

Tämä asiakirja on ainoastaan dokumentoinnin apuväline eikä sillä ole oikeudellista vaikutusta. Unionin toimielimet eivät vastaa sen sisällöstä. Säädösten todistusvoimaiset versiot on johdanto-osineen julkaistu Euroopan unionin virallisessa lehdessä ja ne ovat saatavana EUR-Lexissä. Näihin virallisiin teksteihin pääsee suoraan tästä asiakirjasta siihen upotettujen linkkien kautta.

► **B**

**KOMISSION ASETUS (EY) N:o 152/2009,
annettu 27 päivänä tammikuuta 2009,
näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten
(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)
(EUVL L 54, 26.2.2009, s. 1)**

sellaisena kuin se on muutettuna seuraavilla:

		virallinen lehti		
		N:o	sivu	päivämäärä
► <u>M1</u>	Komission asetus (EU) N:o 278/2012, annettu 28 päivänä maaliskuuta 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Komission asetus (EU) N:o 51/2013, annettu 16 päivänä tammikuuta 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Komission asetus (EU) N:o 691/2013, annettu 19 päivänä heinäkuuta 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Komission asetus (EU) N:o 709/2014, annettu 20 päivänä kesäkuuta 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Komission asetus (EU) 2017/645, annettu 5 päivänä huhtikuuta 2017	L 92	35	6.4.2017

▼B

KOMISSIION ASETUS (EY) N:o 152/2009,
annettu 27 päivänä tammikuuta 2009,
näytteenotto- ja määrittämenetelmistä rehujen virallista valvontaa
varten
(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

▼M3*1 artikla*

Rehujen virallisessa valvonnassa suoritettava näytteenotto, erityisesti rehun sisältämien ainesosien, mukaan lukien ainekset, jotka sisältävät muuntogeenisiä organismeja (GMO) tai koostuvat tai on valmistettu niistä, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 1831/2003 ⁽¹⁾ määriteltyjen rehun lisäaineiden ja Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivissä 2002/32/EY ⁽²⁾ määriteltyjen haitallisten aineiden määrittämiseksi, on suoritettava liitteessä I vahvistettujen menetelmien mukaisesti.

Liitteessä I vahvistettua näytteenottomenetelmää sovelletaan rehun valvonnassa Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 396/2005 ⁽³⁾ määriteltyjen torjunta-ainejäämien määrittämiseksi sekä asetuksen (EU) N:o 619/2011 noudattamisen valvonnassa.

▼B*2 artikla*

Näytteet on valmistettava määrittystä varten ja tulokset on ilmoitettava liitteessä II esitettyjen menetelmien mukaisesti.

3 artikla

Rehujen virallista tarkastusta varten tehtävissä määrityksissä on noudatettava menetelmiä, jotka on vahvistettu liitteessä III (Rehuaineiden ja rehuseosten koostumuksen valvonnassa käytettävät määrittämenetelmät), liitteessä IV (Rehujen sisältämien sallittujen lisäaineiden valvonnassa käytettävät määrittämenetelmät), liitteessä V (Rehujen sisältämien haitallisten aineiden valvonnassa käytettävät määrittämenetelmät) ja liitteessä VI (Rehujen sisältämien eläinperäisten ainesosien määrittämenetelmät rehujen virallista valvontaa varten).

4 artikla

Siipikarjan rehuseosten energia-arvo on laskettava liitteen VII mukaisesti.

5 artikla

Liitteessä VIII vahvistettuja määrittämenetelmiä sellaisten laittomien lisäaineiden osoittamiseksi, jotka eivät enää ole sallittuja rehuissa, käytetään varmistustarkoituksiin.

⁽¹⁾ EUVL L 268, 18.10.2003, s. 29.

⁽²⁾ EYVL L 140, 30.5.2002, s. 10.

⁽³⁾ EUVL L 70, 16.3.2005, s. 1.

*6 artikla*

Kumotaan direktiivit 71/250/ETY, 71/393/ETY, 72/199/ETY, 73/46/ETY, 76/371/ETY, 76/372/ETY, 78/633/ETY, 81/715/ETY, 84/425/ETY, 86/174/ETY, 93/70/ETY, 93/117/EY, 98/64/EY, 1999/27/EY, 1999/76/EY, 2000/45/EY, 2002/70/EY ja 2003/126/EY.

Viittauksia kumottuihin direktiiveihin pidetään viittauksina tähän asetukseen liitteessä IX olevien vastaavuustaulukoiden mukaisesti.

7 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Sitä sovelletaan 26 päivästä elokuuta 2009.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaiseen kaikissa jäsenvaltioissa.

▼ **M3***LIITE I***NÄYTTEENOTTOMENETELMÄT****1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA**

Rehujen virallisessa valvonnassa käytettävät näytteet on otettava seuraavassa esitettyjen menetelmien mukaisesti. Näin saatujen näytteiden katsotaan edustavan koko tutkittavaa erää.

Edustavan näytteenoton tarkoituksena on ottaa erästä pieni osaerä siten, että osaerästä määritettävä tekijä edustaa keskimääräisesti koko tutkittavaa rehuerää. Erästä tulee ottaa osanäytteitä kauttaaltaan useista kohdista erää. Nämä osanäytteet yhdistetään sekoittamalla kokoomanäytteeksi, josta muodostetaan edustavan jakomenettelyn avulla erää edustavat lopulliset näytteet.

Jos rehuerän visuaalisessa tarkastuksessa todetaan, että näytteenoton kohteena oleva rehuerän osa eroaa laadultaan muusta rehusta niin se käsitellään erillisenä osaeränä. Jos rehua ei ole mahdollista jakaa erillisiin osaeriin, sitä käsitellään yhtenä eränä. Tällöin asia mainitaan näytteenottoraportissa.

Jos todetaan, että rehu, josta on otettu näytteet tämän asetuksen säännösten mukaisesti, ei täytä EU:n vaatimuksia ja kyseinen rehu on osa samaan luokkaan kuuluvaa tai samaa kuvausta vastaavaa rehuerää, on oletettava, että tämä säädöstenvastaisuus koskee koko rehuerää, ellei yksityiskohtaisesta arvioinnista ilmene, että ei ole mitään näyttöä siitä, että loppuosa erästä ei täyttäisi EU:n vaatimuksia.

2. MÄÄRITELMÄT

— Erä: tunnistettava määrä rehua, jolla on määritetty olevan yhteisiä ominaisuuksia kuten alkuperä, lajike, pakkaustapa, pakkaaja, lähettäjä tai pakkausmerkinnät, jos kyse on tuotantoprosessista, yksittäisessä laitoksessa samoja tuotantoparametreja käyttäen tuotettu tuotantoerä tai useita tällaisia tuotantoeria, jos ne on tuotettu yhtäjaksoisesti ja varastoidaan yhdessä.

— Tutkittava erä: erä tai tunnistettava osa erästä tai osaerästä.

— Sinetöity näyte: näyte, joka on sinetöity siten, ettei näytteeseen pääse käsiksi rikkomatta tai poistamatta sinettiä.

— Osanäyte: määrä, joka on otettu tutkittavan erän yhdestä kohdasta.

— Kokoomanäyte: tutkittavan erän eri kohdista otetuista osanäytteistä muodostettu yhteisnäyte.

— Supistettu näyte: kokoomanäytteen osa, joka on saatu kokoomanäytteestä edustavasti supistamalla.

— Lopullinen näyte: supistetun näytteen osa tai homogenisoidun kokoomanäytteen osa.

— Laboratorionäyte: laboratoriolle tarkoitettu näyte (laboratorion vastaanottama näyte), joka voi olla lopullinen näyte, supistettu näyte tai kokoomanäyte.

▼ **M3**

3. YLEISET SÄÄNNÖKSET

— Näytteenottajat: näytteitä ottavat toimivaltaisen viranomaisen tähän tehtävään valtuuttamat henkilöt.

— Näyte on sinetöitävä siten, ettei näytteeseen pääse käsiksi rikkomatta tai poistamatta sinettiä. Sinetin merkin olisi oltava selvästi tunnistettavissa ja selvästi näkyvillä. Vaihtoehtoisesti näyte voidaan panna astiaan, joka voidaan sulkea siten, ettei sitä voi avata ilman, että astia tai säiliö rikkoutuu pysyvästi; näin estetään astian tai säiliön käyttö uudelleen.

— Näytteen tunnistaminen: näyte on merkittävä pysyvästi ja siten, että yhteys näytteenottopöytäkirjaan on selvä.

— Kustakin kokoomanäytteestä otetaan vähintään kaksi lopullista näytettä: vähintään yksi valvontaa (valvontatoimenpiteitä) varten ja yksi rehualan toimijaa (oikeusturvaa) varten. Yksi lopullinen näyte voidaan ottaa myös vertailunäytteeksi. Jos kokoomanäyte homogenisoidaan kokonaisuudessaan, niin lopulliset näytteet otetaan homogenisoidusta kokoomanäytteestä edellyttäen, että tällainen menettely on jäsenvaltiossa noudatettavien rehualan toimijoiden oikeuksia koskevien sääntöjen mukainen.

4. VÄLINEISTÖ

4.1 Näytteenottovälineiden on oltava valmistettu materiaaleista, jotka eivät aiheuta kontaminaatiota tuotteista otettuihin näytteisiin. Laitteistojen, joita käytetään useita kertoja, tulee olla ristiinkontaminaation välttämiseksi helppoja puhdistaa.

4.2 **Kiinteiden rehujen näytteenottoon suositellut välineet**4.2.1 *Manuaalinen näytteenotto*

4.2.1.1 Tasapohjainen kauha, jossa on pystysuorat sivuseinämät.

4.2.1.2 Näytteenottokaira, jossa on pitkä ura tai osastoja. Kairan mittojen on oltava oikeassa suhteessa tutkittavaan erään (esim. säiliön syvyys, säkin mitat) sekä rehun raekokoon.

Jos näytteenottokairassa on useita aukkoja, tulee aukkojen olla kairassa osastoittain jaettuna tai aua eriaikaisesti, jotta voidaan varmistaa, että näytettä saadaan kerättyä koko kairan pituudelta.

4.2.2 *Mekaaninen näytteenotto*

Asianmukaista mekaanista laitetta voidaan käyttää otettaessa näytteitä liikkeessä olevasta rehuerästä. Asianmukaisella tarkoitetaan sitä, että näytettä otetaan ainakin liikkeessä olevan rehun koko kerrostumasta.

Rehun ollessa liikkeessä (voimakkaasti virtaavana) rehuerän näytteenotossa voidaan käyttää automaattisia näytteenkeräjiä.

4.2.3 *Näytteenjakolaite*

Supistettujen näytteiden valmistukseen edustavasti olisi käytettävä laitetta, joka on suunniteltu jakamaan näyte suunnilleen yhtä suuriin osiin, jos se on mahdollista ja asianmukaista.

▼ M3

5. OSANÄYTTEIDEN LUKUMÄÄRÄÄ KOSKEVAT MÄÄRÄLLISET VAATIMUKSET

— Osanäytteiden lukumäärää koskevia 5.1 ja 5.2 kohdan määrällisiä vaatimuksia sovelletaan tutkittaviin eriin, joiden koko on enintään 500 tonnia ja joista voidaan ottaa näyte edustavasti. Kuvattu näytteenottomenettely pätee myös rehumäärille, jotka ovat suurempia kuin tutkittavalle erälle määrätty enimmäiskoko edellyttäen, että jäljempänä olevissa taulukoissa esitetty osanäytteiden enimmäismäärä jätetään huomiotta ja osanäytteiden lukumäärä määritetään menettelyn asianomaisessa osassa (katso 5.3 kohta) annetulla neliöjuurikavalla ja kokoomanäytteen vähimmäiskokoa korotetaan suhteessa tarkastettavaan rehumäärään. Tämä ei estä suuren rehuerän jakamista pienempiin osaiiin, joista kustakin otetaan näytteet 5.1 ja 5.2 kohdassa kuvattun menettelyn mukaisesti.

— Tutkittavan erän on oltava sen kokoinen, että näyte voidaan ottaa kaikista erän kohdista.

— Hyvin suuriin eriin tai osaiiin (> 500 tonnia) sekä eriin, jotka kuljetetaan tai varastoidaan siten, että näytteenottoa ei voida suorittaa tämän luvun 5.1 ja 5.2 kohdassa esitetyn näytteenottomenetelmän mukaisesti, sovelletaan 5.3 kohdan mukaista näytteenottomenetelmää.

— Jos lainsäädännössä edellytetään, että rehualan toimija noudattaa tätä asetusta pakollisen laadunvarmistusmenettelynsä puitteissa, rehualan toimija voi toiminnallisia ominaisuuksia huomioon ottaakseen poiketa tässä luvussa säädetyistä määrällisistä vaatimuksista, jos rehualan toimija on toimivaltaista viranomaista tyydyttävällä tavalla osoittanut näytteenottomenettelyn vastaavuuden edustavuuden osalta ja jos toimivaltainen viranomainen on antanut siihen luvan.

— Jos edellä kuvattua näytteenottomenetelmää ei poikkeustapauksissa ole mahdollista määrällisten vaatimusten osalta soveltaa ilman erälle aiheutuvaa kaupallista vahinkoa (esimerkiksi pakkausmuotojen tai kuljetus- tai varastointitapojen vuoksi), joka ei ole hyväksyttävissä, voidaan soveltaa vaihtoehtoista näytteenottomenetelmää edellyttäen, että se on mahdollisimman edustava sekä tarkkaan kuvattu ja dokumentoitu.

5.1 Osanäytteitä koskevat määrälliset vaatimukset sellaisten ainesosien tai tuotteiden valvonnan osalta, jotka ovat tasaisesti jakautuneina rehussa

5.1.1 Kiinteä irtorehu

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu osanäytteiden lukumäärä:
≤ 2,5 tonnia	7
> 2,5 tonnia	$\sqrt{20 \times \text{tutkittavan erän tonnimäärä (*)}$, kuitenkin enintään 40 osanäytettä

(*) Jos saatu luku ei ole kokonaisluku, se pyöristetään ylöspäin lähimpään kokonaislukuun.

▼ M3

5.1.2 *Nestemäinen irtorehu*

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu osanäytteiden lukumäärä:
≤ 2,5 tonnia tai ≤ 2 500 litraa	4 (*)
> 2,5 tonnia tai > 2 500 litraa	7 (*)

(*) Jos nestettä ei saada homogeeniseksi, osanäytteiden lukumäärää on korotettava.

5.1.3 *Pakattu rehu*

Rehu (kiinteä ja nestemäinen) voidaan pakata pusseihin, säkkeihin, tölkeihin, tynnyreihin jne., joihin viitataan taulukossa yksikköinä. Näytteet suurista yksiköistä (≥ 500 kiloa tai litraa) on otettava irtorehua koskevien säännösten mukaisesti (katso 5.1.1 ja 5.1.2. kohta).

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu yksiköiden lukumäärä, joista on otettava (vähintään) yksi osanäyte (*)
1–20 yksikköä	1 yksikkö (**)
21–150 yksikköä	3 yksikköä (**)
151–400 yksikköä	5 yksikköä (**)
> 400 yksikköä	¼ sellaisten yksiköiden √ lukumäärästä, joista tutkittava erä koostuu (***), kuitenkin enintään 40 yksikköä

(*) Jos yksikön avaaminen saattaa vaikuttaa analyysiin (esim. herkästi pilaantuvat kosteat rehut), osanäyte on avaamaton yksikkö.

(**) Jos yksikön sisällön paino on enintään 1 kilo tai yksi litra, osanäyte on yhden alkuperäisyksikön sisältö.

(***) Jos saatu luku ei ole kokonaisluku, se pyöristetään ylöspäin lähimpään kokonaislukuun.

5.1.4 *Rehukakut ja nuolukivet*

Näyte on otettava vähintään yhdestä rehukakusta tai yhdestä nuolukivestä tutkittavan erän jokaista 25 yksikköä kohti, kuitenkin enintään 4 rehukakusta tai nuolukivistä.

Jos rehukakun tai nuolukiven paino on enintään yksi kilo, osanäyte on yhden rehukakun tai yhden nuolukiven sisältö.

5.1.5 *Karkearehu/nurmirehu*

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu osanäytteiden lukumäärä (*)
≤ 5 tonnia	5
> 5 tonnia	√ 5 x tutkittavan erän tonnimäärä (**), kuitenkin enintään 40 osanäytettä

(*) Jos vaadittuja osanäytteitä ei ole mahdollista ottaa tietyissä tilanteissa (esim. säilörehu) aiheuttamatta sellaista vahinkoa erälle, jota ei voida hyväksyä, niin näissä tapauksissa voidaan soveltaa vaihtoehtoista näytteenottomenetelmää. Ohjeet tällaisten erien näytteenottoa varten laaditaan ennen tämän asetuksen soveltamisen voimaantuloa.

(**) Jos saatu luku ei ole kokonaisluku, se pyöristetään ylöspäin lähimpään kokonaislukuun.

▼ **M3****5.2 Osanäytteitä koskevat määrälliset vaatimukset sellaisten ainesosien tai tuotteiden valvonnan osalta, jotka todennäköisesti ovat epätasaisesti jakautuneina rehussa**

Näitä osanäytteitä koskevia määrällisiä vaatimuksia käytetään seuraavissa tilanteissa:

— rehuaineiden sisältämien aflatoksiinien, torajyvän, muiden mykotoksiinien ja haitallisten kasvipööräisten epäpuhtauksien valvonta

— ainesosan, mukaan lukien muuntogeeninen aines, tai sellaisen aineen, jonka odotetaan olevan epätasaisesti jakautuneena rehussa, ristikon-taminaation valvonta.

Jos valvontaviranomaisella on vahva epäily siitä, että tällaista epätasaista jakautumista tapahtuu myös rehuseoksen sisältämän ainesosan tai aineen ristikontaminaatiotapauksessa, voidaan soveltaa jäljempänä olevassa taulukossa olevia määrällisiä vaatimuksia.

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu osanäytteiden lukumäärä:
< 80 tonnia	Katso 5.1 kohdan määrälliset vaatimukset. Otettavien osanäytteiden lukumäärä on kerrottava 2,5:llä.
≥ 80 tonnia	100

5.3 Osanäytteitä koskevat määrälliset vaatimukset hyvin suurten erien osalta

Jos kyseessä ovat suuret tutkittavat erät (tutkittavat erät > 500 tonnia), otettavien osanäytteiden lukumäärä = 40 osanäytettä + $\sqrt{\text{tonnia}}$ sellaisten aineiden tai tuotteiden valvonnan osalta, jotka ovat tasaisesti jakautuneina rehussa tai 100 osanäytettä + $\sqrt{\text{tonnia}}$ sellaisten ainesosien tai aineiden valvonnan osalta, jotka ovat todennäköisesti epätasaisesti jakautuneina rehuaineissa.

6. KOKOONÄYTETTÄ KOSKEVAT MÄÄRÄLLISET VAATIMUKSET

Tutkittavaa erää kohti riittää yksi kokoonnäyte.

	Rehujen tyyppi	Kokoonnäytteen vähimmäiskoko (*) (**)
6.1	Irtorehu	4 kg
6.2	Pakattu rehu	4 kg (***)

▼ M3

Tutkittavaa erää kohti riittää yksi kokoomanäyte.

	Rehujen tyyppi	Kokoomanäytteen vähimmäiskoko (*) (**)
6.3	Nestemäinen tai puolijuokseva rehu	4 litraa
6.4	Rehukakut ja nuolukivet:	
6.4.1	yksikköpaino yli 1 kg	4 kg
6.4.2	yksikköpaino enintään 1 kg	neljän alkuperäisen rehukakun tai nuolukiven paino
6.5	Karkearehu/nurmirehu	4 kg (****)

(*) Jos näytteenoton kohteena oleva rehu on arvokasta, kokoomanäytteen määrä voi olla pienempi, jos asia kuvataan ja dokumentoidaan näytteenottopöytäkirjassa.

(**) Rehun virallisessa valvonnassa käytettävistä näytteenotto- ja määritysmenetelmistä tutkittaessa sellaisen muuntogeenisen aineksen esiintymistä, jota koskeva lupamenettely on kesken tai jonka lupa ei ole enää voimassa, 24 päivänä kesäkuuta 2011 annetun komission asetuksen (EU) N:o 619/2011 (EUVL L 166, 25.6.2011, s. 9) säännösten mukaisesti muuntogeenisen aineksen esiintymisen valvomiseksi otetussa kokoomanäytteessä on oltava vähintään 35 000 siementä/jyvää. Näin ollen maissin osalta kokoomanäytteen koon on oltava vähintään 10,5 kg ja soijapavun osalta 7 kg. Muiden siementen ja jyvien, kuten ohran, hirssin, kauran, riisin, rukiin ja vehnän sekä rapsinsiementen osalta 4 kg:n kokoinen kokoomanäyte vastaa yli 35 000:ta siementä.

(***) Pakatun rehun osalta kokoomanäytteen 4 kg:n kokoa ei ehkä ole mahdollista saavuttaa johtuen yksittäisten yksiköiden koosta.

(****) Jos kyse on karkearehusta tai nurmirehusta, jonka ominaispaino on pieni (esim. heinä, olki), kokoomanäytteen koon on oltava vähintään 1 kg.

7. LOPULLISIA NÄYTTEITÄ KOSKEVAT MÄÄRÄLLISET VAATIMUKSET

Lopulliset näytteet

Analyysi tehdään vähintään yhdestä lopullisesta näytteestä. Analyysia varten valmistetun lopullisen näytteen määrän on oltava vähintään:

Kiinteä rehu	500 g (*) (**) (***)
Nestemäinen tai puolijuokseva rehu	500 ml (*)

(*) Asetuksen (EU) N:o 619/2011 säännösten mukaisesti muuntogeenisen aineksen esiintymisen valvomiseksi otetussa lopullisessa näytteessä on oltava vähintään 10 000 siementä/jyvää. Näin ollen maissin osalta lopullisen näytteen koon on oltava vähintään 3 000 g ja soijapavun osalta 2 000 g. Muiden siementen ja jyvien, kuten ohran, hirssin, kauran, riisin, rukiin ja vehnän sekä rapsinsiementen osalta 500 g:n kokoinen lopullinen näyte vastaa yli 10 000:ta siementä.

(**) Jos kokoomanäytteen koko on huomattavasti pienempi kuin 4 kiloa tai litraa (ks. alaviitteet, 6 kohta), lopullinen näyte voi olla myös pienempi, jos asia kuvataan ja dokumentoidaan näytteenottopöytäkirjassa.

(***) Jos näytteet otetaan palkokasveista, viljanjyvistä ja pähkinöistä torjunta-ainejäämien määrittämiseksi, lopullisen näytteen on oltava vähintään 1 kg komission direktiivin 2002/63/EY säännösten mukaisesti (EYVL L 187, 16.7.2002, s. 30).

▼ **M3**

8. NÄYTTEENOTTOMENETELMÄ ERITTÄIN SUURIA ERIÄ TAI SELLAISIA ERIÄ VARTEN, JOTKA VARASTOIDAAN TAI KULJETETAAN SITEN, ETTÄ NÄYTTEENOTTO KOKO ERÄSTÄ EI OLE TOTEUTETTAVISSA

8.1 **Yleiset periaatteet**

Jos erän kuljetus- tai varastointitapa on sellainen, ettei osanäytettä voida ottaa koko erästä, suositetaan näytteenotto tehtäväksi silloin kuin rehuerä on liikkeessä.

Jos kyse on suurista rehun varastointiin tarkoitetuista varastoista, toimijoita olisi rohkaistava asentamaan varastoon sellaiset laitteet, joilla on mahdollista ottaa näytteet (koneellinen näytteenottolaite) koko varastoidusta erästä.

Jos sovelletaan tässä 8 luvussa säädettyjä näytteenottomenetelmiä, rehualan toimijalle tai sen edustajalle on ilmoitettava näytteenottomenetelmästä. Jos rehualan toimija tai sen edustaja kyseenalaistaa tämän näytteenottomenetelmän, rehualan toimijan tai sen edustajan on annettava toimivaltaiselle viranomaiselle mahdollisuus ottaa näytteet koko erästä rehualan toimijan tai sen edustajan kustannuksella.

8.2 **Laivalla kuljetettavat suuret erät**

8.2.1 *Dynaaminen näytteenotto laivalla kuljetettavista suurista eristä*

Näytteenotto laivalla kuljetettavista suurista eristä suoritetaan mieluiten silloin, kun rehuerä on liikkeessä (dynaaminen näytteenotto).

Näytteenotto suoritetaan lastiruumakohtaisesti (yksikkö, joka voidaan erottaa fyysisesti). Lastiruumat tyhjennetään kuitenkin osittain yksi toisensa jälkeen siten, että alkuperäinen fyysinen erottelu ei enää varastotiloihin siirron jälkeen ole voimassa. Näytteenotto voidaan sen vuoksi suorittaa alkuperäisen fyysisen erottamisen mukaan tai varastotiloihin siirron jälkeisen erottamisen mukaan.

Laivan lastin purku voi kestää useita päiviä. Näytteenotto on yleensä suoritettava säännöllisin väliajoin koko purkamisen keston ajan. Virallisen tarkastajan läsnäolo näytteenotossa koko purkamisen keston ajan ei kuitenkaan välttämättä aina ole toteutettavissa tai tarkoituksenmukaista. Näytteet voidaan sen vuoksi ottaa koko erän (tutkittava erä) osasta. Osanäytteiden lukumäärä määritetään tutkittavan erän koon mukaan.

Jos näyte otetaan osasta samaan luokkaan kuuluvaa tai samaa kuvausta vastaavaa rehuerää ja on todettu, että kyseinen erän osa ei täytä EU:n vaatimuksia, on oletettava, että sama koskee koko rehuerää, ellei yksityiskohtaisesta arvioinnista ilmene, että ei ole mitään näyttöä siitä, että loppuosa erästä ei täyttäisi EU:n vaatimuksia.

Vaikka virallinen näyte otetaan automaattisesti, tarkastajan läsnäolo on tarpeen. Jos automaattisessa näytteenotossa käytetään kuitenkin ennalta asetettuja parametreja, joita ei voida muuttaa näytteenoton aikana ja jos osanäytteet kerätään sinetöityyn astiaan, joka estää mahdolliset väärinkäytökset, tarkastajan läsnäolo vaaditaan ainoastaan näytteenoton alussa, aina kun astia on tarpeen vaihtaa ja näytteenoton lopussa.

▼ **M3****8.2.2** *Staatin näytteenotto laivalla kuljetettavista eristä*

Jos näytteenotossa käytetään staattista tapaa, on sovellettava samaa menetelmää kuin ylhäältä käsin päästävien varastointitilojen (siilot) ollessa kyseessä (katso 8.4.1 kohta).

Näytteenotto on suoritettava erän/lastiruuman siitä osasta, johon on pääsy (yläpuolelta). Osanäytteiden lukumäärä määritetään tutkittavan erän koon mukaan. Jos näyte otetaan osasta samaan luokkaan kuuluvaa tai samaa kuvausta vastaavaa rehuerää ja on todettu, että kyseinen erän osa ei täytä EU:n vaatimuksia, on oletettava, että sama koskee koko rehuerää, ellei yksityiskohtaisesta arvioinnista ilmene, että ei ole mitään näyttöä siitä, että loppuosa erästä ei täyttäisi EU:n vaatimuksia.

8.3 **Näytteenotto varastoihin sijoitetuista suurista eristä**

Näytteenotto on suoritettava erän siitä osasta, johon on pääsy. Osanäytteiden lukumäärä määritetään tutkittavan erän koon mukaan. Jos näyte otetaan osasta samaan luokkaan kuuluvaa tai samaa kuvausta vastaavaa rehuerää ja on todettu, että kyseinen erän osa ei täytä EU:n vaatimuksia, on oletettava, että sama koskee koko rehuerää, ellei yksityiskohtaisesta arvioinnista ilmene, että ei ole mitään näyttöä siitä, että loppuosa erästä ei täyttäisi EU:n vaatimuksia.

8.4 **Näytteenotto varastotiloista (siilot)****8.4.1** *Näytteenotto siiloista, joihin on (helppo) pääsy yläpuolelta*

Näytteenotto on suoritettava erän siitä osasta, johon on pääsy. Osanäytteiden lukumäärä määritetään tutkittavan erän koon mukaan. Jos näyte otetaan osasta samaan luokkaan kuuluvaa tai samaa kuvausta vastaavaa rehuerää ja on todettu, että kyseinen erän osa ei täytä EU:n vaatimuksia, on oletettava, että sama koskee koko rehuerää, ellei yksityiskohtaisesta arvioinnista ilmene, että ei ole mitään näyttöä siitä, että loppuosa erästä ei täyttäisi EU:n vaatimuksia.

8.4.2 *Näytteenotto siiloista, joihin ei ole pääsyä yläpuolelta (suljetut siilot)***8.4.2.1** *Siilot, joihin ei ole pääsyä yläpuolelta (suljetut siilot) ja joiden koko on > 100 tonnia*

Tällaisiin siiloihin varastoiduista rehuista ei voida ottaa näytteitä staattisesti. Jos siilossa olevasta rehusta on otettava näyte, eikä lähetystä ole mahdollista siirtää, on sovittava toimijan kanssa siitä, että toimija ilmoittaa tarkastajalle, milloin siilo tyhjennetään, jotta näytteenotto voidaan suorittaa liikkuvasta rehusta.

8.4.2.2 *Siilot, joihin ei ole pääsyä yläpuolelta (suljetut siilot) ja joiden koko on < 100 tonnia*

Menettelyssä näyte otetaan kaatamalla 50–100 kilon suuruinen määrä astiaan, josta näyte otetaan. Kokoomanäytteen koko vastaa koko erää ja osanäytteiden lukumäärä liittyy siilosta astiaan näytteenottoa varten kaadettuun määrään. Jos näyte otetaan osasta samaan luokkaan kuuluvaa tai samaa kuvausta vastaavaa rehuerää ja on todettu, että kyseinen erän osa ei täytä EU:n vaatimuksia, on oletettava, että sama koskee koko rehuerää, ellei yksityiskohtaisesta arvioinnista ilmene, että ei ole mitään näyttöä siitä, että loppuosa erästä ei täyttäisi EU:n vaatimuksia.

▼ **M3****8.5 Näytteenotto suurissa suljetuissa säiliöissä olevasta irtorehusta**

Tällaisista eristä voidaan usein ottaa näytteet vain purkamisen yhteydessä. Joissakin tapauksissa, kun rehuerän purkua ei ole mahdollista suorittaa tuonti- ja tarkastuspaikassa, olisi näytteet otettava tällaisten säiliöiden purun yhteydessä.

9. NÄYTTEIDEN OTTAMISTA, VALMISTAMISTA JA PAKKAAMISTA KOSKEVAT OHJEET**9.1 Yleistä**

Näytteet on otettava ja valmistettava viipymättä noudattaen varotoimenpiteitä, joilla varmistetaan, ettei tuote muutu tai saastu. Kaikkien näytteiden kanssa kosketuksiin joutuvien välineiden sekä pintojen ja säiliöiden on oltava puhtaita ja kuivia.

9.2 Osanäytteet

Osanäytteet on otettava satunnaisesti koko tutkittavasta erästä, ja niiden on oltava suunnilleen samansuuruisia.

Osanäytteen koon on oltava vähintään 100 grammaa tai karkearehun/nurmirehun tapauksessa vähintään 25 grammaa johtuen tällaisen rehun pienestä ominaispainosta.

Jos 8 kohdassa vahvistetun näytteenottomenetelmän sääntöjen mukaisesti on otettava alle 40 osanäytettä, niin osanäytteiden koon on oltava suhteessa vaadittuun kokoomanäytteen vähimmäiskokoon (katso 6 kohta).

Jos kyse on pakattujen rehujen näytteenotosta pienistä eristä, jolloin määrällisten vaatimusten mukaan on otettava rajallinen määrä osanäytteitä, osanäyte on yhden alkuperäisen yksikön sisältö, joka ei ylitä yhtä kiloa tai yhtä litraa.

Jos kyse on pakattujen rehujen näytteenotosta pienistä yksiköistä (esim. < 250 g), niin osanäytteen koko riippuu yksikön koosta.

9.2.1 Irtorehu

Näytteenotto voidaan tarvittaessa tehdä rehuerää siirrettäessä (lastauksen tai purkamisen yhteydessä).

9.2.2 Pakattu rehu

Kun 5 luvun mukainen lukumäärä yksiköitä on valittu näytteenottoa varten, kunkin yksikön sisällöstä otetaan osa kairaa tai kauhaa käyttäen. Tarvittaessa näytteet otetaan vasta, kun yksiköt on erikseen tyhjennetty.

9.2.3 Homogeeniset ja homogenoituvat nestemäiset tai puolijuoksevat rehut

Kun 5 luvun mukainen lukumäärä yksiköitä on valittu näytteenottoa varten, sisältö on tarvittaessa homogenoitava ja vaadittava määrä näytettä otettava kustakin yksiköstä.

Osanäytteet voidaan ottaa myös sisältöä tyhjennettäessä.

▼ **M3****9.2.4 Nestemäiset tai puolijuoksevat rehut, joita ei voi homogenoida**

Kun 5 luvun mukainen lukumäärä yksiköitä on valittu näytteenottoa varten, on näytettä otettava rehun eri kerroksista.

Osanäytteet voidaan ottaa myös sisältöä tyhjennettäessä, kuitenkin siten, että ensimmäisiä fraktioita ei oteta talteen.

Kummassakin tapauksessa näytteen kokonaismäärän on oltava vähintään 10 litraa.

9.2.5 Rehukakut ja nuolukivet

Kun 5 luvun mukainen lukumäärä rehukakkuja tai nuolukiviä on valittu näytteenottoa varten, niin jokaisesta kakusta tai kivistä voidaan ottaa pala. Jos epäillään, että rehukakku tai nuolukivi on epähomogeeninen, näytteeksi voidaan ottaa koko rehukakku tai nuolukivi.

Jos rehukakun tai nuolukiven paino on enintään yksi kilo, niin osanäyte on yhden rehukakun tai yhden nuolukiven sisältö.

9.3 Kokoomanäytteen koostaminen

Kokoomanäyte muodostetaan sekoittamalla osanäytteet keskenään.

9.4 Lopullisen näytteen valmistaminen

Kokoomanäytteen sisältämä näytemateriaali on sekoitettava huolellisesti ⁽¹⁾.

— Kukin näyte laitetaan asianmukaiseen säiliöön/astiaan. On toteutettava kaikki tarvittavat varotoimenpiteet, jotta vältetään näytteen koostumuksen muuttuminen, saastuminen tai turmeltuminen kuljetuksen tai varastoinnin aikana.

— Jos kyse on rehuun tasaisesti jakautuneiden ainesosien tai aineiden valvonnasta, kokoomanäyte voidaan edustavasti supistaa vähintään 2,0 kiloon tai 2,0 litraan (supistettu näyte) ⁽²⁾ ensisijaisesti käyttämällä joko koneellista tai automaattista näytteenjakolaitetta. Jos valvotaan torjunta-ainejäämien esiintymistä palkokasveissa, viljanjyvissä ja pähkinöissä, supistetun näytteen vähimmäiskoko on 3 kiloa. Jos rehutyyppi on sellaista, että näytteenjakolaitetta ei voida käyttää tai laitetta ei ole käytettävissä, näyte voidaan supistaa neljännesmenetelmällä. Supistetuista näytteistä valmistetaan sen jälkeen lähes sama lukumäärä lopullisia näytteitä (valvontatoimenpiteitä, oikeusturvaa ja vertailua varten), jotka täyttävät 7 luvussa vahvistetut määrälliset vaatimukset. Jos kyse on sellaisten ainesosien, muuntogeeninen aines mukaan lukien, tai aineiden valvonnasta, jotka ovat todennäköisesti epätasaisesti jakautuneina rehuaineissa, kokoomanäytteen on oltava:

— täydellisesti homogenoitu ja jaettu jälkeensä lopullisiksi näytteiksi tai

— supistettu vähintään 2 kiloksi tai 2 litraksi ⁽³⁾ käyttämällä mekaanista tai automaattista näytteenjakolaitetta. Vain siinä tapauksessa, että rehutyyppi on sellainen, ettei näytteenjakolaitetta voida käyttää, näyte voidaan tarvittaessa supistaa neljännesmenetelmällä. Asetuksen (EU) N:o 619/2011 puitteissa suoritettavan muuntogeenisen aineksen esiintymisen valvontaa varten supistetussa näytteessä on oltava vähintään 35 000 siementä/jyvää, jotta olisi mahdollista ottaa vähintään 10 000 siemenen/jyvän lopulliset näytteet valvontatoimenpiteitä, puolustautumista ja vertailua varten (katso 6 luvun alaviite ^(**) ja 7 luvun alaviite ^(*)).

⁽¹⁾ Kaikki kokkareet on hienonnettava (tarvittaessa ottamalla ne erilleen näytteestä ja paneamalla ne hienonnettuna näytteeseen takaisin).

⁽²⁾ Paitsi jos kyse on karkearehusta tai nurmirehusta, jonka ominaispaino on pieni.

⁽³⁾ Paitsi jos kyse on karkearehusta tai nurmirehusta, jonka ominaispaino on pieni.

▼ M3**9.5 Näytteiden pakkaaminen**

Säiliöt tai pakkaukset sinetöidään ja varustetaan etiketillä siten, ettei niitä voi avata vahingoittamatta sinettiä. Koko etiketin on oltava suljettu sinetillä.

9.6 Näytteiden toimittaminen laboratorioon

Näyte lähetetään viipymättä nimettyyn viralliseen laboratorioon yhdessä analyysin suorittajan tarvitsemien tietojen kanssa.

10. NÄYTTEENOTTOPÖYTÄKIRJA

Jokaisesta näytteenotosta on laadittava näytteenottopöytäkirja, josta jokainen tutkittava erä ja sen määrä voidaan yksiselitteisesti tunnistaa.

Näytteenottopöytäkirjassa on mainittava myös mahdolliset poikkeamat tässä asetuksessa säädetyistä näytteenottomenettelyistä.

Sen lisäksi, että näytteenottopöytäkirja toimitetaan virallisen tutkimuslaboratorion saataville, se toimitetaan rehualan toimijan saataville ja/tai rehualan toimijan nimeämän laboratorion saataville.

▼ **M3***LIITE II***REHUIEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ KOSKEVAT YLEISET SÄÄNNÖKSET****A. NÄYTTEIDEN VALMISTAMINEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN****1. Tarkoitus**

Seuraavassa esitettävät menetelmät koskevat näytteiden valmistusta määrittystä varten; näytteet lähetetään tutkimuslaboratorioihin sen jälkeen, kun ne on otettu liitteessä I vahvistettujen säännösten mukaisesti.

Laboratorionäytteet on valmistettava siten, että määrittysmenetelmää varten punnittava määrä näytettä on homogeeninen ja edustaa tutkittavaa lopullista näytettä.

2. Varotoimenpiteet

Näytteen valmistuksessa noudatettava menettely riippuu käytettävistä määrittysmenetelmistä ja valvonnan kohteena olevista ainesosista tai aineista. Tästä syystä on olennaisen tärkeää varmistaa, että näytteiden esikäsittely on käytettävien määrittysmenetelmien ja valvonnan kohteena olevien ainesosien tai aineiden kannalta asianmukainen.

Kaikki toimenpiteet on suoritettava siten, että vältetään mahdollisimman hyvin näytteen saastuminen ja sen koostumuksen muuttuminen.

Näyte on jauhettava, sekoitettava ja seulottava viipymättä siten, että se altistuu ilmalle ja valolle mahdollisimman vähän. Sellaisia myllyjä ja jauhatuslaitteita, joissa näytteen huomattava lämpeneminen on todennäköistä, ei pidä käyttää.

On suositeltavaa jauhaa erityisen lämmönarat rehut käsin. Lisäksi on huolehdittava siitä, ettei itse välineistö ole kontaminaation lähde.

Jos näytettä ei voida valmistaa ilman, että sen kosteuspitoisuus muuttuu merkittävästi, on kosteuspitoisuus määritettävä ennen valmistusta ja sen jälkeen liitteessä III olevassa A osassa säädetyin menetelmän mukaisesti.

3. Menettely**3.1 Yleinen menettely**

Näyte määrittysmenetelmää varten otetaan lopullisesta näytteestä. Kartiomurskaimen ja neljännesmenetelmän käyttöä ei suositella, koska ne saattavat aiheuttaa suuren jakovirheriskin.

3.1.1 Sellaisenaan jauhettavat rehut

— Seulottu lopullinen näyte sekoitetaan ja kerätään tarkoituksenmukaiseen puhtaaseen, kuivaan ja ilmatiiviisti suljettavaan säiliöön. Näyte sekoitetaan uudelleen täydellisen homogeenoinnin varmistamiseksi välittömästi ennen määrittysmenetelmää varten tehtävää näytteen punnitsemista.

3.1.2 Kuivauksen jälkeen jauhettavat rehut

— Jollei määrittysmenetelmissä toisin mainita, lopullinen näyte kuivataan kosteuspitoisuuteen 8–12 % käyttäen esikuivatusmenetelmää, joka esitetään liitteessä III olevan A osan 4.3 kohdassa kuvatun kosteudenmäärittysmenetelmän yhteydessä. Tämän jälkeen käsittelyä jatketaan edellä 3.1.1 jaksossa esitetyllä tavalla.

▼ **M3**

3.1.3 Nestemäiset tai puolijuoksevat rehut

- Lopullinen näyte kerätään sopivaan puhtaaseen, kuivaan ja ilmatii-
viisti suljettavaan säiliöön. Näyte sekoitetaan perusteellisesti täydellisen homogenoinnin varmistamiseksi välittömästi ennen määritystä varten tehtävää määräosan punnitsemista.

3.1.4 Muut rehut

- Jos lopullista näytettä ei voida valmistaa jollain edellä esitetyllä tavalla, se on valmistettava sellaisella tavalla, jolla varmistetaan, että määritysmenetelmää varten punnitut näytteet ovat homogeenisia ja edustavat lopullisia näytteitä.

3.2 *Erityismenettely, jos kyse on visuaalisesta tarkastuksesta tai mikroskooppitutkimuksesta tai jos koko kokoomanäyte homogenoidaan*

- Jos kyse on visuaalisesta tarkastuksesta (ilman mikroskooppia), niin tutkitaan laboratorionäyte kokonaisuudessaan.
- Jos kyse on mikroskooppitutkimuksesta, laboratorio saa supistaa kokoomanäytettä tai siitä supistettua näytettä edelleen. Lopulliset näytteet toimijan oikeusturvan takaamiseksi ja vertailumittauksia varten otetaan samalla näytteenjakomenettelyllä kuin otetaan vastaavasti lopullinen näyte valvontatoimenpiteitä varten.
- Jos koko kokoomanäyte homogenisoidaan, lopulliset näytteet otetaan homogenoidusta kokoomanäytteestä.

4. **Näytteiden säilytys**

Näytteet on säilytettävä lämpötilassa, jossa niiden koostumus ei muutu. Vitamiinien tai valolle erityisen herkkien aineiden määrittämiseen tarkoitettuja näytteitä on varastoitava olosuhteissa, joissa valo ei pääse vaikuttamaan niihin haitallisesti.

B. MÄÄRITYSMENETELMISSÄ KÄYTETTÄVIÄ REAGENSSEJA JA VÄLINEITÄ KOSKEVAT SÄÄNNÖKSET

1. Jollei määritysmenetelmissä toisin mainita, kaikkien reagenssien on oltava analyysilaatua (p.a.). Hivenainejäämiä määritettäessä reagenssien puhtaus on tarkistettava nollanäytteellä. Saatujen tuloksien mukaan voi reagenssien lisäpuhdistus olla tarpeen.
2. Määritysmenetelmän työvaiheissa, joihin liittyy liuosten valmistusta, laimennusta, huuhtelua tai pesua ja joissa käytettävän liuottimen tai laimennusliuoksen laatua ei ole mainittu, on käytettävä vettä. Pääsääntöisesti tämän veden on oltava demineralisoitua tai tislattua. Tietyissä erityistapauksissa, jotka on mainittu määritysmenetelmissä, on vesi puhdistettava erityisillä puhdistusmenetelmillä.
3. Tutkimuslaboratorioissa käytettävistä välineistä määritysmenetelmissä mainitaan ainoastaan erikoisinstrumentit ja -välineet tai erityiskäyttöön tarkoitettut instrumentit ja välineet. Niiden on oltava puhtaita etenkin määritettäessä hyvin pieniä ainemääriä.

▼ **M3****C. MÄÄRITYSMENETELMIEN KÄYTTÖ JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN****1. Uttomenettely**

Useat menetelmät edellyttävät erityistä uuttomenetelmää. Pääsääntöisesti voidaan soveltaa myös muita uuttomenettelyjä kuin menetelmän kuvauksessa tarkoitettu menettely, jos voidaan osoittaa, että käytetyn menetelyn uuttoteho on analysoitavan materiaalin osalta samantasoinen kuin menetelmässä kuvatun menettelyn uuttoteho.

2. Puhdistusmenettely

Useat menetelmät edellyttävät erityistä puhdistusmenettelyä. Pääsääntöisesti voidaan soveltaa myös muita puhdistusmenettelyjä kuin menetelmän kuvauksessa tarkoitettu menettely, jos voidaan osoittaa, että käytetty puhdistusmenettely johtaa tutkittavaa materiaalia analysoitaessa analyysituloksiin, jotka vastaavat menetelmässä mainittua menettelyä käytettäessä saatuja tuloksia.

3. Määritysten lukumäärä

Jos haitallisten aineiden määrittämisessä ensimmäisen määrittäksen tulos on merkittävästi (> 50 %) valvottavaa arvoa alempi, lisämäärittäykset eivät ole tarpeen edellyttäen, että asianmukaisia laatumenettelyjä on sovellettu. Muissa tapauksissa rinnakkaismäärittäminen (toinen määrittäminen) on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikontaminaatio tai näytteen sekoittuminen vahingossa. Sääntöjenmukaisuuden varmistamiseen käytetään näiden kahden määrittäksen keskiarvoa, mittausepävarmuus huomioon ottaen.

Jos kyse on aineen tai ainesosan ilmoitetun pitoisuuden valvonnasta ja jos ensimmäisen määrittäksen tulos vahvistaa ilmoitetun pitoisuuden eli määrittäksen tulos on ilmoitetun pitoisuuden hyväksyttävällä vaihteluvälillä, lisämäärittäykset eivät ole tarpeen edellyttäen, että asianmukaisia laatumenettelyjä on sovellettu. Muissa tapauksissa kaksoismäärittäminen (toinen määrittäminen) on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikontaminaatio tai näytteen sekoittuminen vahingossa. Sääntöjenmukaisuuden varmistamiseen käytetään näiden kahden määrittäksen keskiarvoa, mittausepävarmuus huomioon ottaen.

Joissain tapauksissa hyväksyttävä vaihteluväli määritellään lainsäädännössä, esimerkiksi rehun markkinoille saattamisesta ja käytöstä, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1831/2003 muuttamisesta sekä neuvoston direktiivin 79/373/ETY, komission direktiivin 80/511/ETY, neuvoston direktiivien 82/471/ETY, 83/228/ETY, 93/74/ETY, 93/113/ETY ja 96/25/ETY ja komission päätöksen 2004/217/EY kumoamisesta 13 päivänä heinäkuuta 2009 annetussa Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 767/2009 ⁽¹⁾.

4. Käytetyn määrittäsmenetelmän ilmoittaminen

Tutkimustodistuksessa on mainittava käytetty määrittäsmenetelmä.

5. Määrittäystuloksen ilmoittaminen

Analyysitulokset on ilmaistava määrittäsmenetelmässä vahvistetulla tavalla asianmukaisella merkitsevien numeroiden tarkkuudella, ja tulos on tarvittaessa korjattava sen mukaan, mikä lopullisen näytteen kosteuspitoisuus oli ennen näytteen valmistamista.

⁽¹⁾ EUVL L 229, 1.9.2009, s. 1.

▼ **M3****6. Mittausepävarmuus ja saanto haitallisten aineiden määrittämisessä**

Direktiivissä 2002/32/EY tarkoitettujen haitallisten aineiden ollessa kyseessä eläinten rehuksi tarkoitettua tuotetta ei pidetä vahvistetun enimmäispitoisuuden mukaisena, kun kyse on kosteuspitoisuudeltaan 12 prosentin rehusta, jos analyysituloksen katsotaan ylittävän enimmäispitoisuuden, kun otetaan huomioon laajennettu mittausepävarmuus ja korjaus saannon suhteen. Vaatimustenmukaisuuden arvioinnissa käytetään määritettyä pitoisuutta, joka on korjattu saannon suhteen ja josta on vähennetty laajennettu mittausepävarmuus. Tätä menettelyä sovelletaan ainoastaan silloin, kun määritysmenetelmässä voidaan arvioida mittausepävarmuus ja korjata tulos saannon suhteen (esimerkiksi mikroskooppitutkimuksessa tämä ei ole mahdollista).

Analyysitulos on esitettävä seuraavalla tavalla (sikäli kuin käytetty määritysmenetelmän mittausepävarmuus voidaan arvioida ja tulos korjata saannon suhteen):

- a) saannon suhteen korjattuna, saantoaste ilmoitetaan. Korjaus saannon suhteen ei ole tarpeen, jos saantoaste on 90–110 prosenttia.
- b) muodossa $x \pm U$, jossa x on analyysitulos ja U on mittaukseen liittyvä laajennettu epävarmuus, käyttäen kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 prosenttia.

Jos analyysitulos on kuitenkin merkittävästi ($> 50\%$) valvottavaa arvoa alempi ja edellyttäen, että asianmukaisia laatumenettelyjä on sovellettu ja määrittäksen ainoana tarkoituksena on todeta säännösten noudattaminen, analyysitulos voidaan ilmoittaa ilman korjausta saannon suhteen, ja saantoaste ja mittausepävarmuus voidaan näissä tapauksissa jättää pois.



LIITE III

REHUAINEIDEN JA REHUSEOSTEN KOOSTUMUKSEN VALVONNASSA KÄYTETTÄVÄT MÄÄRITYSMENETELMÄT

A. KOSTEUDEN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää rehun kosteuspitoisuus. Jos rehu sisältää haihtuvia aineita, kuten orgaanisia happoja, on huolehdittava siitä, että kosteuspitoisuuden kanssa määritetään myös merkittäviä määriä haihtuvia aineita.

Menetelmä ei koske suoraan rehuina käytettäviä maitotuotteita, kivennäisaineita ja pääasiassa kivennäisaineista koostuvia seoksia, eläin- ja kasvirasvoja ja -öljyjä tai öljysiemeniä ja öljypitoisia hedelmiä.

