakse metioniiniks, kasutades molekulmassi 149,21.

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

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

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

V = lõppekstrakti ruumala

7. Meetodi hindamine

Meetodit on testitud rahvusvahelises võrdluskatses 1990. aastal, kasutades nelja erinevat sööta (sigade segasöööt, broilerite segasöööt, valgukontsentraat, eelsegu). Tulemuste keskvaartused ja standardhälbed pärast võõrväärtuste elimineerimist on esitatud järgnevas tabelis.

Keskvaartused g/kg

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

n = osalenud laborite arv

7.1. Korratavus

Eespool nimetatud võrdluskatse korratavus on väljendatud laborisese standardhālbenä ja esitatud järgmistes tabelites.

Laborisisene standardhälve (S_r) (g/kg)

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

n = osalenud laborite arv

Laborisisese standardhälbe (S_r) variatsioonikordaja (%)

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

n = osalenud laborite arv

7.2. Reprodutseeritavus

Eespool nimetatud võrdluskatse laboritevahelise standardhälbe tulemused on esitatud järgmises tabelis:

Laboritevaheline standardhälve (S_R) (g/kg)

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

n = osalenud laborite arv

Laboritevahelise standardhälbe (S_R) variatsioonikordaja (%)

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

n = osalenud laborite arv

8. Etalonainete kasutamine

Meetodi õige kohaldamise kontrollimiseks tehakse korduvaid mõõtmisi sertifitseeritud etalonainetega, kui need ained on kättesaadavad. Soovitatav on kaliibrida aminohapete sertifitseeritud kaliibrimislahusega.

9. Tähelepanekud

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

Kõigi aminohapete puhul tuleb kontrollida aparatuuri lineaarse ala vahemikku.

Standardlahus lahjendatakse tsitraadi puhverlahusega, et piigialad oleksid vahemiku keskel.

- 9.2. Kui hüdrolüsaatide analüüsiks kasutatakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia aparatuuri, tuleb katsetingimused optimeerida vastavalt tootja soovitudele.
- 9.3. Meetodi kohaldamisel söötade suhtes, mille kloriidisisaldus on suurem kui 1 % (kontsentraadid, mineraalsöödad, täiendsöödad), võib tulemuseks olla tegelikust väiksem metioniinisaldus ning tuleb kasutada erimeetodit.

B OSA

TOORÕLI JA -RASVA MÄÄRAMINE

1. Eesmärk ja rakendusala

Käesolev meetod on toorõli ja -rasva määramiseks söötades. See ei hõlma nõukogu 22. septembri 1966. aasta määrusega 136/66/EMÜ hõlmatud õliseemnete ja õliviljade analüüsi.

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

1.1. Meetod A – Otse ekstraheeritav toorõli ja -rasv

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

1.2. Meetod B – Kogu toorõli ja -rasv

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

1.3. *Tulemuste tõlgendamine*

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

2. **Põhimõte**

2.1. *Meetod A*

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

2.2. *Meetod B*

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

3. **Reaktiivid**

3.1. Petrooleeter, keemistemperatuur 40–60 °C. Broomiarv peab olema väiksem kui 1 ja aurustamise jääk alla 2 mg/100 ml.

3.2. Veevaba naatriumsulfaat.

3.3. Soolhape, $c = 3 \text{ mol HCl/l}$.

3.4. Filteraine, nt Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. **Seadmed**

4.1. Ekstraheerimisaparaat. Kui kasutatakse sifooni (Soxhlet'i aparaat), peaks tagasijooksu kiirus tekitama ligikaudu 10 tsüklit tunnis; ilma sifoonita peaks tagasijooksu 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: vaakumkuivatuskapp temperatuuriga 75 °C ± 3 °C või ventileeritav kuivatuskapp temperatuuriga 100 °C ± 3 °C.

5. **Analüüsi käik**

5.1. *Meetod A (vt punkt 8.1)*

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

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

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

5.2. *Meetod B*

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

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

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

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

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

6. Tulemuste väljendamine

Jäägi mass väljendatakse protsendimäärana proovist.

7. Korratavus

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

- 0,2 %, kui toorõli ja -rasva sisaldus on alla 5 %,
- 4,0 % suuremast tulemusest, kui toorõli ja -rasva sisaldus on 5–10 %,
- 0,4 %, kui toorõli ja -rasva sisaldus on üle 10 %.

8. Tähelepanekud

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

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

Hülssi jäänud ekstraheerimisjägist 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:

$$(10a + b) \times 5$$

kus:

a = jäägi mass grammides pärast esimest ekstraheerimist (aliquootne osa ekstraktist),

b = jäägi mass grammides pärast teist ekstraheerimist.