2. Periaate

Näyte kuivataan määrättyissä olosuhteissa, jotka vaihtelevat rehun laadun mukaan. Painohäviö määritetään punnitsemalla. Hyvin kosteat, kiinteät rehunäytteet on syytä esikuivata ennen varsinaista kosteusmäärittystä.

3. Välineistö

- 3.1 Kosteutta imemättömästä materiaalista valmistettu mylly, joka on helppo puhdistaa ja jolla saadaan aikaan nopea, tasainen jauhautuminen mutta jolla vältetään havaittavissa oleva kuumentuminen ja ulkopuolisen ilman vaikutus mahdollisimman hyvin ja joka on 4.1.1 ja 4.1.2 kohdassa säädettyjen vaatimusten mukainen (esimerkiksi vasara- tai vesijäähdytteiset pienoismyllyt, kartiomyllyt, hitaasti liikkuvat tai hammaspyörillä varustetut hienonnnuslaitteet).
- 3.2 Analyysivaaka, jonka tarkkuus on 1 mg.
- 3.3 Lasisia tai korroosionkestävästä metallista valmistettuja kuivausastioita, jotka voidaan sulkea ilmatiiviisti kannella; astian tilavuuden on oltava sellainen, että näytettä voidaan levittää sille noin 0,3 g/cm².
- 3.4 Sähkölämmitteinen, tasalämpöinen ja nopeasti säädettävissä oleva lämpökaappi (± 2 °C), jossa on tuuletusjärjestelmä⁽¹⁾.
- 3.5 Säädettävä sähkölämmitteinen vakuumlämpökaappi, jossa on öljypumppu ja johon voidaan johtaa kuumaa, kuivaa ilmaa tai jossa voidaan käyttää kuivausainetta (kuten kalsiumoksidia).
- 3.6 Eksikkaattori, jossa on paksu rei'itetty metalli- tai posliinilevy ja joka sisältää tehokasta kuivausainetta.

4. Menettely

Huomautus: Tässä jaksossa kuvatut toimenpiteet on suoritettava välittömästi näytelähetyksen avaamisen jälkeen. Määritykset on suoritettava ainakin kahtena rinnakkaismäärittysenä.

⁽¹⁾ Viljan, jauhojen, suurimoiden ja rouheiden kuivaamiseen lämpökaapin lämpökapasiteetin on oltava sellainen, että 13 °C:seen etukäteen säädettynä kaapin lämpötila palautuu ennalleen alle 45 minuutissa sen jälkeen, kun siellä on samanaikaisesti suurin mahdollinen määrä näytteitä. Kaapin tuuletuksen on oltava sellainen, että kun siinä kahden tunnin ajan kuivataan niin monta vehnänäytettä kuin sinne mahtuu, tulokset eroavat neljän tunnin ajan suoritettujen kuivauksen tuloksista alle 0,15 %.

▼B**4.1 Valmistaminen****4.1.1 Muut kuin 4.1.2 ja 4.1.3 kohdassa tarkoitettut rehut**

Punnitaan vähintään 50 g näytettä. Tarvittaessa se jauhetaan tai jaetaan sopivalla tavalla kosteuspitoisuuden muuttumista välttämiseksi (ks. 6 kohta).

4.1.2 Vilja ja suurimot

Punnitaan vähintään 50 g näytettä. Se jauhetaan niin hienoksi, että vähintään 50 % näytteestä läpäisee seulan, jonka reikien koko 0,5 mm, eikä 1 mm:n pyöreäreikäistä seulaa jää läpäisemättä yli 10 % näytteestä.

4.1.3 Nestemäiset ja liisterimäiset rehut sekä pääasiassa öljyistä ja rasvoista koostuvat rehut

Punnitaan noin 25 g näytettä 10 mg:n tarkkuudella, lisätään sopiva määrä 10 mg:n tarkkuudella punnittua vedetöntä hiekkaa ja sekoitetaan kunnes saadaan homogeeninen seos.

4.2 Kuivaus**4.2.1 Muut kuin 4.2.2 ja 4.2.3 kohdassa tarkoitettut rehut**

Näyteastia (3.3) punnitaan kansineen 1 mg:n tarkkuudella. Siihen punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 5 g hienonnettua näytettä, joka levitetään tasaisesti. Astia asetetaan ilman kantta 103 °C:ssa olevaan lämpökaappiin. Kaapin lämpötilan tarpeettoman laskun välttämiseksi astia vietään sen sisään mahdollisimman nopeasti. Annetaan kuivua neljän tunnin ajan laskettuna siitä hetkestä, kun lämpökaapin lämpötila on uudelleen saavuttanut 103 °C. Astia suljetaan kannella, otetaan pois lämpökaapista, annetaan jäähtyä 30–45 minuuttia eksikkaattorissa (3.6) ja punnitaan 1 mg:n tarkkuudella.

Pääasiassa öljyistä ja rasvoista koostuvia rehuja kuivataan lämpökaapissa 130 °C:ssa vielä 30 minuutin ajan. Kahden punnituksen välinen ero ei saa olla suurempi kuin 0,1 % kosteudesta.

4.2.2 Vilja, jauhot, suurimot ja rouheet

Näyteastia (3.3) punnitaan kansineen 0,5 mg:n tarkkuudella. Siihen punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 5 g hienonnettua näytettä, joka levitetään tasaisesti. Astia asetetaan ilman kantta 130 °C:ssa olevaan lämpökaappiin. Kaapin lämpötilan tarpeettoman laskun välttämiseksi astia vietään sen sisään mahdollisimman nopeasti. Annetaan kuivua kahden tunnin ajan laskettuna siitä hetkestä, kun lämpökaapin lämpötila on uudelleen saavuttanut 130 °C. Astia suljetaan kannella, otetaan pois lämpökaapista, annetaan jäähtyä 30–45 minuuttia eksikkaattorissa (3.6) ja punnitaan 1 mg:n tarkkuudella.

4.2.3 Rehuseokset, jotka sisältävät yli 4 % sakkaroosia tai laktoosia: rehuaineet, kuten johanneksenleipäpuun palot, hydrolysoidut viljatuotteet, maltaat, kuivatut juurikasleikkeet, kala ja liukoisia sokereita sisältävät rehut; rehuseokset, jotka sisältävät yli 25 % mineraalisuoloja kidevesi mukaan luettuna.

Näyteastia (3.3) punnitaan kansineen 0,5 mg:n tarkkuudella. Siihen punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 5 g hienonnettua näytettä, joka levitetään tasaisesti. Astia asetetaan ilman kantta vakuumlämpökaappiin (3.5), joka on kuumennettu 80–85 °C:seen. Kaapin lämpötilan tarpeettoman laskun välttämiseksi astia vietään sen sisään mahdollisimman nopeasti.

Paine säädetään 100 torriksi ja annetaan kuivua vielä neljän tunnin ajan tässä paineessa joko kuumassa, kuivassa ilmavirrassa tai kuivausainetta käyttäen (noin 300 g 20:tä näytettä kohden). Jälkimmäisessä tapauksessa vakuumpumppu kytketään pois päältä, kun vaadittu paine on saavutettu. Kuivausaika lasketaan siitä hetkestä, kun lämpökaapin lämpötila on uudelleen saavuttanut 80–85 °C. Kuivausajan päätyttyä lämpökaapin paine

▼B

palautetaan varovasti normaalipaineeseen. Lämpökaappi avataan, näyteastia suljetaan välittömästi kannella, otetaan pois lämpökaapista, annetaan jäähtyä 30–45 minuuttia eksikkaattorissa (3.6) ja punnitaan 1 mg:n tarkkuudella. Näytteen annetaan kuivua vielä 30 minuuttia vakuuillämpökaapissa 80–85 °C:ssa ja se punnitaan uudelleen. Kahden punnituksen välinen ero ei saa ylittää 0,1 %:a kosteudesta.

4.3 *Esikuivaus*

4.3.1 Muut kuin 4.3.2 kohdassa tarkoitetut rehut

Kiinteille, vaikeasti jauhettaville rehunäytteille, joiden kosteuspitoisuus on suuri, suoritetaan esikuivaus seuraavasti:

Punnitaan 50 g *hienontamatonta* näytettä (puristetut tai kokkareina olevat rehut voidaan tarvittaessa hienontaa karkeiksi) 10 mg:n tarkkuudella sopivaan astiaan (esim. 0,5 cm:n reunalla varustettu 20 x 12 cm:n alumiiniastia). Annetaan kuivua lämpökaapissa 60–70 °C:ssa, kunnes kosteuspitoisuus on laskenut 8–12 prosenttiin. Näyteastia otetaan pois lämpökaapista, annetaan jäähtyä avoimena laboratorioissa tunnin ajan ja punnitaan 10 mg:n tarkkuudella. Näyte jauhetaan välittömästi 4.1.1 kohdassa esitetyllä tavalla ja kuivataan rehutyyppin mukaan 4.2.1 tai 4.2.3 kohdassa esitetyllä tavalla.

4.3.2 *Viljat*

Jyvät, joiden kosteuspitoisuus on yli 17 %, on esikuivattava seuraavasti:

Punnitaan 50 g *jauhamattomia* jyviä 10 mg:n tarkkuudella sopivaan astiaan (esim. 0,5 cm:n reunalla varustettu 20 x 12 cm:n alumiiniastia). Annetaan kuivua lämpökaapissa 130 °C:ssa 5–7 minuuttia. Astia poistetaan lämpökaapista, annetaan jäähtyä avoimena laboratorioissa 2 tunnin ajan ja punnitaan 10 mg:n tarkkuudella. Jyvät jauhetaan välittömästi 4.1.2 kohdassa esitetyllä tavalla ja kuivataan 4.2.2 kohdan mukaisesti.

5. **Tulosten laskeminen**

Kosteuspitoisuus (X), joka ilmoitetaan prosentteina näytteestä, lasketaan käyttäen seuraavia kaavoja:

5.1 *Kosteuspitoisuus ilman esikuivausta*

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

jossa:

m = näytteen alkuperäinen paino grammoina,
 m_0 = näytteen paino grammoina kuivauksen jälkeen.

5.2 *Kosteuspitoisuus esikuivausta käyttäen*

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

jossa:

m = näytteen alkuperäinen paino grammoina,
 m_1 = näytteen paino grammoina esikuivauksen jälkeen,
 m_2 = näytteen paino grammoina hienontamisen tai jauhamisen jälkeen,
 m_0 = näytteen paino grammoina kuivauksen jälkeen.

▼B**5.3 Toistettavuus**

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärittelyn tulosten välinen ero ei saa olla suurempi kuin 0,2 % kosteuden absoluuttisesta arvosta.

6. Huomautus

Jos jauhaminen on tarpeen ja sen havaitaan muuttavan tuotteen kosteuspitoisuutta, rehun komponenttien määrittystulokset on korjattava alkuperäisen näytteen kosteuspitoisuuden perusteella.

B. ELÄIN- JA KASVIRASVOJEN JA ÖLJYJEN KOSTEUDEN MÄÄRITYS**1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää eläin- ja kasvirasvojen ja öljyjen vesipitoisuus ja haihtuvien aineiden pitoisuus.

2. Periaate

Näyte kuivataan vakiopainoon 103 °C:ssa (kahden peräkkäisen punnituksen välisen painoeron on oltava alle 1 mg). Painohäviö määritetään punnitsemalla.

3. Välineistö

3.1 Korroosionkestävästä materiaalista valmistettu tasapohjainen astia, jonka läpimitta on 8–9 cm ja jonka korkeus on noin 3 cm.

3.2 Lämpömittari, jossa on vahvistettu säiliö ja yläpäässä oleva paisunta-putki ja joka on varustettu asteikolla noin 80 °C:sta ainakin 110 °C:seen ja jonka pituus on noin 10 cm.

3.3 Hiekkahaude tai sähkölevy.

3.4 Eksikkaattori, jossa on tehokasta kuivausainetta.

3.5 Analyysivaaka.

4. Menettely

Punnitaan mg:n tarkkuudella noin 20 g homogenisoitua näytettä kuivaan punnittuun astiaan (3.1), jossa on lämpömittari (3.2). Näytettä kuumennetaan hiekkahauteella tai sähkölevyllä (3.3), sekoittaen jatkuvasti lämpömittarilla niin, että lämpötila saavuttaa 90 °C:n noin 7 minuutissa.

Lämpöä vähennetään pitäen silmällä lautasen pohjasta nousevien kuplien syntymisnopeutta. Lämpötila ei saa nousta yli 105 °C:n. Sekoitusta jatketaan astian pohjaa raaputtaen, kunnes kuplien muodostus lakkaa.

Kosteuden täydellisen poistumisen varmistamiseksi kuumennetaan useita kertoja 103 ± 2 °C:seen jäähdyttäen peräkkäisten kuumennusten välillä 93 °C:seen. Sen jälkeen astian sisältöineen annetaan jäähtyä huoneen lämpötilaan eksikkaattorissa (3.4) ja punnitaan. Tämä menettely toistetaan niin monta kertaa, että kahden peräkkäisen punnituksen välinen ero ei ole yli 2 mg:aa.

Huomautus: Näytteen painon kasvu toistettujen kuumennusten jälkeen viittaa rasvan hapettumiseen, ja tällaisessa tapauksessa tulos lasketaan siitä punnituksesta, joka on tehty välittömästi ennen kuin paino on alkanut kasvaa.

5. Tulosten laskeminen

Kosteuspitoisuus (*X*), joka ilmoitetaan prosentteina näytteestä, saadaan seuraavasta kaavasta:

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

▼B

joissa:

m = näytteen paino grammoina,

m_1 = astian paino sisältöineen grammoina ennen kuumennusta,

m_2 = astian paino sisältöineen grammoina kuumennuksen jälkeen.

Tulokset, jotka ovat pienempiä kuin 0,05 %, on varustettava merkinnällä ”alle 0,05 %”.

Toistettavuus

Samasta näytteestä suoritettujen kahden samanaikaisen rinnakkaismäärityksen ero ei saa absoluuttisena arvona ilmoitettuna olla yli 0,05 %.

C. RAAKAVALKUAISPITOISUUDEN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan laskea Kjeldahlin menetelmän mukaan saadusta typpipitoisuudesta rehujen raakavalkuaispitoisuus.

2. Periaate

Näyte hajotetaan rikkihapolla katalysaattorin läsnä ollessa. Hapan liuos tehdään emäksiseksi natriumhydroksidiliuoksella. Ammoniakki tislataan ja kerätään mitattuun määrään rikkihappoa, ja ylimääräinen rikkihappo titrataan natriumhydroksidin standardiliuoksella.

Vaihtoehtoisesti vapautunut ammoniakki tislataan ylimäärään boorihappoliuosta, jonka jälkeen se titrataan kloorivetyhappo- tai rikkihappoliuoksella.

3. Reagenssit

3.1 Kaliumsulfaatti.

3.2 Katalysaattori: kupari(II)oksidi CuO tai kupari(II)sulfaattipentahydraatti, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.3 Sinkki, rakeinen.

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

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

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

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

3.8 Metyylipunaindikaattori: 300 g metyylipunaista liuotetaan 100 ml:aan 95–96 % etanolia (v/v)

3.9 Natriumhydroksidiliuos (teknisen laadun käyttö mahdollista) $\beta = 40$ g/100 ml (m/v: 40 %).

3.10 Natriumhydroksidi, standardiliuos $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l.

3.11 Natriumhydroksidi, standardiliuos $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l.

3.12 Kiehumakiviä, suolahapossa pestyjä ja hehkutettuja.

3.13 Asetanilidi (sulamispiste = 114 °C, typpipitoisuus = 10,36 %).

3.14 Typetön sakkaroosi.

3.15 Boorihappo (H_3BO_3).

3.16 Metyylipunaindikaattoriliuos: liuotetaan 0,1 g metyylipunaa 100 ml:aan etanolia tai metanolia.

▼B

- 3.17 Bromikresolivihreäliuos: liuotetaan 100 mg bromikresolivihreää 100 ml:aan etanolia tai metanolia.

- 3.18 Boorihappoliuos (10–40 g/l, käytettävien laitteiden mukaan)

Jos loppupisteen toteamiseksi käytetään kolorimetristä menetelmää, boorihappoliuokseen on lisättävä metyyliipuna- ja bromokresoli-indikaattoreita. Kun boorihappoliuosta valmistetaan 1 litra, siihen on ennen tilavuuden säätämistä lisättävä 7 ml metyyliipunaindikaattoriliuosta (3.16) ja 10 ml bromikresolivihreäliuosta (3.17).

Käytetystä vedestä johtuen boorihappoliuoksen pH saattaa vaihdella erien välillä. Usein on lisättävä vähän emästä, jotta nollanäyte saadaan positiiviseksi.

Huomautus: Säätäminen onnistuu yleensä lisäämällä noin 3–4 ml NaOH:ta (3.11) 1 litraan boorihappoa, jonka pitoisuus on 10 g/l. Liuos säilytetään huoneen lämpötilassa suojattuna valolta ja ammoniakkihöyryiltä.

- 3.19 Kloorivetyhapon standardiliuos $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Huomautus: Myös muita standardiliuosten konsentraatioita (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 ja 3.19) voidaan käyttää, jos konsentraatio korjataan laskelmissa. Konsentraatiot on aina ilmaistava neljän desimaalin tarkkuudella.

4. Välineistö

Välineet näytteen hajottamista, tislausta ja titrausta varten Kjeldahlin menetelmän mukaan.

5. Menettely

5.1 Hajotus

Punnitaan 1 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella Kjeldahl-kolviin hajotuspolttoa varten. Lisätään 15 g kaliumsulfaattia (3.1), sopiva määrä katalysaattoria (3.2) (0,3–0,4 g kupari(II)oksidia tai 0,9–1,2 g kupari(II)sulfaattipentahydraattia, 25 ml rikkihappoa (3.4) ja tarvittaessa muutamia kiehumakiviä (3.12) ja sekoitetaan.

Kolvia kuumennetaan varovasti tarvittaessa ajoittain pyörittäen, kunnes massa on hiiltynyt ja kuohu hävinnyt. Tämän jälkeen kuumennetaan voimakkaammin, kunnes neste kiehuu tasaisesti. Kuumennus on sopiva, jos kiehuva happo tiivistyy kolvin seinämiin. Kolvin seinämien ylikuumennusta ja orgaanisen aineksen tarttumista kolvin seinämiin on vältettävä.

Kun liuos on muuttunut kirkkaaksi ja kirkkaanvihreäksi, keittämistä jatketaan vielä kahden tunnin ajan; tämän jälkeen kolvin annetaan jäähtyä.

5.2 Tislaus

Kolviin lisätään varovasti riittävä määrä vettä, jotta sulfaatit liukenisivat täysin. Annetaan jäähtyä ja lisätään tarvittaessa muutama sinkkirae (3.3). Jatketaan 5.2.1 tai 5.2.2 kohdan mukaisesti.

5.2.1 Tislaus rikkihappoon

Tislauslaitteen keräilyastian lisätään oletetun typpipitoisuuden mukaan 25 ml rikkihappoa (3.5) tai (3.7) tarkasti mitattuna. Lisätään muutama pisara metyyliipunaindikaattoria (3.8).

▼B

Kolvi yhdistetään tisluslaitteen jäähdytimeen ja jäähdyttimen pää upotetaan keräilyastiassa olevaan liuokseen vähintään 1 cm:n syvyyteen (ks. 8.3 huomautus). Kolviin lasketaan hitaasti 100 ml natriumhydroksidiliuosta (3.9) siten, ettei ammoniakkia katoa (ks. 8.1 huomautus). Kolvia kuumennetaan siten, että ammoniakki tislautuu kokonaan.

5.2.2 Tislaus boorihappoon

Kun tisleestä titrataan ammoniakki manuaalisesti, noudatetaan alla olevaa menettelyä. Jos tisluslaite on täysin automaattinen ja suorittaa ammoniakkin titraamisen tisleestä, noudatetaan valmistajan käyttöohjeita.

Keräilyastia, joka sisältää 25–30 ml boorihappoliuosta (3.18), asetetaan jäähdyttimen ulostulon alle siten, että poistoputki jää boorihappoliuoksen pinnan alapuolelle. Tisluslaite säädetään annostelemaan 50 ml natriumhydroksidiliuosta (3.9). Tisluslaitetta käytetään valmistajan ohjeiden mukaan ja tislataan pois natriumhydroksidiliuoksen lisäyksen tuloksena vapautunut ammoniakki. Tisleräätään boorihappoa sisältävään vastaanottoliuokseen. Tisleen määrä (vesihöyrytislauksen aika) riippuu näytteen sisältämän typen määrästä. Valmistajan ohjeita noudatetaan.

Huomautus: Puoliautomaattisessa tisluslaitteessa natriumhydroksidiylimäärän lisäys ja vesihöyrytislauk tapahtuvat automaattisesti.

5.3 Titraus

Jatketaan 5.3.1 tai 5.3.2 kohdan mukaisesti.

5.3.1 Rikkihappo

Keräilyastiassa oleva rikkihappoylimäärä titrataan käytetyn rikkihapon konsentraation mukaan natriumhydroksidiliuoksella (3.10 tai 3.11), kunnes loppupiste saavutetaan.

5.3.2 Boorihappo

Keräilyastian sisältö titrataan kloorivetyhapon standardiliuoksella (3.19) tai rikkihapon standardiliuoksella (3.6) byrettia käyttäen ja todetaan käytetyn titrausliuoksen määrä.

Jos loppupisteen toteamiseksi käytetään kolorimetristä menetelmää, loppupiste on saavutettu, kun sisältöön alkaa ilmestyä vaaleanpunaista väriä. Byretin lukema arvioidaan 0,05 ml:n tarkkuudella. Loppupisteen havaitseminen saattaa olla helpompaa valaistun magneettisekoittimen tai fotometrisen detektorin avulla.

Tämä voidaan tehdä automaattisesti vesihöyrytislaimella, jossa on automaattinen titraus.

Tisluslaitteen tai tislus/titrauslaitteen käytössä noudatetaan valmistajan ohjeita.

Huomautus: Kun käytetään automaattista titrausjärjestelmää, titraus alkaa välittömästi tislauksen alettua ja kun 1-prosenttinen boorihappoliuos (3.18) on kulunut.

▼B

Käytettäessä täysin automaattista tislauksyksikköä ammoniakki voidaan titrata automaattisesti ja loppupiste detektoida käyttämällä potentiometristä pH-järjestelmää.

Tässä tapauksessa käytetään automaattista titrauslaitetta, jossa on pH-mittari. pH-mittari on kalibroitava asianmukaisesti välillä pH 4–7 noudattaen tavanomaisia laboratorioden pH-kalibrointimenettelyjä.

Titrauksen pH-loppupiste saavutetaan, kun pH on 4,6, mikä on titrauskäyrän jyrkin kohta (käännekohta).

5.4 *Nollakoe*

Reagenssien typettömyyden varmistamiseksi suoritetaan nollakoe (hajotus, tislauk ja titraus) käyttämällä 1 g sakkaroosia (3.14) näytteen sijasta.

6. **Tulosten laskeminen**

Tulokset lasketaan 6.1 tai 6.2 kohdan mukaisesti.

6.1 *Tuloksen laskeminen 5.3.1 kohdan mukaisessa titrauksessa*

Raakavalkuaispitoisuus ilmaistuna painoprosentteina lasketaan seuraavaa kaavaa käyttäen:

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

jossa:

V_0 = nollakokeessa kulunut NaOH:n (3.10 tai 3.11) määrä (ml),
 V_1 = näytteen titrauksessa kulunut NaOH:n (3.10 tai 3.11) määrä (ml),
 c = natriumhydroksidin (3.10 tai 3.11) konsentraatio (mol/l),
 m = näytteen paino (g).

6.2 *Tuloksen laskeminen 5.3.2 kohdan mukaisessa titrauksessa*

6.2.1 **Titraus kloorivetyhapolla**

Raakavalkuaispitoisuus ilmaistuna painoprosentteina lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

m = näytteen paino (g),
 c = kloorivetyhapon standardiliuoksen (3.19) konsentraatio (mol/l),
 V_0 = nollakokeessa kuluneen kloorivetyhapon määrä (ml),
 V_1 = näytteen titrauksessa kuluneen kloorivetyhapon määrä (ml).

6.2.2 **Titraus rikkihapolla**

Raakavalkuaispitoisuus ilmaistuna painoprosentteina lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

▼B

jossa:

m = näytteen paino (g),

c = rikkihapon standardiliuoksen (3.6) konsentraatio (mol/l),

V_0 = nollakokeessa kuluneen rikkihapon (3.6) määrä (ml),

V_1 = näytteen titrauksessa kuluneen rikkihapon (3.6) määrä (ml).

7. Menetelmän varmistus

7.1 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin:

— 0,2 % absoluuttisena arvona, kun raakavalkuaispitoisuus on alle 20 %,

— 1,0 %, suhteellisenä arvona suuremmasta lukuarvosta, kun raakavalkuaispitoisuus on 20–40 %,

— 0,4 % absoluuttisena arvona, kun raakavalkuaispitoisuus on yli 40 %.

7.2 Tarkkuus

Määrittäminen (hajotus, tislauksen ja titraus) tehdään 1,5–2,0 grammalla asetanilidia (3.13) siten, että läsnä on 1 grammaa sakkaroosia (3.14); 1 g asetanilidia kuluttaa 14,80 ml rikkihappoa (3.5). Saannon on oltava vähintään 99 %.

8. Huomautukset

8.1 Välineet voivat olla käsikäyttöisiä, puoliautomaattisia tai automaattisia. Jos liuos joudutaan siirtämään astiasta toiseen hajotuksen ja tislauksen välillä, siirto on suoritettava siten, ettei häviöitä tapahdu. Jos tislauslaitteen kolvissa ei ole tiputussuppilaa, lisätään natriumhydroksidi välittömästi ennen kolvin liittämistä jäähdyttimeen kaataen liuos hitaasti kolvin seinämää myöten.

8.2 Jos hajotettu tuote kiinteytyy, määrittäminen on aloitettava alusta käyttämällä suurempaa määrää rikkihappoa (3.4) kuin edellä on mainittu.

8.3 Kun tuotteiden typpipitoisuus on alhainen, voidaan rikkihapon (3.7) määrä keräilyastiassa tarvittaessa vähentää 10–15 ml:aan ja täyttää 25 ml:ksi vettä lisäämällä.

8.4 Raakavalkuaisen rutiinimäärittämisessä voidaan käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä, mutta vertailumenetelmänä on käsillä olevassa C osassa kuvailtu Kjeldahlin menetelmä. Vaihtoehtoisilla menetelmillä (kuten Dumas-menetelmällä) saatujen tulosten vastaavuus on osoitettava erikseen kunkin analysoitavan materiaalin osalta. Koska vaihtoehtoisilla menetelmillä saadut tulokset saattavat vastaavuuden varmistamisesta huolimatta hieman poiketa vertailumenetelmällä saaduista tuloksista, määrittämisselosteissa on mainittava, mitä menetelmää raakavalkuaisen määrittämisessä on käytetty.

D. UREAN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen ureapitoisuus.

▼B**2. Periaate**

Näyte suspendoidaan veteen sellaisen aineen läsnä ollessa, joka saa suspension kirkastumaan. Suspensio suodatetaan. Suodoksen ureamäärä määritetään sen jälkeen kun siihen on lisätty 4-dimetyyliaminobentsaldehydiä (4-DMAB) mittaamalla liuoksen absorbanssi 420 nm:n aallonpituudella.

3. Reagenssit

3.1 4-dimetyyliaminobentsaldehydiliuos: 1,6 g 4-DMAB:ta liuotetaan 100 ml:aan 96-prosenttista etanolia ja siihen lisätään 10 ml kloorivetyhappoa (ρ_{20} 1,19 g/ml). Tämä reagenssi säilyy korkeintaan kahden viikon ajan.

3.2 Carrez-liuos I: veteen liuotetaan 21,9 g sinkkiasetaattia $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ja 3 g jäätikkää. Tilavuus säädetään 100 ml:ksi vedellä.

3.3 Carrez-liuos II: Liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Tilavuus säädetään 100 ml:ksi vedellä.

3.4 Aktiivihiili, joka ei absorboi ureaa (tarkastettava).

3.5 Urealiuos 0,1 % (w/v).

4. Välineistö

4.1 Sekoitin: noin 35–40 kierr./min.

4.2 Lasihioistulpallisia koeputkia 160 × 16 mm.

4.3 Spektrofotometri.

5. Menettely**5.1 Näytteen määrittäminen**

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 2 g näytettä sekä 1 g aktiivihiiltä (3.4) 500 ml:n mittapulloon. Lisätään 400 ml vettä ja 5 ml Carrez I -liuosta (3.2), sekoitetaan noin 30 sekunnin ajan ja lisätään 5 ml Carrez II -liuosta (3.3). Pidetään sekoittimessa 30 minuutin ajan. Lisätään vettä merkkiin asti, sekoitetaan ja suodatetaan.

Läpinäkyvästä, värittömästä suodoksesta pipetoidaan 5 ml lasihioistulpallisiin koeputkiin, lisätään 5 ml 4-DMAB -liuosta (3.1) ja sekoitetaan. Putket asetetaan 20 C:ssa (+/- 4 C) olevaan vesihauteeseen. Viidentoista minuutin kuluttua mitataan näyteliuoksen absorbanssi spektrofotometrillä 420 nm:n aallonpituudella. Lukemaa verrataan reagensseista valmistettuun nollakoeliukseen.

5.2 Kalibrointikäyrä

Pipetoidaan 100 ml:n mittapulloihin 1, 2, 4, 5 ja 10 ml urealiuosta (3.5) ja täytetään merkkiin asti vedellä. Kutakin liuosta pipetoidaan koeputkiin 5 ml, lisätään 5 ml 4-DMAB -liuosta (3.1), homogenoidaan ja niiden absorbanssi mitataan edellä kuvatulla tavalla verrattuna kontrolliliukseen, joka sisältää 5 ml 4-DMAB:ta ja 5 ml vettä ja jossa ei ole ureaa. Piirretään kalibrointikäyrä.

6. Tulosten laskeminen

Urean määrä näytteessä määritetään kalibrointikäyrää käyttäen.

Tulokset ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

7. Huomautukset

7.1 Kun urean määrä ylittää 3 %, näytteen määrä vähennetään 1 g:ksi tai alkuperäinen liuos laimennetaan siten, ettei siinä ole yli 50 mg ureaa 500 ml:ssa.

▼B

- 7.2 Kun ureapitoisuus on alhainen, näytteen kokoa suurennetaan, kunhan suodos säilyy läpinäkyvänä ja värittömänä.
- 7.3 Jos näyte sisältää yksinkertaisia typpiyhdisteitä, kuten aminohappoja, optinen tiheys on mitattava 435 nm:ssä.

E. HAIHTUVIEN TYPPIPITOISTEN EMÄSTEN MÄÄRITYS**I MIKRODIFFUUSIO****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehuista haihtuvien typpipitoisten emästen pitoisuus ammoniakkinä ilmoitettuna.

2. Periaate

Näyte uutetaan vedellä, liuos kirkastetaan ja suodatetaan. Haihtuvat typpipitoiset emäkset vapautetaan mikrodiffrusiolla käyttäen kaliumkarbonaattiliuosta, sidotaan boorihappoliuokseen ja titrataan rikkihapolla.

3. Reagenssit

- 3.1 Trikloorietikkahappoliuos, 20 % (w/v).
- 3.2 Indikaattori: liuotetaan 33 mg bromikresolivihreää ja 65 mg metyyliipunaista 100 ml:aan 95–96-prosentista (v/v) etanolia.
- 3.3 Boorihappoliuos: liuotetaan 10 g boorihappoa 1 litran mittapullossa 200 ml:aan 95–96-prosentista (v/v) etanolia ja 700 ml:aan vettä. Lisätään 10 ml indikaattoria (3.2). Sekoitetaan ja liuoksen väri säädetään tarvittaessa vaaleanpunaiseksi lisäämällä natriumhydroksidiliuosta. 1 ml tätä liuosta sitoo enintään 300 µg NH₃:a.
- 3.4 Kyllästetty kaliumkarbonaattiliuos: liuotetaan 100 g kaliumkarbonaattia 100 ml:aan kiehuva vettä. Annetaan jäähtyä ja suodatetaan.
- 3.5 Rikkihappo, 0,01 mol/l.
4. Välineistö
- 4.1 Sekoitin: noin 35–40 kierr./min.
- 4.2 Lasisia tai muovisia Conway-maljoja (ks. oheinen kaavio).
- 4.3 1/100 ml:n asteikolla varustettuja mikrobyrettejä.

5. Menettely

Punnitaan 10 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella 200 ml:n mittapulloon, johon lisätään 100 ml vettä. Pidetään sekoittimessa 30 minuutin ajan. Lisätään 50 ml trikloorietikkahappoliuosta (3.1), täytetään merkkiin asti vedellä, ravistellaan voimakkaasti ja suodatetaan laskostetun suodatinpaperin läpi.

Pipetoidaan Conway-maljan keskiympyrään 1 ml boorihappoliuosta (3.3) ja reunaympyrään 1 ml näytemaljasuodosta. Peitetään osittain rasvatulla kannella. Reunaympyrään lisätään nopeasti 1 ml kyllästettyä kaliumkarbonaattiliuosta (3.4) ja kansi suljetaan ilmatiiviisti. Maljaa pyöritetään varovasti vaakasuorassa tasossa siten, että nämä kaksi reagenssia sekoituvat. Inkuboidaan vähintään neljä tuntia huoneenlämmössä tai yksi tunti 40 °C:ssa.

Boorihappoliuoksessa olevat haihtuvat emäkset titrataan rikkihapolla (3.5) mikrobyrettä (4.3) käyttäen.

Nollakoe suoritetaan samalla tavalla, mutta ilman määritettävää näytettä.

▼B

6. Tulosten laskeminen

1 ml H_2SO_4 :ää, 0,01 mol/l, vastaa 0,34 mg:aa ammoniakkia.

Tulos ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

Toistettavuus

Samasta näytteestä suoritettujen kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa olla yli:

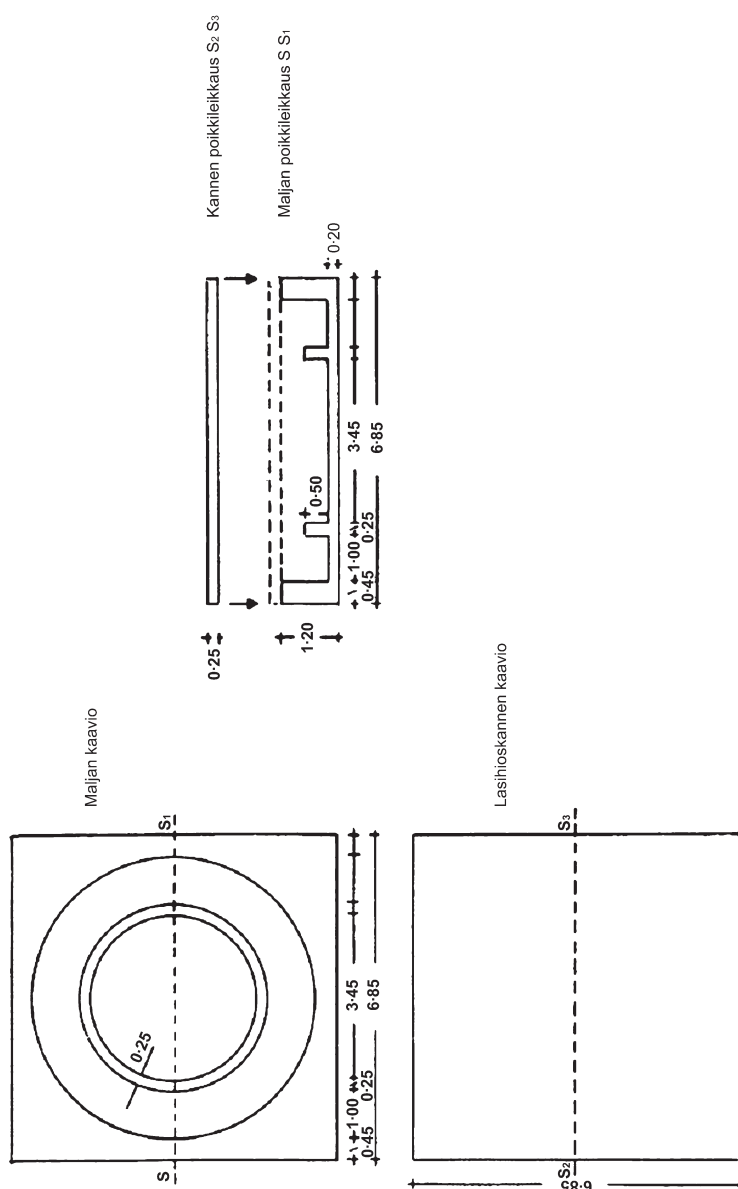
- 10 %:a, suhteellisenä arvona ilmoitettuna, kun ammoniakkipitoisuus on alle 1,0 %,
- 0,1 %:a, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, kun ammoniakkipitoisuus on vähintään 1,0 %.

7. Huomautus

Jos näytteen ammoniakkipitoisuus ylittää 0,6 %, on alkuperäinen suodos laimennettava.

CONWAY CELL

Scale 1/1



▼B**II TISLAUSMENETELMÄ****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää haihtuvien tyypipitoisten emästen pitoisuus ammoniakkina ilmoitettuna kalajauhosta, joka ei käytännöllisesti katsoen sisällä ureaa. Menetelmä soveltuu ainoastaan näytteisiin, joiden ammoniakkipitoisuus on alle 0,25 %.

2. Periaate

Näyte uutetaan vedellä, liuos kirkastetaan ja suodatetaan. Haihtuvat tyypipitoiset emäkset vapautuvat keitetäessä näyteliuosta magnesiumoksidin kanssa ja ne sidotaan tunnettuun määrään rikkihappoa, jonka ylimäärä titrataan takaisin natriumhydroksidiliuoksella.

3. Reagenssit

3.1 Trikloorietikkahappoliuos, 20 % (w/v).

3.2 Magnesiumoksidi.

3.3 Kuohunestoaine (esim. silikoni).

3.4 Rikkihappo, 0,05 mol/l.

3.5 Natriumhydroksidiliuos, 0,1 mol/l.

3.6 Metyyliipunaliuos, 0,3 % (w/v), joka on valmistettu 95–96-prosenttiseen (v/v) etanoliin.

4. Välineistö

4.1 Sekoitin: noin 35–40 kierr./min.

4.2 Kjeldahl-tyyppinen tisluslaitteisto.

5. Menettely

Punnitaan 10 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella 200 ml:n mittapulloon, johon lisätään 100 ml vettä. Pidetään sekoittimessa 30 minuutin ajan. Lisätään 50 ml trikloorietikkahappoliuosta (3.1), täytetään merkkiin asti vedellä, ravistellaan voimakkaasti ja suodatetaan laskostetun suodatinpaperin läpi.

Otetaan kirkasta liuosta sopiva määrä haihtuvien tyypipitoisten emästen oletetun pitoisuuden kannalta (100 ml on yleensä sopiva määrä). Laimennetaan 200 ml:ksi ja lisätään 2 g magnesiumoksidia (3.2) ja muutama pisara kuohunestoainetta (3.3). Liuoksen on oltava lakmuspaperilla määritettynä emäksinen; muussa tapauksessa siihen lisätään hieman magnesiumoksidia (3.2). Jatketaan raakavalkuaispitoisuuden määrittämisessä käytettävän menetelmän 5.2 ja 5.3 kohdan mukaisesti (tämän liitteen C osa).

Nollakoe suoritetaan samalla tavalla, mutta ilman määritettävää näytettä.

6. Tulosten laskeminen

1 ml H₂SO₄:ää, 0,05 mol/l, vastaa 1,7 mg:aa ammoniakkia.

Tulos ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

Toistettavuus

Kahden samasta näytteestä suoritettujen rinnakkaismäärittäysten tulosten välinen ero ei saa olla suhteellisenä arvona ilmoitettuna suurempi kuin 10 % ammoniakkimäärästä.

F. AMINOHAPPOJEN MÄÄRITYS (TRYPTOFAANIA LUKUUN OTTAMATTA)**1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen vapaat aminohapot (synteettiset ja luonnon aminohapot) ja kokonaisaminohapot (peptideihin kiinnittyneet ja vapaat) aminohappoanalysaattorilla. Se sopii seuraaviin aminohappoihin:

▼B

kyst(e)iini, metioniini, lysini, treoniini,alaniini, arginiini, asparagiinihappo, glutamiinihappo, glysiini, histidiini, isoleusiini, leusiini, fenyyialaniini, proliini, seriini, tyrosiini ja valiini.

Menetelmällä ei eroteta toisistaan aminohappojen suoloja eikä aminohappojen D- ja L-muotoja. Se ei sovellu tryptofaanin eikä aminohappojen hydroksianalogien määrittämiseen.

2. Periaate

2.1 *Vapaat aminohapot*

Vapaat aminohapot uutetaan laimealla kloorivetyhapolla. Mukana uuttuneet tyypipitoiset makromolekyylit saostetaan sulfosalisyylillä ja poistetaan suodattamalla. Suodatetun liuoksen pH säädetään arvoon 2,20. Aminohapot erotetaan ioninvaihtokromatografialla ja määritetään fotometrillä ninhydriinijohdoksina aallonpituudella 570 nm.

2.2 *Kokonaisaminohapot*

Menetelmä valitaan tutkittavien aminohappojen mukaan. Kyst(e)iini ja metioniini on hapetettava kysteiinihapoksi ja metioniinisulfoniksi ennen hydrolyysiä. Tyrosiini on määritettävä näytteistä, joita ei hapeteta ennen hydrolyysiä. Kaikki muut 1 kohdassa mainitut aminohapot voidaan määrittää joko hapetetusta tai hapettamattomasta näytteestä.

Hapettaminen tapahtuu 0 °C:ssa permuurahaishapon ja fenolin seoksella. Hapetusreagenssin ylimäärä hajotetaan natriumdisulfiitin avulla. Hapetettu tai hapettamaton näyte hydrolysoidaan kloorivetyhapolla (3.20) avulla 23 tunnin ajan. Hydrolyysituotteen pH säädetään arvoon 2,20. Aminohapot erotetaan ioninvaihtokromatografialla ja määritetään fotometrillä ninhydriinijohdoksina aallonpituudella 570 nm (proliini 440 nm).

3. Reagenssit

Veden on oltava kaksoistislattua tai vastaavan laatuista (johtokyky < 10 µS).

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

3.2 Muurahaishappo, w (w/w) = 98–100 %.

3.3 Fenoli.

3.4 Natriumdisulfiitti.

3.5 Natriumhydroksidi.

3.6 5-Sulfosalisyylihappo-dihydraatti.

3.7 Kloorivetyhappo, tiheys noin 1,18 g/ml.

3.8 Trinatriumsitraatti-dihydraatti.

3.9 2,2'-Tiodietanoli (tiodiglykoli).

3.10 Natriumkloridi.

3.11 Ninhydriini.

3.12 Petrolieetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.

3.13 Norleusiini tai muu yhdiste, jota voidaan käyttää sisäisenä standardina.

▼B

- 3.14 Typpikaasu (<10 ppm happea).
- 3.15 1-Oktanoli.
- 3.16 Aminohapot.
- 3.16.1 Edellä 1 kohdassa luetellut standardina käytettävät yhdisteet. Puhtaat yhdisteet, jotka eivät sisällä kidevettä. Kuivataan tyhjiössä P_2O_5 :n tai H_2SO_4 :n päällä viikon ajan ennen käyttöä.
- 3.16.2 Kysteiinihappo.
- 3.16.3 Metioniinisulfonyli.
- 3.17 Natriumhydroksidiliuos, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
liuotetaan 300 g NaOH:ta (3.5) veteen ja laimennetaan 1 litraksi.
- 3.18 Natriumhydroksidiliuos, $c = 1 \text{ mol/l}$:
liuotetaan 40 g NaOH:ta (3.5) veteen ja laimennetaan 1 litraksi.
- 3.19 Muurahaishappo-fenoliliuos:
sekoitetaan 889 g muurahaishappoa (3.2) ja 111 g vettä ja lisätään 4,73 g fenolia (3.3).
- 3.20 Hydrolyysiseos, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ ja 1 g fenolia litrassa:
lisätään 1 g fenolia (3.3) 492 ml:aan HCl (3.7) ja laimennetaan vedellä 1 litraksi.
- 3.21 Uuttoseos, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ ja 2 % tiodiglykolia litrassa: laimennetaan 8,2 ml HCl (3.7) noin 900 ml:aan vettä, lisätään 20 ml tiodiglykolia (3.9) ja täytetään vedellä yhdeksi litraksi (ei sekoiteta suoraan aineita 3.7 ja 3.9).
- 3.22 5-Sulfosalisyylihappo, $\beta = 6 \text{ \%}$:
Liuotetaan 60 g 5-sulfosalisyylihappoa (3.6) veteen ja laimennetaan vedellä litraksi.
- 3.23 Hapetusseos (permuurahaishappo-fenoli):
sekoitetaan 0,5 ml vetyperoksidia (3.1) 4,5 ml:aan muurahaishappo-fenoliliuosta (3.19) pienessä dekanterilasissa. Inkuboidaan 20–30 °C:ssa tunnin ajan, jotta saadaan permuurahaishappoa, annetaan sitten jäähtyä jäävesihauteessa (15 min) ennen näytteen lisäämistä.
Varoitus: vältettävä ihokosketusta ja käytettävä suojavaatteita.
- 3.24 Sitraattipuskuriliuos, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
liuotetaan 19,61 g natriumsitraattia (3.8), 5 ml tiodiglykolia (3.9), 1 g fenolia (3.3) ja 16,50 ml HCl (3.7) noin 800 ml:aan vettä. Säädetään pH arvoon 2,20. Laimennetaan vedellä yhdeksi litraksi.
- 3.25 Eluointipuskurit, valmistetaan analysaattorin vaatimusten mukaisesti (4.9).
- 3.26 Ninhydiiriinireagenssi, valmistetaan analysaattorin vaatimusten mukaisesti (4.9).
- 3.27 Aminohappojen standardiliuokset. Nämä liuokset säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa.

▼B

3.27.1 Aminohappojen standardin kantaliuos (3.16.1).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ kutakin aminohappoa kloorivetyhapossa.

Saatavana kaupallisesti.

3.27.2 Kysteiinihapon ja metioniinisulfonin standardin kantaliuos, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Liuotetaan 0,2115 g kysteiinihappoa (3.16.2) ja 0,2265 g metioniinisulfonia (3.16.3) sitraattipuskuriin (3.24) litran mittapullossa ja täytetään merkkiin asti sitraattipuskurilla. Säilytetään alle $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa enintään 12 kuukautta. Tätä liuosta ei tarvita, jos standardin kantaliuos (3.27.1) sisältää kysteiinihappoa ja metioniinisulfonia.

3.27.3 Sisäisen standardin kantaliuos, esimerkiksi norleusiini, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Liuotetaan 0,6560 g norleusiinia (3.13) sitraattipuskuriin (3.24) mittapullossa ja täytetään 250,0 ml:ksi sitraattipuskurilla (3.24). Säilytetään alle $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa enintään 6 kuukautta.

3.27.4 Aminohappojen kalibrointiliuos hydrolysaateille: kysteiinihappo ja metioniinisulfoni, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$, muut aminohapot $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$.
Liuotetaan 2,2 g natriumkloridia (3.10) 30 ml:aan sitraattipuskuria (3.24) 100 ml:n dekantterilasissa. Lisätään 4,00 ml aminohappojen standardin kantaliuosta (3.27.1), 4,00 ml kysteiinihapon ja metioniinisulfonin standardin kantaliuosta (3.27.2) ja tarvittaessa 0,50 ml sisäisen standardin kantaliuosta (3.27.3). Säädetään pH arvoon 2,20 natriumhydroksidilla (3.18).

Siirretään kvantitatiivisesti 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti sitraattipuskurilla (3.24) ja sekoitetaan.

Säilytetään alle $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa enintään 3 kuukautta.

Katso myös huomautukset 9.1 kohdassa.

3.27.5 Aminohappojen kalibrointiliuos 5.3.3.1 kohdan mukaisesti valmistetuille hydrolysaateille ja uutuille (5.2). Kalibrointiliuos valmistetaan 3.27.4 kohdan mukaisesti kuitenkin jättäen natriumkloridi pois.

Säilytetään alle $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa enintään 3 kuukautta.

4. **Välineistö**

4.1 100 ml:n tai 250 ml:n pyörökolvi, joka on varustettu palautusjäähdyttimellä.

4.2 Borosilikaattilasinen 100 ml:n pullo, jossa on kumi/teflontiivisteinen kierrettävä uuninkestävä korkki (esimerkiksi Duran, Schott).

4.3 Koneellisella ilmanvaihdolla varustettu ja lämpötilaltaan säädettävä kuivausuuni, jonka tarkkuus on parempi kuin $\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 pH-mittari (lukemat kolmen desimaalin tarkkuudella).

4.5 Kalvosuodatin ($0,2 \text{ } \mu\text{m}$).

4.6 Sentrifugi.

4.7 Vakuumpipyöröhaihdutin.

4.8 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.

▼B

- 4.9 Aminohappoanalysaattori tai HPLC-laitteisto, joissa on ioninvaihtokolonni, välineistö kolonnin jälkeistä ninhydriiniderivointia varten ja fotometri.

Kolonni täytetään sellaisella sulfonoidulla polystyreenihartsilla, jolla voidaan erottaa eri aminohapot toisistaan ja muista ninhydriinin kanssa reagoivista yhdisteistä. Puskuri- ja ninhydriinipumpun virtausnopeuden stabiilisuuden tulee olla $\pm 0,5$ % ajanjaksona, jona analysoidaan sekä standardiliuos että näyte.

Tietyissä aminohappoanalysaattoreissa voidaan käyttää hydrolyysimenetelmää, jossa hydrolysaatin natriumpitoisuus on $c = 0,8$ mol/l ja se sisältää näin kaiken hapetuksessa jäljelle jääneen muurahaishapon. Muut laitteet eivät erota tyydyttävästi tiettyjä aminohappoja, jos hydrolysaatti sisältää liikaa muurahaishappoa ja/tai natriumionipitoisuus on suuri. Tässä tapauksessa hapon määrää vähennetään haihduttamalla hydrolysaatti noin 5 ml:aan ennen pH:n säätämistä. Haihduttamisen on tapahduttava tyhjiössä enintään 40 °C:ssa.

5. Menettely

5.1 Näytteen valmistaminen

Näyte jauhetaan siten, että se läpäisee 0,5 mm:n seulan. Näytteet, joiden kosteuspitoisuus on suuri, on ilmakeivattava korkeintaan 50 °C:n lämpötilassa tai kylmäkuivattava ennen jauhamista. Näytteet, joiden rasvapitoisuus on suuri, on uutettava petroleetterillä (3.12) ennen jauhamista.

5.2 Vapaiden aminohappojen määrittäminen rehuista ja esiseoksista

Punnitaan 0,2 mg:n tarkkuudella sopiva määrä (1–5 g) valmistettua näytettä (5.1) erlenmeyerkolviin ja lisätään 100,0 ml uutoseosta (3.21). Ravistellaan seosta 60 minuuttia mekaanisella ravistelijalla tai magneettisekoittimella (4.8). Annetaan sakan laskeutua ja pipetoidaan 10,0 ml supernatanttiliuosta dekanterilasiin.

Lisätään koko ajan sekoittaen 5,0 ml sulfosalisyylihappoliuosta (3.22) ja jatketaan sekoittamista 5 minuutin ajan magneettisekoittimella. Suodataan tai sentrifugoidaan liuos mahdollisen sakan erottamiseksi. Pipetoidaan 10,0 ml saatua liuosta 100 ml:n dekanterilasiin, säädetään pH arvoon 2,20 natriumhydroksidiliuoksella (3.18), huuhdotaan sopivan kokoiseen mittapulloon sitraattipuskurilla (3.24) ja täytetään merkkiin asti puskuriliuoksella (3.24).

Jos käytetään sisäistä standardia (3.27.3), sitä lisätään 1,00 ml lopullisen liuoksen kutakin 100 ml:aa kohden ja täytetään merkkiin asti puskuriliuoksella (3.24).

Siirrytään kromatografiavaiheeseen 5.4 kohdan mukaisesti.

Jos kromatografiaa ei tehdä samana päivänä, uutteen säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa.

5.3 Kokonaisaminohappojen määrittäminen

5.3.1 Hapettaminen

Punnitaan 0,2 mg:n tarkkuudella 0,1–1 g valmistettua näytettä (5.1):

— 100 ml:n pyörökolviin (4.1) avointa hydrolyysiä varten (5.3.2.3), tai

▼B

- 250 ml:n pyörökolviin (4.1), jos tarvitaan alhaista natriumpitoisuutta (5.3.3.1), tai
- 100 ml:n kierrekorkilliseen pulloon (4.2) suljettua hydrolyysiä varten (5.3.2.4).

Punnitun näytemäärän typpipitoisuuden on oltava noin 10 mg ja kosteuspitoisuuden enintään 100 mg.

Asetetaan pyörökolvi tai pullo jää-vesihauteeseen ja jäähdytetään 0 °C:seen, lisätään 5 ml hapetusseosta (3.23) ja sekoitetaan kaarevakärkisellä lasilastalla. Suljetaan kolvi/pullo lastoineen ilmatiiviin kalvon avulla, asetetaan jää-vesihaude näin suljettuine astioineen jääkaappiin, jonka lämpötila on 0 °C, ja jätetään sinne 16 tunniksi. Tämän jälkeen se otetaan jääkaapista ja hajotetaan hapetusreagenssin ylimäärä lisäämällä 0,84 g natriumdisulfiittia (3.4).

Siirrytään 5.3.2.1 kohtaan.

5.3.2 Hydrolyysi

5.3.2.1 *Hapetettujen näytteiden hydrolyysi*

Edellä 5.3.1. kohdan mukaisesti valmistettuun hapetettuun näytteeseen lisätään 25 ml hydrolyysiseosta (3.20) huolehtien siitä, että astian seinämiin ja lastaan jäänyt näyte huuhdellaan pois.

Jatketaan valitun hydrolyysimenetelmän mukaan 5.3.2.3 tai 5.3.2.4 kohdasta.

5.3.2.2 *Hapettamattomien näytteiden hydrolyysi*

Punnitaan 100 ml:n tai 200 ml:n pyörökolviin (4.1) tai 100 ml:n kierrekorkilliseen pulloon (4.2) 0,1–1,0 g valmistettua näytettä (5.1) 0,2 mg:n tarkkuudella. Punnitun näytemäärän typpipitoisuuden on oltava noin 10 mg. Lisätään varovasti 25 ml hydrolyysiseosta (3.20) ja sekoitetaan näytteeseen. Jatketaan joko 5.3.2.3 tai 5.3.2.4 kohdasta.

5.3.2.3 *Avoin hydrolyysi*

Lisätään kolme lasihelmeä kolvissa olevaan seokseen (valmistettu 5.3.2.1 tai 5.3.2.2 kohdan mukaisesti) ja keitetään tasaisesti kuplittaen palautusjäähdyttimen alla 23 tuntia. Hydrolyysin jälkeen huuhdellaan jäähdytin 5 ml:lla sitraattipuskuria (3.24). Kolvi irrotetaan ja jäähdytetään jäähauteessa.

Jatketaan 5.3.3 kohdan mukaisesti.

5.3.2.4 *Suljettu hydrolyysi*

Asetetaan 5.3.2.1 tai 5.3.2.2 kohdan mukaisesti valmistettua näytteseosta sisältävä pullo uuniin (4.3) 110 °C:seen. Ensimmäisen tunnin aikana pidetään kierrekorkki sulkematta pullon päällä, jottei kaasun muodostuksen vuoksi syntyisi painetta ja jotta välttyttäisiin räjähdyksiltä. Pulloa ei saa sulkea korkilla. Tunnin kuluttua pullo suljetaan kierrekorkilla ja sen annetaan olla uunissa (4.3) 23 tunnin ajan. Hydrolyysin jälkeen pullo otetaan uunista, avataan korkki varovasti ja asetetaan pullo jää-vesihauteeseen. Annetaan jäähtyä.

Riippuen tavasta, jolla pH säädetään (5.3.3), siirretään pullon sisältö kvantitatiivisesti sitraattipuskurin avulla (3.24) 250 ml:n dekantterilasiin tai 250 ml:n pyörökolviin.

Jatketaan 5.3.3 kohdan mukaisesti.

▼B**5.3.3 pH:n säätäminen**

Aminohappoanalysaattorin (4.9) natriuminsietokyvyn mukaan noudatetaan 5.3.3.1 tai 5.3.3.2 kohtaa pH:n säätämiseksi.

5.3.3.1 *Kromatografrit (4.9), jotka edellyttävät alhaista natriumpitoisuutta*

On suositeltavaa käyttää sisäisen standardin perusliuosta (3.27.3), jos käytetään aminohappoanalysaattoreita, jotka edellyttävät alhaista natriumpitoisuutta (kun hapon määrää on vähennettävä).

Tässä tapauksessa lisätään 2,00 ml sisäisen standardin perusliuosta (3.27.3) hydrolysaattiin ennen haihdutusta tai sen jälkeen.

Lisätään 2 tippaa 1-oktanolia (3.15) 5.3.2.3 tai 5.3.2.4 kohdan mukaisesti saatuun hydrolysaattiin.

Haihdutetaan näyte 5–10 ml:aan pyöröhaihduttimella (4.7), jonka hautteen lämpötila on 40 °C. Jos tilavuus pienenee vahingossa alle viiden millilitran, hydrolysaatti on hylättävä ja analyysi aloitettava uudelleen.

pH säädetään arvoon 2,20 natriumhydroksidiliuoksella (3.18) ja jatketaan kohdasta 5.3.4.

5.3.3.2 *Muut aminohappoanalysaattorit (4.9):*

Kohdan 5.3.2.3 tai 5.3.2.4 mukaisesti saatu hydrolysaatti neutraloidaan osittain lisäämällä varovasti koko ajan sekoittaen 17 ml natriumhydroksidiliuosta (3.17) ja huolehditaan siitä, että lämpötila on alle 40 °C.

Lopullinen pH:n säätäminen 2,20:een tapahtuu huoneen lämpötilassa 3.17 kohdan mukaisen natriumhydroksidiliuoksen avulla ja lopuksi 3.18 kohdan mukaisella natriumhydroksidiliuoksella. Siirrytään 5.3.4 kohtaan.

5.3.4 Näyteliuos kromatografiaa varten

Siirretään kvantitatiivisesti hydrolysaatti, jonka pH on säädetty (5.3.3.1 tai 5.3.3.2.), sitraattipuskurilla (3.24) 200 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asti puskurilla (3.24).

Jos sisäistä standardia ei ole vielä käytetty, lisätään sitä 2,00 ml (3.27.3) ja täytetään merkkiin asti sitraattipuskurilla (3.24). Sekoitetaan huolellisesti.

Siirrytään kromatografiavaiheeseen (5.4).

Jos kromatografiaa ei tehdä samana päivänä, näyteliuokset säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa.

5.4 *Kromatografia*

Annetaan uutteen (5.2) tai hydrolysaatin (5.3.4) tasoittua huoneenlämpöisiksi ennen kromatografiaa. Ravistellaan seosta ja suodatetaan sopiva määrä 0,2 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.5). Saatu kirkas liuos analysoidaan aminohappoanalysaattorilla käyttäen ioninvaihtokromatografiaa (4.9).

Injektio voidaan suorittaa käsin tai automaattisesti. On tärkeää, että kolonniin lisätään aina sama määrä (±0,5 %) vertailu- tai näyteliuosta, paitsi silloin kun käytetään sisäistä standardia, ja että natriumin ja aminohappojen suhde standardi- ja näyteliuoksissa on mahdollisimman lähellä toisiaan.

▼B

Kalibrointiajojen tiheys riippuu ninhydiiriinireagenssin ja analysaattorin toiminnan stabiilisuudesta. Standardi- tai näyteliuosta laimennetaan sitaattipuskurilla (3.24), siten, että standardiliuoksen antama piikin pinta-ala on 30–200 % näytteen aminohapon antaman piikin pinta-alasta.

Aminohappojen kromatografia vaihtelee jonkin verran käytetyn analysaattorin tyypin ja käytetyn hartsin mukaan. Valitun menetelmän on mahdollistettava aminohappojen erottaminen toisistaan ja muista ninhydiiriin kanssa reagoivista aineista. Pylväaseen ruiskutettujen yhdisteiden pitoisuuden muutosten on käyttöalueella annettava lineaarinen vaste.

Analysoidessa aminohappojen ekvimolaarisia liuoksia sovelletaan seuraavassa kappaleessa määriteltyjä laakson ja piikin välisiä suhteita. Ekvimolaarisen liuoksen tulee sisältää vähintään 30 % kunkin aminohapon siitä enimmäismäärästä, joka voidaan määrittää tarkasti käytetyllä aminohappoanalysaattorilla (4.9).

Kromatogrammissa treoniinin ja seriinin osittain päällekkäisten piikkien välisen laakson suhde matalamman piikin korkeuteen ei saa olla suurempi kuin 2:10. (Jos määritetään ainoastaan kyst(e)iiniä, metioniiniä, treoniiniä ja lysiiniä, vierekkäisten piikkien riittämätön erottuminen toisistaan häiritsee määrittystä.) Muiden aminohappojen osalta erottumisen on oltava parempi kuin 1:10.

Kromatografiajärjestelmän on pystyttävä erottamaan lysiini lysiiniartefaktoista ja ornitiinistä.

6. Tulosten laskeminen

Näytteen ja vertailuliuoksen piikkien pinta-ala mitataan kunkin yksittäisen aminohapon osalta ja määrä (X) lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti; tulos ilmoitetaan grammoina aminohappoa näytekiloa kohden.

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

Jos sisäistä standardia käytetään, kerrotaan kaava vielä termillä $\frac{D}{C}$

A = analysoitavan piikin pinta-ala, hydrolysaatti tai uute

B = analysoitavan piikin pinta-ala, standardiliuos

C = sisäisen standardin piikin pinta-ala hydrolysaatissa tai uutuksessa

D = sisäisen standardin piikin pinta-ala kalibrointiliuoksessa

M = analysoitavan aminohapon molekyylipaino

c = standardin konsentraatio µmol/ml

m = näytteen paino grammoina (korjataan alkuperäiseen painoon, jos kuivattu tai rasva poistettu)

V = ml kokonaihydrolysaattia (5.3.4) tai ml uutteen laskettua kokonaislaimennosta (6.1).

Sekä kystiini että kysteiini määritetään kysteiinihappona hapetetun näytteen hydrolysaateista, mutta ne lasketaan kystiiniksi ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol) käyttäen molekyylipainoa 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Metioniini määritetään metioniinisulfonina hapetetun näytteen hydrolysaateista, mutta lasketaan metioniiniksi käyttäen metioniinin molekyylipainoa 149,21 g/mol.

▼B

Lisätty vapaa metioniini määritetään uuttamisen jälkeen metioniinina; laskennassa käytetään samaa molekyylipainoa.

- 6.1 Uutteiden kokonaislaimennoksen tilavuus (F) vapaiden aminohappojen määrittämistä varten (5.2) lasketaan seuraavasti:

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

V = lopullisen uutteen määrä.

7. Menetelmän arviointi

Menetelmä on testattu vuonna 1990 tehdyssä kansainvälisessä laboratorioiden välisessä vertailussa käyttäen neljää eri rehua (sikojen täysrehu, broilereiden täysrehu, valkuaistiiviste ja esiseos). Tulosten keskiarvo ja standardipoikkeama poikkeavien arvojen poissulkemisen jälkeen on esitetty tämän kohdan taulukoissa.

Keskiarvot g/kg

Vertailuaine	Aminohappo			
	Treoniini	Kyst(e)iini	Metioniini	Lysiini
Sikojen täysrehu	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Broilereiden täysrehu	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Valkuaistiiviste	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Esiseos	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä.

7.1 Toistettavuus

Toistettavuus edellä mainitussa laboratorioiden välisessä vertailussa on ilmaistu muodossa ”laboratorion sisäinen standardipoikkeama” alla olevassa taulukossa.

Laboratorion sisäinen standardipoikkeama (S_r) g/kg

Vertailuaine	Aminohappo			
	Treoniini	Kyst(e)iini	Metioniini	Lysiini
Sikojen täysrehu	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Broilereiden täysrehu	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Valkuaistiiviste	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Esiseos	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä.

▼B

Variaatiokerroin (%) laskettuna laboratorion sisäisestä standardipoikkeamasta (S_r)

Vertailuaine	Aminohappo			
	Treoniini	Kyst(e)iini	Metioniini	Lysiini
Sikojen täysrehu	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Broilereiden täysrehu	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Valkuaistiiviste	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Esiseos	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = osallistuneiden laboratorioden lukumäärä.

7.2 *Uusittavuus*

Edellä mainitun vertailun laboratorioden välisten standardipoikkeamien tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa.

Standardointipoikkeama laboratorioden välillä (S_R) g/kg

Vertailuaine	Aminohappo			
	Treoniini	Kyst(e)iini	Metioniini	Lysiini
Sikojen täysrehu	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Broilereiden täysrehu	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Valkuaistiiviste	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Esiseos	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = osallistuneiden laboratorioden lukumäärä.

Laboratorioden välisestä standardipoikkeamasta (S_R) laskettu variaatiokerroin (%)

Vertailuaine	Aminohappo			
	Treoniini	Kyst(e)iini	Metioniini	Lysiini
Sikojen täysrehu	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Broilereiden täysrehu	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Valkuaistiiviste	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Esiseos	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = osallistuneiden laboratorioden lukumäärä.

▼B**8. Vertailumateriaalin käyttö**

Menetelmän oikea soveltaminen tarkistetaan sertifioidulla vertailumateriaalilla, jos sellainen on saatavilla, tehdyllä kaksoismäärityksellä. Kalibrointi sertifioidulla aminohappojen kalibrointiliuksella on suotavaa.

9. Huomautukset

- 9.1 Aminohappoanalysaattoreiden välisten erojen vuoksi annettuja aminohappojen kalibrointiliuosten (3.27.4 ja 3.27.5) ja hydrolysaattien (5.3.4) lopullisia konsentraatioita on pidettävä suuntaa antavina.

Laitteiston lineaarisen vasteen alue on tarkistettava kaikkien aminohappojen osalta.

Standardiliuos laimennetaan sitraattipuskurilla siten, että piikit sijoittuvat alueen keskivaiheille.

- 9.2 Kun hydrolysaattien analysointiin käytetään suuren erotuskyvyn nestekromatografialaitteistoa, koeolosuhteet on optimoitava valmistajan suositusten mukaisesti.

- 9.3 Jos menetelmää sovelletaan rehuihin, jotka sisältävät enemmän kuin yhden prosentin kloridia (tiiviste, kivennäisaineita sisältävät ravinteet tai lisäravinteet), sillä saatetaan saada metioniinille liian pieniä arvoja, ja erityiskäsittely on tarpeen.

G. TRYPTOFAANIN MÄÄRITYS**1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmän avulla voidaan määrittää rehuissa olevan tryptofaanin kokonaismäärä ja vapaan tryptofaanin määrä. Menetelmällä ei voi erottaa D- ja L-muotoja toisistaan.

2. Periaate

Tryptofaanin kokonaismäärän määrittämiseksi näyte hydrolysoidaan emäksisissä olosuhteissa kyllästetyllä bariumhydroksidiliuksella ja kuumennetaan 110 °C:ssa 20 tuntia. Hydrolyysin jälkeen lisätään sisäinen standardi.

Vapaan tryptofaanin määrittämiseksi näytettä uutetaan lievästi happamissa olosuhteissa yhdessä sisäisen standardin kanssa.

Tryptofaani ja sisäinen standardi hydrolysaatissa tai uutuksessa määritetään HPLC:llä käyttäen fluoresenssidetektoria.

3. Reagenssit

- 3.1 Veden on oltava kaksoistislattua tai vastaavan laatuista (johtokyky < 10 µS/cm).
- 3.2 Standardi: tryptofaani (puhtaus/pitoisuus ≥ 99 %), kuivattu tyhjiössä fosforipentoksidin päällä.
- 3.3 Sisäinen standardi: α-metyylitryptofaani (puhtaus/pitoisuus ≥ 99 %), kuivattu tyhjiössä fosforipentoksidin päällä.
- 3.4 Bariumhydroksidiotahydraatti (on varottava, ettei Ba(OH)₂ · 8 H₂O joudu liiaksi kosketuksiin ilman kanssa; tällöin muodostuisi BaCO₃:a, joka voi häiritä määritystä) (ks. huomautus 9.3).
- 3.5 Natriumhydroksidi.
- 3.6 Ortofosforihappo, w (w/w) = 85 %
- 3.7 Kloorivetyhappo, ρ₂₀ 1,19 g/ml.
- 3.8 Metanoli, HPLC-laatua vastaava.
- 3.9 Petrolieetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.

▼B

- 3.10 Natriumhydroksidiliuos, $c = 1 \text{ mol/l}$:
- Liutetaan 40,0 g NaOH:ta (3.5) veteen ja täytetään 1 litraksi vedellä (3.1).
- 3.11 Kloorivetyhappo, $c = 6 \text{ mol/l}$:
- Mitataan 492 ml HCl:ää (3.7) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.12 Kloorivetyhappo, $c = 1 \text{ mol/l}$:
- Mitataan 82 ml HCl:ää (3.7) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.13 Kloorivetyhappo, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
- Mitataan 8,2 ml HCl:ää (3.7) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.14 Ortofosforihappo, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
- Mitataan 34 ml ortofosforihappoa (3.6) ja täytetään 1 litraksi vedellä (3.1).
- 3.15 Väkevä tryptofaaniliuos (3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- Liutetaan 500 ml:n mittapullossa 0,2553 g tryptofaania (3.2) kloorivetyhappoon (3.13) ja täytetään merkkiin asti kloorivetyhapolla (3.13). Säilyy $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa enintään 4 viikkoa.
- 3.16 Konsentroitunut sisäisen standardin liuos, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- Liutetaan 500 ml:n mittapullossa 0,2728 g α -metyylitryptofaania (3.3) kloorivetyhappoon (3.13) ja täytetään merkkiin asti kloorivetyhapolla (3.13). Säilyy $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa enintään 4 viikkoa.
- 3.17 Tryptofaanin ja sisäisen standardin kalibrointistandardiliuos:
- Mitataan 2,00 ml konsentroitua tryptofaaniliuosta (3.15) ja 2,00 ml konsentroitua sisäisen standardin (α -metyylitryptofaanin) liuosta (3.16). Laimennetaan vedellä (3.1) ja metanolilla (3.8) siten, että liuoksen tilavuus ja metanolipitoisuus on suunnilleen sama kuin valmiin hydrolysaatin (metanolia 10–30 %).
- Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.
- Liuos suojataan suoralta auringonvalolta valmistuksen aikana.
- 3.18 Etikkahappo.
- 3.19 1,1,1-Trikloori-2-metyyli-2-propanoli.
- 3.20 Etanoliamiini $w(w/w) > 98 \text{ } \%$.
- 3.21 Valmistetaan liuos, jossa on 1 g 1,1,1-trikloori-2-metyyli-2-propanolia (3.19) 100 ml:ssa metanolia (3.8).
- 3.22 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi: 3,00 g etikkahappoa (3.18) + 900 ml vettä (3.1) + 50,0 ml 1,1,1-trikloori-2-metyyli-2-propanolia (3.19) metanolissa (3.21) (1g/100ml). pH säädetään arvoon 5,00 etanoliamiinilla (3.20). Täytetään 1 000 ml:ksi vedellä (3.1).
4. **Välineistö**
- 4.1 HPLC-laitteisto, jossa on spektrofotometri-detektor.
- 4.2 Nestekromatografiakolonne, 125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , hartsin (pakkausaineen) hiukkaskoko 3 μm , tai vastaava.
- 4.3 pH-mittari.
- 4.4 Polypropyleenipullo, tilavuus 125 ml, jossa on leveä kaula ja kierretulppa.

▼B

- 4.5 Kalvosuodatin 0,45 µm.
- 4.6 Autoklaavi, 110 (± 2) °C, 1,4 (±0,1) bar.
- 4.7 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.
- 4.8 Vortex-sekoitin.

5. Menettely**5.1 Näytteiden valmistaminen**

Näyte jauhetaan siten, että se läpäisee 0,5 mm:n seulan. Näytteet, joilla on suuri kosteuspitoisuus, on ilmakeivattava korkeintaan 50 °C:n lämpötilassa tai kylmäkuivattava ennen jauhamista. Näytteet, joilla on suuri rasvapitoisuus, on uutettava petrolieetterillä (3.9) ennen jauhamista.

5.2 Vapaan tryptofaanin määrittäminen (uutteesta)

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella sopiva määrä (1–5 g) valmistettua näytettä (5.1) erlenmeyerkolviin. Lisätään 100,0 ml kloorivetyhappoa (3.13) ja 5,00 ml konsentroitua sisäisen standardin liuosta (3.16). Ravistellaan tai sekoitetaan 60 minuuttia mekaanisella ravistelijalla tai magneettisekoittimella (4.7). Annetaan sakan laskeutua ja pipetoidaan 10,0 ml supernatanttiliuosta dekanterilasiin. Lisätään 5 ml ortofosforihappoa (3.14). Säädetään pH arvoon 3 natriumhydroksidilla (3.10). Lisätään metanolia (3.8) niin että lopputilavuudessa on 10–30 % metanolia. Siirretään liuos sopivankokoiseen mittapulloon ja laimennetaan vedellä sopivaan tilavuuteen kromatografiaa varten (suunnilleen sama tilavuus kuin kalibroitistandardiliuksella (3.17)).

Suodatetaan muutama ml liuosta 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.5) läpi ennen HPLC-kolonnein injektointia. Siirrytään kromatografiavaiheeseen 5.4 kohdan mukaisesti.

Standardiliuos ja uutteet suojataan suoralta auringonvalolta. Jos näyteliuoksia ei voida analysoida samana päivänä, uutteita voi säilyttää 5 °C:ssa enintään 3 päivää.

5.3 Tryptofaanin kokonaismäärän määrittäminen (hydrolysaatista)

Punnitaan 0,2 mg:n tarkkuudella 0,1–1 g valmistettua näytettä (5.1) polypropyleenipulloon (4.4). Punnitun näytemäärän tippipitoisuuden on oltava noin 10 mg. Lisätään 8,4 g bariumhydroksidioktahydraattia (3.4) ja 10 ml vettä. Sekoitetaan vortex-sekoittimella (4.8) tai magneettisekoittimella (4.7). Teflon-päällystetty magneetti jätetään seokseen. Huuhdotaan pullon seinämät 4 ml:lla vettä. Pullo suljetaan löyhästi kierrekorkilla. Pullo pannaan autoklaaviin (4.6), jossa on kiehuva vettä, ja autoklavoidaan 30–60 minuutin ajan. Suljetaan autoklaavi ja autoklavoidaan 110 (± 2) °C:ssa 20 tuntia.

Lämpötila on laskettava juuri alle 100 °C:seen, ennen kuin autoklaavi avataan. Jotta Ba(OH)₂ · 8 H₂O ei kiteytyisi, lämpimään seokseen lisätään 30 ml huoneenlämpöistä vettä. Ravistellaan tai sekoitetaan varovasti. Lisätään 2,00 ml konsentroitua sisäisen standardin liuosta (α-metyyli-tryptofaania, 3.16). Jäähdytetään pulloja vesi/jäähäuteessa 15 minuuttia.

Lisätään 5 ml ortofosforihappoa (3.14). Pullo pidetään jäähdytyslauhteessa ja liuos neutraloidaan HCl:llä (3.11) sekoittaen samalla, ja pH säädetään arvoon 3,0 HCl:llä (3.12). Lisätään metanolia niin että lopputilavuudessa on 10–30 % metanolia. Siirretään liuos sopivankokoiseen mittapulloon ja laimennetaan vedellä tiettyyn sopivaan tilavuuteen kromatografiaa varten (esim. 100 ml). Metanolin lisääminen ei saa aiheuttaa saostumista.

▼B

Suodatetaan muutama ml liuosta 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.5) läpi ennen HPLC-kolonneihin injektointia. Siirrytään kromatografiavaiheeseen 5.4 kohdan mukaisesti.

Standardiliuos ja hydrolysaatit suojataan suoralta auringonvalolta. Jos hydrolysaatteja ei voida analysoida samana päivänä, niitä voi säilyttää 5 °C:ssa enintään 3 päivää.

5.4 HPLC-määrittäminen

Seuraavat isokraattisen erotuksen olosuhteet ovat ohjeellisia; ajo voidaan suorittaa muissa olosuhteissa, jos niillä saadaan samanlaiset tulokset (ks. myös huomautukset 9.1 ja 9.2):

Nestekromatografiakolonne (4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 3 µm, tai vastaava
Kolonnin lämpötila:	huoneenlämpötila
Liikkuva faasi (3.22):	3,00 g etikkahappoa (3.18) + 900 ml vettä (3.1) + 50,0 ml liuosta (3.21), jossa on 1,1,1-trikloori-2-metyyli-2-propanolia (3.19) metanolissa (3.8) (1 g/100 ml). Säädetään pH arvoon 5,00 etanoliamiinilla (3.20). Täytetään 1 000 ml:ksi vedellä (3.1).
Virtausnopeus:	1 ml/min
Kokonaisajoaika:	noin 34 min
Detektioaallonpituus:	eksitaatio: 280 nm, emissio: 356 nm.
Injektiotilavuus:	20 µl.

6. Tulosten laskeminen

Lasketaan tryptofaanin määrä (X) grammoina 100 grammassa näytettä.

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

A = sisäisen standardin piikin pinta-ala, kalibroitistandardiliuos (3.17)

B = tryptofaanin piikin pinta-ala, uute (5.2) tai hydrolysaatti (5.3)

V₁ = kalibroitiliuokseen (3.17) lisätyn konsentroidun tryptofaaniliuoksen (3.15) tilavuus ml (2 ml)

c = kalibroitiliuokseen (3.17) lisätyn konsentroidun tryptofaaniliuoksen (3.15) pitoisuus µmol/ml (= 2,50)

V₂ = uuttovaiheessa (5.2) lisätyn (= 5,00 ml) tai hydrolysaattiin (5.3) lisätyn (= 2,00 ml) konsentroidun sisäisen standardiliuoksen (3.16) tilavuus ml

C = sisäisen standardin piikin pinta-ala, uute (5.2) tai hydrolysaatti (5.3)

D = tryptofaanin piikin pinta-ala, kalibroitistandardiliuos (3.17)

V₃ = kalibroitiliuokseen (3.17) lisätyn konsentroidun sisäisen standardiliuoksen (3.16) tilavuus ml (= 2,00 ml)

m = näytteen paino grammoina (korjataan alkuperäiseen painoon, jos kuivattu ja/tai rasva poistettu)

M = tryptofaanin molekyylipaino (= 204,23 g/mol).

7. Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittäksen välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin 10 % suuremmasta tuloksesta.

▼B

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Järjestetyssä EY-vertailussa (4. vertailututkimus) 12 laboratoriota analysoi kolme näytettä hydrolyysimenetelmän varmentamiseksi. Kustakin näytteestä tehtiin viisi rinnakkaismääritystä. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

	Näyte 1 Sian rehu	Näyte 2 Sian rehu, johon on lisätty L-tryptofaania	Näyte 3 Sian rehutiiviste
L	12	12	12
n	50	55	50
Keskiarvo [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = laboratorioiden lukumäärä

n = keskiarvoon mukaan otettujen yksittäisten tulosten lukumäärä, kun on poistettu poikkeavat arvot (tunnistettu Cochranin ja Dixonin poikkeavien arvojen testillä)

s_r = toistettavuuden keskihajonta

S_R = uusittavuuden keskihajonta

r = toistettavuus

R = uusittavuus

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

Toisessa EY-vertailussa (3. vertailututkimus) 13 laboratoriota analysoi kaksi näytettä vapaan tryptofaanin uuttomenetelmän varmentamiseksi. Kustakin näytteestä tehtiin viisi rinnakkaismääritystä. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

	Näyte 4 Vehnä-soijaseos	Näyte 5 Vehnä-soijaseos (= näyte 4), johon on lisätty tryptofaania (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Keskiarvo [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 = laboratorioiden lukumäärä

n = keskiarvoon mukaan otettujen yksittäisten tulosten lukumäärä, kun on poistettu suuresti poikkeavat arvot (tunnistettu Cochranin ja Dixonin poikkeavien arvojen testillä)

s_r = toistettavuuden keskihajonta

S_R = uusittavuuden keskihajonta

r = toistettavuus

R = uusittavuus

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

▼B

Vielä järjestettiin EY-vertailututkimus, jossa seitsemän laboratoriota analysoi neljä näytettä, tarkoituksena tryptofaanin varmentaminen hydrolyysissä. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa. Kustakin näytteestä tehtiin viisi rinnakkaismäärittystä.

	Näyte 1 Sikarehuseos (CRM 117)	Näyte 2 Vähärasvainen kalajauho (CRM 118)	Näyte 3 Soijajauho (CRM 119)	Näyte 4 Rasvaton maitojauhe (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Keskiarvo [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 = laboratorioiden lukumäärä

n = keskiarvoon mukaan otettujen yksittäisten tulosten lukumäärä, kun on poistettu suuresti poikkeavat arvot (tunnistettu Cochranin ja Dixonin poikkeavien arvojen testillä)

s_r = toistettavuuden keskihajonta

S_R = uusittavuuden keskihajonta

r = toistettavuus

R = uusittavuus

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

9. Huomautukset

- 9.1 Seuraavilla erityisillä kromatografiaolosuhteilla voidaan erottaa paremmin tryptofaani ja α -metyylitryptofaani.

Isokraattinen erotus, jonka jälkeen kolonni puhdistetaan gradientteilla:

Nestekromatografia-kolonne:	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 5 µm, tai vastaava		
Kolonnin lämpötila:	32 °C		
Liikkuva faasi:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /metanoli, 95+5 (V+V). B: metanoli		
Gradientti:	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
Virtausnopeus:	1,2 ml/min		
Kokonaisajoaika:	noin 33 min.		

- 9.2 Kromatografia vaihtelee HPLC-laitetyypin ja käytetyn kolonnin täyttemateriaalin mukaan. Valitun järjestelmän on pystyttävä erottamaan tryptofaanin piikki ja sisäisen standardin piikki pohjaviivalle asti. Lisäksi on tärkeää, että hajoamistuotteet eroavat hyvin tryptofaanista ja sisäisestä

▼B

standardista. Hydrolysaatteja on ajettava myös ilman sisäistä standardia, jotta voidaan tarkistaa epäpuhtauksien esiintyminen sisäisen standardin kohdalla olevan pohjaviivan avulla. On tärkeää, että ajoaika on riittävän pitkä, jotta kaikki hajoamistuotteet eluoituvat; myöhään eluoituvat piikit saattavat muuten häiritä myöhempiä kromatografia-ajoja.

Kromatografijärjestelmän vasteen on oltava lineaarinen toiminta-alueella. Lineaarinen vaste on mitattava sisäisen standardin vakioipitoisuudella (normaalilla pitoisuudella) ja erilaisilla tryptofaanipitoisuuksilla. On tärkeää, että sekä tryptofaanin että sisäisen standardin piikkien koot ovat HPLC-fluoresenssijärjestelmän lineaarisella alueella. Jos joko tryptofaanin ja/tai sisäisen standardin piikki on liian pieni tai liian suuri (piikit ovat liian pienet tai suuret), analyysi on toistettava käyttäen erilaista näytemäärää ja/tai muuttaen lopputilavuutta.

9.3 *Bariumhydroksidi*

Bariumhydroksidi tulee vanhetessaan vaikealiukoisemmaksi. HPLC-määrittystä varten tehty liuos voi sen vuoksi olla samaa, minkä vuoksi voidaan saada alhaisia tryptofaanituloksia.

H. RAAKARASVAN JA RAAKAÖLJYN MÄÄRITYS

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä määritetään rehuissa olevan raakarasvan ja -öljyn määrä. Se ei koske öljysiementen ja öljypitoisten hedelmien määrittäystä.

Jäljempänä kuvattavan kahden menettelytavan käyttö riippuu rehun luonteesta ja koostumuksesta sekä määrittelyn käyttötarkoituksesta.

1.1 *Menettelytapa A — Suoraan uutettavissa oleva raakarasva ja -öljy*

Tätä menetelmää voidaan käyttää kasviperäisiin rehuihin lukuun ottamatta niitä, jotka kuuluvat menettelytavan B soveltamisalaan.

1.2 *Menettelytapa B — Raakarasvan ja -öljyn kokonaismäärä*

Menetelmää voidaan soveltaa eläinperäisiin rehuihin sekä kaikkiin rehu-seoksiin. Sitä käytetään kaikkiin sellaisiin rehuihin, joista rasvaa ja öljyä ei voida täysin uutata ilman sitä edeltävää hydrolysointia (esim. gluteeni, hiiva, perunaproteiinit ja tuotteet, joita on käsitelty muun muassa ekstrudoimalla, kuumentamalla tai hiutaleiksi tekemällä).

1.3 *Tulosten tulkitseminen*

Aina, kun menettelytapaa B käyttäen saadaan suurempi tulos kuin menettelytapaa A käyttäen, menettelytavalla B saatua tulosta pidetään todellisena arvona.

2. **Periaate**

2.1 *Menettelytapa A*

Näyte uutetaan petroleetterillä. Liuotin tislataan pois ja jäännös kuivataan ja punnitaan.

2.2 *Menettelytapa B*

Näyte käsitellään kuumentamalla sitä kloorivetyhapon kanssa. Seos jäähdytetään ja suodatetaan. Jäännös pestään ja kuivataan ja määrittystä jatketaan menettelytavan A mukaisesti.

▼B**3. Reagenssit**

- 3.1 Petrolieetteri, kiehumislämpötila: 40–60 °C. Bromiluvun on oltava alle 1 ja haihdutusjäännöksen alle 2 mg/100 ml.
- 3.2 Natriumsulfaatti, vedetön.
- 3.3 Kloorivetyhappo, $c = 3 \text{ mol /l}$.
- 3.4 Suodatuksen apuaine, esim. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. Välineistö

- 4.1 Uuttolaitteisto. Jos käytetään Soxhlet-laitteistoa (jossa on sifoni), refluksointinopeuden on oltava sellainen, että Soxhlet-väliosan täyttyminen liuottimella ja tyhjeneminen siitä tapahtuvat noin 10 kertaa tunnissa. Jos laitteistoon kuuluu suoramallinen väliosa, refluksointinopeuden on oltava noin 10 ml minuutissa.
- 4.2 Uuttohylsyjä, joissa ei ole petrolieetteriin liukenevaa materiaalia ja joiden huokoisuus täyttää 4.1 kohdassa esitetyt vaatimukset.
- 4.3 Lämpökaappi, joko vakuumikaappi, joka on säädetty $75 \pm 3 \text{ °C}$:seen tai kiertoilmakaappi, joka on säädetty $100 \pm 3 \text{ °C}$:seen.

5. Menettely**5.1 Menettelytapa A (katso 8.1 kohta)**

Näytettä punnitaan 5 g 1 mg:n tarkkuudella uuttohylsyyn (4.2) ja se peitetään rasvattomalla puuvillavanulla.

Hylsy asetetaan uuttolaitteeseen (4.1) ja sitä uutetaan kuusi tuntia petrolieetterillä (3.1). Petrolieetteriuute otetaan talteen kuivaan, punnittuun pulloon, joka sisältää kiehumakiviä ⁽¹⁾.

Liuotin tislataan pois. Pullon ja sen sisältämän jäännöksen annetaan kuivua puolentoista tunnin ajan lämpökaapissa (4.3). Pullon jäännöksiin annetaan jäähtyä eksikkaattorissa ja se punnitaan. Kuivausta jatketaan edelleen 30 minuutin ajan sen varmistamiseksi, että rasvan ja öljyn paino pysyy vakiona (kahden peräkkäisen punnituksen välinen painoero saa olla enintään 1 mg).

5.2 Menettelytapa B

Näytettä punnitaan 2,5 g 1 mg:n tarkkuudella (ks. 8.2 kohta) 400 ml:n dekanterilasiin tai 300 ml:n erlenmeyerkolviin ja astiaan lisätään 100 ml kloorivetyhappoa (3.3) ja kiehumakiviä. Dekanterilasi peitetään kellonlasilla tai erlenmeyerkolvi yhdistetään palautusjäähdytimeen. Seos saatetaan varovasti kiehuvaan käyttäen pientä liekkiä tai sähkölevyä ja seoksen annetaan kiehua hiljalleen tunnin ajan. Näytteen tarttumista astian seinämiin tulee välttää.

Astian sisällön annetaan jäähtyä ja lisätään suodatuksen apuainetta (3.4) sen verran, ettei rasvaa ja öljyä häviä suodatuksessa. Suodatuksen käytetään kostutettua, rasvatonta, kaksinkertaista suodatinpaperia. Jäännös pestään kylmällä vedellä, kunnes saadaan neutraali suodos. Tarkastetaan, ettei suodos sisällä öljyä tai rasvaa. Jos sitä esiintyy, näyte on ennen hydrolysointia uutettava petrolieetterillä menettelytapaa A käyttäen.

Jäännöksen sisältävä kaksinkertainen suodatinpaperi asetetaan kellonlasille ja sen annetaan kuivua puolitoista tuntia $100 \pm 3 \text{ °C}$:ssa lämpökaapissa (4.3).

⁽¹⁾ Jos rasvalle tai öljylle tehdään vielä tämän jälkeen sen laatuun liittyviä määryksiä, kiehumakivet korvataan lasihelmillä.

▼B

Kuivan jäännöksen sisältävä kaksinkertainen suodatinpaperi pannaan uuttohylsyyn (4.2) ja peitetään rasvattomalla puuvillavanulla. Hylsy pannaan uuttolaitteeseen (4.1) ja määrittystä jatketaan 5.1 kohdan toisessa ja kolmannessa kappaleessa esitetyllä tavalla.

6. **Tuloksen ilmoittaminen**

Jäännöksen paino ilmoitetaan prosentteina näytteen painosta.

7. **Toistettavuus**

Samasta näytteestä saman henkilön suorittaman kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa olla yli:

— 0,2 %:a absoluuttisena arvona, kun raakasva- ja -öljypitoisuus on alle 5 %,

— 4,0 %:a suhteellisena arvona, kun raakasva- ja -öljypitoisuus on 5–10 %,

— 0,4 %:a absoluuttisena arvona, kun raakasva- ja -öljypitoisuus on yli 10 %.

8. **Huomautukset**

8.1 Runsaasti rasvaa ja öljyä sisältäviä tuotteita, joita on hankala jauhaa tai joista on vaikea saada homogeenista näytettä, käsitellään seuraavasti:

Näytettä punnitaan 20 g 1 mg:n tarkkuudella ja siihen sekoitetaan vähintään 10 g vedetöntä natriumsulfaattia (3.2). Sitä uutetaan petrolieetterillä (3.1) 5.1 kohdassa esitetyllä tavalla. Saadun uutteen tilavuus täydennetään 500 ml:ksi petrolieetterillä (3.1) ja se sekoitetaan. Liuosta otetaan 50 ml ja kaadetaan pieneen, kuivaan, punnittuun pulloon, joka sisältää kiehumakiviä. Liuotin tislataan pois, jäännös kuivataan ja määrittystä jatketaan 5.1 kohdan viimeisessä kappaleessa kuvatulla tavalla.

Liuotimen annetaan haihtua hylsyssä olevasta uuttojäännöksestä, jäännös jauhetaan 1 mm raekokoon ja siirretään takaisin hylsyyn (lisäämättä natriumsulfaattia) ja määrittystä jatketaan 5.1 kohdan toisessa ja kolmannessa kappaleessa kuvatulla tavalla.

Rasvan ja öljyn pitoisuus prosentteina näytteestä lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

m_1 = ensimmäisen uuton jälkeen saadun jäännöksen (määräosa uutteen) paino grammoina,

m_2 = toisen uuton jälkeen saadun jäännöksen paino grammoina.

8.2 Pieniä rasva- ja öljymääriä sisältävien näytteiden punnitusmäärä voidaan nostaa 5 grammaan.

8.3 Lemmikkieläinten ruokiin, joiden vesipitoisuus on suuri, voi olla tarvetta sekoittaa vedetöntä natriumsulfaattia ennen hydrolysointia ja uuttoa, joka suoritetaan menettelytavassa B kuvatulla tavalla.

8.4 Edellä 5.2 kohdassa voi olla tehokkaampaa käyttää kuumaa vettä kylmän veden sijaan jäännöksen pesemiseksi suodatuksen jälkeen.

8.5 Mainittua 1,5 tunnin kuivatusaikaa saatetaan joutua pidentämään joidenkin rehujen osalta. Liiallista kuivaamista on kuitenkin vältettävä, sillä se voi johtaa alhaisempiin tuloksiin. Myös mikroaaltouunia voidaan käyttää.

▼B

- 8.6 Ennen hydrolysointia tapahtuvaa menettelytavan A mukaista esiuuttoa ja menettelytavan B mukaista uudelleen uuttoa suositellaan, jos raakarasvan/öljyn pitoisuus on yli 15 %. Tämä riippuu jossakin määrin rehun tai refuseoksen luonteesta ja siinä olevan rasvan/öljyn laadusta.

I. RAAKAKUIDUN MÄÄRITYS**1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehusta sen rasvaton orgaaninen aines, joka ei liukene happo- ja emäsluoksen kanssa keitetessä ja jota kutsutaan sovitusti raakakuiduksi.

2. Periaate

Näyte, josta tarvittaessa on poistettu rasva, käsitellään peräkkäin tietyn väkevyisillä kiehuvilla rikkihappo- ja kaliumhydroksidiliuoksilla. Jäännös erotetaan suodattamalla näyte lasisinterisuodattimella, se pestään, kuivataan, punnitaan ja poltetaan tuhaksi 475–500 °C:ssa. Tuhkaamisesta aiheutuva painohäviö vastaa näytteen raakakuitupitoisuutta.

3. Reagenssit

- 3.1 Rikkihappo, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2 Kuohunestoaine (esimerkiksi n-oktanoli).
- 3.3 Suodatuksen apuaine (Celite 545 tai vastaava), jota on kuumennettu 500 °C:n lämpötilassa neljän tunnin ajan (8.6).
- 3.4 Asetoni.
- 3.5 Petrolieetteri, kiehumislämpötila: 40–60 °C.
- 3.6 Kloorivetyhappo, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7 Kaliumhydroksidiliuos, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Välineistö

- 4.1 Lämmityslaitteisto rikkihappoliuoksella tai kaliumhydroksidiliuoksella tehtävään kuumauuttoon; lämmityslaitteistoon kuuluu suodatinupokkaan (4.2) jalusta ja letku, jossa on ilmanpoisto- ja tyhjennysventtiili; tarvittaessa laitteistoon saadaan paineilmaa. Ennen kutakin päivittäistä käyttöä laitteisto esilämmitetään keittämällä siinä vettä viiden minuutin ajan.
- 4.2 Vetoisuudeltaan 50 ml:n suuruinen lasinen suodatinupokas, jossa on huokoisuudeltaan 40–90 µm:n lasisinterisuodatin. Ennen ensimmäistä käyttökertaa upokasta kuumennetaan 500 °C:ssa muutaman minuutin ajan ja jäädytetään (8.6).
- 4.3 Vetoisuudeltaan vähintään 270 ml oleva sylinteri, jossa on kiehumisen kestävä palautusjäähdytin.
- 4.4 Termostaattisäätoinen lämpökaappi.
- 4.5 Termostaattisäätoinen muhveliuuni.
- 4.6 Uuttoyksikkö, johon kuuluu suodatinupokkaan jalusta (4.2) ja poistoletku, jossa on ilmanpoisto- ja tyhjennysventtiili.
- 4.7 Osia lämmityslaitteiston (4.1), upokkaan (4.2) ja sylinterin (4.3) kokoamiseen sekä kylmäuuttoyksikön (4.6) ja upokkaan liittämiseen.

5. Menettely

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 1 g esikäsiteltyä näytettä upokkaaseen (4.2) (ks. huomautukset 8.1, 8.2 ja 8.3) ja lisätään 1 g suodatuksen apuainetta (3.3).

▼B

Liitetään suodatinupokas (4.2) lämmityslaitteistoon (4.1), ja tämän jälkeen liitetään sylinteri (4.3) upokkaaseen. Sylinteri-upokasyhdistelmä täytetään 150 ml:lla kiehuvaan rikkihappoon (3.1) ja tarvittaessa lisätään muutama pisara kuohunestoainetta (3.2).

Neste saatetaan kiehuvaan 5 ± 2 minuutissa ja annetaan kiehua voimakkaasti tarkalleen 30 minuuttia.

Avataan poistoletkun venttiili (4.1), ja suodatetaan rikkihappo tyhjässä suodatinupokkaan läpi ja pestään jäännös kolme kertaa peräkkäin 30 ml:lla kiehuvaan vettä huolehtien siitä, että jäännös suodatetaan kuivaksi jokaisen pesukerran jälkeen.

Suljetaan tyhjennysventtiili, kaadetaan 150 ml kiehuvaan kaliumhydroksidiliuosta (3.7) sylinteriupokasyhdistelmään ja lisätään muutama pisara kuohunestoainetta (3.2). Neste saatetaan kiehuvaan 5 ± 2 minuutissa ja annetaan kiehua voimakkaasti tarkalleen 30 minuuttia. Suodatetaan ja toistetaan pesumenettelyt samalla tavoin kuin rikkihapon kanssa.

Viimeisen pesun ja kuivauksen jälkeen upokas sisältöineen irrotetaan ja upokas yhdistetään uudelleen kylmäuuttoyksikköön (4.6). Poistetaan ilma ja pestään jäännös upokkaassa kolme kertaa peräkkäin 25 ml:lla asetonilla (3.4) huolehtien siitä, että jäännös kuivuu jokaisen pesukerran jälkeen.

Annetaan upokkaan kuivua vakiopainoon lämpökaapissa, jonka lämpötila on 130 °C. Jokaisen kuivauksen jälkeen jäähdytetään eksikkaattorisissa ja punnitaan nopeasti. Upokas asetetaan muhveliuuniin, jossa näytteen annetaan palaa tuhkaksi vakiopainoon (kahden peräkkäisen punnituksen välinen painoero saa olla enintään 2 mg) 475–500 °C:ssa vähintään 30 minuuttia.

Jokaisen kuumennuksen jälkeen upokkaan annetaan jäähtyä ensin uunissa ja tämän jälkeen eksikkaattorisissa ennen punnitusta.

Nollakoe suoritetaan ilman näytettä. Tuhkaamisesta johtuva painohäviö ei saa olla yli 4 mg:aa.

6. Tulosten laskeminen

Raakakuitupitoisuus prosentteina näytteestä saadaan seuraavasti:

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

jossa:

- m = näytteen paino grammoina,
- m₀ = määrittämisen aikana näytteen polttamisesta aiheutuva painohäviö grammoina,
- m₁ = nollakokeessa polttamisesta aiheutuva painohäviö grammoina.

7. Toistettavuus

Kahden samasta näytteestä suoritettujen määrittämisen tulosten välinen ero ei saa olla yli:

- 0,6 %:a absoluuttisena arvona, kun raakakuitupitoisuus on alle 10 %,
- 6 %:a suhteellisenä arvona suuremmasta tuloksesta, kun raakakuitupitoisuus on vähintään 10 %.

8. Huomautukset

- 8.1 Rehuista, jotka sisältävät yli 10 % öljyä ja rasvoja, on rasva ennen määrittämistä poistettava petroleetterillä (3.5). Liitetään suodatinupokas (4.2) sisältöineen kylmäuuttoyksikköön (4.6), poistetaan ilma ja pestään

▼B

jäännös kolme kertaa 30 ml:lla petrolieetteriä; varmistetaan, että jäännös on kuiva. Yhdistetään upokas sisältöineen lämmityslaitteistoon (4.1) ja jatketaan 5 kohdassa esitetyllä tavalla.