- 8.2. Väikese õli- ja rasvasisaldusega toodete puhul võib uuritava proovi massi suurendada 5 grammini.
- 8.3. Suure veesisaldusega lemmikloomatoite võib olla vaja segada veevaba naatriumsulfaadiga enne hüdrolüüsi ja ekstraheerimist vastavalt meetodile B.
- 8.4. Punktis 5.2 võib olla tõhusam kasutada jäägi pesemiseks pärast filtreerimist külma vee asemel sooja vett.
- 8.5. Mõnede söötade puhul võib olla vaja pikendada 1,5 tunnist kuivamisega. Tuleks vältida liigset kuivatamist, kuna see võib põhjustada madalaid tulemusi. Kasutada võib ka mikrolaineahju.
- 8.6. Kui toorõli ja -rasva sisaldus on üle 15 %, on soovitatav proov enne hüdrolüüsi eelnevalt ekstraheerida meetodi A järgi ning uuesti ekstraheerida meetodi B järgi. Mingil määral sõltub see sööda ja selles leiduva õli ning rasva laadist.

C OSA

OLAKVINDOKSI MÄÄRAMINE

(2-[N-2'-(hüdrosüetüül)karbamöüül]-3-metüülkinoksaliin-N¹, N⁴-dioksüüd)

1. Eesmärk ja rakendusala

Käesolev meetod on olakvindoksi määramiseks söötades. Alumine määramispiir on 5 mg/kg.

2. Põhimõte

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

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

3. Reaktiivid

3.1. Metanool.

3.2. Metanool, HPLC-puhas.

3.3. Vesi, HPLC-puhas.

3.4. HPLC liikuv faas:

Vesi (3.3) + metanool (3.2), 900 + 100 (ruumala järgi).

3.5. Standardaine: puhas olakvindoks 2-[N-2'-(hüdrosüetüül)karbamooül]-3-metüülkinoksaliin-N¹, N⁴-dioksüüd, E 851.

3.5.1. Olakvindoksi põhistandardlahus, 250 µg/ml.

50 mg olakvindoksi (3.5) kaalutis täpsusega 0,1 mg asetatakse 200 ml mõõtekolbi ja lisatakse ligikaudu 190 ml vett. Kolb asetatakse 20 minutiks ultrahelivanni (4.1). Pärast ultraheliga mõjutamist viiakse lahuse temperatuur toatemperatuurini, täidetakse kolb veega kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi ja säilitatakse külmikus. See lahus tuleb igal kuul uuesti valmistada.

3.5.2. Olakvindoksi vahestandardlahus, 25 µg/ml.

Valatakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.5.1) 100 ml mõõtekolbi, täidetakse see liikuva faasiga (3.4) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi ja säilitatakse külmikus. See lahus tuleb iga päev uuesti valmistada.

3.5.3. Kaliibrimislahused.

50 ml mõõtekolbidesse pannakse 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 ja 20,0 ml vahestandardlahust (3.5.2). Täidetakse kolvid liikuva faasiga (3.4) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi. Nende lahuste olakvindoksisisaldus on vastavalt 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 ja 10,0 µg/ml.

Need lahused tuleb iga päev uuesti valmistada.

4. Seadmed

4.1. Ultrahelivann.

4.2. Mehaaniline loksuti.

4.3. HPLC seade muudetava lainepikkusega ultraviolettdetektoriga või dioodireadetektoriga.

4.3.1. Vedelikkromatograafiakolonn 250 mm × 4 mm, vahatihend C18, 10 µm või samaväärne.

4.4. Membraanfiltrid 0,45 µm.

5. Analüüsi käik

Märkus: Olakvindoks on valgustundlik. Kõik protseduurid tehakse nõrgas valguses või kasutatakse tumedaid anumaid.

5.1. Üldsätted

5.1.1. Tuleb analüüsida võrdlussööta veendumaks, et selles ei ole ei olakvindoksit ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus olakvindoksit. Et saada kontsentratsiooni 50 mg/kg, kantakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.5.1) 250 ml Erlenmeyeri kolbi ja aurustatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitriini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerimist (5.2) asumist veel mitu korda.

Märkus: Selle meetodi puhul peab võrdlussööt olema prooviga samalaadne ja olakvindoksit ei tohi selles olla avastataval määral.