- 8.2 Rehuista, jotka sisältävät öljyjä ja rasvoja, joita ei voida uuttaa suoraan petrolieetterillä (3.5), rasva on poistettava 8.1 kohdassa esitetyllä tavalla ja tämän jälkeen rasva on poistettava vielä uudelleen hapolla kiehumisen jälkeen. Hapolla kiehumisen ja sitä seuraavien pesujen jälkeen upokas sisältöineen yhdistetään kylmäuuttoyksikköön (4.6) ja jäännöstä pestään kolme kertaa 30 ml:lla asetonia ja tämän jälkeen kolme kertaa 30 ml:lla petrolieetteriä. Suodatetaan tyhjössä kunnes jäännös on kuiva ja jatketaan määrittystä kaliumhydroksidikäsittelyllä 5 kohdassa esitetyllä tavalla.
- 8.3 Jos näyte sisältää yli 5 % karbonaatteja kalsiumkarbonaattina ilmaistuna, upokas (4.2) yhdistetään punnittuine näytteineen lämmityslaitteistoon (4.1). Näyte pestään kolme kertaa 30 ml:lla kloorivetyhappoa (3.6). Jokaisen lisäämiskerran jälkeen odotetaan noin yksi minuutti ennen suodatuksen aloittamista. Näyte pestään kerran 30 ml:lla vettä ja tämän jälkeen jatketaan 5 kohdassa esitetyllä tavalla.
- 8.4 Jos käytetään telineenmuotoista laitteistoa (useita upokkaita on liitetty samaan lämmityslaitteistoon), kahta koetta samasta näytteestä ei saa suorittaa samalla kertaa.
- 8.5 Jos kiehumisen jälkeen happamien ja emäksisten liuosten suodatus osoittautuu vaikeaksi, käytetään lämmityslaitteiston tyhjennysletkun kautta annettavaa paineilmaa, minkä jälkeen jatketaan suodatusta.
- 8.6 Tuhkanlämpötila ei saa olla yli 500 °C lasisten suodatinupokkaiden käyttöänsä pidentämiseksi. Kuumennus- ja jäähdytysjaksojen aikana on vältettävä suuria lämpötilanvaihteluita.

J. SOKERIN MÄÄRITYS**1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää pelkistävien sokerien ja kokonaissokerien määrä invertoinnin jälkeen glukoosina, tai tarvittaessa sakkaroosina käyttäen muunnoskerrointa 0,95. Menetelmä soveltuu rehuseoksiin. Muita rehuja varten on säädetty erityismenetelmistä. Laktoosi on tarvittaessa mitattava erikseen ja otettava huomioon tuloksia laskettaessa.

2. Periaate

Sokerit uutetaan laimeaan etanoliin ja liuos kirkastetaan Carrez-liuoksilla I ja II. Etanolin poiston jälkeen määritykset suoritetaan ennen invertointia ja sen jälkeen saadut Luff-Schoorl-menetelmällä.

3. Reagenssit

- 3.1 Etanoli 40 % (v/v), tiheys: 0,948 g/ml 20 °C:ssa, neutraalia fenoliftaleiiniä määritettynä.
- 3.2 Carrez-liuos I: liuotetaan veteen 21,9 g sinkkiasetaattia, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ja 3 g jääetikkaa. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.
- 3.3 Carrez-liuos II: liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.
- 3.4 Metyylioranssiluos 0,1 % (w/v).
- 3.5 Kloorivetyhappo 4 mol/l.
- 3.6 Kloorivetyhappo 0,1 mol/l.

▼B

- 3.7 Natriumhydroksidiliuos 0,1 mol/l.
- 3.8 Luff-Schoorl-reagenssi:
- Kaadetaan sitruunahappoliuos (3.8.2) natriumkarbonaattiliuokseen (3.8.3) varovasti sekoittaen. Tämän jälkeen lisätään kuparisulfaattiliuos (3.8.1) ja täytetään 1 litraksi vedellä. Annetaan seistä yön yli ja suodatetaan.
- Näin saadun reagenssin (Cu 0,05 mol/l; Na₂ CO₃ 1 mol/l) konsentraatio tarkistetaan; ks. 5.4 kohdan viimeinen kappale. Liuoksen pH:n on oltava noin 9,4.
- 3.8.1 Kuparisulfaattiliuos: liuotetaan 25 g raudatonta kuparisulfaattia, Cu-SO₄·5H₂O, 100 ml:aan vettä.
- 3.8.2 Sitruunahappoliuos: liuotetaan 50 g sitruunahappoa, C₆H₈O₇·H₂O, 50 ml:aan vettä.
- 3.8.3 Natriumkarbonaattiliuos: liuotetaan 143,8 g vedetöntä natriumkarbonaattia noin 300 ml:aan lämmintä vettä. Annetaan jäähtyä.
- 3.9 Natriumtiosulfaattiliuos 0,1 mol/l.
- 3.10 Tärkkelysliuos: 5 g liukoista tärkkelystä lisätään 30 ml:aan vettä, seos lisätään 1 litraan kiehuvaan vettä. Keitetään kolme minuuttia, annetaan jäähtyä ja tarvittaessa lisätään 10 mg elohopeajodidia säilytteenä.
- 3.11 Rikkihappo, 3 mol/l.
- 3.12 Kaliumjodidiliuos, 30 % (w/v)
- 3.13 Kiehumakiviä, jotka keitetään suolahapossa, pestään vedellä ja kuivataan.
- 3.14 3-metyylibutan-1-oli.

4. Välineistö

Sekoitin: noin 35–40 kierr./min.

5. Menettely**5.1 Näytteen uutto**

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 2,5 g näytettä 250 ml:n mittapulloon. Lisätään 200 ml etanolia (3.1) ja sekoitetaan sekoittajassa yhden tunnin ajan. Lisätään 5 ml Carrez-liuosta I (3.2) ja sekoitetaan noin 30 sekunnin ajan. Lisätään 5 ml Carrez-liuosta II (3.3) ja sekoitetaan uudelleen yhden minuutin ajan. Täytetään pullo etanolilla (3.1), homogenoidaan ja suodatetaan. Otetaan 200 ml suodosta ja haihdutetaan se noin puoleen tilavuuteen, jotta saadaan poistetuksi suurin osa etanolista. Haihdutusjäännös siirretään kvantitatiivisesti 200 ml:n mittapulloon käyttäen lämmintä vettä, jäähdytetään, täytetään vedellä merkkiin asti, homogenoidaan ja suodatetaan tarvittaessa. Tätä liuosta käytetään pelkistävien sokerien määrittämiseksi ja invertointireaktion jälkeen kokonaissokerien määrittämiseksi.

5.2 Pelkistävien sokerien määrittäminen

Pipetoidaan enintään 25 ml liuosta, joka sisältää alle 60 mg glukoosina ilmoitettuja pelkistäviä sokereita. Tarvittaessa tilavuus säädetään 25 ml:ksi tislattua vedellä ja pelkistävien sokerien pitoisuus määritetään Luff-Schoorl-menetelmällä. Tulos ilmoitetaan glukoosiprosenttina.

5.3 Kokonaissokerien määrittäminen invertointireaktion jälkeen

Pipetoidaan 50 ml liuosta 100 ml:n mittapulloon. Lisätään muutama pisara metyylioranssiliuosta (3.4) ja tämän jälkeen lisätään varovasti ja jatkuvasti sekoittaen kloorivetyhappoa (3.5), kunnes neste muuttuu selvästi punaiseksi. Lisätään 15 ml kloorivetyhappoa (3.6), pullo upotetaan

▼B

voimakkaasti kiehuvaan vesihauteeseen ja pidetään siinä 30 minuutin ajan. Jäähdytetään nopeasti noin 20 °C:seen ja lisätään 15 ml natriumhydroksidiliuosta (3.7). Tilavuus säädetään 100 ml:ksi vedellä ja homogenoidaan. Otetaan enintään 25 ml:n erä, joka sisältää alle 60 mg glukosina ilmoitettuja pelkistäviä sokereita. Tarvittaessa tilavuus säädetään 25 ml:ksi tislattulla vedellä, ja pelkistävien sokerien pitoisuus määritetään Luff-Schoorl-menetelmällä. Tulos ilmoitetaan glukosiprosenttina tai tarvittaessa sakkaroosina kertomalla kertoimella 0,95.

5.4 *Titraus Luff-Schoorl-menetelmällä*

Pipetoidaan 25 ml Luff-Schoorl-reagenssia (3.8) 300 ml:n erlenmeyer-erkolviin, lisätään tarkalleen 25 ml kirkastettua sokeriliuosta. Lisätään kaksi kiehumakiveä (3.13), lämmitetään keskikokoisen liekin yläpuolella käsin ravistaen ja kuumennetaan neste kiehumapisteeseen noin kahdessa minuutissa. Erlenmeyerkolvi asetetaan välittömästi asbestiverkolle, jossa on noin 6 cm:n läpimittainen reikä ja verkon alla on etukäteen sytytetty liekki. Säädetään liekki sellaiseksi, että erlenmeyerkolvi kuumenee ainoastaan pohjastaan. Tämän jälkeen erlenmeyerkolviin kiinnitetään palautusjäähdytin. Keitetään tarkalleen 10 minuutin ajan. Jäähdytetään välittömästi kylmässä vedessä ja noin viiden minuutin kuluttua titrataan seuraavasti:

Lisätään 10 ml kaliumjodidiliuosta (3.12) ja välittömästi tämän jälkeen (varoen, koska liuos voi vaahdota runsaasti) lisätään 25 ml rikkihappoa (3.11). Titrataan natriumtiosulfaattiliuksella (3.9) kunnes väri muuttuu samean keltaiseksi, lisätään tarkkelysindikaattori (3.10) ja titraus suoritetaan loppuun.

Sama titraus suoritetaan liuoksesta, jossa on tarkasti mitattuna 25 ml Luff-Schoorl-reagenssia (3.8) ja 25 ml vettä, sen jälkeen kun 10 ml kaliumjodidiliuosta (3.12) ja 25 ml rikkihappoa (3.11) on lisätty kohottamatta lämpötilaa kiehumispisteeseen.

6. Tulosten laskeminen

Oheisen taulukon avulla määritetään milligrammoissa se glukosimäärä, joka vastaa näiden kahden titrauksen erotusta ilmaistuna milligrammoina natriumtiosulfaattia, 0,1 mol/l. Tulos ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

7. Menettely erityistapauksissa

- 7.1 Runsaasti melasseja sisältävistä rehuista ja rehuista, jotka eivät ole homogeenisia, punnitaan 20 g näyte 1 litran mittapulloon ja lisätään 500 ml vettä. Sekoitetaan 1 tunti sekoittajassa. Selkeytetään käyttäen Carrez I (3.2) ja II (3.3) -reagensseja 5.1 kohdassa kuvatulla tavalla kuitenkin tällä kertaa käyttäen nelinkertaiset määrät kutakin reagenssia. Täytetään merkkiin asti 80-prosenttisellä (v/v) etanolilla.

Homogenoidaan ja suodatetaan. Poistetaan etanoli 5.1 kohdan mukaisesti. Jos yhtään dekstrinoitua tarkkelystä ei esiinny, täytetään merkkiin asti tislattulla vedellä.

- 7.2 Melassista ja runsaasti sokeria sisältävistä ja tarkkelysköyhistä rehuaineista (kuten johanneksenleipäpuun hedelmät, kuivatut sokerijuurikasleikkeet) punnitaan 5 gramman näyte 250 ml:n mittapulloon, lisätään 200 ml tislattua vettä ja sekoitetaan ravistelijassa yhden tunnin ajan tai tarvittaessa kauemmin. Kirkastetaan käyttäen Carrez-reagensseja I (3.2) ja II (3.3) 5.1 kohdassa kuvatulla tavalla. Mittapullo täytetään vedellä merkkiin, liuos homogenoidaan ja suodatetaan. Kokonaissokerien määrän toteamiseksi suoritusta jatketaan 5.3 kohdan mukaisesti.

8. Huomautukset

- 8.1 Vaahdonmuodostuksen estämiseksi on suositeltavaa lisätä noin 1 ml 3-metyylibutan-1-olia (3.14) (riippumatta tilavuudesta) ennen Luff-Schoorl-reagenssin kanssa keittämistä.

▼B

- 8.2 Invertoinnin jälkeen saadun glukoosina ilmoitetun kokonaissokeripitoisuuden ja glukoosina ilmoitetun pelkistävien sokerien pitoisuuden välisestä erosta 0,95:llä kerrottuna saadaan sakkaroosin prosentuaalinen pitoisuus.
- 8.3 Pelkistävien sokerien, paitsi laktoosin, pitoisuuden määrittämiseksi voidaan käyttää kahta menetelmää:
- 8.3.1 Likimääräisen arvion laskemiseksi laktoosipitoisuus, joka on saatu eri analyysimenetelmällä, kerrotaan 0,675:llä ja saatu tulos vähennetään pelkistävien sokerien pitoisuudesta.
- 8.3.2 Pelkistävien sokerien, paitsi laktoosin, määrän tarkkaa laskemista varten on tehtävä kaksi lopullista määritystä samasta näytteestä. Toinen määrittämisistä suoritetaan liuokselle, joka saadaan osasta 5.1 kohdan mukaisesti saatua liuosta, ja toinen määrittämisistä suoritetaan osasta liuosta, joka saadaan laktoosimäärittäksen yhteydessä tähän tarkoitukseen kehitetty menetelmän mukaisesti (sen jälkeen kun muut sokerit on fermentoitu ja liuos kirkastettu).

Molemmissa tapauksissa sokerin määrä määritetään Luff-Schoorl-menetelmällä ja lasketaan milligrammoina glukoosia. Arvot vähennetään toisistaan ja erotus ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

Esimerkki

Kaksi tilavuutta vastaa 250 mg:n näytteestä tehtyjä määrittäksiä.

Ensimmäisessä tapauksessa on kulunut 17 ml natriumtiosulfaattiliuosta, 0,1 mol/l, joka vastaa 44,2 mg:aa glukoosia; toisessa tapauksessa 11 ml, joka vastaa 27,6 mg:aa glukoosia.

Erotus on 16,6 mg glukoosia.

Pelkistävien sokerien, laktoosia lukuun ottamatta, glukoosina laskettu määrä on:

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

Taulukko 25 ml:lle Luff-Schoorl-reagenssia

Na₂S₂O₃, 0,1 mol/l, millilitroina, kahden minuutin kuumennus, 10 minuutin keitto

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

▼B

K. LAKTOOSIN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää laktoosin pitoisuus rehuissa, jotka sisältävät yli 0,5 % laktoosia.

2. Periaate

Sokerit liuotetaan veteen. Liuokselle suoritetaan fermentointi käyttäen *Saccharomyces cerevisiae* -hiivaa, joka ei kuluta laktoosia. Selkeyttäminen ja suodatuksen jälkeen määritetään suodoksen laktoosipitoisuus Luff-Schoorl-menetelmällä.

3. Reagenssit

3.1 *Saccharomyces cerevisiae* -suspensio: suspendoidaan 25 g tuoretta hiivaa 100 ml:aan vettä. Suspensio säilyy jääkaapissa enintään yhden viikon ajan.

3.2 Carrez-liuos I: liuotetaan veteen 21,9 g sinkkiasetaattia $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ja 3 g jääetikkaa. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.3 Carrez-liuos II: liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.4 Luff-Schoorl-reagenssi:

Kaadetaan sitruunahappoliuos (3.4.2) natriumkarbonaattiliuokseen (3.4.3) sekoittaen varovasti lisäyksen aikana. Tämän jälkeen lisätään kuparisulfaattiliuos (3.4.1) ja täytetään 1 litraksi vedellä. Annetaan seistä yön yli ja suodatetaan. Näin saadun reagenssin (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l) konsentraatio tarkistetaan. Liuoksen pH:n on oltava noin 9,4.

3.4.1 Kuparisulfaattiliuos: liuotetaan 25 g raudatonta kuparisulfaattia, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 ml:aan vettä.

3.4.2 Sitruunahappoliuos: liuotetaan 50 g sitruunahappoa, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 50 ml:aan vettä.

3.4.3 Natriumkarbonaattiliuos: liuotetaan 143,8 g vedetöntä natriumkarbonaattia noin 300 ml:aan lämmintä vettä. Annetaan jäähtyä.

3.5 Kiehumakiviä, jotka keitetään suolahapossa, pestään vedellä ja kuivataan.

3.6 Kaliumjodidiliuos, 30 % (w/v).

3.7 Rikkihappo, 3 mol/l.

3.8 Natriumtiosulfaattiliuos, 0,1 mol/l.

3.9 Tärkkelysliuos: 5 g liukoista tärkkelystä lisätään 30 ml:aan vettä, seos lisätään 1 litraan kiehuva vettä. Keitetään kolme minuuttia, annetaan jäähtyä ja tarvittaessa lisätään 10 mg elohopeajodidia säilytysaineeksi.

4. Välineistö

Vesihaude, jonka termostaatti on säädetty 38–40 °C:seen.

5. Menettely

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 1 g näytettä 100 ml:n mittapulloon. Lisätään 25–30 ml vettä. Pullo asetetaan kiehuvaan vesihauteeseen 30 minuutin ajaksi ja tämän jälkeen se jäähdytetään noin 35 °C:seen. Lisätään 5 ml hiivasuspensiota (3.1) ja homogenoidaan. Annetaan pullon seistä kaksi tuntia vesihauteessa 38–40 °C:n lämpötilassa. Jäähdytetään noin 20 °C:seen.

Lisätään 2,5 ml Carrez-liuosta I (3.2) ja sekoitetaan 30 sekuntia, tämän jälkeen lisätään 2,5 ml Carrez-liuosta II (3.3) ja sekoitetaan uudelleen 30 sekuntia. Täytetään 100 ml:ksi vedellä, sekoitetaan ja suodatetaan.

▼B

Suodosta pipetoidaan 300 ml:n erlenmeyerkolviin sellainen määrä, joka sisältää 40–80 mg laktoosia, korkeintaan 25 ml. Tarvittaessa täytetään vedellä 25 ml:ksi.

Nollakoe suoritetaan samalla tavoin käyttäen 5 ml hiivasuspensiota (3.1). Laktoosimäärä määritetään Luff-Schoorlin mukaan seuraavasti. Lisätään tarkalleen 25 ml Luff-Schoorl-reagenssia (3.4) ja kaksi kiehumakiveä (3.5). Lämmitetään keskikokoisen liekin yläpuolella käsin ravistellen ja kuumennetaan neste kiehumispisteeseen noin kahdessa minuutissa. Erlenmeyerkolvi asetetaan välittömästi asbestiverkolle, jossa on noin 6 cm:n läpimittainen reikä ja verkon alla on etukäteen sytytetty liekki. Säädetään liekki sellaiseksi, että erlenmeyerkolvi kuumenee ainoastaan pohjastaan. Tämän jälkeen erlenmeyerkolviin kiinnitetään pystyjäähdytin. Keitetään tarkalleen 10 minuutin ajan. Jäähdytetään välittömästi kylmässä vedessä ja noin viiden minuutin kuluttua titrataan seuraavasti:

Lisätään 10 ml kaliumjodidiliuosta (3.6) ja välittömästi tämän jälkeen (varovasti, koska liuos voi vaahdota voimakkaasti) lisätään 25 ml rikkihappoa (3.7). Titrataan natriumtiosulfaattiliuoksella (3.8) kunnes väri muuttuu samean keltaiseksi, lisätään tarkkelysindikaattori (3.9) ja titraus suoritetaan loppuun.

Sama titraus suoritetaan liuoksesta, johon pipetoidaan tarkalleen mitatuna 25 ml Luff-Schoorl-reagenssia (3.4) ja 25 ml vettä, sen jälkeen kun 10 ml kaliumjodidiliuosta (3.6) ja 25 ml rikkihappoa (3.7) on lisätty ilman keittämistä.

6. Tulosten laskeminen

Oheisen taulukon avulla määritetään milligrammoina se laktoosimäärä, joka vastaa näiden kahden titraustuloksen erotusta ilmaistuna natriumtiosulfaattia, 0,1 mol/l, millilitroissa.

Tulos ilmoitetaan vedettömän laktoosin prosentteina näytteestä.

7. Huomautus

Yli 40 % fermentoituvaa sokeria sisältäville tuotteille käytetään yli 5 ml hiivasuspensiota (3.1).

Taulukko 25 ml:lle Luff-Schoorl-reagenssia

ml Na₂S₂O₃, 0,1 mol/l, kahden minuutin kuumennus, 10 minuutin keitto

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

▼B**L. TÄRKKELYKSEN MÄÄRITYS****POLARIMETRINEN MENETELMÄ****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää tärkkelyksen ja tärkkelyksen suurimolekyylisten pilkkoutumistuotteiden pitoisuus rehuissa tarkoituksena todeta, onko niiden ilmoitettu energiamäärä liitteen VII mukainen ja ovatko ne neuvoston direktiivin 96/25/EY ⁽¹⁾ säännösten mukaisia.

2. Periaate

Menetelmä perustuu kahteen määrittelyyn. Ensimmäisessä määrittelyssä näyte käsitellään laimealla kloorivetyhapolla. Kun liuos on saatu kirkkaaksi ja suodatettu, liuoksen optinen kiertokyky mitataan polarimetrisesti.

Toisessa määrittelyssä näyte uutetaan 40-prosenttisella etanolilla. Kun suodos on tehty happamaksi kloorivetyhapolla ja se on saatu kirkkaaksi ja suodatettu, optinen kiertokyky mitataan kuten ensimmäisessä määrittelyssä.

Kun näiden kahden mittauksen erotus kerrotaan tunnetulla kertoimella, saadaan näytteen tärkkelyspitoisuus.

3. Reagenssit

3.1 Kloorivetyhappoliuos 25 % (w/w) tiheys: 1,126 g/ml.

3.2 Kloorivetyhappoliuos 1,13 % (w/v)

Konsentraatio on tarkistettava titraamalla natriumhydroksidiliuoksella 0,1 mol/l, indikaattorina 0,1 % (w/v) metyyliipuna 94 % (v/v) etanolissa. 10 ml:n neutralointiin tarvitaan 30,94 ml NaOH:ta, 0,1 mol/l.

3.3 Carrez-liuos I: liuotetaan veteen 21,9 g sinkkiasetaattia, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ja 3 g jäätikkää. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.4 Carrez-liuos II: liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.5 Etanoli 40 % (v/v), tiheys: 0,948 g/ml 20 °C:ssa.

4. Välineistö

4.1 250 ml:n vakiohioksellinen erlenmeyerkolvi, jossa on palautusjäähdytin.

4.2 Polarimetri tai sakkarimetri.

5. Menettely**5.1 Näytteen valmistaminen**

Näyte jauhetaan niin hienoksi, että se läpäisee kokonaan 0,5 mm:n pyöreäreikäisen seulan.

5.2 Optisen kokonaiskiertyvyyden (*P* tai *S*) määrittely (ks. huomautus 7.1)

Punnitaan 2,5 g hienoksi jauhettua näytettä 1 mg:n tarkkuudella 100 ml:n mittapulloon. Lisätään 25 ml kloorivetyhappoa (3.2), ravistellaan kunnes näyte on jakaantunut tasaisesti, sen jälkeen lisätään vielä 25 ml kloorivetyhappoa (3.2). Pullo pannaan kiehuvaan vesihauteeseen ja sitä

⁽¹⁾ EYVL L 125, 23.5.1996, s. 35.

▼B

ravistellaan voimakkaasti ja yhtäjaksoisesti ensimmäisten kolmen minuutin ajan kokkaroitumisen estämiseksi. Vesihäuteen vesimäärän on oltava riittävän suuri, jotta häute pysyy kiehuvana kun pullo upotetaan siihen. Pulloa ravisteltaessa sitä ei saa ottaa pois häuteesta. Tarkalleen 15 minuutin kuluttua pullo otetaan häuteesta, lisätään 30 ml kylmää vettä ja jäähdytetään välittömästi 20^o:seen.

Lisätään 5 ml Carrez-liuosta I (3.3) ja ravistellaan noin 30 sekunnin ajan. Lisätään 5 ml Carrez-liuosta II (3.4) ja ravistellaan uudestaan 30 sekunnin ajan. Täytetään merkkiin asti vedellä, sekoitetaan ja suodatetaan. Jos suodos ei ole täysin kirkas (mikä tapahtuu harvoin), määrittäminen uusintaan käyttäen suurempaa määrää Carrez-liuoksia I ja II (esimerkiksi 10 ml).

Liuoksen optinen kiertokyky mitataan 200 mm:n putkessa polarimetrillä tai sakkarimetrillä.

5.3 *40-prosenttiseen etanoliin liukoisten yhdisteiden optisen kiertokyvyn (P' tai S') määrittäminen*

Punnitaan 5 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella 100 ml:n mittapulloon ja lisätään noin 80 ml etanolia (3.5) (ks. huomautus 7.2). Mittapullon annetaan seistä yhden tunnin ajan huoneenlämmössä; tänä aikana sitä ravistellaan voimakkaasti kuusi kertaa siten, että näyte sekoittuu perusteellisesti etanoliin. Täytetään merkkiin asti etanolilla (3.5), sekoitetaan ja suodatetaan.

Pipetoidaan 50 ml suodosta (vastaa 2,5:tä grammaa näytettä) 250 ml:n erlenmeyerkolviin, lisätään 2,1 ml kloorivetyhappoa (3.1) ja ravistellaan voimakkaasti. Erlenmeyerkolviin kiinnitetään pystyjäähdytin ja pullo pannaan kiehuvaan vesihäuteeseen. Tarkalleen 15 minuutin kuluttua erlenmeyerkolvi otetaan häuteesta ja liuos siirretään 100 ml:n mittapulloon huuhdomalla pienellä määrällä kylmää vettä ja jäähdytetään 20 °C:seen.

Tämän jälkeen näyteliuos tehdään kirkkaaksi Carrez-liuoksilla I (3.3) ja II (3.4), täytetään merkkiin asti vedellä, sekoitetaan, suodatetaan ja mitataan optinen kiertokyky 5.2 kohdan toisessa ja kolmannessa alakohdassa esitetyllä tavalla.

6. **Tulosten laskeminen**

Tärbkelyspitoisuus (%) lasketaan seuraavalla tavalla:

6.1 *Polarimetriset mittaukset*

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

P = optinen kokonaiskiertokyky asteina

P' = 40-prosenttiseen etanoliin (V/V) liukoisten yhdisteiden optinen kiertokyky asteina

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = puhtaan tärbkelyksen ominaiskiertokyky. Tälle on sovittu seuraavat numeeriset arvot:

+185,9 ^o :	riisitärbkelys
+185,7 ^o :	perunätärbkelys
+184,6 ^o :	maissitärbkelys
+182,7 ^o :	vehnätärbkelys
+181,5 ^o :	ohratärbkelys
+181,3 ^o :	kauratärbkelys
+184,0 ^o :	muut tärbkelyslajit sekä tärbkelysseokset rehuseoksissa.

6.2 *Sakkarimetriset mittaukset*

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

▼B

- S = optinen kokonaiskiertyky sakkarimetrin asteina
 S' = 40-prosenttiseen (v/v) etanoliin liukoisten yhdisteiden optinen kiertokyky asteina
 N = sellainen sakkaroosin määrä grammoina, jonka optinen kiertokyky on 100 sakkarimetrin astetta 100 ml:ssa vettä ja 200 mm:n putkessa mitattuna
 16,29 g ranskalaisella sakkarimetrillä
 26,00 g saksalaisella sakkarimetrillä
 20,00 g muilla sakkarimetreillä.
 $[\alpha]_D^{20}$ = puhtaan tärkkelyksen ominaiskiertyky (ks. 6.1).

6.3 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 0,4:ää prosenttiyksikköä, jos tärkkelyspitoisuus on alle 40 %, eikä 1:tä prosenttia tärkkelyspitoisuudesta suhteellisenä arvona, jos tärkkelyspitoisuus on 40 % tai suurempi.

7. Huomautukset

- 7.1 Jos näyte sisältää yli 6 % karbonaatteja, kalsiumkarbonaattina laskettuna, on ne ennen optisen kokonaiskiertykyn määritystä hajotettava juuri tarkalleen sopivalla määrällä laimeaa rikkihappoa.

- 7.2 Paljon laktoosia sisältävien tuotteiden, kuten herajauheen tai rasvattoman maitojauheen, määritystä jatketaan 80 ml:n etanolilisäyksen (3.5) jälkeen seuraavasti. Palautusjäähdytin kiinnitetään pulloon ja pullo pannaan 50 °C:n vesihauteeseen 30 minuutin ajaksi. Annetaan jäähtyä ja jatketaan määritystä 5.3 kohdassa esitetyllä tavalla.

- 7.3 Seuraavien rehuissa merkittävänä määrinä esiintyvien rehuaineiden tiedetään häiritsevän tärkkelyspitoisuuden määritystä polarimetrisellä menetelmällä ja näin ollen voidaan saada vääriä tuloksia:

— (sokeri)juurikastuotteet, kuten (sokeri)juurikasleike, (sokeri)juurikasmelassi, melassoitu (sokeri)juurikasleike, (sokeri)juurikasrankki, (juurikas)sokeri,

— sitrushedelmämassa,

— pellavansiemenet, pellavansiemenkakku, pellavansiemenrouhe,

— rypsinisiemenet, rypsikakku, rypsirouhe, rypsinisienten kuoret,

— auringonkukansiemenet, auringonkukkarouhe, auringonkukkarouhe osaksi kuorituista siemenistä,

— kookoskakku, kookosrouhe,

— perunapulppa,

— kuivahiiva,

— runsaasti inuliinia sisältävät tuotteet (esim. maa-artistikkaleike ja -jauho),

— rasvan sulatuksessa muodostuva valkuaisjäännö.

M. RAAKATUHKAN MÄÄRITYS**1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen raakatuhkapitoisuus.

▼B**2. Periaate**

Näyte poltetaan tuhaksi 550 °C:ssa, jäännös punnitaan.

3. Reagenssit

Ammoniumnitraattiliuos, 20 % (w/v).

4. Välineistö**4.1 Sähkölevy.****4.2 Sähkökäyttöinen muhveliuuni, jossa on termostaatti.****4.3**

Hehkutusupokkaita, jotka on valmistettu kvartsista, posliinista tai platinasta, joko suorakulmaisia (noin 60 × 40 × 25 mm) tai pyöreitä (läpimitta 60–75 mm, korkeus 20–25 mm).

5. Menettely

Noin 5 grammaa näytettä (2,5 g sellaisia tuotteita, joilla on pyrkimys turvota) punnitaan 1 mg:n tarkkuudella hehkutusupokkaaseen, joka on ensin hehkutettu 550 °C:seen, jäähdytetty ja taarattu. Upokas asetetaan sähkölevylle ja sitä kuumennetaan vähitellen kunnes aine hiiltäytyy. Tuhkataan 5.1 tai 5.2 kohdan mukaisesti.

5.1

Upokas asetetaan kalibroituun muhveliuuniin, joka on säädetty 550 °C:seen. Upokasta pidetään tässä lämpötilassa, kunnes saadaan valkeaa, vaaleanharmaa tai punertava tuhka, jossa ei näytä enää olevan orgaanista ainesta. Upokas asetetaan eksikkaattoriin, sen annetaan jäähtyä ja se punnitaan välittömästi.

5.2

Upokas asetetaan kalibroituun muhveliuuniin, joka on säädetty 550 °C:seen. Poltetaan tuhaksi 3 tunnin ajan. Upokas asetetaan eksikkaattoriin, sen annetaan jäähtyä ja se punnitaan välittömästi. Kuivausta jatketaan edelleen 30 minuutin ajan sen varmistamiseksi, että tuhkan paino pysyy vakiona (kahden peräkkäisen punnituksen välinen painoero saa olla enintään 1 mg).

6. Tulosten laskeminen

Jäännöksen paino lasketaan vähentämällä taarapaino.

Tulos ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

7. Huomautukset**7.1**

Niille näytteille, joita on vaikea polttaa tuhaksi, on alustava tuhaksi polttaminen tehtävä ainakin kolmen tunnin ajan, jonka jälkeen näyte jäähdytetään ja siihen lisätään muutama pisara 20 % ammoniumnitraattiliuosta tai vettä (varovasti, välttämällä tuhkan leviämistä tai paakkuuntumista). Hehkutusta jatketaan uunissa kuivaamisen jälkeen. Menettely toistetaan tarvittaessa kunnes näyte on tuhkaantunut täydellisesti.

7.2

Ne aineet, joihin 7.1 kohdan käsittely ei vaikuta, käsitellään seuraavasti: Kolmen tunnin polttamisen jälkeen tuhkan joukkoon lisätään lämmintä vettä ja se suodatetaan pienen tuhkataman suodattimen läpi. Suodatin ja sen sisältö poltetaan tuhaksi alkuperäisessä upokkaassa. Suodos siirretään jäähtyneeseen upokkaaseen, haihdutetaan kuivaksi, poltetaan tuhaksi ja punnitaan.

7.3

Jos kyse on öljyistä ja rasvoista, punnitaan tarkasti 25 g näytettä sopivan kokoiseen upokkaaseen. Näytteen annetaan hiiltäytyä sytyttämällä se tuhkatamalla suodatinpaperiliuskalla. Palamisen jälkeen näytettä kostutetaan mahdollisimman pienellä määrällä vettä. Kuivataan ja poltetaan tuhaksi 5 kohdan mukaisesti.

▼B**N. KLOORIVETYHAPPOON LIUKENEMATTOMAN TUHKAN MÄÄRITYS****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää kloorivetyhappoon liukenemattomien kivennäisainesten pitoisuus rehuissa. Näytteen laadun mukaan voidaan käyttää kahta eri menetelmää.

1.1 *Menetelmä A:* soveltuu orgaanista ainetta oleviin rehuihin ja useimpiin rehuseoksiin;

1.2 *Menetelmä B:* soveltuu kivennäisrehuihin ja kivennäisrehuseoksiin sekä rehuseoksiin, joiden kloorivetyhappoon liukenemattomien aineiden pitoisuus menetelmällä A määritettynä on suurempi kuin 1 %.

2. Periaate

2.1 *Menetelmä A:* näyte poltetaan tuhkaksi, tuhka keitetään kloorivetyhappossa ja liukenematon jäännös suodatetaan ja punnitaan.

2.2 *Menetelmä B:* näytettä käsitellään kloorivetyhapolla. Liuos suodatetaan, jäännös poltetaan tuhkaksi ja näin saatu tuhka käsitellään menetelmän A mukaan.

3. Reagenssit

3.1 Kloorivetyhappo, 3 mol/l.

3.2 Trikloorietikkahappoliuos, 20 % (w/v).

3.3 Trikloorietikkahappoliuos, 1 % (w/v).

4. Välineistö

4.1 Sähkölevy.

4.2 Sähkökäyttöinen muhveliuuni, jossa on termostaatti.

4.3 Hehkutusupokkaita, jotka on valmistettu kvartsista, posliinista tai platinasta, joko suorakulmaisia (noin 60 × 40 × 25 mm) tai pyöreitä (läpimitta 60–75 mm, korkeus 20–25 mm).

5. Menettely

5.1 *Menetelmä A:*

Näyte poltetaan tuhkaksi raakatuhkan määrittystä varten esitettyä menetelmää käyttäen. Myös tästä määrittämisestä saatua tuhkaa voidaan käyttää.

Tuhka siirretään 250–400 ml:n dekanterilasiin käyttäen 75 ml kloorivetyhappoa (3.1). Liuos kuumennetaan hitaasti kiehumapisteeseen ja sitä keitetään varovasti 15 minuuttia. Lämmin liuos suodatetaan tuhkatottoman suodatinpaperin läpi ja jäännös pestään lämpimällä vedellä kunnes pesuvesi ei enää ole hapan. Jäännöksen sisältävä suodatinpaperi kuivataan ja poltetaan tuhkaksi taaratussa upokkaassa 550–700 °C:n lämpötilassa. Sen annetaan jäähtyä eksikkaattorissa ja se punnitaan.

5.2 *Menetelmä B:*

Punnitaan 5 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella 250–400 ml:n dekanterilasiin. Siihen lisätään ensin 25 ml vettä ja sen jälkeen 25 ml kloorivetyhappoa (3.1), sekoitetaan ja odotetaan kunnes kuohuminen lakkaa. Lisätään vielä 50 ml kloorivetyhappoa (3.1). Kun kaasuja ei enää muodostu, dekanterilasi asetetaan kiehuvaan vesihauteeseen ja pidetään siinä 30 minuuttia tai tarvittaessa pitempään, jotta mahdollinen jäljellä oleva tarkkelys tulisi kokonaan hydrolysoituksi. Liuos suodatetaan lämpimänä käyttäen tuhkatonta suodatinpaperia, joka pestään 50 ml:lla lämmintä

▼B

vettä (ks. 7 kohdan huomautus). Suodatinpaperi jäännöksineen siirretään hehkutusupokkaaseen, kuivataan ja poltetaan tuhkaksi 550–700 °C:n lämpötilassa. Tuhka siirretään 250–400 ml:n dekantterilasiin käyttäen 75 ml kloorivetyhappoa (3.1) ja jatketaan 5.1 kohdan toisen alakohdan mukaan.

6. Tulosten laskeminen

Jäännöksen paino lasketaan vähentämällä taarapaino. Tulos ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

7. Huomautus

Jos suodatus osoittautuu vaikeaksi, suoritetaan määrittäminen uudelleen korvaamalla 50 ml kloorivetyhappoa 50 ml:lla 20-prosenttista trikloorietikkahappoa (3.2) ja suodatinpaperin pesuun käytetään lämmintä 1-prosenttista trikloorietikkahappoliuosta (3.3).

O. KARBONAATTIEN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää useimpien rehujen karbonaatit, jotka tavanomaisesti ilmoitetaan kalsiumkarbonaattina.

Tietyissä tapauksissa (esim. rautakarbonaatin osalta) on kuitenkin käytettävä erityismenetelmää.

2. Periaate

Karbonaatit hajotetaan kloorivetyhapossa, vapautunut hiilidioksidi kerätään talteen asteikolla varustettuun putkeen ja sen tilavuutta verrataan tilavuuteen, jonka tunnettu määrä kalsiumkarbonaattia vapauttaa samoissa olosuhteissa.

3. Reagenssit

3.1 Kloorivetyhappo, tiheys 1,10 g/ml.

3.2 Kalsiumkarbonaatti.

3.3 Rikkihappo, noin 0,05 mol/l, värjätty metyylipunalla.

4. Välineistö

Scheibler-Dietrich-laite (ks. kaavio) tai vastaava laite.

5. Menettely

Näytettä punnitaan karbonaattipitoisuuden mukaan seuraavasti:

— 0,5 g tuotetta, joka sisältää 50–100 % karbonaattia, kalsiumkarbonaattina ilmoitettuna,

— 1 g tuotetta, joka sisältää 40–50 % karbonaattia, kalsiumkarbonaattina ilmoitettuna,

— 2–3 g muita tuotteita.

Punnittu näyte pannaan laitteeseen kuuluvaan pulloon (4), jossa on pieni murtumattomasta materiaalista valmistettu koeputki, joka sisältää 10 ml kloorivetyhappoa (3.1), ja pullo liitetään laitteeseen. Käännetään kolmitiehanaa (5) siten, että putki (1) on auki laitteen ulkopuolelle. Käyttäen liikkuvaa putkea (2), joka on täytetty värjättyllä rikkihapolla (3.3) ja liitetty asteikolla varustettuun putkeen (1), säädetään nesteen taso nolلامerkkiin. Käännetään hanaa (5) putkien (1) ja (3) yhdistämiseksi ja tarkastetaan, että taso säilyy nollassa.

Kaadetaan kloorivetyhappo (3.1) koeputkesta hitaasti näyte-erän päälle pulloa (4) kallistaen. Paine tasoitetaan laskemalla putki (2) alemmaksi. Pulloa (4) ravistellaan kunnes hiilidioksidin kehittyminen on kokonaan lakannut.

Paine palautetaan alkuperäiseksi tuomalla neste samalle tasolle putkissa (1) ja (2). Lukema otetaan *muutaman minuutin* kuluttua siitä, kun kaasutilavuus on saavuttanut vakiotason.

Kontrollikoe suoritetaan samoissa olosuhteissa käyttäen 0,5 g kalsiumkarbonaattia (3.2).

▼B**6. Tulosten laskeminen**

Karbonaattipitoisuus kalsiumkarbonaattina ilmaistuna lasketaan kaavasta:

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

jossa:

X = karbonaatti prosentteina (w/w) näytteestä, ilmaistuna kalsiumkarbonaattina,

V = ml CO₂:ta, jonka punnittu näytemäärä on vapauttanut,

V₁ = ml CO₂:ta, jonka 0,5 g CaCO₃:a on vapauttanut,

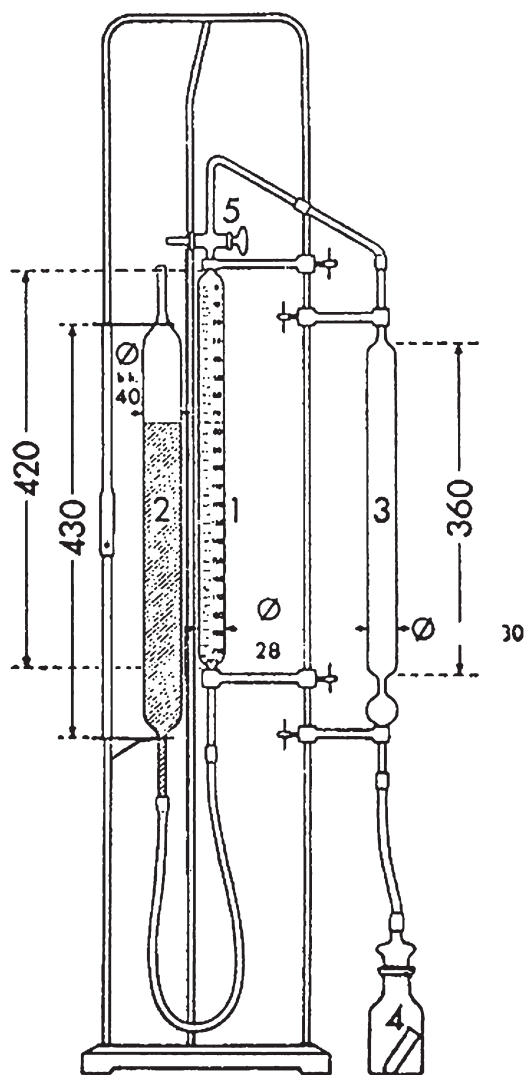
m = näytteen paino grammoina.

7. Huomautukset

7.1 Jos näyte painaa yli 2 g, lisätään ensin 15 ml tislattua vettä pulloon (4) ja sekoitetaan ennen kokeen alkua. Kontrollikokeessa käytetään samaa vesitilavuutta.

7.2 Jos käytetyssä laitteessa on eri tilavuus kuin Scheibler-Dietrich-laitteessa, on näytteestä ja kontrolliaineesta otettavia eriä ja tulosten laskua muutettava vastaavanlaisesti.

SCHEIBLER-DIETRICH-LAITE CO₂-N MÄÄRITTÄMISEKSI



(mitat millimetreinä)

▼B

P. KOKONAISFOSFORIN MÄÄRITYS

FOTOMETRINEN MENETELMÄ

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen kokonaisfosforipitoisuus. Se soveltuu erityisesti alhaisten fosforipitoisuuksien analysoimiseen. Tietyissä tapauksissa (runsaasti fosforia sisältävät tuotteet) voidaan käyttää gravimetristä menetelmää.

2. Periaate

Näyte mineralisoidaan joko polttamalla kuivana ja liuottamalla happoon (orgaaniset rehut) tai happokeiton avulla (mineraaliyhdisteet ja nestemäiset rehut), ja se siirretään happamaan liuokseen. Liuos käsitellään molybdovanadaattireagenssilla. Muodostuneen keltaisen liuoksen optinen tiheys mitataan spektrofotometrissä 430 nm:ssä.

3. Reagenssit

3.1 Kalsiumkarbonaatti.

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

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

3.4 Typpihappo, $\rho_{20} 1,38\text{--}1,42$ g/ml.

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

3.6 Molybdovanadaattireagenssi: sekoitetaan 200 ml ammoniumheptamolybdaattiliuosta (3.6.1), 200 ml ammoniummonovanadaattiliuosta (3.6.2) ja 134 ml typpihappoa (3.4) 1 litran mittapullossa. Täytetään merkkiin asti vedellä.

3.6.1 Ammoniumheptamolybdaattiliuos: liuotetaan 100 g ammoniumheptamolybdaattia $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ kuumaan veteen. Lisätään 10 ml ammoniakkia (tiheys 0,91 g/ml) ja täytetään 1 litraksi vedellä.

3.6.2 Ammoniummonovanadaattiliuos: liuotetaan 2,35 g ammoniummonovanadaattia NH_4VO_3 400 ml:aan kuumaa vettä. Lisätään hitaasti, samalla sekoittaen 20 ml laimeaa typpihappoa (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) ja täytetään 1 litraksi vedellä.

3.7 Fosforistandardiliuos, 1 mg/ml: liuotetaan 4,387 g kaliumdivetyfosfaattia KH_2PO_4 veteen. Täytetään 1 litraksi vedellä.

4. Välineistö

4.1 Kvartsi-, posliini- tai platinaupokkaita.

4.2 Sähkölämmitteinen muhveliuuni, jossa on 550 °C:seen säädetty termos- taatti.

4.3 250 ml:n Kjeldahl-kolvi.

4.4 Mittapulloja ja tarkkuuspipettejä.

4.5 Spektrofotometri.

4.6 Noin 16 mm:n läpimittaisia koeputkia, joissa on 14,5 mm:n läpimittaiset tulpat ja joiden vetoisuus on 25–30 ml.

5. Menettely

5.1 Liuoksen valmistaminen

Näytteen pitoisuuden mukaan valmistetaan 5.1.1 tai 5.1.2 kohdassa esitetty liuos.

5.1.1 Tavallinen menettely

Punnitaan vähintään 1 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella. Näyte pannaan Kjeldahl-kolviin, lisätään 20 ml rikkihappoa (3.5), ravistellaan, jotta happo imeytyisi aineeseen täydellisesti eikä aine tarttuisi pullon seinämiin, kuumennetaan ja pidetään kiehuvana 10 minuutin ajan. Annetaan

▼B

jäähtyä hieman, lisätään 2 ml typpihappoa (3.4), kuumennetaan varovasti, annetaan jäähtyä hieman, lisätään uudelleen hieman typpihappoa (3.4) ja kohotetaan lämpötila jälleen kiehumispisteeseen. Tämä menettely toistetaan kunnes saadaan väritön liuos. Jäähdytetään, lisätään hieman vettä, neste dekantoidaan 500 ml:n mittapulloon huuhtomalla Kjeldahl-kolvi kuumalla vedellä. Annetaan jäähtyä, täytetään merkkiin asti vedellä, homogenoidaan ja suodatetaan.

5.1.2 Orgaanisia aineita sisältävät näytteet, jotka eivät sisällä kalsium- ja magnesiumdivetyfosfaatteja

Hehkutusupokkaaseen punnitaan noin 2,5 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella. Näytteeseen lisätään 1 g kalsiumkarbonaattia (3.1) ja sekoitetaan kunnes se on täysin sekoittunut näytteeseen. Poltetaan tuhkaksi uunissa 550 °C:ssa kunnes saadaan valkoista tai harmaata tuhkaa (pieni määrä hiiltä ei häiritse). Tuhka siirretään 250 ml:n dekantterilasiin. Lisätään 20 ml vettä ja kloorivetyhappoa (3.2) kunnes kuohuminen lakkaa. Lisätään vielä 10 ml kloorivetyhappoa (3.2). Dekantterilasi asetetaan hiekkahautteelle ja haihdutetaan kuivaksi piin saostamiseksi. Jäännös liuotetaan uudelleen 10 ml:aan typpihappoa (3.3) ja keitetään hiekkahauteella tai sähkölevyllä 5 minuuttia haihduttamatta sitä kuivaksi. Neste dekantoidaan 500 ml:n mittapulloon huuhtomalla dekantterilasi useaan kertaan kuumalla vedellä. Annetaan jäähtyä, täytetään merkkiin asti vedellä, homogenoidaan ja suodatetaan.

5.2 Värin kehitys ja optisen tiheyden mittaust

Laimennetaan 5.1.1 tai 5.1.2 kohdassa saatu suodos siten, että fosforipitoisuus on enintään 40 µg/ml. Pipetoidaan 10 ml tätä liuosta koeputkeen (4.6) ja lisätään siihen 10 ml molybdovanadaattireagenssia (3.6). Homogenoidaan ja annetaan seistä ainakin 10 minuuttia 20 °C:ssa. Mitataan optinen tiheys spektrofotometrissä 430 nm:ssä liuosta vastaan, joka on saatu lisäämällä 10 ml molybdovanadaattireagenssia (3.6) 10 ml:aan vettä.

5.3 Kalibrointikäyrä

Standardiliuoksesta (3.7) valmistetaan liuokset, joissa on 5, 10, 20, 30 tai 40 µg fosforia/ml. Kaikista liuoksista otetaan 10 ml:n erä ja siihen lisätään 10 ml molybdovanadaattireagenssia (3.6). Homogenoidaan ja annetaan seistä ainakin 10 minuuttia 20 °C:ssa. Optinen tiheys mitataan 5.2 kohdan mukaisesti. Kalibrointikäyrä laaditaan piirtämällä optisia tiheyksiä ja näitä vastaavia fosforimääriä esittävä kuvaaja. Käyrä on lineaarinen välillä 0–40 µg/ml olevien konsentraatioiden osalta.

6. Tulosten laskeminen

Tutkittavassa näytteessä oleva fosforimäärä määritetään kalibrointikäyrää käyttäen.

Tulos ilmoitetaan prosentteina näytteestä.

Toistettavuus

Samasta näytteestä suoritettujen kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa olla yli:

— 3 %:a, suhteessa korkeampaan tulokseen, alle 5 % olevien fosforipitoisuuksien osalta,

— 0,15 %:a, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, vähintään 5 % olevien fosforipitoisuuksien osalta.

▼B**Q. KLORIDIEN MÄÄRITYS REHUISTA****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää vesiliukoisten kloridien määrä; tulokset ilmoitetaan yleensä natriumkloridina. Menetelmä soveltuu käytettäväksi kaikkiin rehuihin.

2. Periaate

Kloridit liuotetaan veteen. Jos tuote sisältää orgaanista ainetta, se kirkastetaan. Liuos tehdään hieman happamaksi typpihapolla ja kloridit saostetaan hopeakloridin muodossa hopeanitraattiliuosta käyttäen. Hopeanitraatin ylimäärä titrataan ammoniumtiosyanaattiliuoksella Volhardin menetelmän mukaan.

3. Reagenssit

3.1 Ammoniumtiosyanaattiliuos 0,1 mol/l.

3.2 Hopeanitraattiliuos 0,1 mol/l.

3.3 Ammoniumferrisulfaattiliuos, kyllästetty liuos $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.

3.4 Typpihappo, tiheys 1,38 g/ml.

3.5 Dietyylieetteri.

3.6 Asetoni.

3.7 Carrez I -liuos: liuotetaan veteen 21,9 g sinkkiasetaattia, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ja 3 g jääetikkaa. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.8 Carrez-liuos II: liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

3.9 Aktiivihiili, jossa ei ole klorideja ja joka ei absorboi niitä.

4. Välineistö

Sekoittaja: noin 35–40 kierr./min.

5. Menettely**5.1 Liuoksen valmistaminen**

Näytteen mukaan valmistetaan 5.1.1, 5.1.2 tai 5.1.3 kohdassa esitetty liuos.

Samanaikaisesti suoritetaan *nollakoe*, josta määritettävä näyte on jätetty pois.

5.1.1 Näytteet, joissa ei ole orgaanista ainesta

Punnitaan milligramman tarkkuudella enintään 10 g näytettä, joka sisältää alle 3 g kloridien muodossa olevaa klooria. Lisätään 500 ml:n mittapulloon näyte ja 400 ml noin 20 °C:n lämpöistä vettä. Sekoitetaan 30 minuuttia sekoittajassa, täytetään merkkiin asti, homogenoidaan ja suodatetaan.

5.1.2 Orgaanista ainesta sisältävät näytteet, paitsi 5.1.3 kohdassa luetellut tuotteet.

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 5 g näytettä sekä 1 g aktiivihiiltä 500 ml:n mittapulloon. Lisätään 400 ml noin 20 °C:n lämpöistä vettä ja 5 ml Carrez I -liuosta (3.7), sekoitetaan 30 sekunnin ajan ja tämän jälkeen lisätään 5 ml Carrez II -liuosta (3.8). Sekoitetaan 30 minuuttia sekoittajassa, täytetään merkkiin asti, homogenoidaan ja suodatetaan.

▼B

- 5.1.3 Keitetyt rehut, pellavansiemenkakut ja -jauho, pellavajauhoa runsaasti sisältävät tuotteet ja muut tuotteet, joissa on runsaasti lima-ainesta tai kolloidisia aineksia (esim. dekstrinoitu tärkkelys).

Valmistetaan liuos 5.1.2 kohdassa esitetyllä tavalla, mutta sitä ei suodateta. Dekantoidaan (tarvittaessa sentrifugoidaan), siirretään 100 ml supernatanttia 200 ml:n mittapulloon. Sekoitetaan asetonin (3.6) kanssa ja täytetään merkkiin asti asetonilla, homogenoidaan ja suodatetaan.

5.2 *Titraus*

Pipetoidaan erlenmeyerkolviin 25–100 ml suodosta (oletetun klooripitoisuuden mukaan), joka on saatu 5.1.1, 5.1.2 tai 5.1.3 kohdassa esitetyllä tavalla. Pipetoitu erä saa sisältää korkeintaan 150 mg klooria (Cl). Laimennetaan tarvittaessa vähintään 50 ml:ksi vedellä, lisätään 5 ml typpihappoa (3.4), 20 ml kyllästettyä ammoniumferrisulfaattiliuosta (3.3) ja kaksi tippaa ammoniumtiosyanaattiliuosta (3.1), joka annostellaan nollamerkkiin täytetystä byretistä. Byrettia käyttäen lisätään hopeanitraattiliuosta (3.2) siten, että saadaan 5 ml:n ylimäärä. Lisätään 5 ml dietyylieetteriä (3.5) ja ravistellaan voimakkaasti saostuman koaguloimiseksi. Ylimäärä hopeanitraattia titrataan ammoniumtiosyanaattiliuoksella (3.1) kunnes punaruskea väri säilyy noin yhden minuutin ajan.

6. **Tulosten laskeminen**

Kloorimäärä (X), joka ilmoitetaan natriumkloridiprosentteina, lasketaan seuraavaa kaavaa käyttäen:

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

jossa:

V_1 = lisätyn hopeanitraattiliuoksen 0,1 mol/l määrä millilitroina

V_2 = itraukseen käytetyn ammoniumtiosyanaatin 0,1 mol/l määrä millilitroina.

m = näytteen paino.

Jos hopeanitraattiliuosta, 0,1 mol/l, on kulunut nollakoetta titrattaessa, kuluneen liuoksen määrä vähennetään tilavuudesta ($V_1 - V_2$).

7. **Huomautukset**

- 7.1 Titraus voidaan suorittaa myös potentiometrisesti.
- 7.2 Jos määritettävät tuotteet sisältävät runsaasti öljyä ja rasvoja, öljyt ja rasvat on ensin poistettava dietyylieetterillä tai petroolieetterillä.
- 7.3 Kalajauhon osalta titraus voidaan suorittaa Mohrin menetelmällä.



LIITE IV

REHUIEN SISÄLTÄMIEN SALLITTUIEN LISÄAINEIDEN VALVON- NASSA KÄYTETTÄVÄT MÄÄRITYSMENETELMÄT

A. A-VITAMIININ MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää A-vitamiinin (retinolin) pitoisuus rehuissa ja esiseoksissa. A-vitamiini käsittää all-*trans*-retinyylialkoholin ja sen *cis*-isomeerit, jotka saadaan määritetyiksi tällä menetelmällä. A-vitamiinipitoisuus ilmoitetaan kansainvälisinä yksikköinä (ky) kilogrammaa kohti. Yksi ky vastaa aktiivisuutta, joka on 0,300 µg:lla all-*trans*-A-vitamiinialkoholia tai 0,344 µg:lla all-*trans*-A-vitamiiniasetaattia tai 0,550 µg:lla all-*trans*-A-vitamiinipalmitaattia.

Määrittäysraja on 2 000 ky A-vitamiinia/kg.

2. Periaate

Näyte hydrolysoidaan etanoli-kaliumhydroksidiliuoksella, ja A-vitamiini uutetaan petroleetteriin. Liuotin haihdutetaan pois, haihdutusjäännös liuotetaan metanoliin ja laimennetaan tarvittaessa halutulle pitoisuusalueelle. A-vitamiinipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (RP-HPLC) UV- tai fluoresenssidetektorilla käytäen. Kromatografian ajo-olosuhteet valitaan siten, että all-*trans*-A-vitamiinialkoholi ja sen *cis*-isomeerit eivät erotu toisistaan.

3. Reagenssit

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

3.2 Petroleetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.

3.3 Metanoli.

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

3.5 Natriumaskorbaattiliuos, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (ks. 7.7 huomautukset).

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

3.6.1 Natriumsulfidiliuos, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ glyserolissa, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (kun $x = 9$) (ks. 7.8 huomautukset).

3.7 Fenoltaleiiniliuos, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ etanolissa (3.1).

3.8 2-Propanoli.

3.9 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi: metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (v + v). Tarkka suhde määräytyy käytetyn kolonnin ominaisuuksien perusteella.

3.10 Typpi, happivapaa.

3.11 All-*trans*-A-vitamiiniasetaatti, erikoispuhdasta, jonka aktiivisuus on sertifioitu, esim. $2,80 \times 10^6 \text{ ky/g}$.

3.11.1 All-*trans*-A-vitamiiniasetaatin kantaliuos: Punnitaan 0,1 milligramman tarkkuudella 50 mg A-vitamiiniasetaattia (3.11) 100 ml:n mittapulloon. Liuotetaan 2-propanoliin (3.8) ja täytetään merkkiin asti samalla liuottimella. Tämän liuoksen nimellinen A-vitamiinipitoisuus on 1 400 ky/ml. Tarkka pitoisuus määritetään 5.6.3.1 kohdan mukaisesti.

3.12 All-*trans*-A-vitamiinipalmitaatti, erikoispuhdasta, jonka aktiivisuus on sertifioitu, esim. $1,80 \times 10^6 \text{ ky/g}$.

▼B

3.12.1 All-*trans*-A-vitamiinipalmitaatin kantaliuos: Punnitaan 0,1 milligramman tarkkuudella 80 mg A-vitamiinipalmitaattia (3.12) 100 ml:n mittapulloon. Liuotetaan 2-propanoliin (3.8) ja täytetään merkkiin asti samalla liuottimella. Tämän liuoksen nimellinen A-vitamiinipitoisuus on 1 400 ky/ml. Tarkka pitoisuus määritetään 5.6.3.2 kohdan mukaisesti.

3.13 2,6-Di-*tert*-butyyli-4-metyylifenoli (BHT) (ks. 7.5 huomautukset).

4. Välineistö

4.1 Vakuumpyyrörohaidutin.

4.2 Ruskeita lasiastioita.

4.2.1 Tasapohjaisia tai kartionmuotoisia kolveja, 500 ml, joissa on lasihios.

4.2.2 Mittapulloja, joissa on lasihiostulpat, kapeakaulaisia, 10, 25, 100 ja 500 ml.

4.2.3 Erotussupiloita, kartiomaisia, 1 000 ml, joissa on lasihiostulpat.

4.2.4 Kartiopohjaisia kolveja, 250 ml, joissa on lasihios.

4.3 Allihn-jäähdytin, vaipan pituus 300 mm, jossa on lasihios ja liitin kaasunsyöttöputkelle.

4.4 Laskottettua suodatinpaperia faasien erotukseen, halkaisija 185 mm (esim. Schleicher & Schüll 597 HY 1/2).

4.5 HPLC-laitteisto, jossa injektori.

4.5.1 Nestekromatografiakolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava (suorituskykyvaatimus: vain yksi piikki kaikille retinoli-isomeereille ko. HPLC-ajo-olosuhteilla).

4.5.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV- tai fluoresenssidetektor.

4.6 Spektrofotometri ja 10 mm:n kvartsikyvettejä.

4.7 Vesihaude, jossa on magneettisekoitin.

4.8 Uttolaitteisto, jossa on (ks. kuva 1):

4.8.1 Lasisylinteri, tilavuus 1 l, jossa on lasihioskaula ja tulppa.

4.8.2 Lasihiosliitin, jossa on sivuputki ja keskeltä läpi menevä liikuteltava putki. Liikuteltavassa putkessa on oltava U:n muotoinen alapää ja toisessa päässä nokka, niin että sylinterissä oleva ylempi nestekerros voidaan siirtää erotussuppilon.

5. Menettely

Huomautus: A-vitamiini on herkkä (UV-)valolle ja hapettumiselle. Kaikki toimenpiteet on suoritettava valolta suojattuna (käyttäen ruskeita tai alumiinifoliolla suojattuja lasitarvikkeita) ja hapelta suojattuna (typpivirtauksessa). Uuton aikana nestepinnan yläpuolella oleva ilma on korvattava typpellä (ylipaineen muodostuminen estettävä raottamalla tulpaa silloin tällöin).

5.1 Näytteen valmistaminen

Näyte jauhetaan niin että se läpäisee 1 mm:n seulan; näytteen lämpenemistä on vältettävä. Näytteen jauhaminen on tehtävä **välittömästi** ennen punnitusta ja saippuointia A-vitamiinin hajoamisen välttämiseksi.

▼B

5.2 *Saippuointi*

A-vitamiinipitoisuudesta riippuen punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 2–25 g näytettä 500 ml:n tasapohjaiseen tai pyöreäpohjaiseen kolviin (4.2.1). Lisätään peräkkäin kolvia pyörittäen 130 ml etanolia (3.1), noin 100 mg BHT:tä (3.13), 2 ml natriumaskorbaattiliuosta (3.5) ja 2 ml natrium-sulfidiliuosta (3.6). Kiinnitetään jäähdytin (4.3) kolviin, ja kolvi pannaan vesihauteeseen, jossa on magneettisekoitin (4.7). Kuumennetaan kiehumispisteeseen ja annetaan kiehua 5 minuuttia. Lisätään 25 ml kalium-hydroksidiliuosta (3.4) jäähdyttimen läpi (4.3) ja annetaan kiehua vielä 25 minuuttia sekoittaen hitaassa typpivirrassa. Jäähdytin huuhdellaan noin 20 ml:lla vettä ja kolvin sisältö jäähdytetään huoneenlämpötilaan.

5.3 *Uutto*

Saippuointiliuos siirretään dekantoimalla kvantitatiivisesti, huuhtomalla kaikkiaan 250 ml:lla vettä, 1 000 ml:n erotussuppiloon (4.2.3) tai uuttolaitteeseen (4.8). Saippuointikolvi huuhdotaan ensin 25 ml:lla etanolia (3.1) ja sitten 100 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja huuhteluliuos siirretään erotussuppiloon tai uuttolaitteeseen. Veden ja etanolin lopputilavuuksien suhteen on oltava noin 2:1. Ravistellaan voimakkaasti 2 minuuttia ja annetaan laskeutua 2 minuuttia.

5.3.1 *Uutto erotussuppiloa (4.2.3) käyttäen*

Kun kerrokset ovat erottuneet (ks. huomautus 7.3), petrolieetterikerros siirretään toiseen erotussuppiloon (4.2.3). Uutto toistetaan kahdesti 100 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja kahdesti 50 ml:lla petrolieetteriä (3.2).

Yhdistetyt uutteet pestään erotussuppilossa, pyörittäen varovasti (emulsion muodostumisen välttämiseksi), kahdesti 100 ml:lla vettä ja sitten toistuvasti ravistelemalla edelleen 100 ml:lla vettä kerrallaan, kunnes pesuvesi on väritön lisättäessä fenolftaleiiniliuosta (3.7) (neljä pesukertaa riittää yleensä). Pesty uute suodatetaan suspendoitujen vesijäämien poistamiseksi kuivan laskostetun faasinerotussuodatinpaperin läpi (4.4) 500 ml:n mittapulloon (4.2.2). Erotussuppilo ja suodatinpaperi huuhdotaan 50 ml:lla petrolieetteriä (3.2), täytetään merkkiin asti petrolieetterillä (3.2) ja sekoitetaan hyvin.

5.3.2 *Uutto uuttolaitteella (4.8)*

Kun kerrokset ovat erottuneet (ks. huomautus 7.3), pannaan lasisylinterin (4.8.1) tulpan tilalle lasihiosliitin (4.8.2) ja asetetaan liikuteltavan putken U:n muotoinen alapää siten, että se on juuri faasien rajakohdan yläpuolella. Johtamalla paineistettua tyypeä sivuputkeen siirretään ylempi petrolieetterikerros 1 000 ml:n erotussuppiloon (4.2.3). Lisätään 100 ml petrolieetteriä (3.2) lasisylinteriin, suljetaan tulpalla ja ravistellaan hyvin. Annetaan faasien erottua ja siirretään ylempi kerros erotussuppiloon kuten edellä. Uutto toistetaan vielä 100 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja kahdesti 50 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja petrolieetterikerrokset siirretään erotussuppiloon.

Yhdistetyt petrolieetteriuutteet pestään kuten 5.3.1 kohdassa ja jatketaan kuten kyseisessä kohdassa kerrottu.

5.4 *Näyteliuoksen valmistaminen HPLC-ajoa varten*

Pipetoidaan tietty määrä petrolieetteriliuosta (joka on saatu kohdassa 5.3.1 tai 5.3.2) 250 ml:n päärynämuotoiseen kolviin (4.2.4). Liuotin haihdutetaan lähes kuiviin pyöröhaihduttimella (4.1) alennetussa paineessa; vesihauteen lämpötila saa olla korkeintaan 40 °C. Ilmanpaine palautetaan

▼B

normaaliksi tyypellä (3.10) ja kolvi otetaan pois pyöröhaihduttimesta. Jäljellä oleva liuotin haihdutetaan typpivirrassa (3.10) ja jäännös liuotetaan välittömästi tunnettuun tilavuuteen (10–100 ml) metanolia (3.3) (A-vitamiinipitoisuuden on oltava välillä 5–30 ky/ml).

5.5 *Määrittäminen HPLC:llä*

A-vitamiini erotetaan C₁₈-käänteisfaasikolonilla (4.5.1) ja sen pitoisuus mitataan UV-detektorilla (325 nm) tai fluoresenssidetektorilla (eksitaatio: 325 nm, emissio: 475 nm) (4.5.2).

Injektoidaan tietty määrä (esim. 20 µl) kohdassa 5.4 saatua metanoliliuosta ja eluoidaan liikkuvalla faasilla (3.9). Lasketaan useiden saman näyteliuoksen injektoiden sekä useiden kalibrointiliuosten (5.6.2) injektoiden piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

HPLC-ajolosuhteet

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia; muita ajo-olosuhteita voidaan käyttää, jos niillä saadaan vastaavat tulokset.

Nestekromatografiakoloni (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi (3.9):	Metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (v + v).
Virtausnopeus:	1–2 ml/min
Detektori (4.5.2):	UV-detektori (325 nm) tai fluoresenssidetektori (eksitaatio: 325 nm / emissio: 475 nm)

5.6 *Kalibrointi*5.6.1 *Käyttöstandardiliuosten valmistaminen*

Pipetoidaan 20 ml A-vitamiiniasetaatin kantaliuosta (3.11.1) tai 20 ml A-vitamiinipalmitaatin kantaliuosta (3.12.1) 500 ml:n tasapohjaiseen tai pyöreäpohjaiseen kolviin (4.2.1) ja hydrolysoidaan kuten kohdassa 5.2, mutta ilman BHT-lisäystä. Tämän jälkeen uutetaan petroleetterillä (3.2) kohdan 5.3 mukaisesti ja täytetään 500 ml:aan petroleetterillä (3.2). Haihdutetaan 100 ml tätä uutetta pyöröhaihduttimella (ks. 5.4) lähes kuiviin, jäljellä oleva liuotin poistetaan typpivirralla (3.10) ja jäännös liuotetaan 10,0 ml:aan metanolia (3.3). Tämän liuoksen nimellinen A-vitamiinipitoisuus on 560 ky/ml. Tarkka pitoisuus on määritettävä kohdan 5.6.3.3 mukaisesti. Käyttöstandardiliuos valmistetaan juuri ennen käyttöä.

Pipetoidaan 2,0 ml tätä käyttöstandardiliuosta 20 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.3) ja sekoitetaan. Tämän **laimennetun** käyttöstandardiliuoksen nimellinen pitoisuus on 56 ky/ml A-vitamiinia.

5.6.2 *Kalibrointiliuosten valmistaminen ja kalibrointikäyrä*

Pipetoidaan 1,0, 2,0, 5,0 ja 10,0 ml **laimennettua** käyttöstandardiliuosta 20 ml:n mittapulloihin, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.3) ja sekoitetaan. Näiden liuosten nimelliset pitoisuudet ovat 2,8, 5,6, 14,0 ja 28,0 ky/ml A-vitamiinia.

Injektoidaan 20 µl kutakin kalibrointiliuosta useita kertoja ja määritetään piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrointikäyrä käyttäen korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvoja, ottaen huomioon UV-spektrin tarkistuksen tulokset (5.6.3.3).

▼B

5.6.3 Standardiliuosten UV-standardisointi

5.6.3.1 *A-vitamiiniasetaattikantaliuos*

Pipetoidaan 2,0 ml A-vitamiiniasetaattikantaliuosta (3.11.1) 50 ml:n mittapulloon (4.2.2) ja täytetään merkkiin asti 2-propanolilla (3.8). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 56 ky/ml A-vitamiinia. Pipetoidaan 3,0 ml tätä laimennettua A-vitamiiniasetaattiliuosta 25 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asti 2-propanolilla (3.8). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 6,72 ky/ml A-vitamiinia. Mitataan liuoksen UV-spektri 2-propanolia (3.8) vastaan spektrofotometrillä (4.6) välillä 300–400 nm. Ekstinktiomaksimin on oltava välillä 325–327 nm.

A-vitamiinipitoisuuden laskeminen:

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

(A-vitamiiniasetaatin $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1\,530$ aallonpituudella 326 nm 2-propanolissa)

5.6.3.2 *A-vitamiinipalmitaattikantaliuos*

Pipetoidaan 2,0 ml A-vitamiinipalmitaattikantaliuosta (3.12.1) 50 ml:n mittapulloon (4.2.2) ja täytetään merkkiin asti 2-propanolilla (3.8). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 56 ky/ml A-vitamiinia. Pipetoidaan 3,0 ml tätä laimennettua A-vitamiinipalmitaattiliuosta 25 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asti 2-propanolilla (3.8). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 6,72 ky/ml A-vitamiinia. Mitataan liuoksen UV-spektri 2-propanolia (3.8) vastaan spektrofotometrillä (4.6) välillä 300–400 nm. Ekstinktiomaksimin on oltava välillä 325–327 nm.

A-vitamiinipitoisuuden laskeminen:

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

(A-vitamiinipalmitaatin $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 957$ aallonpituudella 326 nm 2-propanolissa)

5.6.3.3 *A-vitamiinin käyttöstandardiliuos*

Pipetoidaan 3,0 ml **laimentamatonta** A-vitamiinin käyttöstandardiliuosta, joka on valmistettu kohdan 5.6.1 mukaisesti, 50 ml:n mittapulloon (4.2.2) ja täytetään merkkiin asti 2-propanolilla (3.8). Pipetoidaan 5,0 ml tätä liuosta 25 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asti 2-propanolilla (3.8). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 6,72 ky/ml A-vitamiinia. Mitataan liuoksen UV-spektri 2-propanolia (3.8) vastaan spektrofotometrillä (4.6) välillä 300–400 nm. Ekstinktiomaksimin on oltava välillä 325–327 nm.

A-vitamiinipitoisuuden laskeminen:

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

(A-vitamiinialkoholin $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1\,821$ aallonpituudella 325 nm 2-propanolissa)

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen A-vitamiinipitoisuus (ky/ml) lasketaan näyteliuoksen A-vitamiinipitoisuuden korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibroitikäyrän (5.6.2) avulla.

▼B

Näytteen A-vitamiinipitoisuus w (ky/kg) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

c = näyteliuoksen (5.4) A-vitamiinipitoisuus (ky/ml),

V_1 = näyteliuoksen (5.4) tilavuus (ml),

V_2 = kohdassa 5.4 otetun näyteliuoksen tilavuus (ml),

m = näyte-erän paino (g).

7. Huomautukset

7.1 Jos näytteiden A-vitamiinipitoisuus on alhainen, voi olla hyödyllistä yhdistää kahden saippuointierän petrolieetteriuutteet (punnittu määrä: 25 g) yhdeksi näyteliuokseksi HPLC-määrittystä varten.

7.2 Analyysiä varten otetussa näytemäärässä ei saa olla yli 2 g:aa rasvaa.

7.3 Jos faasit eivät erotu, lisätään noin 10 ml etanolia (3.1) emulsion hajottamiseksi.

7.4 Kun on kyseessä kalanmaksaöljy ja muut puhtaat rasvat, saippuointiajan on oltava 45–60 minuuttia.

7.5 Hydrokinonia voi käyttää BHT:n sijasta.

7.6 Käytettäessä normaalfaasikolonnia retinoli-isomeerit voivat erottua toisistaan. Siinä tapauksessa kaikkien cis- ja trans-isomeeriipikkien korkeudet (pinta-alat) on laskettava yhteen.

7.7 Natriumaskorbaattiliuoksen voi korvata noin 150 mg:lla askorbiinihappoa.

7.8 Natriumsulfidiliuoksen voi korvata noin 50 mg:lla EDTA:ta.

7.9 Maidonkorvikkeiden A-vitamiinin määrittämisessä on kiinnitettävä erityistä huomiota

— saippuointiin (5.2): näytteen sisältämän rasvamäärän vuoksi kaliumhydroksidiliuoksen (3.4) määrää voi olla tarpeen lisätä,

— uuttamiseen (5.3): emulsioiden esiintymisen vuoksi veden ja etanolin suhdetta 2:1 voi olla tarpeen muuttaa.

Ylimääräisellä näyte-erällä tehtävällä saantokokeella varmistetaan, että käytetty menetelmä tuottaa luotettavat tulokset tällä materiaalilla (maidonkorvikkeella). Jos saantoaste on alempi kuin 80 %, määrittämissuhteesta on korjattava saannon suhteen.

8. Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittämissuhteiden välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin 15 % suuremmasta arvosta.

▼B9. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset ⁽¹⁾**

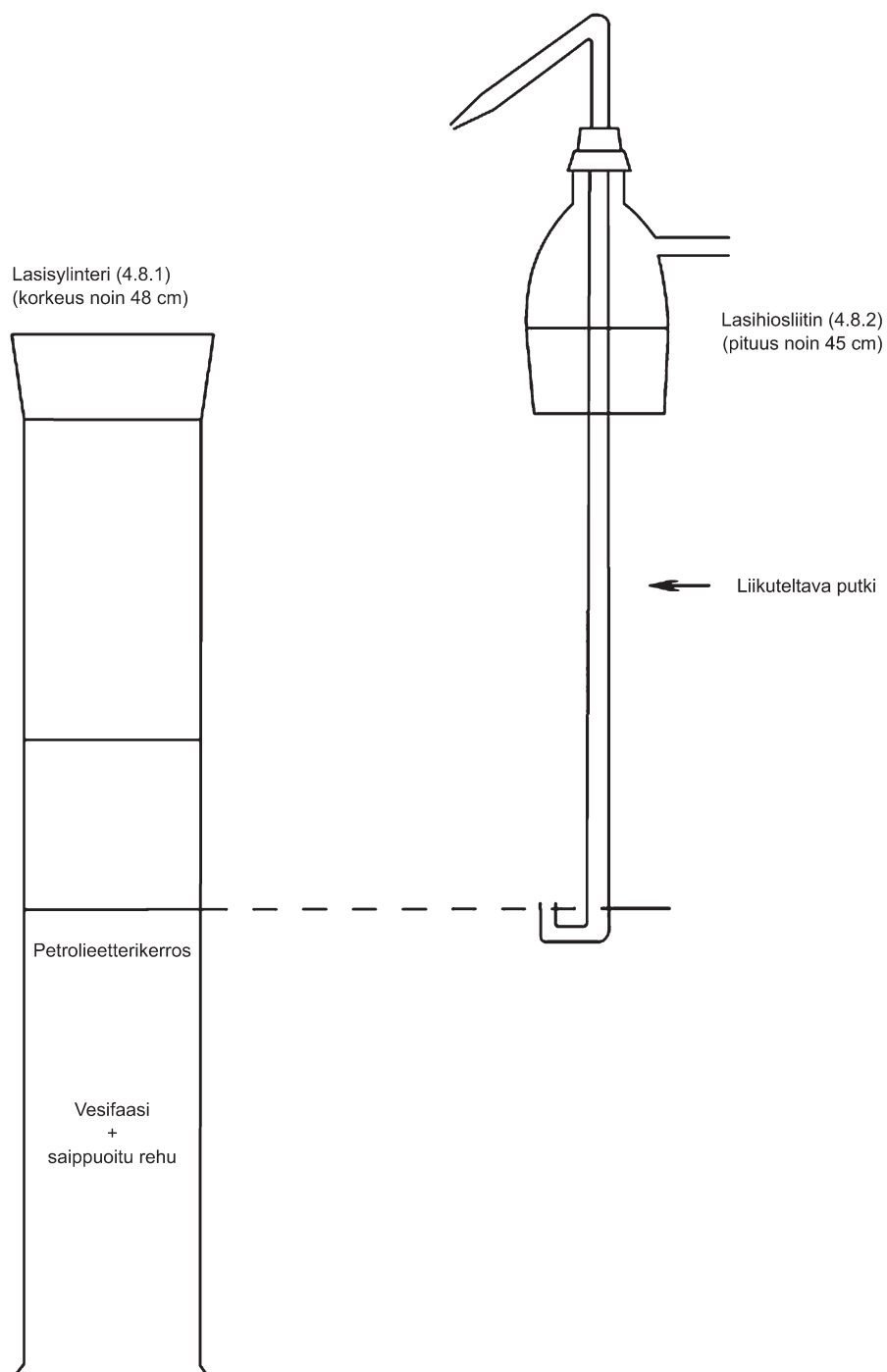
	Esiseos	Esiseosvalmis- te	Kivennäisrehu	Tiiviste	Porsasrehu
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
keskiarvo [ky/kg]	$17,02 \times 106$	$1,21 \times 106$	537 100	151 800	18 070
s_r [ky/kg]	$0,51 \times 106$	$0,039 \times 106$	22 080	12 280	682
r [ky/kg]	$1,43 \times 106$	$0,109 \times 106$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [ky/kg]	$1,36 \times 106$	$0,069 \times 106$	46 300	23 060	3 614
R [ky/kg]	$3,81 \times 106$	$0,193 \times 106$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = laboratorioiden lukumäärä
 n = yksittäisten arvojen lukumäärä
 s_r = toistettavuuden keskihajonta
 s_R = uusittavuuden keskihajonta
 r = toistettavuus
 R = uusittavuus
 CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin
 CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin

⁽¹⁾ Vertailun järjestäjä: Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), rehutyöryhmä.

▼B

Kuva 1: Uuttolaitteisto (4.8)



▼B**B. E-VITAMIININ MÄÄRITYS****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää E-vitamiinin pitoisuus rehuissa ja esiseoksissa. E-vitamiinipitoisuus ilmoitetaan mg/kg DL- α -tokoferoliasetaattia. 1 mg DL- α -tokoferoliasetaattia vastaa 0,91 mg:aa DL- α -tokoferolia (E-vitamiinia).

Määritysraja on 2 mg E-vitamiinia/kg. Tämä määritysraja voidaan saavuttaa ainoastaan fluoresenssi-detektorilla. UV-detektoria käytettäessä määritysraja on 10 mg/kg.

2. Periaate

Näyte hydrolysoidaan etanoli-kaliumhydroksidiliuoksella ja E-vitamiini uutetaan petroleetteriin. Liuotin haihdutetaan pois, haihdutusjäännös liuotetaan metanoliin ja laimennetaan tarvittaessa halutulle pitoisuusalueelle. E-vitamiinipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (RP-HPLC) fluoresenssi- tai UV-detektoria käyttäen.

3. Reagenssit

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

3.2 Petroleetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.

3.3 Metanoli.

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

3.5 Natriumaskorbaattiliuos, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (ks. 7.7 huomautukset).

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

3.6.1 Natriumsulfidiliuos, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ glyserolissa, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (kun $x = 9$) (ks. 7.8 huomautukset).

3.7 Fenoltaleiiniliuos, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ etanolissa (3.1).

3.8 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi: metanolin (3.3) ja veden seos, esim. $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Tarkka suhde määräytyy käytetyn kolonnin ominaisuuksien perusteella.

3.9 Typpi, happivapaa.

3.10 DL- α -tokoferoliasetaatti, erikoispuhdas, sertifioitu aktiivisuus.

3.10.1 DL- α -tokoferoliasetaatin kantaliuos: Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 100 mg DL- α -tokoferoliasetaattia (3.10) 100 ml:n mittapulloon. Liuotetaan etanoliin (3.1) ja täytetään merkkiin asti samalla liuottimella. 1 ml tätä liuosta sisältää 1 mg DL- α -tokoferoliasetaattia. (UV-tarkistus, ks. 5.6.1.3; stabilointi, ks. 7.4 huomautukset).

3.11 DL- α -tokoferoli, erikoispuhdas, sertifioitu aktiivisuus.

3.11.1 DL- α -tokoferolin kantaliuos: Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 100 mg DL- α -tokoferolia (3.11) 100 ml:n mittapulloon. Liuotetaan etanoliin (3.1) ja täytetään merkkiin asti samalla liuottimella. 1 ml tätä liuosta sisältää 1 mg DL- α -tokoferolia. (UV-tarkistus, ks. 5.6.2.3; stabilointi, ks. 7.4 huomautukset).

3.12 2,6-Di-*tert*-butyyli-4-metyylifenoli (BHT) (ks. 7.5 huomautukset).

4. Välineistö

4.1 Pyörivä kalvohaihdutin.

▼B

- 4.2 Ruskeita lasiastioita.
 - 4.2.1 Tasapohjaisia tai kartionmuotoisia keittokolveja, 500 ml, joissa on lasihios.
 - 4.2.2 Mittapulloja, joissa on lasihiostulpat, kapeakaulaisia, 10, 25, 100 ja 500 ml.
 - 4.2.3 Erotussuppiloita, kartiomaisia, 1 000 ml, joissa on lasihiostulpat.
 - 4.2.4 Päärynänmuotoisia kolveja, 250 ml, joissa on lasihios.
- 4.3 Allihn-jäähdytin, vaipan pituus 300 mm, jossa on lasihios ja liitin kaasunsyöttöputkelle.
- 4.4 Laskostettua suodatinpaperia faasien erotukseen, halkaisija 185 mm (esim. Schleicher & Schüll 597 HY 1/2).
- 4.5 HPLC-laitteisto, jossa injektor.
- 4.5.1 Nestekromatografiakolonne, 250 mm × 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava.
- 4.5.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen fluoresenssi- tai UV- detektor.
- 4.6 Spektrofotometri ja 10 mm:n kvartsikyvettejä.
- 4.7 Vesihaude, jossa on magneettisekoitin.
- 4.8 Uttolaitteisto, jossa on (ks. kuva 1):
 - 4.8.1 Lasisylinteri, tilavuus 1 l, jossa on lasihioskaula ja tulppa.
 - 4.8.2 Lasihiosliitin, jossa on sivuputki ja keskeltä läpi menevä liikuteltava putki. Liikuteltavassa putkessa on oltava U:n muotoinen alapää ja toisessa päässä nokka, niin että sylinterissä oleva ylempi nestekerros voidaan siirtää erotussuppiloon.

5. Menettely

Huomautus: E-vitamiini on herkkä (UV-)valolle ja hapettumiselle. Kaikki toimenpiteet on suoritettava valolta suojattuna (käyttäen ruskeita tai alumiinifoliolla suojattuja lasitarvikkeita) ja hapelta suojattuna (typpivirtauksessa). Uuton aikana nestepinnan yläpuolella oleva ilma on korvattava typpellä (ylipaineen muodostuminen estettävä raottamalla tulppaa silloin tällöin).

5.1 Näytteen valmistaminen

Näyte jauhetaan niin että se läpäisee 1 mm:n seulan; näytteen lämpenemistä on vältettävä. Näytteen jauhaminen on tehtävä **välittömästi** ennen punnintaa ja saippuointia E-vitamiinin hajoamisen välttämiseksi.

5.2 Saippuointi

E-vitamiinipitoisuudesta riippuen punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella 2–25 g näytettä 500 ml:n tasapohjaiseen tai pyöreäpohjaiseen kolviin (4.2.1). Lisätään peräkkäin kolvia pyörittäen 130 ml etanolia (3.1), noin 100 mg BHT:tä (3.12), 2 ml natriumaskorbaattiliuosta (3.5) ja 2 ml natriumsulfidiliuosta (3.6). Kiinnitetään jäähdytin (4.3) kolviin ja kolvi pannaan vesihauteeseen, jossa on magneettisekoitin (4.7). Kuumennetaan kiehumispisteeseen ja annetaan kiehua 5 minuuttia. Lisätään 25 ml kaliumhydroksidiliuosta (3.4) jäähdyttimen läpi (4.3) ja annetaan kiehua vielä 25 minuuttia sekoittaen hitaassa typpivirrassa. Jäähdytin huuhdellaan noin 20 ml:lla vettä ja kolvin sisältö jäähdytetään huoneenlämpötilaan.

▼B

5.3 *Uutto*

Saippuointiliuos siirretään dekantoimalla kvantitatiivisesti, huuhtomalla kaikkiaan 250 ml:lla vettä, 1 000 ml:n erotussuppiloon (4.2.3) tai uuttolaitteeseen (4.8). Saippuointikolvi huuhdotaan ensin 25 ml:lla etanolia (3.1) ja sitten 100 ml:lla petroleetteriä (3.2) ja huuhteluliuos siirretään erotussuppiloon tai uuttolaitteeseen. Veden ja etanolin lopputilavuuksien suhteen pitää olla noin 2:1. Ravistellaan voimakkaasti 2 minuuttia ja annetaan laskeutua 2 minuuttia.

5.3.1 *Uutto erotussuppiloa (4.2.3) käyttäen*

Kun kerrokset ovat erottuneet (ks. huomautus 7.3), petroleetterikerros siirretään toiseen erotussuppiloon (4.2.3). Uutto toistetaan kahdesti 100 ml:lla petroleetteriä (3.2) ja kahdesti 50 ml:lla petroleetteriä (3.2).

Yhdistetyt uutteet pestään erotussuppilossa, pyörittäen varovasti (emulsion muodostumisen välttämiseksi), kahdesti 100 ml:lla vettä ja sitten toistuvasti ravistelemalla edelleen 100 ml:lla vettä kerrallaan, kunnes pesuvesi on väritön lisättäessä fenolftaleiiniliuosta (3.7) (neljä pesukertaa riittää yleensä). Pesty uute suodatetaan suspendoitujen vesijäämien poistamiseksi kuivan laskostetun suodatinpaperin läpi (4.4) 500 ml:n mittapulloon (4.2.2). Erotussuppilo ja suodatinpaperi huuhdotaan 50 ml:lla petroleetteriä (3.2), täytetään merkkiin asti petroleetterillä (3.2) ja sekoitetaan hyvin.

5.3.2 *Uutto uuttolaitteella (4.8)*

Kun kerrokset ovat erottuneet (ks. huomautus 7.3), pannaan lasisylinterin (4.8.1) tulpan tilalle lasihiosliitin (4.8.2) ja asetetaan liikuteltavan putken U:n muotoinen alapää siten, että se on juuri faasien rajakohdan yläpuolella. Johtamalla paineistettua tyyppä sivuputkeen siirretään ylempi petroleetterikerros 1 000 ml:n erotussuppiloon (4.2.3). Lisätään 100 ml petroleetteriä (3.2) lasisylinteriin, suljetaan tulpalla ja ravistellaan hyvin. Annetaan faasien erottua ja siirretään ylempi kerros erotussuppiloon kuten edellä. Uutto toistetaan vielä 100 ml:lla petroleetteriä (3.2) ja kahdesti 50 ml:lla petroleetteriä (3.2) ja petroleetterikerrokset siirretään erotussuppiloon.

Yhdistetyt petroleetteriuutteet pestään kuten 5.3.1 kohdassa ja jatketaan kuten kyseisessä kohdassa kerrottu.

5.4 *Näyteliuoksen valmistaminen HPLC-ajoa varten*

Pipetoidaan tietty määrä petroleetteriliuosta (joka on saatu kohdassa 5.3.1 tai 5.3.2) 250 ml:n päärynämuotoiseen kolviin (4.2.4). Liuotin haihdutetaan lähes kuiviin pyöröhaihduttimella (4.1) alennetussa paineessa; vesihäuteen lämpötila saa olla korkeintaan 40 °C. Ilmanpaine palautetaan normaaliksi tyypellä (3.9) ja kolvi otetaan pois pyöröhaihduttimesta. Jäljellä oleva liuotin haihdutetaan typpivirrassa (3.9) ja jäännös liuotetaan välittömästi tunnettuun tilavuuteen (10–100 ml) metanolia (3.3) (DL- α -tokoferolipitoisuuden on oltava välillä 5–30 µg/ml).

5.5 *Määrittäminen HPLC:llä*

E-vitamiini erotetaan C₁₈-käänteisfaasikolonnilta (4.5.1) ja sen pitoisuus mitataan fluoresenssidetektorilla (eksitaatio: 295 nm, emissio: 330 nm) tai UV-detektorilla (292 nm) (4.5.2).

▼B

Injektoidaan tietty määrä (esim. 20 µl) kohdassa 5.4 saatua metanoliliuosta ja eluoidaan liikkuvalla faasilla (3.8). Lasketaan useiden saman näyteliuoksen injektioiden sekä useiden kalibrointiliuosten (5.6.2) injektioiden piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

HPLC-ajolosuhteet

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia; muita ajo-olosuhteita voidaan käyttää, jos niillä saadaan vastaavat tulokset.

Nestekromatografiakoloni (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi (3.8):	Metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (v + v).
Virtausnopeus:	1–2 ml/min
Detektori (4.5.2):	Fluoresenssidetektor (eksitaatio: 295 nm / emissio: 330 nm) tai UV-detektori (292 nm)

5.6 Kalibrointi (DL- α -tokoferoliasetaatti tai DL- α -tokoferoli)**5.6.1 DL- α -tokoferoliasetaattistandardi****5.6.1.1 Käyttöstandardiliuoksen valmistaminen**

Pipetoidaan 25 ml DL- α -tokoferoliasetaattikantaliuosta (3.10.1) 500 ml:n tasapohjaiseen tai pyöreäpohjaiseen kolviin (4.2.1) ja hydrolysoidaan kuten kohdassa 5.2. Tämän jälkeen uutetaan petrolieetterillä (3.2) kohdan 5.3 mukaisesti ja täytetään 500 ml:aan petrolieetterillä. Haihdutetaan 25 ml tätä uutetta pyöröhaihduttimella (ks. 5.4) lähes kuiviin, jäljellä oleva liuotin poistetaan typpivirralla (3.9) ja jäännös liuotetaan 25,0 ml:aan metanoliala (3.3). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 45,5 µg/ml DL- α -tokoferolia, mikä vastaa 50 µg/ml:aa DL- α -tokoferoliasetaattia. Käyttöstandardiliuos valmistetaan juuri ennen käyttöä.

5.6.1.2 Kalibrointiliuosten valmistaminen ja kalibrointikäyrä

Pipetoidaan 1,0, 2,0, 4,0 ja 10,0 ml kantastandardiliuosta 20 ml:n mitapulloihin, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.3) ja sekoitetaan. Näiden liuosten nimelliset pitoisuudet ovat 2,5, 5,0, 10,0 ja 25,0 µg/ml DL- α -tokoferoliasetaattia eli 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml ja 22,8 µg/ml DL- α -tokoferolia.

Injektoidaan 20 µl kutakin kalibrointiliuosta useita kertoja ja määritetään piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrointikäyrä käyttäen piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvoja.

5.6.1.3 DL- α -tokoferoliasetaattikantaliuoksen (3.10.1) UV-standardisointi

Laimennetaan 5,0 ml DL- α -tokoferoliasetaattikantaliuosta (3.10.1) 25,0 ml:ksi etanolilla ja mitataan tämän liuoksen UV-spektri etanoliala (3.1) vastaan spektrofotometrillä (4.6) välillä 250–320 nm.

Absorptiomaksimin pitää olla aallonpituudella 284 nm:

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

Tällä laimennuksella pitää saada ekstinktioarvo 0,84–0,88.

▼B**5.6.2 DL- α -tokoferolistandardi****5.6.2.1 Käyttöstandardiliuoksen valmistaminen**

Pipetoidaan 2 ml DL- α -tokoferolikantaliuosta (3.11.1) 50 ml:n mittapulloon, liuotetaan metanoliin (3.3) ja täytetään merkkiin asti metanolilla. Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 40 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tokoferolia, mikä vastaa 44,0 $\mu\text{g/ml}$:aa DL- α -tokoferoliasetaattia. Käyttöstandardiliuos valmistetaan juuri ennen käyttöä.

5.6.2.2 Kalibrointiliuosten valmistaminen ja kalibrointikäyrä

Pipetoidaan 1,0, 2,0, 4,0 ja 10,0 ml kantastandardiliuosta 20 ml:n mittapulloihin, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.3) ja sekoitetaan. Näiden liuosten nimelliset pitoisuudet ovat 2,0, 4,0, 8,0 ja 20,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tokoferolia eli 2,20, 4,40, 8,79 $\mu\text{g/ml}$ ja 22,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tokoferoliasetaattia.

Injektoidaan 20 μl kutakin kalibrointiliuosta useita kertoja ja määritetään piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrointikäyrä käyttäen piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvoja.

5.6.2.3 DL- α -tokoferolikantaliuoksen (3.11.1) UV-standardisointi

Laimennetaan 2,0 ml DL- α -tokoferolikantaliuosta (3.11.1) 25,0 ml:ksi etanolilla ja mitataan tämän liuoksen UV-spektri etanolia (3.1) vastaan spektrofotometrillä (4.6) välillä 250–320 nm. Absorptiomaksimin pitää olla aallonpituudella 292 nm:

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

Tällä laimennuksella pitää saada ekstinktioarvo 0,6.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen E-vitamiinipitoisuus $\mu\text{g/ml}$ (laskettuna α -tokoferoliasetaattina) määritetään näyteliuoksen E-vitamiinipiikkien korkeuden (pinta-ala) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.6.1.2 tai 5.6.2.2) avulla.

Näytteen E-vitamiinipitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

c = näyteliuoksen (5.4) E-vitamiinipitoisuus (α -tokoferoliasetaattina) ($\mu\text{g/ml}$);

V_1 = näyteliuoksen (5.4) tilavuus (ml);

V_2 = näyteliuoksen (5.4) tilavuus (ml);

m = näyte-erän paino (g).

7. Huomautukset

7.1 Jos näytteiden E-vitamiinipitoisuus on alhainen, voi olla hyödyllistä yhdistää kahden saippuointierän petrolieetteriuutteet (punnittu määrä: 25 g) yhdeksi näyteliuokseksi HPLC-määrittystä varten.

7.2 Analyysiä varten otetussa näytemäärässä ei saa olla yli 2 g:aa rasvaa.

7.3 Jos faasit eivät erotu, lisätään noin 10 ml etanolia (3.1) emulsion hajottamiseksi.

▼B

- 7.4 Sen jälkeen, kun DL- α -tokoferoliasetaattiliuoksen pitoisuus on määritetty 5.6.1.3 kohdan mukaisesti tai DL- α -tokoferoliliuoksen pitoisuus 5.6.2.3 kohdan mukaisesti spektrofotometrisesti, lisätään noin 10 mg BHT:tä (3.12) liuokseen (3.10.1 tai 3.10.2); liuos säilytetään jääkaapissa (enintään 4 viikkoa).
- 7.5 Hydrokinonia voi käyttää BHT:n sijasta.
- 7.6 Käytettäessä normaalifaasikolonnissa α -, β -, γ - ja δ -tokoferolit voivat erottua toisistaan.
- 7.7 Natriumaskorbaattiliuoksen voi korvata noin 150 mg:lla askorbiinihappoa.
- 7.8 Natriumsulfidiliuoksen voi korvata noin 50 mg:lla EDTA:ta.
- 7.9 E-vitamiiniasetaatti hydrolysoituu hyvin nopeasti emäksisissä olosuhteissa, ja siksi se hapettuu herkästi eritoten hivenaineiden kuten raudan tai kuparin läsnä ollessa. Jos esiseoksessa on E-vitamiinia yli 5 000 mg/kg, E-vitamiini saattaa hajota. Tästä syystä varmistuksessa suositellaan käytettäväksi HPLC-menetelmää, johon kuuluu E-vitamiiniyhdisteen hajottaminen entsymaattisesti ilman emäksistä saippuointivaihetta.

8. Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin 15 % suuremmasta arvosta.

9. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset ⁽¹⁾

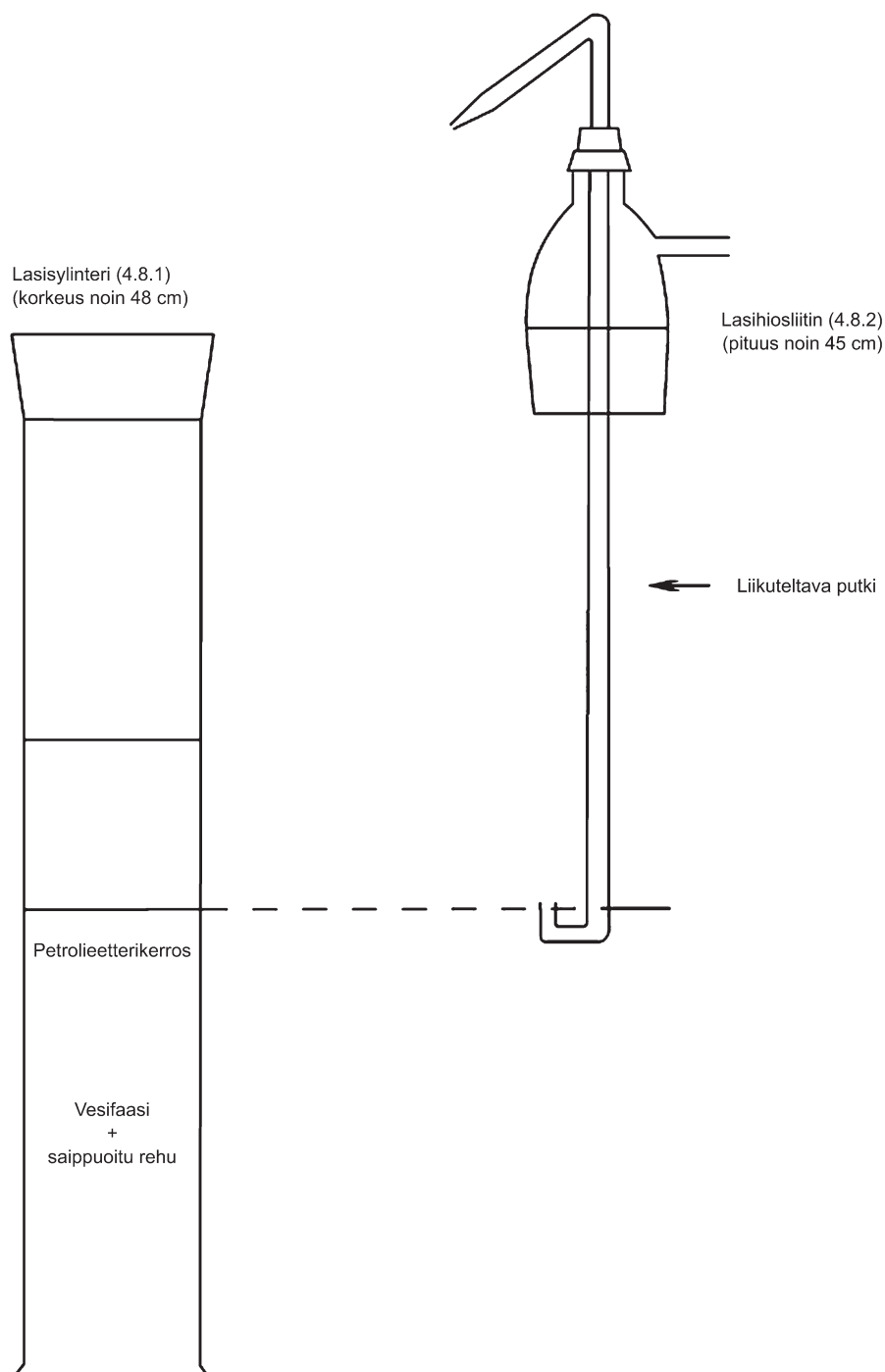
	Esiseos	Esiseosvalmistus	Kivennäisrehu	Tiiviste	Porsasrehu
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
keskiarvo [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = laboratorioiden lukumäärä
n = yksittäisten arvojen lukumäärä
s_r = toistettavuuden keskihajonta
s_R = uusittavuuden keskihajonta
r = toistettavuus
R = uusittavuus
CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin
CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.