5.2. Ekstraheerimine

Võetakse ligikaudu 50 g proovi kaalutis 0,01 g täpsusega. Kaalutis kantakse 1 000 ml Erlenmeyeri kolbi, lisatakse 100 ml metanooli (3.1) ja asetatakse kolb 5 minutiks ultrahelivanni (4.1). Lisatakse 410 ml vett ja hoitakse kolbi ultrahelivannis veel 15 minutit. Kolb võetakse ultrahelivannist välja, loksutatakse 30 minutit loksutil (4.2) ja filtreeritakse läbi kurdfiltrit. Kallatakse 10,0 ml filtraati 20 ml mõõtekolbi, täiendatakse veega kuni märgini ja segatakse. Alikvoot filtreeritakse läbi membraanfiltrit (4.4) (vt 9. Tähelepanek). Seejärel alustatakse HPLC-määramist (5.3).

5.3. HPLC-määramine

5.3.1. Parameetrid:

Soovitatakse juhendada järgmistest tingimustest, muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad sama-väärsed tulemused.

Analüüsikolonn (4.3.1)

Liikuv faas (3.4): vesi (3.3) + metanool (3.2), 900 + 100 (ruumala järgi)

Voolukiirus: 1,5–2 ml/min.

Avastamise lainepikkus: 380 nm

Injekteeritav ruumala: 20 µl – 100 µl

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, injekteerides korduvalt kaliibrimislahust (3.5.3) kontsentratsiooniga 2,5 µg/ml, kuni saavutatakse reprodutseeritavad piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kaliibrimisgraafik

Iga kaliibrimislahust (3.5.3) injekteeritakse korduvalt ja määratakse igale kontsentratsioonile vastavad keskmised piigi kõrgused (pindalad). Ehitatakse kaliibrimisgraafik, kandes ordinaatteljele kaliibrimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.3.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.2) injekteeritakse mitu korda samas mahus mis kaliibrimislahuste puhul ja määratakse olakvindoksiipikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse olakvindoksiipikide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kaliibrimisgraafiku (5.3.2) abil proovilahuse kontsentratsioon (µg/ml).

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

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

kus:

c = prooviekstrakti (5.2) olakvindoksikontsentratsioon (µg/ml)

m = uuritava proovi kaalutis grammides (5.2).

7. Tulemuste kontrollimine

7.1. Samasus

Uuritava aine samasust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades dioodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (5.2) ja 5,0 µg/ml sisaldusega kaliibrimislahuse (3.5.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafiakatse

Prooviekstraktile (5.2) lisatakse vajalik kogus kaliibrimislahust (3.5.3). Lisatud olakvindoksikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud olakvindoksikogus.

Lisatud koguse ja ekstrakti lahjenduse arvessevõtmise tulemusena peaks tõusma üksnes olakvindoksiipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui $\pm 10\%$ kontsentreerimata prooviekstrakti olakvindoksiipiigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine dioodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad jääma analüüsiseadme lahutusvõime piiridesse. Diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;

- b) lainepikkustel 220–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad kromatogrammil oleva proovi ja standardi piigi tipu spektrid ühte langema. Seda nõuet käsitletakse täidetuna, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõrgis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 220–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet käsitletakse täidetuna, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõrgis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei peeta otsitava aine olemasolu tõestatuks.

7.2. *Korratavus*

Kui olakvindoksisisaldus on 10–20 mg/kg, ei tohi sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ületada 15 % suuremast tulemusest.

7.3. *Saagis*

Suurendatud kontsentratsiooniga võrdlusproovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati EÜ ühisuuring, mille käigus analüüsisid kuni 13 laborit nelja põrsasööda proovi, millest üks oli pimekatse. Tulemused olid järgmised:

	Proov 1	Proov 2	Proov 3	Proov 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
keskväärtus (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
S_r (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S_R (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
CV_r (%)	—	5,6	4,3	6,7
CV_R (%)	—	11,1	8,9	8,8
Nominaalsisaldus (mg/kg)	—	15	50	100
saagis (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : laborite arv

n : üksikväärtuste arv

S_r : korratavuse standardhälve

S_R : reprodutseeritavuse standardhälve

CV_r : korratavuse variatsioonikordaja

CV_R : reprodutseeritavuse variatsioonikordaja

9. Tähelepanek

Kuigi söötade puhul, mille olakvindoksisisaldus on üle 100 mg/kg, ei ole meetodi valiidsus kontrollitud, võib saavutada rahuldavaid tulemusi, kasutades väiksema massiga proove ja/või lahjendades ekstrakti (5.2) kaliibrimisgraafiku (5.3.2) vahemikku jääva kontsentratsiooni saamiseks.