⁽¹⁾ Vertailun järjestäjä: Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), rehutyöryhmä.

▼B

Kuva 1: Uuttolaitteisto (4.8)



▼B**C. RAUDAN, KUPARIN, MANGAANIN JA SINKIN MÄÄRITYS****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehuista hivenaineet rauta, kupari, mangaani ja sinkki. Määrittämisrajat ovat:

- rauta (Fe): 20 mg/kg
- kupari (Cu): 10 mg/kg
- mangaani (Mn): 20 mg/kg
- sinkki (Zn): 20 mg/kg.

2. Periaate

Näytteet liuotetaan kloorivetyhappoon sen jälkeen, kun siinä mahdollisesti esiintyvät orgaaniset aineet on tuhottu. Alkuaineet rauta, kupari, mangaani ja sinkki määritetään sopivan laimennuksen jälkeen atomiabsorbtiospektrometrillä.

3. Reagenssit*Alustavat huomautukset*

Reagenssien ja analyysiliuosten valmistuksessa käytetään määritettävistä kationeista vapaata vettä, joka on saatu joko tislamalla se kaksi kertaa borosilikaattilasista tai kvartsista valmistetussa tisluslaitteessa tai käsittelemällä se kaksi kertaa ioninvaihtohartsilla.

Reagenssien on oltava vähintään analyysilaatua. Nollakokeella tarkistetaan, ettei määritettävää alkuainetta esiinny. Tarvittaessa reagensseja on puhdistettava lisää.

Seuraavassa kuvattujen standardiliuosten tilalla voidaan käyttää kaupallisesti saatavilla olevia standardiliuoksia, jos ne ovat takuulaatua ja ne on tarkistettu ennen käyttöä.

- 3.1 Kloorivetyhappo, tiheys 1,19 g/ml.
- 3.2 Kloorivetyhappo, 6 mol/l.
- 3.3 Kloorivetyhappo, 0,5 mol/l.
- 3.4 38–40 % (v/v) fluorivetyhappo, jonka rautapitoisuus on alle 1 mg Fe/l ja haihdutusjäännös alle 10 mg (sulfaattina)/litra.
- 3.5 Rikkihappo, tiheys 1,84 g/ml.
- 3.6 Vetyperoksidi, noin 100 tilavuusosaa happea (30 % (w/v)).
- 3.7 Rautastandardiliuos (1 000 µg Fe/ml), joka on valmistettu seuraavasti, tai vastaava kaupallisesti saatavilla oleva liuos: liuotetaan 1 g rautalankaa 200 ml:aan kloorivetyhappoa, 6 mol/l, (3.2), lisätään 16 ml vetyperoksidia (3.6) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
 - 3.7.1 Rautakäyttöstandardiliuos (100 µg Fe/ml), joka on valmistettu laimentamalla 1 osa standardiliuosta (3.7) 9 osalla vettä.
- 3.8 Kuparistandardiliuos (1 000 µg Cu/ml), joka on valmistettu seuraavasti, tai vastaava kaupallisesti saatavilla oleva liuos:
 - liuotetaan 1 g jauhemaista kuparia 25 ml:aan kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), lisätään 5 ml vetyperoksidia (3.6) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.8.1 Kuparikäyttöstandardiliuos (10 µg Cu/ml), joka on valmistettu laimentamalla 1 osa standardiliuosta (3.8) 9 osalla vettä ja sen jälkeen laimentamalla 1 osa saatua liuosta 9 osalla vettä.

▼B

- 3.9 Mangaanistandardiliuos (1 000 µg Mn/ml), joka on valmistettu seuraavasti, tai vastaava kaupallisesti saatavilla oleva liuos:

— liuotetaan 1 g jauhemaista mangaania 25 ml:aan kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), ja täytetään 1 litraksi vedellä.

- 3.9.1 Mangaanikäyttöstandardiliuos (10 µg Mn/ml), joka on valmistettu laimentamalla 1 osa standardiliuosta (3.9) 9 osalla vettä ja sen jälkeen laimentamalla 1 osa saatua liuosta 9 osalla vettä.

- 3.10 Sinkkistandardiliuos (1 000 µg Zn/ml), joka on valmistettu seuraavasti, tai vastaava kaupallisesti saatavilla oleva liuos:

— liuotetaan 1 g nauhamaisessa tai lehtimäisessä muodossa olevaa sinkkiä 25 ml:aan kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), ja täytetään 1 litraksi vedellä.

- 3.10.1 Sinkkikäyttöstandardiliuos (10 µg Zn/ml), joka on valmistettu laimentamalla 1 osa standardiliuosta (3.10) 9 osalla vettä ja sen jälkeen laimentamalla 1 osa saatua liuosta 9 osalla vettä.

- 3.11 Lantaanikloridiliuos: liuotetaan 12 g lantaanioksidia 150 ml:aan vettä, lisätään 100 ml kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), ja täytetään 1 litraksi vedellä.

4. Välineistö

- 4.1 Muhveliuuni, jossa on lämpötilan säätölaite ja mielellään myös piirturi.
- 4.2 Lasitavaroiden on oltava kestävää borosilikaattityyppiä, ja on suositeltavaa käyttää välineitä, jotka on erityisesti tarkoitettu hivenaineiden määrittäisiin.
- 4.3 Atomiabsorbtióspektrofotometri, jonka herkkyys ja tarkkuus vaaditulla alueella täyttävät menetelmän vaatimukset.

5. Menettely ⁽¹⁾

5.1 *Orgaanista ainetta sisältävät näytteet*

- 5.1.1 Polttaminen tuhkaksi ja analyysiin tarvittavan liuoksen valmistaminen ⁽²⁾

- 5.1.1.1 Punnitaan 5–10 g näytettä 0,2 mg:n tarkkuudella, pannaan kvartsi- tai platinaupokkaaseen (ks. huomautus b), kuivataan lämpökaapissa 105 °C:ssa ja pannaan upokas kylmään muhveliuuniin (4.1). Uuni suljetaan (ks. huomautus c) ja lämpötila nostetaan vähitellen 450–475 °C:seen noin 90 minuutin aikana. Lämpötila pidetään tässä 4–16 tuntia (esimerkiksi yön yli) hiilipitoisen materiaalin poistamiseksi ja uuni avataan ja sen annetaan jäähtyä (ks. huomautus d).

⁽¹⁾ Myös muita hajotusmenetelmiä (kuten mikroaaltouunihajotusta paineen alaisena) voidaan käyttää sillä edellytyksellä, että niiden on osoitettu antavan samanlaiset tulokset.

⁽²⁾ Vihreisiin rehuihin (tuoreisiin tai kuivattuihin) oletetaan sisältyvän suuria määriä kasvipärisiä piyhdisteitä, jotka saattavat sitoa mikromineraaleja, ja jotka on siksi poistettava. Sellaisten rehujen tarkastuksessa on siksi sovellettava seuraavaa muutettua menetelyä. Menetellään 5.1.1.1 alakohdassa esitetyllä tavalla aina suodattamisvaiheeseen asti. Pestään suodatinpaperi, jossa on liukenemattomat jäämät, kahteen kertaan kiehuvalle vedelle ja siirretään ne kvartsi- tai platinaupokkaaseen. Poltetaan tuhkaksi muhveliuunissa (4.1) alle 550 °C:ssa kunnes kaikki hiilipitoinen aine on hävinnyt kokonaan. Annetaan jäähtyä, lisätään muutama tippa vettä ja sen jälkeen 10–15 ml fluorivetyhappoa (3.4) ja haihdutetaan kuivaksi noin 150 °C:ssa. Jos jäännökseen jää piyhdisteitä, se liuotetaan uudelleen muutama millilitraa fluorivetyhappoa (3.4) ja haihdutetaan kuivaksi. Lisätään viisi tippaa rikkihappoa (3.5) ja kuumennetaan kunnes valkoinen savu on haihtunut. Lisätään viisi tippaa kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), ja noin 30 ml vettä, kuumennetaan ja suodatetaan liuos 250 ml:n vetoiseen mittapulloon ja täytetään merkkiin asti vedellä (HCl-pitoisuus on noin 0,5 mol/l). Sen jälkeen jatketaan menettelyä 5.1.2 kohdasta alkaen.

▼B

Tuhka kostutetaan vedellä ja siirretään 250 ml:n dekanterilasiin. Upokas pestään yhteensä noin 5 ml:lla kloorivetyhappoa (3.1), happo lisätään hitaasti ja varovasti dekanterilasiin (tällöin voi esiintyä voimakas reaktio, joka johtuu CO₂:n muodostumisesta). Lisätään kloorivetyhappoa (3.1) pisaroittain samalla sekoittaen kunnes kupliminen on kokonaan lakannut. Haihdutetaan kuivaksi ajoittain lasisauvalla sekoittaen.

Jäännökseen lisätään 15 ml kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), ja noin 120 ml vettä. Sekoitetaan lasisauvalla, joka jätetään dekanterilasiin, ja peitetään astia kellonlasilla. Kuumennetaan varovasti kiehumispisteeseen ja pidetään kiehumispisteessä kunnes enempää tuhkaa ei havaita liukenevan. Suodatetaan tuhkattomalla suodatinpaperilla ja suodos kerätään talteen 250 ml:n mittapulloon. Dekanterilasi ja suodatin pestään 5 ml:lla kuumaa kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), sekä kaksi kertaa kiehuvalle vedelle. Mittapullo täytetään merkkiin asti vedellä (HCl-konsentraatio noin 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2 Jos suodatinpaperissa oleva jäännös on ulkonäöltään mustaa (hiiltä), se viedään takaisin uuniin ja poltetaan uudelleen tuhaksi 450–475 °C:ssa. Tämä poltto kestää vain muutaman tunnin (noin 3–5 tuntia) ja on suoritettu loppuun silloin, kun tuhka on ulkonäöltään valkeaa tai lähes valkeaa. Jäännös liuotetaan noin 2 ml:aan kloorivetyhappoa (3.1), haihdutetaan kuivaksi ja lisätään 5 ml kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2). Kuumennetaan, suodatetaan mittapulloon ja täytetään merkkiin asti vedellä (HCl-konsentraatio noin 0,5 mol/l).

Huomautukset:

- a) Hivenaineita määritettäessä on tärkeää pitää jatkuvasti mielessä erityisesti sinkistä, kuparista ja raudasta aiheutuvat saastumisriskit. Tästä syystä näytteiden valmistuksessa käytetyt välineet eivät saa sisältää näitä metalleja.

Yleisen kontaminaatoriskin vähentämiseksi olisi työskenneltävä pölyttömässä tilassa ja käytettävä huolellisesti puhdistettuja välineitä ja lasitavaroita. Sinkin määrittäminen on erityisen herkkä saastumiselle, joka aiheutuu erityisesti lasitavaroista, reagensseista, pölystä jne.

- b) Tuhkaksi poltettavan näytteen paino lasketaan rehun likimääräisestä hivenainepitoisuudesta käytetyn spektrofotometrin herkkyYTEEN suhteutettuna. Tiettyjen pieniä hivenainemääriä sisältävien rehujen määrittäminen on ehkä aloitettava 10–20 g:n näytteellä ja valmistettava lopullista liuosta vain 100 ml.

- c) Tuhkaksi poltto on suoritettava suljetussa uunissa ilmaa tai happea lisäämättä.

- d) Pyrometrin osoittama lämpötila ei saa olla yli 475:tä °C.

5.1.2 Spektrofotometrinen määrittäminen

5.1.2.1 Kalibrointiliuosten valmistaminen

Kutakin määritettävää alkuainetta varten valmistetaan 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 ja 3.1.10 kohdassa mainituista käyttöstandardiliuoksista sarja standardiliuoksia siten, että kunkin standardiliuoksen HCl-konsentraatio on noin 0,5 mol/l ja lantaanikloridikonsentraatio sellainen, joka vastaa 0,1 %:a (w/v) lantaania.

Valittujen hivenainekonsentraatioiden on oltava käytetyn spektrofotometrin herkkyysalueella. Seuraavissa taulukoissa annetaan esimerkiksi erilaisia standardiliuoskoostumuksia; käytetyn spektrofotometrin tyyppistä ja herkkyystä riippuen voi kuitenkin olla tarpeen valita muita pitoisuuksia.

▼B**Rauta**

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

+ 10 ml lantaanikloridiliuosta (3.11) ja täytetään 100 ml:ksi vedellä

Kupari

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

Mangaani

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

+ 10 ml lantaanikloridiliuosta (3.11) ja täytetään 100 ml:ksi vedellä

Sinkki

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

+ 10 ml lantaanikloridiliuosta (3.11) ja täytetään 100 ml:ksi vedellä

5.1.2.2 Liuoksen valmistaminen määrittystä varten

Kuparin määrittystä varten voidaan 5.1.1 kohdassa valmistettua liuosta käyttää yleensä suoraan. Tarvittaessa sen pitoisuus tuodaan kalibrointiliuosten alueelle, tästä otettu erä voidaan pipetoida 100 ml:n mittapulloon ja täyttää merkkiin asti kloorivetyhapolla, 0,5 mol/l (3.3).

Raudan, mangaanin ja sinkin määrittystä varten pipetoidaan erä 5.1.1 kohdassa valmistettua liuosta 100 ml:n mittapulloon, lisätään 10 ml lantaanikloridiliuosta (3.11) ja täytetään merkkiin asti kloorivetyhapolla, 0,5 mol/l (3.3.) (ks. myös 8 kohdan huomautus).

5.1.2.3 Nollakoe

Nollakoe suoritetaan samalla tavalla mutta ilman määritettävää näytettä. Standardiliuosta '0' ei saa käyttää nollanäytteenä.

5.1.2.4 Atomiabsorptiomittaus

Standardiliuosten ja määritettävän liuoksen atomiabsorptio mitataan hapeuttavalla ilma-asetyleenilikillä seuraavilla aallonpituuksilla:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

▼B

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Kukin mittaus suoritetaan neljä kertaa.

5.2 *Kivennäisrehut*

Jos näyte ei sisällä orgaanista ainetta, sitä ei ole tarpeen polttaa tuhaksi. Suoritusta jatketaan 5.1.1.1 kohdan toisesta kappaleesta. Haihdutus fluorivetyhapolla voidaan jättää pois.

6. **Tulosten laskeminen**

Määritettävässä liuoksessa oleva hivenainepitoisuus lasketaan kalibrointikäyrältä ja tulos ilmoitetaan milligrammoina hivenainetta kilogrammassa näytettä (ppm).

7. **Toistettavuus**

Samasta näytteestä saman henkilön tekemän kahden rinnakkaismäärittäyksen tulosten välinen ero ei saa olla yli:

- 5:tä mg/kg, absoluuttisena arvona, kun hivenainepitoisuus on enintään 50 mg/kg,
- 10 %:a, suurempaan arvoon verrattuna, kun hivenainepitoisuus on 50–100 mg/kg,
- 10:tä mg/kg, absoluuttisena arvona, kun hivenainepitoisuus on 100–200 mg/kg,
- 5 %:a, suurempaan arvoon verrattuna, kun hivenainepitoisuus on yli 200 mg/kg.

8. **Huomautus**

Suuret fosfaattimäärät voivat häiritä raudan, mangaanin ja sinkin määrittäystä. Tällainen häiriö on korjattava lantaanikloridiliuosta (3.11) lisäämällä. Jos näytteessä painosuhte $\text{Ca} + \text{Mg} / \text{P}$ on > 2 , voidaan lantaanikloridiliuoksen (3.11) lisäys määritettävään liuokseen ja standardiliuoksiin jättää pois.

D. HALOFUGINONIN MÄÄRITTÄMINEN

DL-trans-7-bromi-6-kloori-3-[3-(3-hydroksi-2-piperidyli)asetonyyli]-kinatsoliini-4-(3H)-oni-hydrobromidi

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen halofuginonipitoisuus. Määrittämisraja on 1 mg/kg.

2. **Periaate**

Näytettä käsitellään kuumalla vedellä ja halofuginoni uutetaan tämän jälkeen vapaana emäksenä etyyliasetaattiin ja erotetaan hydrokloridina happamaan vesiliuokseen. Uute puhdistetaan ioninvaihtokromatografialla. Halofuginonipitoisuus määritetään suuren erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektorilla käyttäen.

3. **Reagenssit**

- 3.1 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.
- 3.2 Amberlite XAD-2 -hartsi.
- 3.3 Ammoniumasetaatti.
- 3.4 Etyyliasetaatti.
- 3.5 Jäätikka.

▼B

3.6 Halofuginonistandardi (DL-trans-7-bromi-6-kloori-3-[3-hydroksi-2-piperidyyli]asetonyyli]-kinatsoliini-4-(3H)-onihydrobromidi, E 764).

3.6.1 Halofuginonistandardin kantaliuos, 100 µg/ml

Mitataan 500 ml:n mittapulloon 50 mg (0,1 mg:n tarkkuudella) halofuginonia (3.6), liuotetaan ammoniumasetatipuskuriliuokseen (3.18), täytetään merkkiin asti puskuriliuoksella ja sekoitetaan. Tämä liuos säilyy 5 °C:ssa kolmen viikon ajan, jos sitä säilytetään valolta suojattuna.

3.6.2 Kalibrointiliuokset

Mitataan sarjaan 100 ml:n mittapulloja 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 6,0 ml standardikantaliuosta (3.6.1). Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.21) ja sekoitetaan. Näiden liuosten halofuginonipitoisuudet ovat 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 6,0 µg/ml. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.7 Kloorivetyhappo (ρ_{20} noin 1,16 g/ml)

3.8 Metanoli

3.9 Hopeanitraatti.

3.10 Natriumaskorbaatti.

3.11 Natriumkarbonaatti.

3.12 Natriumkloridi.

3.13 EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo, dinatriumsuola).

3.14 Vesi, HPLC-laatua vastaava.

3.15 Natriumkarbonaattiliuos, $c = 10$ g/100 ml.

3.16 Natriumkloridilla kyllästetty natriumkarbonaattiliuos, $c = 5$ g/100 ml.

Liuotetaan 50 g natriumkarbonaattia (3.11) veteen, täytetään 1 litraksi ja lisäään natriumkloridia (3.12), kunnes liuos on kyllästetty.

3.17 Kloorivetyhappo: noin 0,1 mol/l.

Laimennetaan 10 ml kloorivetyhappoa (3.7) vedellä 1 litraksi.

3.18 Ammoniumasetatipuskuriliuos, noin 0,25 mol/l.

Liuotetaan 19,3 g ammoniumasetattia (3.3) ja 30 ml etikkahappoa (3.5) veteen (3.14) ja laimennetaan 1 litraksi.

3.19 Amberlite XAD-2 -hartsin valmistaminen.

Pestään sopivaa määrää Amberlitea (3.2) vedellä, kunnes pesuun käytetyssä vesifaasissa hopeanitraatilla (3.20) tehtävä koe osoittaa, että kloridi-ioneita ei enää ole. Tämän jälkeen hartsi pestään 50 ml:lla metanolia (3.8), tämä metanoli heitetään pois ja hartsia säilytetään puhtaassa metanolissa.

3.20 Hopeanitraattiliuos, noin 0,1 mol/l.

Liuotetaan 0,17 g hopeanitraattia (3.9) 10 ml:aan vettä.

3.21 HPLC:n liikkuva faasi.

Sekoitetaan 500 ml asetonitriiliä (3.1) 300 ml:aan ammoniumasetatipuskuriliuosta (3.18) ja 1 200 ml:aan vettä (3.14). Säädetään pH arvoon 4,3 etikkahapolla (3.5). Suodatetaan 0,22 µm:n suodattimen (4.8) läpi ja poistetaan kaasut liuoksesta (esimerkiksi 10 minuutin ultraäänikäsittelyllä). Tämä liuos säilyy yhden kuukauden ajan, jos sitä säilytetään suljetussa astiassa valolta suojattuna.

▼ B**4. Välineistö**

- 4.1 Ultraäänihaude.
- 4.2 Pyörivä kalvohaihdutin.
- 4.3 Sentrifugi.
- 4.4 HPLC-laitteisto, jossa on vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetektori.
- 4.4.1 Nestekromatografiakolonni, 300 mm × 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava kolonni.
- 4.5 Lasikolonni (300 mm × 10 mm), joka on varustettu lasisintterisuodattimella ja hanalla.
- 4.6 Lasikuitusuodattimia, halkaisija 150 mm.
- 4.7 Kalvosuodattimia, 0,45 µm.
- 4.8 Kalvosuodattimia, 0,22 µm.

5. Menettely

Huomautus: Vapaana emäksenä halofuginoni on epästabiili alkalisisä liuoksissa ja etyyliasetaattiliuoksissa. Se ei saa olla etyyliasetaatissa yli 30 minuuttia.

5.1 Yleistä

- 5.1.1 Nollanäyte on analysoitava, jotta varmistetaan, ettei se sisällä halofuginonia tai mittausta häiritseviä aineita.
- 5.1.2 Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on tehty näytteen halofuginonipitoisuutta vastaava halofuginonilisäys. Pitoisuuden 3 mg/kg aikaan saamiseksi lisätään 300 µl standardikantaliuosta (3.6.1) 10 grammaan nollarehua, sekoitetaan ja annetaan seistä 10 minuuttia ennen uutamista (5.2).

Huomautus: Tätä menetelmää käytettäessä nollarehun on vastattava koostumukseltaan näytettä, ja halofuginonia ei saa havaita määrittäksessä.

5.2 Utto

Punnitaan 0,1 gramman tarkkuudella 10 g valmistettua näytettä 200 ml:n sentrifugiputkeen, lisätään 0,5 g natriumaskorbaattia (3.10), 0,5 g EDTA:a (3.13) ja 20 ml vettä; sekoitetaan. Asetetaan putki vesihauteeseen (80 °C) 5 minuutiksi. Annetaan jäähtyä huoneen lämpötilaan, jonka jälkeen lisätään 20 ml natriumkarbonaattiliuosta (3.15) ja sekoitetaan. Lisätään viipymättä 100 ml etyyliasetaattia (3.4) ja ravistellaan käsin voimakkaasti 15 sekunnin ajan. Tämän jälkeen putki sijoitetaan kolmeksi minuutiksi ultraäänihauteeseen (4.1) ja korkkia höllennetään. Sentrifugoidaan 2 minuuttia ja dekantoidaan etyyliasetaattifaasi lasikuitusuodattimen (4.6) läpi 500 ml:n erotussuppiloon. Toistetaan näytteen utto toisella 100 ml:n etyyliasetaattiannoksella. Pestään yhdistettyjä uutteen 1 minuutin ajan 50 ml:lla natriumkloridilla kyllästettyä natriumkarbonaattiliuosta (3.16) ja poistetaan vesifaasi.

Uutetaan orgaanista kerrosta 50 ml:lla kloorivetyhappoa (3.17) 1 minuutin ajan. Juoksutetaan alempi happokerros 250 ml:n erotussuppiloon. Uutetaan orgaanista kerrosta vielä 50 ml:lla kloorivetyhappoa 1,5 minuutin ajan ja yhdistetään uutteen. Pestään yhdistetyt happouutteen heiluttamalla niitä noin 10 sekunnin ajan 10 ml:n etyyliasetaattimäärän kanssa (3.4).

▼B

Siirretään vesikerros kvantitatiivisesti 250 ml:n pyörökolviin ja heitetään orgaaninen faasi pois. Haihdutetaan pyörivällä kalvohaihduttimella (4.2) kaikki etyyliasetaattijäämät happoliuoksesta. Vesihäuteen lämpötila ei saa olla yli 40:tä °C. Noin 25 mbar:n tyhjöissä etyyliasetaattijäämät poistuvat 5 minuutissa 38 °C:ssa.

5.3 *Puhdistaminen*

5.3.1 *Amberlite-kolonnin valmistaminen*

Kullekin näyteuutteelle valmistetaan XAD-2-kolonne. Siirretään metanolilla (3.8) 10 g esikäsiteltyä Amberlitea (3.19) lasikolonnein (4.5). Lisätään pieni lasivillatuppo hartsikerroksen päälle. Juoksutetaan metanoli kolonnista ja pestään hartsi 100 ml:lla vettä ja pysäytetään virtaus, kun neste yltää hartsikerroksen yläosaan. Annetaan kolonnin stabiloitua 10 minuuttia ennen sen käyttöä. Kolonnin ei saa koskaan antaa kuivua.

5.3.2 *Näytteen puhdistaminen*

Siirretään uute (5.2) kvantitatiivisesti valmistetun Amberlite-kolonnin (5.3.1) yläosaan, eluoidaan ja heitetään eluaatti pois. Eluointinopeus ei saa olla yli 20 ml:aa minuutissa. Huuhdellaan pyörökolvi 20 ml:lla kloorivetyhappoa (3.17) ja käytetään tätä liuosta hartsikolonnin pesemiseen. Poistetaan happoliuosjäämä ilmavirralla. Heitetään pesuliukset pois. Lisätään kolonnein 100 ml metanolia (3.8) ja annetaan eluotua 5–10 ml ja kerätään eluaatti 250 ml:n pyörökolviin. Annetaan jäljelle jääneen metanolin stabiloitua hartsin kanssa 10 minuutin ajan, jatketaan eluointia alle 20 ml minuutissa olevalla nopeudella ja kerätään eluaatti samaan pyörökolviin. Haihdutetaan metanoli pyöröhaihduttimella (4.2) huolehden siitä, että vesihäuteen lämpötila ei ole yli 40 °C. Siirretään jäännös kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon käyttäen liikkuvaa faasia (3.21). Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla ja sekoitetaan. Suodatetaan näyte kalvosuodattimen (4.7) läpi. Säilytetään tämä liuos HPLC-määrittystä (5.4) varten.

5.4 *HPLC-määrittäminen*

5.4.1 *Muuttujat*

Seuraavat edellytykset ovat ohjeellisia; muita määrittäolosuhteita voidaan käyttää sillä edellytyksellä, että niillä saadaan vastaavat tulokset.

Nestekromatografiakolonne (4.4.1)

HPLC:n liikkuva faasi (3.21)

Virtausnopeus: 1,5–2 ml/min

Detektioaallonpituus: 243 nm

Injektiotilavuus: 40–100 µl.

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus on tarkistettava injektioimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.6.2), jonka pitoisuus on 3,0 µg/ml, kunnes piikkien korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat eivät muutu.

5.4.2 *Kalibrointikäyrä*

Injektoidaan jokaista kalibrointiliuosta (3.6.2) useita kertoja ja mitataan piikkien korkeudet (pinta-alat) jokaiselle pitoisuudelle. Kalibrointikäyrä piirretään siten, että y-akselilla ovat kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot (µg/ml).

▼B**5.4.3 Näyteliuos**

Injektoidaan useita kertoja näyteutetta (5.3.2) käyttäen samaa tilavuutta kuin kalibrointiliuksille ja määritetään halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Määritetään näyteliuoksen pitoisuus (µg/ml) näyteliuoksen halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibroitikäyrän (5.4.2) avulla.

Näytteessä olevan halofuginonin määrä w (mg/kg) lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

c = näyteliuoksen halofuginonipitoisuus, µg/ml,

m = näyte-erän paino grammoina.

7. Tulosten validointi**7.1 Tunnistaminen**

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmistaa yhteiskromatografi-alla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla voidaan verrata näyteutteen ja halofuginonia 6,0 µg/ml sisältävän kalibrointiliuoksen (3.6.2) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteutteeeseen lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.6.2). Lisätyn halofuginonimäärän on vastattava näyteutteesta todetun halofuginonin arvioitua määrää.

Ainoastaan halofuginonipiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä halofuginonia että näyteliuoksen laimeneminen. Piikin puolivälissä sen leveyden on oltava ± 10 % lähtöleveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- a) näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorptioaallonpituuksien on kromatogrammin piikin huipun kohdalla mitattuna oltava samat il-maisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Dio-dirivimäärityksessä se on yleensä ± 2 nm;
- b) välillä 225–300 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajetut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden kahden spektrin välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 % standardina olevan tutkittavan aineen absorbanssista;
- c) välillä 225–300 nm näyteliuoksesta ajetut spektrit piikin nousun, hui-pun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa kohdissa spektrien välinen poikkeama ei ole suurempi kuin 15 % huipun spektrin absorbanssista.

▼B

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä ei saa olla yli 0,5 mg/kg, kun halofuginipitoisuudet ovat enintään 3 mg/kg.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 80 %.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Laboratorioiden välisessä tutkimuksessa ⁽¹⁾ analysoitiin kolme näytettä kahdeksassa laboratoriossa.

Tulokset

	Näyte A (nollanäyte) vastaanotet- taessa	Näyte B (jauhona)		Näyte C (rakeina)	
		Vastaanotet- taessa	2 kuukauden kuluttua	Vastaanotet- taessa	2 kuukauden kuluttua
Keskiarvo [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
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = ei havaittu

S_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %

Rec. = saanto (%).

E. ROBENIDIININ MÄÄRITTÄMINEN

1,3-bis[(4-kloori-bentsylideeni)amino]guanidiinihydrokloridi

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää robenidiinin pitoisuus rehuissa. Määrittäysraja on 5 mg/kg.

2. Periaate

Näyte uutetaan happamoidulla metanolilla. Uute kuivataan ja määräosa puhdistetaan alumiinioksidikolonnissa. Robenidiini eluoidaan kolonnista metanolilla, konsentroidaan ja saatetaan sopivaksi tilavuudeksi liikkuvalla faasilla. Robenidiinipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasiestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

3. Reagenssit

3.1 Metanoli.

3.2 Happamoitu metanoli.

Siirretään 4,0 ml kloorivetyhappoa ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) 500 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, s. 1 252–1 256.

▼B

- 3.3 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.
- 3.4 Molekyyliseula.
- Tyyppiä 3A, 8–12 meshin helmiä (1,6–2,5 mm:n helmiä, kiteistä alumiinisilikaattia, huokosten halkaisija 0,3 mm).
- 3.5 Alumiinioksidi, hapan, aktiviteettiluokka I pylväskromatografiaa varten.
- Siirretään 100 grammaa alumiinioksidia sopivaan astiaan ja lisätään 2,0 ml vettä. Suljetaan ja ravistellaan noin 20 minuutin ajan. Säilytetään hyvin suljetussa astiassa.
- 3.6 Kaliumdivetyfosfaattiliuos, $c = 0,025$ mol/l.
- Liuotetaan 3,40 g kaliumdivetyfosfaattia veteen (HPLC-laatua) 1 000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti ja sekoitetaan.
- 3.7 Dinatriumvetyfosfaattiliuos, $c = 0,025$ mol/l.
- Liuotetaan 3,55 g vedetöntä (tai 4,45 g dihydraattia tai 8,95 g dodekahydraattia) dinatriumvetyfosfaattia veteen (HPLC-laatua vastaava) litran mittapullossa, täytetään merkkiin asti ja sekoitetaan.
- 3.8 HPLC:n liikkuva faasi.
- Sekoitetaan seuraavat reagenssit:
- 650 ml asetonitriiliä (3.3),
- 250 ml vettä (HPLC-laatua vastaava),
- 50 ml kaliumdivetyfosfaattiliuosta (3.6),
- 50 ml dinatriumvetyfosfaattiliuosta (3.7).
- Suodatetaan 0,22 μm :n suodattimen (4.6) läpi ja poistetaan kaasut liuoksesta (esimerkiksi 10 minuutin ultraäänikäsittelyllä).
- 3.9 Standardiyhdiste.
- Puhdas robenidiini: 1,3-bis[(4-klooribentsylideeni)amino]guanidiinihydrokloridi.
- 3.9.1 Robenidiinistandardin kantaliuos: 300 $\mu\text{g/ml}$
- Punnitaan 30 mg 0,1 mg:n tarkkuudella robenidiinin standardiyhdistettä (3.9). Liuotetaan happamoituun metanoliin (3.2) 100 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti samalla liuottimella ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään valolta suojattuna.
- 3.9.2 Robenidiinistandardin välimuotoliuos: 12 $\mu\text{g/ml}$
- Siirretään 10,0 ml standardikantaliuosta (3.9.1) 250 ml:n pulloon, täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.8) ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään valolta suojattuna.
- 3.9.3 Kalibrointiliuokset
- Siirretään sarjassa 50 ml:n mittapulloihin 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ja 25,0 ml standardin välimuotoliuosta (3.9.2). Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.8) ja sekoitetaan. Näiden liuosten robenidiinipitoisuudet ovat vastaavasti 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 ja 6,0 $\mu\text{g/ml}$. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.
- 3.10 Vesi, HPLC-laatua vastaava.

▼B**4. Välineistö****4.1 Lasikolonne.**

Valmistettu ruskeasta lasista, varustettu hanalla ja säiliöllä, jonka tilavuus on noin 150 ml, sisähalkaisija 10–15 mm, pituus 250 mm.

4.2 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.**4.3 Pyörivä kalvohaihdutin.****4.4 Vaihtuva-aallonpituuksinen HPLC-laitteisto tai diodirividetektor, detektioaallonpituusalue 250–400 nm.****4.4.1 Nestekromatografiakolonne: 300 mm × 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava****4.5 Lasikuitusuodatinpaperia (Whatman GF/A tai vastaava).****4.6 Kalvosuodattimia, 0,22 µm.****4.7 Kalvosuodattimia, 0,45 µm.****5. Menettely**

Huomautus: Robenidiini on herkkä valolle. Kaikissa toiminnoissa on käytettävä ruskeaa lasia.

5.1 Yleistä**5.1.1 Nollanäyte on analysoitava, jotta varmistetaan, ettei se sisällä robenidiinia tai mittausta häiritseviä aineita.****5.1.2 Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte (5.1.1), johon on lisätty näytteen robenidiinipitoisuutta vastaava määrä robenidiinia. Pitoisuuden 60 mg/kg aikaan saamiseksi siirretään 3,0 ml standardikantaliuosta (3.9.1) 250 ml:n erlenmeyerkolviin. Liuos haihdutetaan noin 0,5 ml:ksi typpivirrassa. Lisätään 15 g nollarehua, sekoitetaan ja odotetaan 10 minuuttia ennen siirtymistä uuttovaiheeseen (5.2).**

Huomautus: Tätä menetelmää käytettäessä nollarehun on vastattava tyyppiltään näytettä, ja robenidiinia ei saa havaita määrittämisessä.

5.2 Uutto

Punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella noin 15 g valmistettua näytettä. Siirretään 250 ml:n erlenmeyerkolviin ja lisätään 100,0 ml happamoitua metanolia (3.2), suljetaan astia ja ravistellaan tunnin ajan ravistelijalla (4.2). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatinpaperin (4.5) läpi ja koko suodos kerätään talteen 150 ml:n erlenmeyerkolviin. Lisätään 7,5 g molekyyli-seulua (3.4), suljetaan astia ja ravistellaan viisi minuuttia. Suodatetaan välittömästi lasikuitusuodatinpaperin läpi. Tämä liuos säilytetään puhdistusta (5.3) varten.

5.3 Puhdistus**5.3.1 Alumiinioksidikolonnin valmistaminen**

Lasikolonnin (4.1) alapäähän laitetaan pieni tuppola lasivillaa ja tiivistetään se lasisauvaa käyttäen. Punnitaan 11,0 g valmistettua alumiinioksidia (3.5) ja siirretään kolonniin. Tässä vaiheessa on pidettävä huolta siitä, että altistuminen ilmalle on mahdollisimman vähäistä. Taputellaan täytetyn kolonnin alapäätä kevyesti, jotta alumiinioksidi tiivistyy sopivasti.

▼B**5.3.2 Näytteen puhdistus**

Pipetoidaan kolonniin 5,0 ml valmistettua näyteuutetta (5.2). Annetaan pipetin kärjen levätä kolonnin seinää vasten ja liuoksen absorboitua alumiinioksiidiin. Eluoidaan robenidiini kolonnista 100 ml:lla metanolia (3.1) virtausnopeudella 2–3 ml/min ja kerätään eluaatti 250 ml:n pyörökolviin. Haihdutetaan metanoliliuos kuiviin alipaineessa pyöröhaihduttimessa (4.3) lämpötilan ollessa 40 °C. Liuotetaan jäännös uudelleen 3–4 ml:aan liikkuvaa faasia (3.8) ja siirretään kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon. Huuhdellaan pullo usealla 1–2 ml:n annoksella liikkuvaa faasia ja siirretään nämä huuhteluliukset mittapulloon. Täytetään merkkiin asti samalla liuottimella ja sekoitetaan. Suodatetaan näyte 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.7) läpi. Tämä liuos säilytetään HPLC-määrittystä (5.4) varten.

5.4 HPLC-määrittäminen**5.4.1 Muuttujat**

Seuraavat olosuhteet ovat ohjeellisia, ja myös muita olosuhteita voidaan käyttää, jos niillä saadaan vastaavat tulokset:

Nestekromatografiakolonne (4.4.1)

HPLC:n liikkuva faasi (3.8)

Virtausnopeus: 1,5–2 ml/min

Detektioaallonpituus: 317 nm

Injektioalavuus: 20–50 µl.

Kromatografisen järjestelmän stabiilisuus tarkastetaan injektioimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.9.3), jonka pitoisuus on 3,6 µg/ml, kunnes saadaan piikkejä, joiden korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.4.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan useita kertoja kutakin kalibrointiliuosta (3.9.3) ja mitataan kunkin pitoisuuden piikkien korkeudet (pinta-alat). Kalibrointikäyrä piirretään siten, että y-akselilla ovat kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot µg/ml.

5.4.3 Näyteliuos

Injektoidaan useita kertoja näyteuutetta (5.3.2) käyttäen samaa määrää kuin kalibrointiliuksille, ja määritetään robenidiinipiikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen robenidiinipitoisuus µg/ml lasketaan robenidiinipiikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.4.2) avulla.

Näytteen robenidiinipitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

c = näyteliuoksen robenidiinipitoisuus, µg/ml,

m = näyte-erän paino grammoina.

▼B**7. Tulosten validointi****7.1 Tunnistaminen**

Määritettävän aineen tunnistaminen voidaan varmistaa yhteiskromatografialla tai diodirividetektorilla, joka mahdollistaa näyteuutteen ja 6 µg/ml robenidiinia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.6.3) spektrien vertailun.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.9.3). Lisätyn robenidiinin määrän on vastattava näyteuutteesta olevan robenidiinin arvioitua määrää.

Ainoastaan robenidiinihiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimeneminen. Hiikin leveyden, sen puolikorkeudella, on oltava noin 10 % sen alkuperäisestä leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimäärittäminen

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- a) kromatogrammin hiikin huipun kohdalla näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorptioaallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorimäärittämisessä tämä on yleensä noin ± 2 nm;
- b) välillä 250–400 nm kromatogrammin hiikin huipun kohdalla ajettujen näyte- ja standardispektrit eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden kahden spektrin välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 % standardina olevan tutkittavan aineen absorbanssista;
- c) välillä 250–400 nm näyteliuksesta ajettujen spektrien hiikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa kohdissa spektrien välinen poikkeama ei ole suurempi kuin 15 % huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaisen, samasta näytteestä tehdyn määrittäksen tulosten välinen ero ei saa olla suurempi kuin 10 % suuremmasta tuloksesta, kun robenidiinipitoisuus on yli 15 mg/kg.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 85 %.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Euroopan yhteisön laboratorioiden välisessä tarkastelussa 12 laboratoriota määritteli neljä jauhon tai rakeiden muodossa olevaa kani- ja siipikarjarehunäytettä. Kukin näyte määritettiin kaksi kertaa. Tulokset esitetään alla olevassa taulukossa:

▼B

	Siipikarja		Kani	
	Jauho	Rakeet	Jauho	Rakeet
Keskiarvo [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
Saanto [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = toistettavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

S_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

F. DIKLATSURIILIN MÄÄRITYS

(+)-4-kloorifenyli-[2,6-dikloori-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triatsin-2-yyli)fenyli]asetonitriili

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää diklatsuriilin pitoisuus rehuissa ja esiseoksissa. Toteamisraja on 0,1 mg/kg ja määritysraja 0,5 mg/kg.

2. Periaate

Sisäisen standardin lisäyksen jälkeen näyte uutetaan happamoidulla metanolilla. Osa rehunäytteen uutteesta puhdistetaan C₁₈-kiinteäfaasiuuttopylväällä. Diklatsuriili eluoidaan pylvästä happamoidun metanolin ja veden seoksella. Haihdutuksen jälkeen jäännös liuotetaan DMF-vesiseokseen. Esiseoksista saadut uutteet haihdutetaan ja jäännös liuotetaan DMF-vesiseokseen. Diklatsuriilipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (RP-HPLC) käyttäen ternaarigradienttia ja UV-detektoria.

3. Reagenssit

- 3.1 Vesi, HPLC-laatua vastaava.
- 3.2 Ammoniumasetaatti.
- 3.3 Tetrabutyyliammoniumvetysulfaatti (TBHS).
- 3.4 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.
- 3.5 Metanoli, HPLC-laatua vastaava.
- 3.6 N, N-dimetyyliformamidi (DMF).
- 3.7 Kloorivetyhappo, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8 Standardiyhdiste: diklatsuriili II-24: (+)-4-kloorifenyli-[2,6-dikloori-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triatsin-2-yyli)-fenyyli]asetonitriili, jonka puhtaus on taattu, E 771.
- 3.8.1 Diklatsuriilistandardin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella noin 25 mg diklatsuriilistandardia (3.8) 50 ml:n mittapulloon. Liuotetaan DMF:ään (3.6), täytetään merkkiin asti DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo käännetään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

▼B**3.8.2 Diklatsuriilistandardin kantaliuos, 50 µg/ml**

Pipetoidaan 5,00 ml standardin kantaliuosta (3.8.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo kääritytään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

**3.9 Sisäinen standardi: 2,6-dikloori- α -(4-kloorifenyli)-4-(4,5-dihydro-3,5-dio-
kso-1,2,4-triatsin-2-(3H)-yyli)- α -metyylibentseeniasetonitriili.****3.9.1 Sisäisen standardin kantaliuos, 500 µg/ml**

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella noin 25 mg sisäistä standardia (3.9) 50 ml:n mittapulloon. Liuotetaan DMF:ään (3.6), täytetään merkkiin asti DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo kääritytään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.9.2 Sisäisen standardin kantaliuos, 50 µg/ml

Pipetoidaan 5,00 ml sisäisen standardin kantaliuosta (3.9.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo kääritytään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.9.3 Sisäinen standardiliuos esiseoksille, p/1000 mg/ml

(p = diklatsuriilin nimellispitoisuus esiseoksessa, mg/kg)

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 10 mg sisäistä standardia 100 ml:n mittapulloon, liuotetaan DMF:ään (3.6) ultraäänihäuteessa (4.6), täytetään merkkiin asti DMF:llä ja sekoitetaan. Pullo kääritytään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.10 Kalibrintiliuos, 2 µg/ml.

Pipetoidaan 2,00 ml diklatsuriilin standardiliuosta (3.8.2) ja 2,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2) 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 16 ml DMF:ää (3.6), täytetään merkkiin asti vedellä ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.11 C₁₈-kiinteäfaasiuuttopylväs, esim. Bond Elut, 1 ml, sorbentin paino: 100 mg.**3.12 Uuttoliuos: happamoitu metanoli.**

Pipetoidaan 5,0 ml suolahappoa (3.7) 1 000 ml:aan metanolia (3.5) ja sekoitetaan.

3.13 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi.**3.13.1 Eluentti A: ammoniumasetaatti-tetrabutyyliammoniumvetysulfaattiliuos.**

Liuotetaan 5 g ammoniumasetaattia (3.2) ja 3,4 g TBHS:ää (3.3) 1 000 ml:aan vettä (3.1) ja sekoitetaan.

3.13.2 Eluentti B: asetonitriili (3.4).**3.13.3 Eluentti C: metanoli (3.5).**

▼ B**4. Välineistö**

- 4.1 Mekaaninen ravistelijä.
- 4.2 Ternaarigradientti HPLC -laitteisto.
- 4.2.1 Nestekromatografiakolonne, 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, hiukkas-koko 3 µm, tai vastaava.
- 4.2.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetkatori.
- 4.3 Pyörivä kalvohaihdutin.
- 4.4 Kalvosuodatin, 0,45 µm.
- 4.5 Tyhjiösuodatuslaite.
- 4.6 Ultraäänihaude.

5. Menettely**5.1 Yleistä****5.1.1 Nollarehu**

Nollanäyte on analysoitava, jotta varmistetaan, ettei se sisällä diklatsuriilia tai mittausta häiritseviä aineita. Nollanäytteen on oltava näytteen kaltainen, eikä siinä saa olla havaittavia määriä diklatsuriilia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe

Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on lisätty näytteen diklatsuriilipitoisuutta vastaava määrä diklatsuriilia. Jotta saadaan konsentraatio, joka vastaa arvoa 1 mg/kg diklatsuriilia, siirretään 0,1 ml standardin kantaliuosta (3.8.1) 50 grammaan nollanäytettä, sekoitetaan perusteellisesti ja annetaan tasoittua 10 minuuttia sekoittaen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (katso 5.1.1), voidaan saantokoe suorittaa vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään suunnilleen näytteiden jo sisältämä määrä diklatsuriilia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto**5.2.1 Rehu**

Punnitaan noin 50 g näytettä 0,01 gramman tarkkuudella. Siirretään 500 ml:n erlenmeyerkolviin, lisätään 1,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2), 200 ml uuttoliuosta (3.12) ja suljetaan kolvi tulpalla. Seosta ravistellaan ravistelijalla (4.1) yli yön. Annetaan laskeutua 10 minuuttia. Siirretään 20 ml supernatantista sopivaan lasiastiaan ja laimennetaan 20 ml:lla vettä. Siirretään liuos uuttohylsyyn (3.11) ja imetään liuos sen läpi vakuumilla (4.5). Pestään hylsy 25 ml:lla uuttoliuoksen (3.12) ja veden seosta, 65 + 35 (V + V). Kerätyt fraktiot heitetään pois ja määritettävät aineet eluoidaan 25 ml:lla uuttoliuoksen (3.12) ja veden seosta, 80 + 20 (V + V). Tämä fraktio haihdutetaan pyöröhaihduttimella (4.3) 60 °C:ssa niin, että se on juuri ja juuri kuivunut. Jäännös liuotetaan 1,0 ml:aan DMF:ää (3.6), lisätään 1,5 ml vettä (3.1) ja sekoitetaan. Suodatetaan kalvosuodattimella (4.4). Tehdään HPLC-määritys (5.3).

5.2.2 Esiseokset

Punnitaan noin 1 g näytettä 0,001 gramman tarkkuudella. Siirretään 500 ml:n erlenmeyerkolviin, lisätään 1,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.3), 200 ml uuttoliuosta (3.12) ja suljetaan kolvi tulpalla. Seosta ravistellaan

▼B

yli yön ravistelijalla (4.1). Annetaan laskeutua 10 minuuttia. Siirretään 10 000/p ml:n (p = diklatsuriilin nimellispitoisuus esiseoksessa mg/kg) erä supernatanttia sopivankokoiseen keittokolviin. Haihdutetaan alipaineessa pyöröhaihduksella (4.3) 60 °C:ssa niin, että se on juuri ja juuri kuivunut. Jäännös liuotetaan uudelleen 10,0 ml:aan DMF:ää (3.6), lisätään 15,0 ml vettä (3.1) ja sekoitetaan. Tehdään HPLC-määritys (5.3).

5.3 HPLC-määritys

5.3.1 Muuttujat

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia ja niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaiset tulokset.

Nestekromatografiakoloni (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, hiukkaskoko 3 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi:	Eluentti A (3.13.1): ammoniumasetatin ja tetrabutyyliammoniumvetysulfaatin vesiliuos Eluentti B (3.13.2): asetonitrili Eluentti C (3.13.3): metanoli
Eluointi:	— lineaarinen gradientti — alku: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — 10 min kuluttua gradienttieluointi 30 minuutissa: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Huuhdotaan B:llä 10 min.
Virtausnopeus:	1,5–2 ml/min
Injektoitava määrä:	20 µl
Detektioaallonpituus:	280 nm

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektioimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.10), jonka konsentraatio on 2 µl/ml, kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat ovat vakiot.

5.3.2 Kalibrointiliuos

Injektoidaan 20 µl kalibrointiliuosta (3.10) useita kertoja ja määritetään diklatsuriilin ja sisäisen standardin piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot.

5.3.3 Näyteliuos

Injektoidaan 20 µl näyteliuosta (5.2.1 tai 5.2.2) useita kertoja ja määritetään diklatsuriilin ja sisäisen standardin piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot.

6. Tulosten laskeminen

6.1 Rehut

Näytteen diklatsuriilipitoisuus w (mg/kg) saadaan seuraavasta kaavasta:

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

▼B

jossa:

$h_{d,s}$ = näyteliuoksen (5.2.1) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala),
 $h_{i,s}$ = näyteliuoksen (5.2.1) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala),
 $h_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala),
 $h_{i,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala),
 $c_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilipitoisuus, µg/ml,
 m = näyte-erän paino (g),
 V = 5.2.1 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus (2,5 ml).

6.2 Esiseokset

Näytteen diklatsuriilipitoisuus w (mg/kg) saadaan seuraavasta kaavasta:

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

jossa:

$h_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala),
 $h_{i,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala),
 $h_{d,s}$ = näyteliuoksen (5.2.2) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala),
 $h_{i,s}$ = näyteliuoksen (5.2.2) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala),
 $c_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilipitoisuus, µg/ml,
 m = näyte-erän paino (g),
 V = 5.2.2 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus (25 ml),
 p = diklatsuriilin nimellispitoisuus esiseoksessa, mg/kg.

7. Tulosten validointi

7.1 Tunnistaminen

Analyytin tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla verrataan näyteuutteen (5.2.1 tai 5.2.2) ja kalibrointiliuoksen (3.10) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen (5.2.1 tai 5.2.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.10). Lisätyn diklatsuriilin määrän on oltava samaa suuruusluokkaa kuin näytteessä todettu diklatsuriilin määrä.

Ainoastaan diklatsuriilin ja sisäisen standardin piikit saavat kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimentaminen. Piikin leveys puolivälissä piikin korkeutta on oltava $\pm 10 \%$ sellaisen näyteuutteen alkuperäisen diklatsuriilipiikin tai sisäisen standardin piikin leveydestä, johon ei ole tehty lisäystä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- Kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti $\pm 2 \text{ nm}$.

▼B

- b) Välillä 230–320 nm kromatogrammin piikkien huipun kohdalla ajetus näyte- ja standardispektrit eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % standardianalyysin absorbanssista.
- c) Välillä 230–320 nm näyteuutteesta ajetus spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % piikin huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärityksen välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin

- 30 % suuremmasta rinnakaistuloksesta, kun diklatsuriilipitoisuus on 0,5–2,5 mg/kg
- 0,75 mg/kg, kun diklatsuriilipitoisuus on 2,5–5 mg/kg
- 15 % suuremmasta rinnakaistuloksesta, kun diklatsuriilipitoisuus on yli 5 mg/kg.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty mitattavaa ainetta, on oltava vähintään 80 %.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Laboratorioiden välisessä tutkimuksessa analysoitiin viisi näytettä 11 laboratoriossa. Näytteistä kaksi oli esiseoksia. Toiseen sekoitettiin orgaanista materiaalia (O 100) ja toiseen epäorgaanista materiaalia (A 100). Teoreettinen pitoisuus on 100 mg diklatsuriilia kilogrammassa. Näitä kolmea siipikarjan rehuseosta valmisti kolme eri valmistajaa (L1/Z1/K1) (NL). Teoreettinen pitoisuus on 1 mg diklatsuriilia kilogrammassa. Laboratorioita pyydettiin analysoimaan kukin näyte kerran tai kaksoismäärityksinä. (Tarkempia tietoja tästä laboratorioiden välisestä tutkimuksesta saa julkaisusta *Journal of AOAC International*, Volume 77, n:o 6, 1994, s. 1 359–1 361.) Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

	Näyte 1 A 100	Näyte 2 O 100	Näyte 3 L1	Näyte 4 Z1	Näyte 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Keskiarvo	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nimellispitoisuus mg/kg)	100	100	1	1	1

L = laboratorioiden lukumäärä

n = yksittäisten arvojen lukumäärä

S_r = toistettavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin

▼B

S_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.

9. **Huomautukset**

Diklatsuriilivasteen lineaarisuus on osoitettava etukäteen ao. konsentraatioalueilla.

G. LASALOSID-NATRIUMIN MÄÄRITTÄMINEN

Streptomyces lasaliensis -bakteerin tuottama
polyeetterimonokarboksylihapon natriumsuola

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää lasalosid-natriumin pitoisuus rehuissa ja esiseoksissa. Toteamisraja on 5 mg/kg ja määrittämisraja 10 mg/kg.

2. **Periaate**

Lasalosid-natrium uutetaan näytteestä happamoituun metanoliin ja määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) käyttäen spektrofлуорimetridetektoria.

3. **Reagenssit**

3.1 Kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4).

3.2 Ortofosforihappo, w (w/w) = 85 %.

3.3 Ortofosforihappoliuos, c = 20 %.

Laimennetaan 23,5 ml ortofosforihappoa (3.2) vedellä 100 ml:aan.

3.4 6-metyyli-2-heptyyliamiini (1,5-dimetyyliheksyyliamiini), w (w/w) = 99 %.

3.5 Metanoli, HPLC-laatu vastaava.

3.6 Kloorivetyhappo, tiheys = 1,19 g/ml.

3.7 Fosfaattipuskuriliuos, c = 0,01 mol/l.

Liutetaan 1,36 g kaliumdivetyfosfaattia (3.1) 500 ml:aan vettä (3.11), lisätään 3,5 ml ortofosforihappoa (3.2) ja 10,0 ml 6-metyyli-2-heptyyliamiinia (3.4). Säädetään pH ortofosforihappoliuoksen avulla arvoon 4,0 ja laimennetaan vedellä (3.11) 1 000 ml:aan.

3.8 Happamoitu metanoli.

Pipetoidaan 5,0 ml suolahappoa (3.6) 1 000 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.5) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.9 HPLC:n liikkuva faasi, fosfaattipuskuri-metanolioliuos 5 + 95 (V + V).

Sekoitetaan 5 ml fosfaattipuskuriliuosta (3.7) ja 95 ml metanolia (3.5).

3.10 Lasalosid-natriumstandardi, jonka puhtaus on taattu, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (*Streptomyces lasaliensis* -bakteerin tuottama polyeetterimonokarboksylihapon natriumsuola), E763.

3.10.1 Lasalosid-natriumstandardin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 50 mg lasalosid-natriumia (3.10) 0,1 mg:n tarkkuudella 100 ml:n mittapulloon, liutetaan happamoituun metanoliin (3.8), täytetään merkkiin asti samalla liuottimella ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava välittömästi ennen käyttöä.

▼B**3.10.2 Lasalosiid-natriumstandardin välimuotoliuos, 50 µg/ml**

Pipetoidaan 10,0 ml standardin kantaliuosta (3.10.1) 100 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti happamoidulla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.10.3 Kalibrointiliuokset

Pipetoidaan 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 ml standardin välimuotoliuosta (3.10.2) 50 ml:n mittapulloihin. Täytetään merkkiin asti happamoidulla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan. Nämä liuokset vastaavat konsentraatioita 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 µg/ml lasalosiid-natriumia. Nämä liuokset on valmistettava aina juuri ennen käyttöä.

3.11. Vesi, HPLC-laatua vastaava.**4. Välineistö****4.1 Ultraäänihaude (tai ravisteleva vesihaude), jossa on lämpötilansäätö.****4.2 Kalvosuodattimia, 0,45 µm.****4.3 HPLC-laitteisto, jossa voidaan injektoida 20 µl:n näytteitä.****4.3.1 Nestekromatografiakolonni, 125 mm × 4 mm, käänteisfaasi C₁₈, hiukkaskoko 5 µm, tai vastaava.****4.3.2 Spektrofluorimetri, jossa voidaan säätää eksitaatio- ja emissioaallonpituudet.****5. Menettely****5.1 Yleistä****5.1.1 Nollarehu**

Saantokokeen (5.1.2) suorittamista varten analysoidaan nollanäyte, jotta varmistetaan, ettei se sisällä lasalosiid-natriumia tai mittausta häiritseviä aineita. Nollanäytteen on oltava näytteen kaltainen, eikä siinä saa olla havaittavia määriä lasalosiid-natriumia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe

Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on lisätty näytteen lasalosiid-natriumia vastaava määrä lasalosiid-natriumia. Jotta saadaan liuos, jossa on 100 mg/kg lasalosiid-natriumia vastaava lisäys, siirretään 10,0 ml standardin kantaliuosta (3.10.1) 250 ml:n erlenmeyerkolviiniin ja haihdutetaan noin 0,5 ml:aan. Lisätään 50 g nollanäytettä, sekoitetaan huolellisesti, annetaan tasoittua 10 minuuttia sekoittaen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (katso 5.1.1), voidaan saantokoe suorittaa vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään näytteiden jo sisältämää määrää vastaava määrä lasalosiid-natriumia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto**5.2.1 Rehu**

Punnitaan 5–10 g näytettä 0,01 gramman tarkkuudella 250 ml:n tulpalliseen erlenmeyerkolviiniin. Lisätään pipetillä 100,0 ml happamoitua metanolia (3.8). Suljetaan löyhästi tulpalla ja sekoitetaan kunnes näyte on

▼B

liuennut. Asetetaan pullo noin 40-asteiseen ultraäänihauteeseen (4.1) 20 minuutiksi, otetaan pois ja jäähdytetään huoneenlämpöiseksi. Annetaan laskeutua noin tunnin ajan ja suodatetaan määräosa 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.2) läpi sopivaan astiaan. Tehdään HPLC-määritys (5.3).

5.2.2 Esiseokset

Punnitaan 2 g jauhamatonta esiseosta 0,001 gramman tarkkuudella 250 ml:n mittapulloon. Lisätään 100,0 ml happamoitua metanolia (3.8) ja sekoitetaan kunnes esiseos on liuennut. Laitetaan pullo sisältöineen noin 40-asteiseen ultraäänihauteeseen (4.1) 20 minuutiksi, otetaan pois ja jäähdytetään huoneenlämpöiseksi. Täytetään merkkiin asti happamoidulla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan hyvin. Annetaan laskeutua tunnin ajan ja suodatetaan määräosa 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.2) läpi sopivaan astiaan. Laimennetaan sopiva määrä kirkasta suodosta happamoidulla metanolilla (3.8) siten, että lopullisessa koeliuoksessa on lasalosisid-natriumia noin 4 µg/ml. Tehdään HPLC-määritys (5.3).

5.3 HPLC-määritys

5.3.1 Muuttujat

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia; ajo voidaan suorittaa muissa olosuhteissa, jos niillä saadaan samat tulokset:

Nestekromatografia-kolonne (4.3.1):	125 mm × 4 mm, käänteisfaasi C ₁₈ , hiukkaskoko 5 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi (3.9):	Fosfaattipuskuriliuoksen (3.7) ja metanolin (3.5) seos, 5 + 95 (V+V)
Virtausnopeus:	1,2 ml/min
Mittausaallonpituudet:	
Eksitaatio:	310 nm
Emissio:	419 nm
Injektoitava määrä:	20 µl.

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektioimalla useita kertoja 4,0 µg/ml:n kalibrointiliuosta (3.10.3), kunnes piikkien korkeudet (tai pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.3.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan kutakin kalibrointiliuosta (3.10.3) useita kertoja ja lasketaan kutakin konsentraatiota vastaavat piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrointikäyrä merkiten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot y-akselille ja vastaavat konsentraatiot (µg/ml) x-akselille.

5.3.3 Näyteliuos

Injektoidaan 5.2.1 tai 5.2.2 kohdassa saatuja näyteuutteita useita kertoja käyttäen samaa tilavuutta kuin kalibrointiliuksille ja määritetään lasalosisid-natriumpiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuosta (5.3.3) injektioimalla saatujen piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvosta määritetään lasalosisid-natriumkonsentraatio (µg/ml) kalibrointikäyrän avulla.

▼B**6.1 Rehut**

Näytteen lasalosid-natriumpitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

c = näyteliuoksen (5.2.1) lasalosid-natriumkonsentraatio (µg/ml),
 V_1 = 5.2.1 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus (ts. 100 ml),
 m = näyte-erän paino (g).

6.2 Esiseokset

Näytteen lasalosid-natriumpitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

c = näyteliuoksen (5.2.2) lasalosid-natriumkonsentraatio (µg/ml),
 V_2 = 5.2.2 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus (ts. 250 ml),
 f = 5.2.2 kohdan mukainen laimennuskerroin,
 m = näyte-erän paino (g).

7. Tulosten validointi**7.1 Tunnistaminen**

Spektrofluorimetriaan perustuvissa menetelmissä on vähemmän häiriömahdollisuuksia kuin UV-mittauksissa. Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen (5.2.1 tai 5.2.2) lisätään sopiva määrä kalibrintiliuosta (3.10.3). Lisätyn lasalosid-natriummäärän on oltava suunnilleen sama kuin näyteliuoksesta määritetty lasalosid-natriummäärä. Ainoastaan lasalosid-natriumpiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä lasalosid-natriumia että näyteliuoksen laimeneminen. Piikin leveyden tulisi olla puolikorkeudessa ± 10 % sellaisen näyteliuoksen piikin leveydestä, johon ei ole lisätty lasalosid-natriumia.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin

- 15 % lasalosid-natriumpitoisuuden korkeammasta arvosta välillä 30–100 mg/kg,
- 15 mg/kg lasalosid-natriumpitoisuuden ollessa 100–200 mg/kg,
- 7,5 % lasalosid-natriumpitoisuuden korkeammasta arvosta pitoisuuksien ollessa yli 200 mg/kg.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 80 %. Sellaisen esiseosnäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, saannon on oltava vähintään 90 %.

▼B

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Laboratorioiden välinen vertailu (*) järjestettiin siten, että 12 laboratoriossa tutkittiin 2 esiseosta (näytteet 1 ja 2) ja 5 rehua (näytteet 3–7). Kukin näyte määritettiin kaksi kertaa. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

	Näyte 1 Kananrehun esiseos	Näyte 2 Kalkkunanrehun esiseos	Näyte 3 Kalkkunanrehupelletit	Näyte 4 Kananrehurakeet	Näyte 5 Kalkkunanrehu	Näyte 6 Siipikarjanrehu A	Näyte 7 Siipikarjanrehu B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Keskiarvo [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
Nimellispitoisuus [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Valmistajan ilmoittama pitoisuus

(**) Laboratoriossa valmistettu rehu.

L = laboratorioiden lukumäärä

n = yksittäisten tulosten lukumäärä

s_r = toistettavuuden keskihajonta

s_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

(*) Analyst, 1995, 120, 2175–2180.



LIITE V

REHUIEN SISÄLTÄMIEN HAITALLISTEN AINEIDEN VALVON- NASSA KÄYTETTÄVÄT MÄÄRITYSMENETELMÄT

A. VAPAAN GOSSYPOLIN JA KOKONAISGOSSYPOLIN MÄÄ- RITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää vapaan gossypolin, kokonaigossypolin ja niitä kemiallisesti lähellä olevien aineiden pitoisuus puuvillansiemenissä, puuvillansiemenjauhossa ja puuvillansiemenkakussa sekä näitä rehuaineita sisältävissä rehuseoksissa; vapaan gossypolin, kokonaigossypolin ja niitä kemiallisesti lähellä olevien aineiden määrityksen alaraja on 20 mg/kg.

2. Periaate

Gossypoli uutetaan 3-amino-1-propanolin läsnä ollessa joko isopropanolin ja heksaanin seoksella vapaan gossypolin määrittämiseksi tai dime-tyyliformamidilla kokonaigossypolin määrittämiseksi. Gossypoli muu- tetaan aniliinilla gossypolidianiliiniksi, jonka optinen tiheys mitataan 440 nm:ssä.

3. Reagenssit

3.1 Isopropanoli-heksaaniseos: sekoitetaan 60 tilavuusosaa isopropanolia ja 40 tilavuusosaa *n*-heksaania.

3.2 Liuotinseos A: Lisätään noin 500 ml isopropanoli-heksaani-seosta (3.1), 2 ml 3-amino-1-propanolia, 8 ml jäätikkoa ja 50 ml vettä 1 litran mittapulloon. Mittapullo täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaanise- oksella (3.1). Säilyy yhden viikon ajan.

3.3 Liuotinseos B: Pipetoidaan 2 ml 3-amino-1-propanolia ja 10 ml jäätetik- kaa 100 ml:n mittapulloon. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön ja täyte- tään merkkiin asti N, N-dimetyyliformamidilla. Säilyy yhden viikon ajan.

3.4 Aniliini: *Jos nollakokeessa saatu optinen tiheys on yli 0,022*, aniliini on tislattava sinkkijauheen päältä siten, että tisleestä jätetään pois 10 % sekä alusta että lopusta. Suljetussa ruskeassa lasipullossa kylmässä säilytet- tynä reagenssiluosis säilyy useiden kuukausien ajan.

3.5 Gossypolin standardiliuosis: Punnitaan 27,9 g gossypoliasetaattia 250 ml:n mittapulloon. Liuotetaan liuotinseokseen A, täytetään merkkiin asti samalla liuotinseoksella (3.2). Pipetoidaan 50 ml tätä liuosta 250 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asti liuotinseoksella A. Tämän liuok- sen gossypolikonsentraatio on 0,02 mg/ml. Annetaan seistä yhden tunnin ajan huoneenlämmössä ennen käyttöä.

3.6 Gossypolin standardiliuosis: Punnitaan 27,9 g gossypoliasetaattia 50 ml:n mittapulloon. Liuotetaan liuotinseokseen B, täytetään merkkiin asti samalla liuotinseoksella (3.3). Tämän liuoksen gossypolikonsentraa- tio on 0,5 mg/ml.

Gossypolin standardiliuokset A ja B säilyvät 24 tuntia valolta suojattui- na.

4. Välineistö

4.1 Sekoittaja: noin 35 kierr./min.

▼B

4.2 Spektrofotometri.

5. Menettely

5.1 Näyte

Punnitusmäärä riippuu näytteen oletetusta gossypolipitoisuudesta. On suositeltavaa käyttää pientä punnitusmäärää ja suhteellisen suurta suodsmäärää, jotta gossypolin määrä saataisiin riittävän suureksi tarkan spektrofotometrisen mittauksen suorittamiseen. Näyte ei saa olla suurempi kuin 1 g määritettäessä vapaan gossypolin pitoisuutta puuvillansiemenistä, puuvillansiemenjauhosta tai puuvillansiemenkakusta; jos määrittäminen tapahtuu rehuseoksesta, näytekoko voi olla jopa 5 g. Useimmissa tapauksissa riittää 10 ml suodosta; suodoksen pitää sisältää 50–100 µg gossypolia. Kokonaisgossypolin määrittämiseen punnitusmäärän pitää olla 0,5–5 g siten, että 2 ml:n määrä suodosta sisältää 40–200 µg gossypolia.

Määrittäminen on suoritettava noin 20 °C:n huoneenlämmössä.

5.2 Vapaan gossypolin määrittäminen

Sopiva määrä näytettä punnitaan hiokselliseen, lasitulpalla suljettavaan 250 ml:n keittokolviin, jonka pohjalla on lasimurskaa. Lisätään pipetillä kolviin 50 ml liuotinkeosta A (3.2), suljetaan kolvi tulpalla ja sekoitetaan yhden tunnin ajan sekoittajassa. Suodatetaan kuivan suodattimen läpi pieneen, hiokselliseen kolviin. Suodatinsuppilo peitetään kellonlasilla suodatuksen ajaksi.

Pipetoidaan kahteen 25 ml:n mittapulloon (A ja B) sama määrä suodosta, joka sisältää 50–100 µg gossypolia. Tarvittaessa täytetään 10 ml:aan liuotinkeoksella A (3.2). Tämän jälkeen mittapullo (A) täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Tätä liuosta käytetään referenssiluoksen mittaauksessa.

Pipetoidaan 10 ml liuotinkeosta A (3.2) kahteen 25 ml:n mittapulloon (C ja D). Toinen mittapullo (C) täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Tätä liuosta käytetään referenssiluoksen mittaauksessa.

Pipetoidaan mittapulloihin D ja B 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään 30 minuutin ajan kiehuvalle vesihautelle värin kehittymiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan.

Mitataan nollakoeliuoksen (D) optinen tiheys spektrometrillä 440 nm:ssä 1 cm:n lasikyvetissä vertailuliuosta (C) vastaan, ja näyteliuoksen (B) optinen tiheys vertailuliuosta (A) vastaan.

Nollakoeliuoksen optinen tiheys vähennetään näyteliuoksen optisesta tiheydestä (= korjattu optinen tiheys). Tästä arvosta lasketaan vapaan gossypolin pitoisuus 6 kohdassa kuvatulla tavalla.

5.3 Kokonaisgossypolin määrittäminen

Näyttemäärä, joka sisältää 1–5 mg gossypolia, punnitaan 50 ml:n mittapulloon ja siihen lisätään 10 ml liuotinkeosta B (3.3). Samanaikaisesti valmistetaan nollakoeliuos pipetoimalla 10 ml liuotinkeosta B (3.3) toiseen 50 ml:n mittapulloon. Molemmat mittapullot asetetaan kiehuvalle

▼B

vesihauteelle 30 minuutin ajaksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön ja täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Homogenoidaan ja annetaan seistä 10–15 minuuttia, suodatetaan hioksellisiin pulloihin.

Sekä suodatettua näyteliuosta että suodatettua nollakoeliuosta pipetoidaan 2 ml 25 ml:n mittapulloihin. Toinen näyteliuosta ja toinen nollakoeliuosta sisältävä mittapullo täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Näitä liuoksia käytetään vertailuliuksina.

Jäljelle jääneisiin kahteen mittapulloon lisätään 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään 30 minuutin ajan kiehuvalle vesihauteelle värin kehittymiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään 25 ml:aan isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan.

Optinen tiheys mitataan 5.2 kohdan mukaisesti kuten vapaan gossypolin optinen tiheys. Tästä arvosta lasketaan kokonaisgossypolipitoisuus 6 kohdassa esitetyllä tavalla.

6. Tulosten laskeminen

Tulokset voidaan laskea joko optista ominaistiheyttä (6.1) tai kalibrointikäyrää (6.2) käyttäen.

6.1 Optinen ominaistiheys

Optinen ominaistiheys on annetuissa olosuhteissa seuraava:

$$\text{Vapaa gossypoli: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 625$$

$$\text{Kokonaisgossypoli: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 600$$

Näytteen vapaan gossypolin tai kokonaisgossypolin pitoisuus lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

E = korjattu optinen tiheys määritettynä 5.2 kohdan mukaisesti,
p = punnittu näytemäärä grammoina,
a = suodospää millilitroina.

6.2 Kalibrointikäyrän avulla

6.2.1 Vapaa gossypoli

Valmistetaan kaksi viiden 25 ml:n mittapullon sarjaa. Molempiin mittapullosarjoihin pipetoidaan 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ja 10,0 ml gossypolistandardiliuosta A (3.5). Täytetään 10 ml:aan liuotinkeksellä A (3.2). Molempiin sarjoihin otetaan mukaan 25 ml:n mittapullo, joka sisältää vain 10 ml liuotinkeksistä A (3.2) (nollakoe).

Toinen sarja mittapulloja (myös nollakokeessa käytettävä pullo) täytetään 25 ml:aan isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1) (vertailusarja).

▼B

Toiseen mittapullosarjaan (myös nollakokeeseen) lisätään 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään 30 minuutin ajan kiehuvalle vesihautteelle värin kehittymiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan (standardisarja).

Mitataan 5.2 kohdassa mainituissa olosuhteissa standardisarjan liuosten optinen tiheys vertailusarjan vastaavia liuoksia vastaan. Kalibrointikäyrä laaditaan piirtämällä optisia tiheyksiä ja näitä vastaavia gossypolimääriä (mikrogrammoina) esittävä kuvaaja.

6.2.2 Kokonaissossypoli

Valmistetaan kuuden 50 ml:n mittapullon sarja. Ensimmäiseen mittapulloon pipetoidaan 10 ml liuotineseosta B (3.3) ja muihin 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ja 10,0 ml gossypolistandardiliuosta B (3.6). Pullojen tilavuus säädetään 10 ml:ksi liuotineseoksella B (3.3). Lämmitetään kiehuvalle vesihautteelle 30 minuuttia. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1) ja homogenoidaan.

Kuhunkin kahden sarjan kuuteen 25 ml:n mittapulloon pipetoidaan 2,0 ml tätä liuosta. Ensimmäisen sarjan pullot täytetään 25 ml:ksi isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1) (vertailusarja).

Kuhunkin toisen sarjan mittapulloon lisätään 2 ml aniliiniliuosta (3.4). Lämmitetään kiehuvalle vesihautteelle 30 minuuttia. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön, täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1), homogenoidaan ja annetaan seistä yhden tunnin ajan (standardisarja).

Mitataan 5.2 kohdassa mainituissa olosuhteissa standardisarjan liuosten optinen tiheys vertailusarjan vastaavia liuoksia vastaan. Kalibrointikäyrä laaditaan piirtämällä optisia tiheyksiä ja näitä vastaavia gossypolimääriä (mikrogrammoina) esittävä kuvaaja.

6.3 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin

- 15 %, suhteessa korkeampaan tasoon, kun gossypolipitoisuudet ovat alle 500 mg/kg,
- 75 mg/kg, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, kun gossypolipitoisuudet ovat 500–750 mg/kg,
- 10 %, suhteessa korkeampaan arvoon, kun gossypolipitoisuudet ovat yli 750 mg/kg.

▼ M4

B. DIOKSIINIEN (PCDD/PCDF) JA PCB-YHDISTEIDEN PITOISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN

I LUKU

Näytteenottomenetelmät ja määrittystulosten tulkinta

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Rehun polykloorattujen dibentso-para-dioksiinien (PCDD-yhdisteiden), polykloorattujen dibentsofuraanien (PCDF-yhdisteiden), dioksiinien kaltaisten polykloorattujen bifenyyliden (PCB-yhdisteiden)⁽¹⁾ ja muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien viralliseen valvontaan tarkoitetut näytteet on otettava liitteessä I vahvistettujen säännösten mukaisesti. Rehuun tasaisesti jakautuneiden aineiden tai tuotteiden valvontaan on sovellettava liitteessä I olevassa 5.1 kohdassa vahvistettuja määriä koskevia vaatimuksia. Tällä tavoin saatujen kokoomanäytteiden katsotaan edustavan eriä tai osaeriä, joista ne on otettu. Laboratorioinäytteistä määritettyjen pitoisuuksien perusteella arvioidaan, noudattavatko tutkittavat erät niitä enimmäismääriä, jotka on vahvistettu direktiivissä 2002/32/EY.

Tässä B osassa sovelletaan komission päätöksen 2002/657/EY⁽²⁾ liitteessä I vahvistettuja määritelmiä.

⁽¹⁾ Dioksiinien, furaanien ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden toksisuusekvivalenssikertoimia (Toxic Equivalency Factor, TEF) koskeva taulukko: Ihmisille aiheutuvan riskin arvioinnissa käytettävät WHO:n toksisuusekvivalenssikertoimet (TEF) perustuvat Genevessä kesäkuussa 2005 pidetyn Maailman terveysjärjestön (WHO) asiantuntijakokouksen päätelmiin (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)).

Kongeneeri	TEF-arvo	Kongeneeri	TEF-arvo
<i>Dibentso-p-dioksiinit (PCDD:t) ja dibentso-p-furaanit (PCDF:t)</i>		<i>Dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet. Ei-orto-PCB-yhdisteet + mono-orto-PCB-yhdisteet</i>	
2,3,7,8-TCDD	1	Ei-orto-PCB-yhdisteet	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
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	Mono-orto-PCB-yhdisteet	
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		

Käytetyt lyhenteet: T = tetra; Pe = penta; Hx = heksa; Hp = hepta; O = okta; CDD = klooridibentsodioksiini; CDF = klooridibentsofuraani; CB = klooribifenyylä.

⁽²⁾ Komission päätös 2002/657/EY, tehty 14 päivänä elokuuta 2002, neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määrittymenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta (EYVL L 221, 17.8.2002, s. 8).

▼ M4

Kyseisten määritelmien lisäksi tässä B osassa sovelletaan seuraavia määritelmiä:

’Seulontamenetelmillä’ tarkoitetaan niiden näytteiden valitsemista, joissa PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet ylittävät enimmäismäärät tai toimintakynnykset. Seulontamenetelmien on mahdollistettava suuri näytteenkäsittelykapasiteetti, joka on kustannustehokas ja parantaa mahdollisuutta havaita uusia tapauksia, joihin liittyy merkittäviä altistumis- ja terveysriskejä kuluttajien kannalta. Seulontamenetelmien on perustuttava bioanalyttisiin tai GC-MS-menetelmiin. Enimmäismäärän noudattamisen tarkastamiseksi otetuista cut-off-arvon ylittävistä näytteistä saadut tulokset on tarkistettava tekemällä alkuperäisestä näytteestä täydellinen uusi analyysi varmistusmenetelmällä.

’Varmistusmenetelmillä’ tarkoitetaan menetelmiä, joilla saadaan täydelliset tiedot tai lisätietoja, joiden avulla PCDD/PCDF-yhdisteet ja dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet voidaan tunnistaa ja määrittää yksiselitteisesti enimmäistasolla tai tarvittaessa toimintakynnyksellä. Tällaisia varmistusmenetelmiä ovat korkean erotuskyvyn kaasukromatografia/korkean erotuskyvyn massaspektrometria (GC-HRMS) tai kaasukromatografia/tandem-massaspektrometria (GC-MS/MS).

2. Erän tai osaerän enimmäismäärää koskevien vaatimusten mukaisuus

2.1 Muut kuin dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet

Erä on enimmäismäärää koskevien vaatimusten mukainen, jos määrittäytulos ei ylitä direktiivissä (EY) N:o 2002/32/EY muille kuin dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille vahvistettua enimmäismäärää, kun otetaan huomioon mittausepävarmuus.

Erä ei ole enimmäismäärää koskevien vaatimusten mukainen, jos suurimman arvon ⁽³⁾ 2 mukainen määrittäytulos, joka on vahvistettu toistomäärityksellä ⁽⁴⁾, ylittää direktiivissä 2002/32/EY vahvistetun enimmäismäärän, kun otetaan huomioon mittausepävarmuus. Vaatimustenmukaisuuden varmistamiseen käytetään näiden kahden määrittäytulon keskiarvoa, mittausepävarmuus huomioon ottaen.

Mittausepävarmuus otetaan huomioon jollakin seuraavista tavoista:

- Lasketaan laajennettu epävarmuus käyttäen kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 %. Erä tai osa-erä ei ole vaatimustenmukainen, jos mitattu arvo, josta on vähennetty mittausepävarmuustekijä U, ylittää enimmäismäärän.
- Vahvistetaan päätösraja (CC_α) päätöksen 2002/657/EY liitteessä I olevan 3.1.2.5 kohdan mukaisesti. Erä tai osa-erä ei ole vaatimustenmukainen, jos mitattu arvo on suurempi tai yhtä suuri kuin CC_α.

1, 2 ja 3 kohtaa sovelletaan virallista valvontaa varten otettujen näytteiden määrittäytuloksiin. Suoja- ja riitojenratkaisutoimenpiteitä varten suoritettaviin määrittäytuloksiin sovelletaan kansallisia sääntöjä.

⁽³⁾ Suurimmat arvot: kunkin määrittämättä jääneen kongeneerin arvon oletetaan olevan määrittäytaraja vastaava arvo. Pienimmät arvot: kunkin määrittämättä jääneen kongeneerin arvon oletetaan olevan nolla. Väliarvot: kunkin määrittämättä jääneen kongeneerin arvon oletetaan olevan puolet määrittäytaraja vastaavasta arvosta.

⁽⁴⁾ Yleisesti sovelletaan liitteessä II olevan C luvun 3 kohdassa vahvistettuja toistomääritystä koskevia vaatimuksia. Kuitenkin varmistusmenetelmissä, joissa käytetään ¹³C-leimattua sisäistä standardia asianomaisten analyttien osalta, toistomääritys on tarpeen ainoastaan, jos tällaisia varmistusmenetelmiä käytettäessä ensimmäisen määrittäytulon tulos ei ole vaatimustenmukainen. Toistomääritys on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikonaminaatio tai näytteiden sekoittuminen vahingossa. Jos määrittäytulos suoritetaan kontaminaatiotapauksen yhteydessä, varmistus toistomäärityksellä voidaan jättää tekemättä, mikäli määrittäytulon valitut näytteet liittyvät jäljitettävyyden perusteella kontaminaatiotapaukseen ja havaittu määrä ylittää huomattavasti enimmäismäärän.

▼M4

2.2 PCDD/PCDF-yhdisteet ja dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet

Erä on enimmäismäärien mukainen, jos tulos yhdestä analyysistä,

- joka on suoritettu seulontamenetelmällä, jossa väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuus on alle 5 %, osoittaa, ettei pitoisuus ylitä enimmäismäärää, joka on vahvistettu direktiivissä 2002/32/EY PCDD/PCDF-yhdisteille sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle,
- joka on suoritettu varmistusmenetelmällä, ei ylitä enimmäismäärää, joka on vahvistettu direktiivissä 2002/32/EY PCDD/PCDF-yhdisteille sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle, kun otetaan huomioon mittausepävarmuus.

Seulontamäärittysten osalta on vahvistettava cut-off-arvo sen määrittämiseksi, noudattaako näyte niitä enimmäismääriä, jotka on vahvistettu joko PCDD/PCDF-yhdisteille tai PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle.

Erä ei ole enimmäismäärää koskevien vaatimusten mukainen, jos varmistusmenetelmällä saadun suurimman arvon⁽⁵⁾ mukainen määrittystulos, joka on vahvistettu toistomäärittelyllä, ylittää direktiivissä 2002/32/EY vahvistetun enimmäismäärän, kun otetaan huomioon mittausepävarmuus⁽⁶⁾ 2. Vaatimustenmukaisuuden varmistamiseen käytetään näiden kahden määrittelyn keskiarvoa, mittausepävarmuus huomioon ottaen.

Mittausepävarmuus otetaan huomioon jollakin seuraavista tavoista:

- Lasketaan laajennettu epävarmuus käyttäen kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 %. Erä tai osa-erä ei ole vaatimustenmukainen, jos mitattu arvo, josta on vähennetty mittausepävarmuustekijä U, ylittää enimmäismäärän. Jos PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet määritetään erikseen, PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden erillisten määrittystulosten yhteenlaskettua arvioitua laajennettua epävarmuutta on käytettävä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien summana.
- Vahvistetaan päätösraja (CC α) päätöksen 2002/657/EY liitteessä I olevan 3.1.2.5 kohdan mukaisesti. Erä tai osa-erä ei ole vaatimustenmukainen, jos mitattu arvo on suurempi tai yhtä suuri kuin CC α .

1–4 kohtaa sovelletaan virallista valvontaa varten otettujen näytteiden määrittystuloksiin. Suoja- ja riitojenratkaisutoimenpiteitä varten suoritettaviin määrittelyihin sovelletaan kansallisia sääntöjä.

3. Tulokset, jotka ylittävät direktiivin 2002/32/EY liitteessä II vahvistetut toimintakynnykset

Toimintakynnysten avulla voidaan valita näytteet niissä tapauksissa, joissa on tarpeen tunnistaa saastumisen lähde ja toteuttaa toimia sen vähentämiseksi tai poistamiseksi. Seulontamenetelmällä määritetään taroituksenmukaiset cut-off-arvot näiden näytteiden valitsemiseksi. Jos

⁽⁵⁾ Suurimmat arvot: toksisuusekvivalenttia TEQ laskettaessa oletetaan kunkin määrittämättä jääneen kongeneerin arvoksi määrittärajaa vastaava arvo. Pienimmät arvot: TEQ:ta laskettaessa oletetaan kunkin määrittämättä jääneen kongeneerin arvoksi nolla. Väliarvot: TEQ:ta laskettaessa oletetaan kunkin määrittämättä jääneen kongeneerin arvoksi puolet määrittärajaa vastaavasta arvosta.

⁽⁶⁾ Yleisesti sovelletaan liitteessä II olevan C luvun 3 kohdassa vahvistettuja toistomäärittäyksiä koskevia vaatimuksia. Kuitenkin varmistusmenetelmissä, joissa käytetään ¹³C-leimattua sisäistä standardia asianomaisten analyttien osalta, toistomäärittäminen on tarpeen ainoastaan, jos tällaisia varmistusmenetelmiä käytettäessä ensimmäisen määrittelyn tulos ei ole vaatimustenmukainen. Toistomäärittäminen on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikonaminaatio tai näytteiden sekoittuminen vahingossa. Jos määrittäminen suoritetaan kontaminaatiotapauksen yhteydessä, varmistus toistomäärittelyllä voidaan jättää tekemättä, mikäli määrittäykseen valitut näytteet liittyvät jäljitettävyyden perusteella kontaminaatiotapaukseen ja havaittu määrä ylittää huomattavasti enimmäismäärän.

▼ **M4**

lähteen tunnistamiseksi ja saastumisen vähentämiseksi tai poistamiseksi tarvitaan huomattavia ponnistuksia, toimintakynnysten ylittyminen saat-
taa olla aiheellista vahvistaa toistomäärittelyä käyttäen varmistusmenetelmää ja ottaa huomioon mittausepävarmuus ⁽⁷⁾.

II LUKU

Näytteiden valmistus ja vaatimukset, jotka rehussa olevien dioksiinipitoisuuksien (PCDD/PCDF) ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden virallisessa valvonnassa käytettyjen määrittämenetelmien on täytettävä

1. **Soveltamisala**

Tässä luvussa vahvistettuja vaatimuksia on sovellettava analysoitaessa rehua 2,3,7,8-substituoitujen polykloorattujen dibentso-para-dioksiinien (PCDD:t) ja polykloorattujen dibentsofuraanien (PCDF:t) ja dioksiinien kaltaisten polykloorattujen bifenyylien (dioksiinien kaltaiset PCB:t) pitoisuuksien virallista valvontaa ja muita sääntelytarkoituksia varten.

PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden esiintymistä rehussa voidaan valvoa kahdella erityyppisellä määrittämenetelmällä:

a) **Seulontamenetelmät**

Seulontamenetelmillä pyritään valitsemaan ne näytteet, joissa PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet ylittävät enimmäismäärät tai toimintakynnykset. Seulontamenetelmien olisi mahdollistettava suuri näytteenkäsittelykapasiteetti, joka on kustannustehokas ja parantaa mahdollisuutta havaita uusia tapauksia, joihin liittyy merkittäviä altistumis- ja terveysriskejä kuluttajien kannalta. Niiden tavoitteena tulisi olla väärin vaatimustenmukaisten tulosten välttäminen. Niihin voi kuulua bioanalyttisiä menetelmiä ja GC-MS-menetelmiä.

Seulontamenetelmät perustuvat määrittäytuloksen ja cut-off-arvon keskinäiseen vertailuun ja antavat myönteisen tai kielteisen viitteen siitä, ylittyykö enimmäismäärä tai toimintakynnys. PCDD/PCDF-pitoisuus sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summa näytteissä, joiden epäillään olevan enimmäismäärää koskevien vaatimusten vastaisia, on määritettävä tai vahvistettava varmistusmenetelmän avulla.

Lisäksi seulontamenetelmät voivat antaa viitteen PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksista näytteessä. Sovellettaessa bioanalyttisiä seulontamenetelmiä tulos ilmaistaan bioanalyttisinä ekvivalenteina (BEQ), kun taas sovellettaessa fysikaalis-kemiallisia GC-MS-menetelmiä se ilmaistaan toksisuusekvivalenteina (TEQ). Seulontamenetelmien numeerisesti ilmoitetut tulokset soveltuvat vaatimustenmukaisuuden, epäillyn vaatimustenvastaisuuden tai toimintakynnysten ylittymisen osoittamiseen, ja ne antavat viitteen pitoisuuksien vaihteluvälistä, kun suoritetaan jatkotoimia varmistusmenetelmin. Ne eivät sovellu esimerkiksi taustapitoisuustasojen arvioimiseen, saannin arvioimiseen, pitoisuuksien kehityssuuntausten seuraamiseen tai toimintakynnysten ja enimmäismäärien uudelleenarviointiin.

b) **Varmistusmenetelmät**

⁽⁷⁾ Toimintakynnysten tarkistukseen liittyvään toistomäärittelyyn sovelletaan samoja kriteerejä ja vaatimuksia kuin enimmäismääriin, ks. alaviite ⁽⁵⁾.

▼M4

Varmistusmenetelmät mahdollistavat näytteessä esiintyvien PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden yksiselitteisen tunnistamisen ja määrittämisen ja antavat täydelliset tiedot kongeneerin tasolla. Sen vuoksi näiden menetelmien avulla voidaan valvoa enimmäismääriä ja toimintakynnyksiä sekä vahvistaa seulontamenetelmillä saadut tulokset. Lisäksi tuloksia voidaan käyttää muihin tarkoituksiin, kuten matalien taustapitoisuustasojen määrittämiseen rehuvalvonnassa, kehityssuuntausten seuraamiseen, väestön altistumisen arvioimiseen ja tietokannan luomiseen enimmäismäärien ja toimintakynnysten mahdollista uudelleenarviointia varten. Ne ovat merkittäviä myös kongeneerijakauman määrittämisessä, jotta mahdolliset saastumislähteet voidaan kartoittaa. Tällaiset menetelmät ovat GC-HRMS-menetelmiä. Sen vahvistamiseksi, noudattaako näyte enimmäismäärää koskevia vaatimuksia, voidaan käyttää myös GC-MS/MS-menetelmää.

2. Tausta

Toksisuusekvivalenttien (TEQ) pitoisuudet lasketaan siten, että tietyssä näytteessä olevien yksittäisten aineiden pitoisuudet kerrotaan kunkin aineen toksisuusekvivalenssikertoimella (TEF) (ks. alaviite ⁽¹⁾ luvussa I) ja saadut määrät lasketaan yhteen, jolloin tulokseksi saadaan dioksiinien kaltaisten yhdisteiden kokonaispitoisuus toksisuusekvivalenteina ilmaistuna.

Tässä B osassa yksittäisen kongeneerin hyväksytyllä määritysrajalla tarkoitetaan matalinta analyytin pitoisuutta, joka voidaan mitata kohtuullisella tilastollisella varmuudella ja joka täyttää tunnistamista koskevat kriteerit, jotka on kuvattu kansainvälisesti tunnustetuissa standardeissa, esimerkiksi standardissa EN 16215:2012 (Animal feed — Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS) ja/tai tarkistetuissa EPA-menetelmissä 1613 ja 1668.

Yksittäisen kongeneerin hyväksytty määritysraja voi olla

- a) se näyteuutteesta olevan analyytin pitoisuus, joka tuottaa kahdelle mitattavalle ionille mittalaitteessa vasteen, jossa vähemmän herkän raakadatasignaalin signaali-kohinasuhde on 3:1; tai
- b) jos signaali-kohinasuhteen laskelma ei teknisistä syistä tuota luotettavia tuloksia, kalibrointikäyrällä oleva alin pitoisuus, joka antaa hyväksyttävän ($\leq 30\%$) ja johdonmukaisen (mitattuna vähintään näytesarjan alusta ja lopusta) poikkeaman keskimääräisestä suhteellisesta vastekertoimesta, joka on laskettu kalibrointikäyrän kaikille pisteille kussakin näytesarjassa. Määritysraja lasketaan alimmasta pitoisuudesta ottaen huomioon sisäisten standardien saannot ja näytteen määrä.

Bioanalyttisillä seulontamenetelmillä ei saada tuloksia kongeneeritasolla, vaan ainoastaan viite ⁽⁸⁾ TEQ-tasosta bioanalyttisinä ekvivalenteina (BEQ) ilmaistuna sen vuoksi, että kaikki vasteen tuottavassa näyteuutteesta olevat yhdisteet eivät täytä kaikkia TEQ-periaatteen vaatimuksia.

Seulonta- ja varmistusmenetelmiä voidaan käyttää tietyn matriisin tarkastuksessa ainoastaan, jos menetelmät ovat riittävät herkkiä ja kykenevät luotettavasti havaitsemaan määrät toimintakynnyksellä tai enimmäismäärällä.

⁽⁸⁾ Bioanalyttiset menetelmät eivät kohdistu suoraan TEF-järjestelmään sisältyviin kongeneereihin. Näyteuutteesta voi olla muita rakenteellisesti samankaltaisia AhR-aktiivisia yhdisteitä, jotka vaikuttavat kokonaisvasteeseen. Sen vuoksi bioanalyttisillä menetelmillä saadut tulokset eivät ole arvio näytteen TEQ-arvosta vaan viite siitä.

▼ **M4****3. Laadunvarmistusta koskevat vaatimukset**

- 3.1 On toimittava ristikontaminaation välttämiseksi kussakin näytteenoton ja analyysin vaiheessa.
- 3.2 Näytteet on varastoitava ja kuljetettava varastointiin soveltuviin lasista, alumiinista, polypropyleenistä tai polyetyleenistä valmistetuissa säiliöissä, jotka eivät vaikuta PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksiin näytteissä. Paperipölyjäämät on poistettava näytesäiliöstä.
- 3.3 Näytteiden varastointi ja kuljetus on järjestettävä niin, että rehunäyte pysyy koskemattomana.
- 3.4 Jokainen laboratorionäyte jauhetaan tarvittaessa hienoksi ja sekoitetaan huolellisesti käyttäen menetelmää, jonka on osoitettu homogenoivan näytteen täydellisesti (esim. hienonnus 1 mm:n siivilän läpäiseviksi hiukkasiksi). Liian kosteat näytteet on kuivattava ennen hienontamista.
- 3.5 Reagenssit, lasitavarat ja laitteet on tarkistettava sen varalta, että ne voivat osaltaan vaikuttaa TEQ- ja BEQ-arvoihin perustuviin tuloksiin.
- 3.6 On suoritettava ilman näytettä tehtävä nolla-analyysi, jossa käydään läpi kaikki analyysin vaiheet.
- 3.7 Bioanalyttisten menetelmien osalta määrittämisessä käytettävät lasitavarat ja liuottimet on testattava sen toteamiseksi, ettei niissä ole yhdisteitä, jotka voivat häiritä kohdeyhdisteiden havaitsemista mitta-alueella. Lasitavarat on huuhdeltava liuottimilla tai kuumennettava lämpötiloihin, jotka soveltuvat PCDD/PCDF-yhdisteiden, dioksiinien kaltaisten yhdisteiden ja häiriöitä aiheuttavien yhdisteiden poistamiseen lasitavaroitten pinnalta.
- 3.8 Uuttamisessa käytettävän näytteen määrän on oltava riittävä, jotta täytetään vaatimukset, jotka koskevat riittävän matalaa mitta-alueetta, joka käsittää enimmäismäärien tai toimintakynnysten suuruiset pitoisuudet.
- 3.9 Tarkasteltavien tuotteiden yhteydessä käytettäviin näytteiden valmistusmenetelmiin on sovellettava kansainvälisesti hyväksyttyjä suuntaviivoja.

4. Laboratorioita koskevat vaatimukset

- 4.1 Asetuksen (EY) N:o 882/2004 säännösten mukaisesti laboratorioiden on oltava ISO-oppaan 58 mukaisesti toimivan tunnustetun laitoksen hyväksymiä, millä varmistetaan, että laboratoriot soveltavat analyttistä laadunvarmistusta. Laboratorioiden hyväksyntä on tehtävä EN ISO/IEC 17025 -standardin mukaisesti.
- 4.2 Laboratorion pätevyys osoitetaan sen osallistumisella jatkuvasti hyvin tuloksin laboratorioiden välisiin tutkimuksiin, jotka koskevat PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden määrittämistä asianmukaisissa rehumatriiseissa ja pitoisuusalueilla.
- 4.3 Seulontamenetelmiä näytteiden rutiinitarkastuksissa käyttävien laboratorioiden on tehtävä tiivistä yhteistyötä varmistusmenetelmää käyttävien laboratorioiden kanssa laadunvalvonnan ja vaatimustenvastaisiksi epäiltyjen näytteiden määrittäytuloksen varmistuksen osalta.

▼ M4

5. **Perusvaatimukset dioksiinien (PCDD/PCDF-yhdisteiden) ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden analyysille**5.1 *Matala mittausalue ja määrittäysrajat*

Koska osa PCDD/PCDF-yhdisteistä on erittäin myrkyllisiä, ne on pystyttävä havaitsemaan jo femtogrammoina (10^{-15} g) ilmaistavan alueen ylemmillä arvoilla. Useimpien PCB-kongeneerien osalta määrittäysrajaksi riittää nanogrammoina (10^{-9} g) ilmaistava alue. Toksisempien dioksiinien kaltaisten PCB-kongeneerien (erityisesti ei-orto-substituoitujen kongeneerien) mittauksessa mittausalueen ala-arvojen on oltava pikogrammoina (10^{-12} g) ilmaistavan alueen alimpia arvoja. Kaikkien muiden PCB-yhdisteiden osalta määrittäysrajaksi riittää nanogrammoina (10^{-9} g) ilmaistava alue.

5.2 *Hyvä selektiivisyys (spesifisyys)*

5.2.1 PCDD/PCDF-yhdisteet ja dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet on voitava erottaa lukuisista muista uuttamisessa mukana tulevista ja mahdollisesti häiriöitä aiheuttavista yhdisteistä, joiden pitoisuudet voivat olla moninkertaisia verrattuna tarkasteltavien analyttien pitoisuuksiin. GC-MS-menetelmissä on pystyttävä tarvittaessa erottelemaan eri kongeneerit, kuten toksiset kongeneerit (esim. seitsemäntoista 2,3,7,8-substituoitua PCDD/PCDF-yhdistettä ja kaksitoista dioksiinien kaltaista PCB-yhdistettä) muista kongeneereista.

5.2.2 Bioanalyttisten menetelmien on kyettävä havaitsemaan kohdeyhdisteet PCDD/PCDF-yhdisteiden ja/tai dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summana. Näytteen puhdistamisella pyritään poistamaan yhdisteet, jotka voivat aiheuttaa vääriä vaatimustenvastaisia tuloksia, tai yhdisteet, jotka voivat heikentää vastetta ja johtaa vääriin vaatimustenmukaisiin tuloksiin.

5.3 *Hyvä tarkkuus (oikeellisuus ja täsmällisyys, biotestin korjattu saanto)*

5.3.1 GC-MS-menetelmien osalta määrittäyksessä on pystyttävä antamaan pätevä arvio aineen todellisesta pitoisuudesta näytteessä. Hyvä tarkkuus on välttämätön, jotta voidaan välttää näytteen määrittäytuloksen hylkääminen sen perusteella, että määritetyn TEQ-arvon luotettavuus on heikko. Tarkkuus ilmaistaan *oikeellisuutena* (sertifioidusta materiaalista mitatun tutkittavan aineen määrän keskiarvon ja sertifioitun arvon erotus prosentteina tästä arvosta) ja *täsmällisyytenä* (RSD_R on uusittavissa olosuhteissa saaduista tuloksista laskettu suhteellinen standardipoikkeama).

5.3.2 Bioanalyttisten menetelmien osalta on määritettävä biotestin korjattu saanto. Biotestin korjatulla saannolla tarkoitetaan BEQ-arvoa, joka on laskettu TCDD:n tai PCB 126:n kalibrintikäyrästä korjattuna nollanäytteelle ja sen jälkeen jaettu varmistusmenetelmällä määritetyllä TEQ-arvolla. Sillä pyritään korjaamaan sellaisia tekijöitä kuin PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten yhdisteiden hävikkiä uuttamis- ja puhdistusvaiheissa, sellaisten mukana uuttuneiden yhdisteiden vaikutusta, jotka voivat voimistaa tai heikentää vastetta (agonistiset ja antagonistiset vaikutukset), käyrän sovituksen laatua tai toksisuusekvivalenssikertoimen (TEF) arvojen ja suhteellisen voimakkuuden (REP) arvojen välisiä eroja. Biotestin korjattu saanto lasketaan soveltuvista vertailunäytteistä, joissa on edustava kongeneerijakauma lähellä merkittävänä pidettyä tasoa olevissa pitoisuuksissa.

5.4 *Validointi enimmäispitoisuusalueella ja yleiset laadunvalvontatoimet*

5.4.1 Laboratorioiden on osoitettava menetelmän suorituskky enimmäispitoisuuksilla, esimerkiksi $0,5 \times$, $1 \times$ ja $2 \times$ enimmäismäärä, ja toistomittauksen hajonnan on oltava hyväksyttävä validointimenettelyn ja rutiinialueen aikana.

▼ **M4**

- 5.4.2 Sisäistä laadunvalvontaa varten on analysoitava säännöllisesti nollanäytteitä ja näytteitä, joihin on lisätty analyyttiä, tai kontrollinäytteitä (mieluiten sertifioiduilla vertailuaineilla, jos niitä on saatavilla). Nollanäytteiden, näytteiden, joihin on lisätty analyyttiä, tai kontrollinäytteiden tulokset on kirjattava laadunvalvontakortteihin. Tulosten avulla on varmistettava, että määrittämenetelmien suorituskkyky täyttää vaatimukset.

5.5 Määrittäysraja

- 5.5.1 Määrittäysrajan (LOQ) vahvistaminen ei ole bioanalyttisessä seulontamenetelmässä välttämätöntä, mutta menetelmällä on pystyttävä erottamaan toisistaan nolla- ja cut-off-arvo. BEQ-arvon ilmoittamista varten on vahvistettava raportointipitoisuus, jotta voidaan käsitellä näytteitä, joiden vaste alittaa tätä pitoisuutta vastaavan vasteen. On osoitettava, että raportointipitoisuus eroaa vähintään kertoimella kolme sellaisen nollanäytteen pitoisuudesta, jonka vaste on mittausalueen alarajan alapuolella. Siksi se lasketaan näytteistä, jotka sisältävät kohdeyhdisteitä noin vaaditun vähimmäispitoisuuden verran, eikä signaali-kohinasuhteesta tai nollamäärittäyksestä.

- 5.5.2 Varmistusmenetelmän määrittäysrajan (LOQ) on oltava noin yksi viidesosa enimmäismäärästä.

5.6 Analyttiset vaatimukset

Varmistus- tai seulontamenetelmistä saatujen luotettavien tulosten osalta TEQ- tai BEQ-arvon enimmäismäärien tai toimintakynnyksen on täytettävä seuraavat vaatimukset mittausalueella, määritettiin ne sitten TEQ-kokonaisarvoina (eli PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summana) tai erikseen PCDD/PCDF-yhdisteille ja dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille:

	Seulonta bioanalyttisin tai fysikaalis-kemiallisin menetelmin	Varmistusmenetelmät
Väärin vaatimustenmukaisien tulosten osuus ⁽¹⁾	< 5 %	
Oikeellisuus		– 20 % – + 20 %
Toistettavuus (RSD _r)	< 20 %	
Laboratorionsisäinen uusittavuus (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ Enimmäismäärien osalta.

5.7 Seulontamenetelmiä koskevat erityisvaatimukset

- 5.7.1 Seulontaan voidaan käyttää sekä GC-MS-menetelmiä että bioanalyttisiä menetelmiä. GC-MS-menetelmien on täytettävä 6 kohdassa esitetyt vaatimukset. Solupohjaisten bioanalyttisten menetelmien erityisvaatimukset esitetään 7 kohdassa.

- 5.7.2 Seulontamenetelmiä näytteiden rutiinitarkastuksissa käyttävien laboratorioden on tehtävä tiivistä yhteistyötä varmistusmenetelmää käyttävien laboratorioden kanssa.

- 5.7.3 Seulontamenetelmän suorituskkyky on tarkistettava rutiinianalyysin aikana analyttisellä laadunvalvonnalla ja menetelmän jatkuvalla validoinnilla. Vaatimustenmukaisia tuloksia on valvottava jatkuvalla ohjelmalla.

▼ M4

- 5.7.4 Soluvasteen mahdollinen vaimentuminen ja sytotoksisuus on tarkistettava:

Rutiiniseurannassa 20 % näyteuutteista mitataan sekä siten, että niihin on lisätty enimmäismäärää tai toimintakynnystä vastaava pitoisuus 2,3,7,8-TCDD-yhdistettä, että lisäämättä kyseistä yhdistettä, millä tarkistetaan, vaimentavatko näyteuutteessa olevat häiritsevät yhdisteet mahdollisesti määrittämenetelmän vastetta. Lisäsnäytteen pitoisuutta verrataan sellaisen näytteen pitoisuuteen, johon ei ole lisätty analyyyttiä, ja lisätyn pitoisuuden summaan. Jos tämä mitattu pitoisuus on enemmän kuin 25 % matalampi kuin laskettu pitoisuuksien summa, se on indikaatio mahdollisesta signaalin vaimentumisesta, jolloin kyseiselle näytteelle on tehtävä GC-HRMS-varmistusanalyysi. Tuloksia seurataan laadunvalvontakorteilla.

- 5.7.5 Vaatimustenmukaisten näytteiden laadunvalvonta:

Näytematriisista ja laboratoriossa saadusta kokemuksesta riippuen noin 2–10 % vaatimustenmukaisista näytteistä on varmistettava GC-HRMS-analyysillä.

- 5.7.6 Väärien vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden määrittäminen laadunvalvontatiedoista:

Enimmäismäärän tai toimintakynnyksen ylittävien ja alittavien väärien vaatimustenmukaisten tulosten osuus näytteiden seulonnassa on määritettävä. Todellisten väärien vaatimustenmukaisten tulosten osuuden on oltava alle 5 %. Kun vaatimustenmukaisten näytteiden laadunvalvonnasta on saatavissa vähintään 20 vahvistettua tulosta matriisia tai matriisiryhmää kohti, väärien vaatimustenmukaisten näytteiden osuutta koskevat johtopäätökset on tehtävä kyseisestä tietokannasta. Väärien vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden arviointia varten tarvittavaan 20 tuloksen vähimmäismäärään voidaan sisällyttää myös vertailutesteissä tai kontaminaatiotapausten yhteydessä analysoitujen näytteiden ne tulokset, joissa pitoisuudet ovat enimmillään esim. $2 \times$ enimmäismäärä. Näytteiden on katettava eri näytelähteitä edustavat yleisimmät kongeneerijakaumat.

Vaikka seulontamäärityksissä on mieluiten pyrittävä havaitsemaan toimintakynnyksen ylittävät näytteet, väärien vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden määrittämisen kriteerinä on enimmäistaso, kun otetaan huomioon mittaukseen liittyvät epävarmuustekijät varmistusmenetelmässä.

- 5.7.7 Seulonnan mahdollisesti vaatimustenvastaiset tulokset on aina tarkistettava tekemällä alkuperäisestä näytteestä täydellinen uusi analyysi varmistusmenetelmällä. Näitä näytteitä voidaan myös käyttää väärien vaatimustenvastaisten tulosten osuuden arvioimiseen. Seulontamenetelmien osalta väärien vaatimustenvastaisten tulosten osuuden muodostavat ne tulokset, joiden on varmistusmenetelmällä vahvistettu olevan vaatimustenmukaisia, vaikka edeltävän seulonnan perusteella näytteen on ilmoitettu olevan mahdollisesti vaatimustenvastainen. Seulontamenetelmän hyödyllisyyden arvioinnin on perustuttava siihen, että väärien vaatimustenvastaisten näytteiden määrää verrataan tarkistettujen näytteiden kokonaismäärään. Tämän osuuden pitää olla niin pieni, että seulontavälineen käytöstä on hyötyä.

- 5.7.8 Bioanalyttisten menetelmien on ainakin validointiolosuhteissa tuotettava pätevä indikaatio TEQ-tasosta, laskettuna ja ilmaistuna BEQ-arvona.

Bioanalyttisten menetelmien laboratorionsäisen RSD_r:n tulisi toistettavissa olosuhteissa tyypillisesti olla pienempi kuin uusittavuus RSD_R.

▼ **M4****6. Seulonnassa tai varmistuksessa käytettäviä GC-MS-menetelmiä koskevat erityisvaatimukset****6.1 WHO-TEQ-tulosten suurimman ja pienimmän arvon hyväksyttävät erot**

Enimmäismäärän tai tarvittaessa toimintakynnysten ylityksen varmistuksessa suurimman ja pienimmän arvon ero saa olla enintään 20 %.

6.2 Saantojen valvonta

6.2.1 Määrittämenettelyjen validoimiseksi on aivan menetelmän alussa eli esimerkiksi ennen uuttamista lisättävä ¹³C-leimattuja 2,3,7,8-kloorisubstituoituja sisäisiä PCDD/PCDF-standardeja ja ¹³C-leimattuja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden sisäisiä standardeja. On lisättävä vähintään yhtä näistä kongeneereista kutakin tetra-oktakloorattua PCDD/PCDF-homologiryhmää kohden ja vähintään yhtä näistä kongeneereista kutakin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden homologiryhmää kohden (tai vaihtoehtoisesti vähintään yhtä näistä kongeneereista kutakin PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden valvonnassa käytettyä massaspektrillä määritettyä ionia kohden). Varmistusmenetelmien yhteydessä on käytettävä kaikkia 17:ää ¹³C-leimattua 2,3,7,8-kloorisubstituoitua sisäistä PCDD/PCDF-standardia ja kaikkia 12:tä ¹³C-leimattua dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden sisäistä standardia.

6.2.2 Suhteelliset vastekertoimet on asianmukaista kalibrointiliuosta käyttäen määritettävä myös niille kongeneereille, joiden osalta ei lisätä ¹³C-leimattua analogia.

6.2.3 Kasviperaisista rehuista ja alle 10 % rasvaa sisältävistä eläinperäisistä rehuista otettuihin näytteisiin on lisättävä sisäiset standardit ennen uuttamista. Yli 10 % rasvaa sisältävistä eläinperäisistä rehuista otettuihin näytteisiin ne on lisättävä joko ennen rasvojen uuttamista tai uuttamisen jälkeen. Uuttamisen tehokkuus on validoitava asianmukaisesti sen mukaan, missä vaiheessa sisäiset standardit lisätään, ja sen mukaan, ilmoitetaanko tulokset tuotteessa vai rasvassa olevan pitoisuuden perusteella.

6.2.4 Ennen GC-MS-analyysia on lisättävä 1 tai 2 saantostandardia.

6.2.5 Saantojen valvonta on välttämätöntä. Varmistusmenetelmissä sisäisten standardien saantojen on oltava 60–120 %. Yksittäisten kongeneerien pienemmät tai suuremmat saantoarvot voidaan hyväksyä erityisesti hepta- ja oktakloorattujen dibentso-para-dioksiinien ja dibentsofuraanien osalta edellyttäen, että niiden vaikutus TEQ-arvoon on enintään 10 % TEQ-arvon kokonaismäärästä (perustana PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summa). GC-MS-seulontamenetelmissä saantojen on oltava 30–140 %.

6.3 Häiritsevien aineiden poistaminen

— PCDD/PCDF-yhdisteet on erotettava häiriöitä aiheuttavista klooratuista yhdisteistä — esimerkiksi muista kuin dioksiinien kaltaisista PCB-yhdisteistä ja klooratuista difenyyliettereistä — soveltuvilla kromatografiatekniikoilla (mieluiten florisil-, alumiinioksidi- ja/tai hiilikolonneilla).

— Isomeerien erotuksen kaasukromatografian avulla on oltava < 25 % huipusta huippuun 1,2,3,4,7,8-HxCDF:n ja 1,2,3,6,7,8-HxCDF:n välillä.

6.4 Kalibrointi standardikäyrän avulla

Kalibrointikäyrän vaihteluvälin laajuuden on oltava riittävä kattaakseen enimmäismäärien tai toimintakynnysten relevantin vaihteluvälin.

▼ **M4**6.5 *Varmistusmenetelmiä koskevat erityisvaatimukset*

— GC-HRMS:

HRMS-menetelmässä erotuskyvyn on yleensä oltava koko massa-alueella vähintään 10 000 käyttäen 10 % laakson määritelmää.

Tunnistamista ja varmistamista koskevien lisäkritereiden, jotka on kuvattu kansainvälisesti tunnistetussa standardissa, esim. standardissa EN 16215:2012 (Animal feed — Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS) ja/tai tarkistetuissa EPA-menetelmissä 1613 ja 1668, täyttyminen.

— GC-MS/MS:

Vähintään kahden spesifisen prekursori-ionin valvonta, joista kummallakin on spesifinen vastaava siirtymätuoteioni kaikilla leimatuilla ja leimaamattomilla analyyteillä tutkittavalla alueella.

Suhteellisten ioni-intensiteettien suurin sallittu toleranssi $\pm 15\%$ valituilla siirtymätuoteioneilla verrattuna laskettuihin tai mitattuihin arvoihin (kalibroitistandardien keskiarvo) identtisissä MS/MS-olosuhteissa, etenkin törmäysenergian ja törmäyskaasupaineen suhteen, kullakin analyytin siirtymällä.

Kunkin kvadrupolin erotuskyky asetetaan vähintään yhtä suureksi tai paremmaksi kuin yksikkömassaresoluutio (yksikkömassaresoluutio: riittävä resoluutio kahden vierekkäisillä kokonaisilla massaluvuilla olevan piikin erottumiseksi ilman merkittävää päällekkäisyyttä) tarkasteltavana oleviin analyytteihin mahdollisesti kohdistuvien häiriöiden minimoimiseksi.

Lisäkritereiden, jotka on kuvattu kansainvälisesti tunnistetussa standardissa, esim. standardissa EN 16215:2012 (Animal feed — Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS) ja/tai tarkistetuissa EPA-menetelmissä 1613 ja 1668, täyttyminen, lukuun ottamatta velvoitetta käyttää GC-HRMS-menetelmää.

7. **Bioanalyttisia menetelmiä koskevat erityisvaatimukset**

Bioanalyttiset menetelmät ovat menetelmiä, jotka perustuvat biologisiin periaatteisiin, esimerkiksi solupohjaiset määritykset, reseptorimääritykset tai immunomääritykset. Tässä 7 kohdassa vahvistetaan bioanalyttisia menetelmiä koskevat yleiset vaatimukset.

Seulontamenetelmän perusteella periaatteessa luokitellaan, onko näyte vaatimusten mukainen vai epäilläänkö, ettei se täytä vaatimuksia. Lasketta BEQ-arvoa verrataan tätä varten cut-off-arvoon (ks. 7.3 kohta). Jos näytteen arvo on alle cut-off-arvon, sitä pidetään vaatimustenmukaisena. Jos näytteen arvo on yhtä suuri tai suurempi kuin raja-arvo, näytteen epäillään olevan vaatimusten vastainen, ja sille on tehtävä analyysi varmistusmenetelmällä. Käytännössä cut-off-arvona voidaan pitää BEQ-arvoa, joka on 2/3 enimmäismäärästä, edellyttäen, että väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuus jää alle 5 %:n ja että väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuus on hyväksyttävä. Koska PCDD/PCDF-yhdisteillä sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalla on erilliset enimmäismäärät, näytteiden vaatimustenmukaisuuden tarkistaminen ilman fraktiointitilausta edellyttää, että PCDD/PCDF-yhdisteillä on tarkoituksenmukaiset cut-off-arvot biotestejä varten. Toimintakynnykset ylittävien näytteiden tarkastuksen yhteydessä cut-off-arvoksi soveltuu tarkoituksenmukainen prosenttiosuus kustakin toimintakynnyksestä.

Joidenkin bioanalyttisten menetelmien tapauksessa voidaan antaa BEQ-arvona ilmaistu indikaatiivinen määrä sellaisia näytteitä varten, jotka sisältyvät mittausalueelle ja ylittävät raportointirajan (ks. 7.1.1 ja 7.1.6 kohta).

▼ **M4**7.1 *Testivasteen arviointi*7.1.1 *Yleiset vaatimukset*

- Laskettaessa pitoisuuksia TCDD-kalibrointikäyrän avulla käyrän alaja yläpäässä olevissa arvoissa on suurta vaihtelua (korkea variaatio-kerroin, jäljempänä 'CV'). Mittausalue on alue, jossa tämä CV on alle 15 %. Mittausalueen ala-arvo (raportointiraja) on asetettava nollanäytettä korkeammaksi soveltamalla vähintään kerrointa kolme. Mittausalueen yläarvo esitetään yleensä EC₇₀-arvona (70 % vaikuttavan pitoisuuden enimmäismäärästä), mutta se on matalampi, jos CV on suurempi kuin 15 % tällä vaihteluvälillä. Mittausalue on määritettävä validoinnin aikana. Cut-off-arvojen (ks. 7.3 kohta) on oltava selvästi mittausalueen sisällä.
- Standardiliuokset ja näyteuutteet on testattava vähintään kahtena toistomäärityksenä. Toistomäärityksiä käytettäessä mikrotitrauslevyn eri osista valituissa 4–6 kuopassa testatun standardiliuoksen tai varmistusuutteen on tuotettava vaste tai pitoisuus (mahdollinen vain mittausalueella), jossa CV < 15 %.

7.1.2 *Kalibrointi*

7.1.2.1 Kalibrointi standardikäyrän avulla

- Näytteissä olevat pitoisuudet on arvioitava vertaamalla testivastetta TCDD:n (tai PCB 126:n tai PCDD:n/PCDF:n/dioksiinien kaltaisen PCB:n standardiseoksen) kalibrointikäyrään ja laskemalla sen perusteella BEQ-arvo uutteesta ja sitä kautta näytteessä.
- Kalibrointikäyriin on sisällyttävä 8–12 pitoisuutta (ainakin toistomäärityksinä) siten, että käyrän alapäässä on riittävästi pitoisuuksia (mittausalue). Erityistä huomiota on kiinnitettävä käyrän sovitukseen mittausalueella. R²-arvolla sellaisenaan on vain vähäinen tai olematon arvo arvioitaessa epälineaarisen regression sovitusta. Parempi sovitus saadaan aikaan minimoimalla laskettujen ja havaittujen määrien välinen ero, esimerkiksi minimoimalla neliöön korotettujen jäämien summa.
- Seuraavaksi näyteuutteen arvioitu pitoisuus on korjattava matriisi/liuotin-nollanäytteelle lasketun BEQ-arvon (jotta otetaan huomioon epäpuhtaudet käytetyistä liuottimista ja kemikaaleista) ja korjatun saannon perusteella (lasketaan sellaisten soveltuvien vertailunäytteiden BEQ-arvosta, joissa on edustava kongeneerijakauma lähellä enimmäismäärää tai toimintakynnystä olevilla pitoisuuksilla). Jotta saanto voidaan korjata, korjatun saannon on oltava vaadittavan vaihteluvälin sisällä (ks. 7.1.4 kohta). Saannon korjaamisessa käytettävien vertailunäytteiden on täytettävä 7.2 kohdassa esitetyt vaatimukset.

7.1.2.2 Kalibrointi vertailunäytteiden avulla

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kalibrointikäyrää, joka on tuotettu vähintään neljän vertailunäytteen avulla (ks. 7.2.4 kohta: voidaan ottaa yksi matriisinolla ja kolme vertailunäytettä, joiden pitoisuudet ovat 0,5 ×, 1,0 × ja 2,0 × enimmäismäärä tai toimintakynnys), jolloin nollanäytettä ja saantoa ei tarvitse korjata. Tällöin testivaste, joka vastaa 2/3 enimmäismäärästä (ks. 7.3 kohta), voidaan laskea suoraan näistä näytteistä ja sitä voidaan käyttää cut-off-arvona. Toimintakynnykset ylittävien näytteiden tarkastuksen yhteydessä cut-off-arvoksi soveltuu tarkoituksenmukainen prosenttiosuus kustakin toimintakynnyksestä.

▼ **M4**7.1.3 *PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden erillinen määrittäminen*

Uutteet voidaan jakaa PCDD/PCDF-yhdisteitä ja dioksiinien kaltaisia PCB-yhdisteitä sisältäviin fraktioihin, jotta PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden TEQ-arvot (BEQ:ina) voidaan ilmoittaa erillisinä. Dioksiinien kaltaisia PCB-yhdisteitä sisältävän fraktion tulosten arvioinnissa olisi käytettävä PCB 126:n standardilla tuotettua kalibrointikäyrää.

7.1.4 *Biotestien korjatut saannot*

”Biotestin korjattu saanto” on laskettava soveltuvista vertailunäytteistä, joissa kongeneerijakauma on lähellä enimmäismäärää tai toimintakynnystä ja ilmaistaan prosenttiosuutena BEQ-arvosta verrattuna TEQ-arvoon. Sen mukaan, minkä tyyppistä testiä ja TEF-arvoja⁽⁹⁾ käytetään, dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteisiin sovellettavien TEF- ja REP-kertoimien väliset erot voivat johtaa siihen, että dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden korjatut saannot ovat matalia PCDD/PCDF-yhdisteisiin verrattuna. Jos PCDD/PCDF-yhdisteille ja dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille tehdään erillinen määrittäminen, biotestien korjatut saannot ovat sen vuoksi seuraavat: dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille 20–60 % ja PCDD/PCDF-yhdisteille 50–130 % (vaihteluvälejä sovelletaan TCDD:n kalibrointikäyrään). Koska dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden vaikutus PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summaan voi vaihdella eri matriisien ja näytteiden välillä, biotestin korjatut saannot PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summan osalta heijastavat näitä vaihteluvälejä ja niiden on oltava 30–130 %. Jos unionin lainsäädännössä ilmenee merkittävästi muutettuja PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden TEF-arvoja, kyseiset vaihteluvälit on tarkistettava.

7.1.5 *Saantojen valvonta puhdistusta varten*

Yhdisteiden hävikki puhdistuksen aikana on tarkistettava validoinnin yhteydessä. Nollanäyte, johon on lisätty eri kongeneerien seosta, on puhdistettava (vähintään $n = 3$), ja saanto ja vaihtelevuus on tarkistettava varmistusmenetelmällä. Saannon on oltava 60–120 % etenkin niiden kongeneerien osalta, joiden vaikutus eri seosten TEQ-arvoon on enemmän kuin 10 %.

7.1.6 *Raportointiraja*

BEQ-arvoista raportoimista varten on määritettävä raportointiraja relevanttien matriisinäytteiden perusteella, joilla on tyypillinen kongeneerijakauma, mutta ei standardien kalibrointikäyrän perusteella, koska käyrän ala-arvojen tarkkuus ei ole riittävä. Uuttamisen ja puhdistuksen vaikutukset on otettava huomioon. Raportointiraja on asetettava nollanäytettä korkeammaksi soveltamalla vähintään kerrointa kolme.

7.2 *Vertailunäytteiden käyttö*

7.2.1 Vertailunäytteiden on edustettava näytematriisia, kongeneerijakaumia ja pitoisuusalueita PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden osalta lähellä enimmäismäärää tai toimintakynnystä olevilla pitoisuuksilla.

7.2.2 Kuhunkin testisarjaan on sisällytettävä matriisinolla tai mieluiten nollanäyte sekä viitenäyte, jonka pitoisuus vastaa enimmäismäärää tai toimintakynnystä. Nämä näytteet on uutettava ja testattava samanaikaisesti identtisissä oloissa. Vertailunäytteen vasteen on oltava selvästi kohonnut verrattuna nollanäytteeseen, jotta testin soveltuvuus olisi taattu. Näitä näytteitä voidaan käyttää nolla- ja saantokorjauksiin.

⁽⁹⁾ Nykyiset vaatimukset perustuvat seuraavassa asiakirjassa julkaistuihin TEF-arvoihin: M. Van den Berg *et al.*, *Toxicol Sci* 93 (2), 223–241 (2006).

▼ M4

7.2.3 Saantokorjauksen suorittamiseen valittujen vertailunäytteiden on edustettava testinäytteitä, eli näytteiden kongeneerijakaumat eivät saa johtaa määrien aliarvioimiseen.

7.2.4 Lisäksi voidaan käyttää esimerkiksi 0,5- ja 2-kertaista enimmäismäärää tai toimintakynnystä edustavia ylimääräisiä vertailunäytteitä, joilla osoitetaan testin toimivuus halutulla mittausalueella enimmäismäärän tai toimintakynnyksen valvontaa varten. Yhdessä näitä näytteitä voidaan käyttää testinäytteiden BEQ-arvojen laskemiseen (ks. 7.1.2.2 kohta).

7.3 *Cut-off-arvojen määrittäminen*

BEQ-arvoina ilmaistujen bioanalyttisten tulosten ja TEQ-arvoina ilmaistujen varmistusmenetelmän tulosten välinen suhde on määritettävä esimerkiksi kalibroinnilla, jossa vertailunäytteisiin, joissa on samanlainen matriisi, on lisätty analyttia $0 \times$, $0,5 \times$, $1 \times$ ja $2 \times$ enimmäismäärä, ja jossa kukin näyte määritetään 6 kertaa ($n = 24$). Korjauskertoimet (nolla ja saanto) voidaan arvioida tämän suhteen perusteella, mutta ne on tarkistettava 7.2.2 kohdan mukaisesti.

Cut-off-arvot on määritettävä sen arvioimiseksi, vastaako näyte enimmäismääriä koskevia vaatimuksia, tai tarvittaessa toimintakynnyksen valvontaa varten, ja vastaavat enimmäismäärät tai toimintakynnykset on vahvistettava joko erikseen PCDD/PCDF-yhdisteille ja dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille taikka PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle. Niitä edustaa bioanalyttisten tulosten jakauman *alempi* piste (korjattuna nollanäytteelle ja saannolle), joka vastaa varmistusmenetelmän päätösrajaa 95 %:n luottamusrajalla, mikä tarkoittaa, että väärien vaatimustenmukaisten tulosten osuus on $< 5 \%$ ja $RSD_R < 25 \%$. Varmistusmenetelmän päätösraja on sama kuin enimmäismäärä, kun otetaan huomioon mittausepävarmuus.

Cut-off-arvo (BEQ-arvona ilmaistuna) voidaan laskea 7.3.1, 7.3.2 tai 7.3.3 kohdassa esitetyn mallin avulla (ks. kuva 1).

7.3.1 Kun käytetään 95 %:n ennustevälin *alempaa* kaistaa varmistusmenetelmän päätösrajalla:

$$\text{Cut-off-arvo} = \text{BEQ}_{DL} - S_{y,x} * t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

jossa

BEQ_{DL} varmistusmenetelmän päätösrajaa vastaava BEQ, joka vastaa enimmäismäärää mittausepävarmuus mukaan luettuna

$S_{y,x}$ jäännöksen keskihajonta

$t_{\alpha, f=m-2}$ Studentin kerroin ($\alpha = 5 \%$, $f =$ vapausasteet, yksipuoliset)

m kalibrointipisteiden kokonaismäärä (indeksi j)

n toistojen lukumäärä kullakin tasolla

x_i näytteen pitoisuus (TEQ-arvona) kalibrointipisteessä i varmistusmenetelmällä määritettynä

$\bar{x}$ kaikkien kalibrointinäytteiden pitoisuuksien keskiarvo (TEQ-arvona)

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$ neliösummamuuuttuja, $i =$ kalibrointipisteen i indeksi

7.3.2 Laskeminen (nollan ja saannon suhteen korjatusta) bioanalyttisistä tuloksista, kun on analysoitu useita näytteitä ($n \geq 6$), jotka on kontaminoitu varmistusmenetelmän päätösrajalla, joka on mittaus tulosten jakauksen *alempi* piste vastaavalla BEQ:n keskiarvolla:

▼ M4

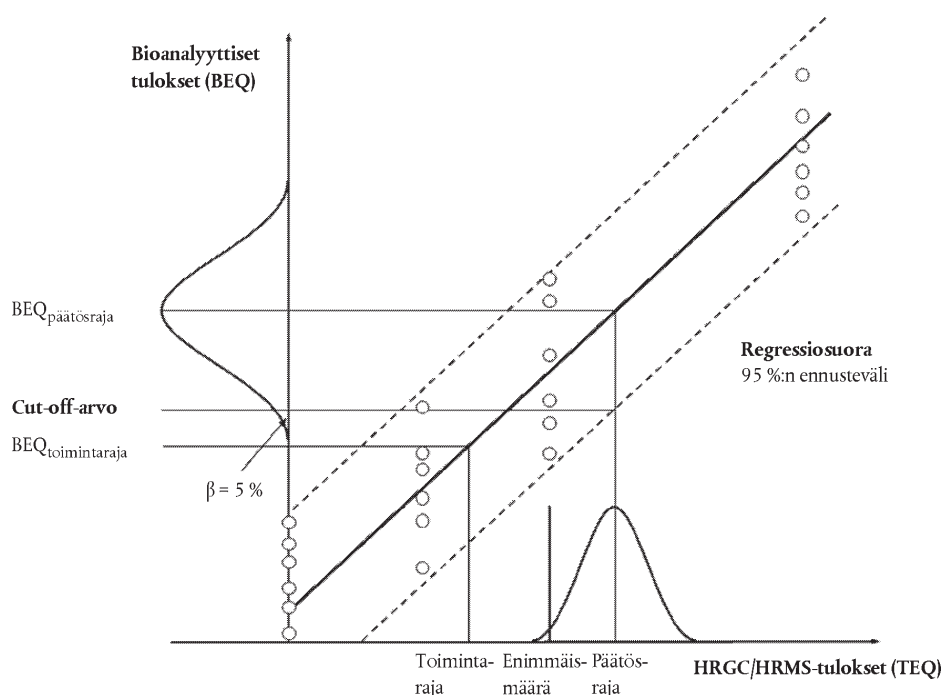
$$\text{Cut-off-arvo} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

jossa

SD_R biologisten määrittystulosten keskihajonta kohdassa BEQ_{DL} , mitattuna laboratorionsisäisissä uusittavuusoloissa

- 7.3.3 Laskeminen bioanalyttisten tulosten keskiarvona (BEQ -arvona, korjattuna nollan ja saannon suhteen), kun on analysoitu useita näytteitä ($n > 6$), jotka on kontaminoitu tasolla 2/3 enimmäismäärästä tai toimintakynnyksestä. Tämä perustuu havaintoon siitä, että kyseinen pitoisuus on 7.3.1 tai 7.3.2 kohdan mukaan määritetyn cut-off-arvon lähistöllä:

Kuva 1



Kuva 1. 95 %:n luottamustasoon perustuva cut-off-arvon laskenta, mikä tarkoittaa, että väärien vaatimustenmukaisten tulosten osuus on $< 5 \%$ ja $\text{RSD}_R < 25 \%$:

1. kun käytetään 95 %:n ennustevälin *alempaa* kaistaa varmistusmenetelmän päätösrajalla
2. kun on analysoitu useita näytteitä ($n > 6$), jotka on kontaminoitu varmistusmenetelmän päätösrajalla, joka on mittaustulosten jakauman *alempi* piste (jota kuvassa esittää kellonmuotoinen käyrä) vastaavalla BEQ :n keskiarvolla.

7.3.4 Cut-off-arvoja koskevat rajoitukset

BEQ -arvoihin perustuvat cut-off-arvot, jotka on laskettu validoinnin aikana saadusta RSD_R -arvosta käyttämällä rajallista määrää näytteitä, joiden matriisit ja/tai kongeneerijakaumat ovat erilaisia, saattavat olla korkeammat kuin TEQ -arvoihin perustuvat enimmäismäärät tai toimintakynnykset, koska tarkkuus on tällöin parempi kuin rutiinitesteissä, kun mahdollisten kongeneerijakaumien tuntematon spektri on tarkastettava. Tällöin cut-off-arvot on laskettava siten, että $\text{RSD}_R = 25 \%$, tai mieluiten on käytettävä kaksi kolmasosaa enimmäismäärästä tai toimintakynnyksestä.

7.4 Suorituskykyä koskevat tiedot

▼ **M4**

- 7.4.1 Koska bioanalyttisissä menetelmissä ei voida käyttää sisäisiä standardeja, bioanalyttisten menetelmien toistettavuus on testattava, jotta saadaan tietoa yksittäisen koesarjan sisäisestä ja koesarjojen välisestä keskihajonnasta. Toistettavuuden on oltava alle 20 % ja laboratorionsisäisen uusittavuuden alle 25 %. Tämän on perustuttava BEQ-arvona ilmaistuihin laskettuihin määriin nolla- ja saantokorjauksen jälkeen.
- 7.4.2 Validointiprosessin yhteydessä on osoitettava, että testillä pystytään erottamaan toisistaan nolla- ja cut-off-arvo, jolloin vastaavan cut-off-arvon ylittävät näytteet voidaan tunnistaa (ks. 7.1.2 kohta).
- 7.4.3 On määriteltävä kohdeyhdisteet, mahdolliset häiriöt sekä suurimmat hyväksyttävät nollatasot.
- 7.4.4 Vasteen tai vasteesta lasketun pitoisuuden (mahdollista ainoastaan mitausalueella) prosentuaalinen keskihajonta kunkin näyteuutteen kolmin kertaisessa määrityksessä saa olla enintään 15 %.
- 7.4.5 BEQ-arvoina ilmaistuja vertailunäytte(id)en korjaamattomia tuloksia (nollanäyte ja enimmäistasolla tai toimintakynnyksellä) käytetään bioanalyttisen menetelmän suorituskvyn arviointiin vakiomittaisella ajankaksolla.
- 7.4.6 Nollanäytteille ja kullekin vertailunäytetyypille on luotava laadunvalvontakortit, jotka on tarkastettava. Näin varmistetaan, että analyttinen suorituskvyy vastaa vaatimuksia. Tämä koskee etenkin nollanäytteiden ja mittausalueen ala-arvojen välistä vähimmäiseroa ja vertailunäytteiden laboratorionsisäistä uusittavuutta. Nollanäytteet on tarkastettava huolellisesti, jotta vältetään väärät vaatimustenmukaiset tulokset vähentämisen yhteydessä.
- 7.4.7 Tulokset varmistusmenetelmillä saaduista vaatimustenvastaisiksi epäilyistä näytteistä ja 2–10 prosentista vaatimustenmukaisia näytteitä (vähintään 20 näytettä matriisia kohden) on koottava, ja niitä on käytettävä seulontamenetelmän suorituskvyn sekä BEQ-arvon ja TEQ-arvon välisen suhteen arvioimisessa. Tätä tietokantaa voidaan hyödyntää rutiininäytteisiin sovellettavien cut-off-arvojen uudelleen arvioinnissa validoitujen matriisien osalta.
- 7.4.8 Menetelmän hyvä suorituskvyy voidaan osoittaa myös osallistumalla vertailutesteihin. Jos laboratorio kykenee osoittamaan hyvän suorituskvynsä, vertailutesteissä analysoidujen näytteiden tulokset, joissa pitoisuudet ovat enimmillään esim. $2 \times$ enimmäismäärä, voidaan sisällyttää väärin vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden arviointiin. Näytteiden on katettava eri näytelähteitä edustavat yleisimmät kongeneerijakaumat.
- 7.4.9 Kontaminaatiotapauksissa cut-off-arvot voidaan arvioida uudelleen ottaen huomioon näytematriisi ja tapauksessa esiintyneet kongeneerijakaumat.

8. Tulosten raportointi**8.1 Varmistusmenetelmät**

- 8.1.1 Jos käytetty määrittymenelmä sallii, määrittystuloksiin on sisällyttävä yksittäisten PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet. Tulokset on ilmoitettava pienimpinä, suurimpina ja väliarvoina, jotta tulosten raportointiin saadaan mukaan mahdollisimman paljon tietoa. Näin tuloksia pystytään tulkitsemaan kulloistenkin vaatimusten mukaisesti.
- 8.1.2 Raportissa on myös ilmoitettava PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden ja uuttamisessa käytetty menetelmä.
- 8.1.3 Yksittäisten sisäisten standardien saantotiedot on ilmoitettava, jos saantojen arvot ovat 6.2.5 kohdassa mainitun alueen ulkopuolella tai jos enimmäismäärä ylittyy (tällöin on ilmoitettava jommankumman toistomäärityksen saantotiedot). Muissa tapauksissa ne on toimitettava pyydettyä.

▼ **M4**

- 8.1.4 Koska mittausepävarmuus on otettava huomioon päätettäessä näytteen vaatimustenmukaisuudesta, tiedot tästä muuttujasta on ilmoitettava. Siksi määrittystulos on ilmoitettava muodossa $x \pm U$, jossa x on määrittystulos ja U on laajennettu mittausepävarmuus, jossa käytetään kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 %. Jos PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet määritetään erikseen, PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden erillisten määrittystulosten yhteenlaskettua arvioitua laajennettua epävarmuutta on käytettävä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien summana.
- 8.1.5 Jos mittausepävarmuus otetaan huomioon soveltamalla päätösrajaa $CC\alpha$ (I luvun 2.2 kohdassa kuvatulla tavalla), tiedot tästä muuttujasta on ilmoitettava.
- 8.1.6 Tulokset on ilmaistava samoina yksikköinä ja vähintään yhtä monen merkitsevän numeron tarkkuudella kuin direktiivissä 2002/32/EY vahvistetut enimmäispitoisuudet.
- 8.2 *Bioanalyttiset seulontamenetelmät*
- 8.2.1 Seulonnan tuloksen perusteella näytteen ilmoitetaan olevan ”vaatimustenmukainen” tai sen ”epäillä olevan vaatimustenvastainen”.
- 8.2.2 Lisäksi tulos voidaan ilmaista PCDD/PCDF-yhdisteiden ja/tai dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden osalta BEQ-arvona eikä TEQ-arvona.
- 8.2.3 Jos näytteen vaste on raportointirajan alapuolella, näytteellä ilmoitetaan olevan ”raportointirajaa matalampi arvo”.
- 8.2.4 Kunkin näyttematriisityypin osalta raportissa on mainittava enimmäismäärä tai toimintakynnys, johon arviointi perustuu.
- 8.2.5 Raportissa on mainittava käytetyn testin tyyppi, testin peruserä ja kalibrointimenetelmä.
- 8.2.6 Raportissa on myös ilmoitettava PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden ja uuttamisessa käytetty menetelmä.
- 8.2.7 Jos näytteiden epäillä olevan vaatimusten vastaisia, raporttiin on liitettävä selvitys toteutettavista toimenpiteistä. Jos näytteissä on merkittäviä PCDD/PCDF-pitoisuuksia sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summan pitoisuuksia, kohonneet pitoisuudet on määritettävä tai vahvistettava varmistusmenetelmän avulla.

III LUKU

Näytteiden valmistus ja vaatimukset, jotka koskevat muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) pitoisuuksien virallisessa valvonnassa käytettäviä määrittämenetelmiä

1. Soveltamisala

Tässä luvussa vahvistettuja vaatimuksia on sovellettava analysoitaessa rehuja muiden kuin dioksiinien kaltaisten polykloorattujen bifenyylien (muut kuin dioksiinien kaltaiset PCB:t) pitoisuuksien virallista valvontaa ja muita sääntelytarkoituksia varten.

2. Soveltuvat osoitusmenetelmät

Kaasukromatografia-elektronisieppausdetektio (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS tai vastaavat menetelmät.

3. Tarkasteltavana olevien analyttien tunnistus ja varmistus

- 3.1 Suhteellinen retentioaika verrattuna sisäisiin standardeihin tai vertailustandardeihin (hyväksyttävä poikkeama $\pm 0,25$ %).

▼ M4

- 3.2 On varmistettava, että kaikki kuusi indikaattori-PCB-yhdistettä (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 ja PCB 180) erotetaan mittausta häiritsevista aineista ja eritoten mukana eluoituvista PCB-yhdisteistä kaasukromatografian avulla, erityisesti jos joidenkin näytteiden pitoisuudet ovat laillisissa rajoissa, ja vaatimustenvastaisuus on vahvistettava.

[Mukana eluoituvia kongeneereja ovat usein esimerkiksi PCB 28/31, PCB 52/69 ja PCB 138/163/164. GC-MS-menetelmien osalta on otettava huomioon myös mahdolliset useampia klooriatomeja sisältävien kongeneerien aiheuttamat häiriöt.]

3.3 GC-MS-tekniikkaa koskevat vaatimukset

Vähintään seuraavien valvonta:

- kaksi spesifistä ionia HRMS-menetelmässä,
- kaksi spesifistä ionia, joiden $m/z > 200$, tai kolme spesifistä ionia, joiden $m/z > 100$, LRMS-menetelmässä;
- 1 prekursori- ja 2 tuoteionia MS-MS-menetelmässä.

Suurimmat sallitut toleranssit valikoitujen massafragmenttien määrien suhteille:

Valikoitujen massafragmenttien määräsuhteen suhteellinen poikkeama teoreettisesta määrästä tai kohdeionin (runsaimmin esiintyvä mitattu ion) ja sekundaaris(t)en ion(i)e(n) kalibrointistandardista:

Sekundaaris(t)en ion(i)e(n) suhteellinen intensiteetti verrattuna kohdeioniin	GC-EI-MS (suhteellinen poikkeama)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (suhteellinen poikkeama)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 %–50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 %–20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % ⁽¹⁾	± 50 % ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Saatavilla on riittävä lukumäärä massafragmentteja, joiden suhteellinen intensiteetti on yli 10 %, joten ei ole suositeltavaa käyttää sekundaarista ionia, jonka suhteellinen intensiteetti on alle 10 % kohdeioniin verrattuna.

3.4 GC-ECD-tekniikoita koskevat vaatimukset

Toleranssin ylittävät tulokset on varmistettava kahdella kaasukromatografikolonnilla, joiden stationäärifasiin polariteetti on erilainen.

4. Menetelmän suorituskyvyn osoittaminen

Menetelmän suorituskyky on validoitava enimmäispitoisuuden mittausalueella ($0,5\text{--}2 \times$ enimmäismäärä), ja toistettujen mittausten variaatiokerroin on oltava hyväksyttävä (ks. 9 kohta, kohtalaista tarkkuutta koskevat vaatimukset).

5. Määritysraja

Nolla-arvot eivät saa ylittää 30:tä prosenttia enimmäistasoa vastaavasta kontaminaatiotasosta ⁽¹⁰⁾.

6. Laadunvalvonta

Nollanäytteiden säännöllinen mittaus; sellaisten näytteiden analyysi, joihin on lisätty analyyttiä; laadunvalvontanäytteet; osallistuminen asianomaisia matriiseja koskeviin laboratorioden välisiin tutkimuksiin.

7. Saantojen valvonta

- 7.1 On käytettävä sopivia sisäisiä standardeja, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ovat vastaavat kuin tarkasteltavana olevilla analyteillä.

⁽¹⁰⁾ On erittäin suositeltavaa, että reagenssinolla vaikuttaa vain vähän näytteessä olevan kontaminantin tasoon. Laboratorion on seurattava nollatasojen vaihtelua etenkin, jos nollatasot vähennetään mittausarvoista.

▼ M4**7.2 Sisäisten standardien lisääminen:**

Lisääminen tuotteisiin (ennen uuttoja ja puhdistusta).

7.3 Vaatimukset menetelmille, joissa käytetään kaikkia kuutta isotooppileimattua indikaattori-PCB-kongeneeria:

- a) tulokset on oikaistava sisäisten standardien saantojen suhteen,
- b) isotooppileimattujen sisäisten standardien saantojen on oltava 50–120 %,
- c) pienemmät tai suuremmat saannot voidaan hyväksyä yksittäisille kongeneereille, jos niiden osuus kuuden indikaattori-PCB-yhdisteen yhteismäärästä on alle 10 %.

7.4 Vaatimukset menetelmille, joissa ei käytetä kaikkia kuutta isotooppileimattua sisäistä standardia tai muuta sisäistä standardia:

- a) sisäisten standardien saannot on tarkastettava kaikista näytteistä,
- b) sisäisten standardien saantojen on oltava 60–120 %,
- c) tulokset on oikaistava sisäisten standardien saantojen suhteen.

7.5 Leimaamattomien kongeneerien saannot tarkastetaan sellaisten näytteiden avulla, joihin on lisätty analyttää, tai laadunvalvontanäytteiden avulla, joiden pitoisuudet ovat enimmäismäärän vaihteluvälillä. Näiden kongeneerien hyväksyttävät saannot ovat 70–120 %.**8. Laboratorioita koskevat vaatimukset**

Asetuksen (EY) N:o 882/2004 säännösten mukaisesti laboratorioiden on oltava ISO-oppaan 58 mukaisesti toimivan tunnustetun laitoksen hyväksymiä, millä varmistetaan, että laboratoriot soveltavat analyttistä laadunvarmistusta. Laboratorioiden hyväksyntä on tehtävä EN ISO/IEC 17025 -standardin mukaisesti.

9. Suorituskykyä koskevat tiedot: kriteerit, jotka koskevat kuuden indikaattori-PCB-yhdisteen summaa enimmäismäärän tasolla

Oikeellisuus	– 30 % + 30 %
Kohtalainen tarkkuus (RSD%)	≤ 20 %
Suurimman ja pienimmän arvon erotus	≤ 20 %

10. Tulosten raportointi**10.1 Mikäli määritysmenetelmä sallii, analyysin tuloksiin on sisällyttävä yksittäisten PCB-kongeneerien pitoisuudet ja tulokset on ilmoitettava pienimpinä, suurimpina ja väliarvoina, jotta tulosten raportointiin saataisiin mukaan mahdollisimman paljon tietoja. Näin tuloksia pystytään tulkitsemaan kulloistekin vaatimusten mukaisesti.****10.2 Raportissa on ilmoitettava PCB-yhdisteiden ja rasvojen uuttamisessa käytetty menetelmä.****10.3 Yksittäisten sisäisten standardien saantotiedot on toimitettava, jos saantojen arvo on 7 kohdassa tarkoitetun alueen ulkopuolella tai jos enimmäismäärä ylittyy. Muissa tapauksissa ne on toimitettava pyydettyä.**

▼ M4

- 10.4 Koska mittausepävarmuus on otettava huomioon päätettäessä näytteen vaatimustenmukaisuudesta, tiedot tästä muuttujasta on myös ilmoitettava. Siksi määrittystulos on ilmoitettava muodossa $x \pm U$, jossa x on määrittystulos ja U on laajennettu mittausepävarmuus, jossa käytetään kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 %.
- 10.5 Jos mittausepävarmuus otetaan huomioon soveltamalla päätösrajaa $CC\alpha$ (I luvun 2.1 kohdassa kuvatulla tavalla), tiedot tästä muuttujasta on ilmoitettava.
- 10.6 Tulokset on ilmaistava samoina yksikköinä ja vähintään yhtä monen merkitsevän numeron tarkkuudella kuin direktiivissä 2002/32/EY vahvistetut enimmäismäärät.

▼ **M2***LIITE VI***REHUIEN SISÄLTÄMIEN ELÄINPERÄISTEN AINESOSIEN
MÄÄRITYSMENETELMÄT REHUIEN VIRALLISTA VALVONTAA
VARTEN****1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA**

Rehujen eläinperäiset ainesosat olisi määritettävä valomikroskopiolla tai polymeerasiketjureaktiolla (PCR) tässä liitteessä vahvistettujen säännösten mukaisesti.

Näillä kahdella menetelmällä on mahdollista havaita eläinperäisten ainesosien esiintyminen rehuaineissa ja rehuseoksissa. Niillä ei kuitenkaan ole mahdollista laskea kyseisten ainesosien määrää rehuaineissa ja rehuseoksissa. Kummankin menetelmän toteamisraja on alle 0,1 % (w/w).

PCR-menetelmän ansiosta rehuaineissa ja rehuseoksissa esiintyvien eläinperäisten ainesosien taksonominen ryhmä on mahdollista tunnistaa.

Näitä menetelmiä on käytettävä valvottaessa asetuksen (EY) N:o 999/2001 7 artiklan 1 kohdassa ja liitteessä IV sekä asetuksen (EY) N:o 1069/2009 11 artiklan 1 kohdassa säädettyjen kieltojen täytäntöönpanoa.

Näitä menetelmiä voidaan käyttää joko yksin tai yhdessä testattavasta rehutyyppistä riippuen yhden operatiivisen protokollan puitteissa rehuissa esiintyvää eläinproteiinia käsittelevän EU:n vertailulaboratorion (EURL-AP) laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden (Standard Operating Procedures, SOP) ⁽¹⁾ mukaisesti.

2. MENETELMÄT**2.1 Valomikroskopia****2.1.1 Periaate**

Määritettäväksi lähetetyissä rehuaineissa ja rehuseoksissa mahdollisesti esiintyvät eläinperäiset ainesosat tunnistetaan tyypillisten mikroskooppisesti tunnistettavissa olevien ominaisuuksien, kuten lihassäikeiden ja muiden lihan palojen, ruston, luiden, sarvien, karvojen, harjasten, veren, höyhenten, munankuorten, kalanluiden ja suomujen, perusteella.

2.1.2 Reagenssit ja laitteet**2.1.2.1 Reagenssit****2.1.2.1.1 Konsentroitireagenssi****2.1.2.1.1.1 Tetrakloorietyleenin (suhteellinen tiheys 1,62).****2.1.2.1.2 Värjäysreagenssi****2.1.2.1.2.1 Alitsariinipunaluos (laimennetaan 2,5 ml:aa 1 M:n kloorivetyhappoon 100 ml:aan vettä ja lisätään liuokseen 200 mg alitsariinipunaista).****2.1.2.1.3 Kiinnitysreagenssit****2.1.2.1.3.1 Lipeä (NaOH 2,5 % w/v tai KOH 2,5 % w/v).**

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

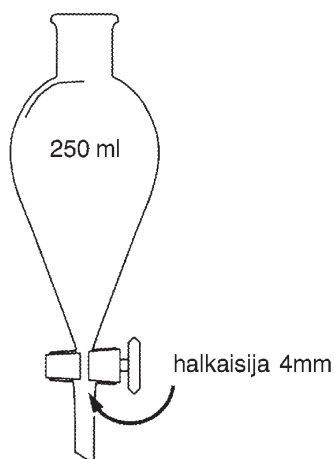
▼ **M2**

- 2.1.2.1.3.2 Glyseroli (laimentamaton, viskositeetti: 1 490 cP).
- 2.1.2.1.3.3 Norland ® Optical Adhesive 65 (viskositeetti: 1 200 cP) tai hartsi, jolla on kestopreparaatin valmistukseen soveltuvat ominaisuudet.
- 2.1.2.1.4 Kiinnitysreagenssit, joilla on värjäysominaisuuksia
- 2.1.2.1.4.1 Lugolin liuos (2 g kaliumjodidia liuotetaan 100 ml:aan vettä ja lisätään 1 g jodia ja sekoitetaan useita kertoja).

- 2.1.2.1.4.2 Kystiinireagenssi (2 g lyijyasetaattia, 10 g NaOH/100 ml vettä).
- 2.1.2.1.4.3 Fehlingin liuos (valmistetaan ennen käyttöä kahdesta samansuuruisesta osasta (1/1) varastoliuosta A ja B. Liuos A: liuotetaan 6,9 g:aa kupari(II)sulfaattipentahydraattia 100 ml:aan vettä. Liuos B: liuotetaan 34,6 g:aa kaliumnatriumtartraattitetrahydraattia ja 12 g:aa NaOH:ta 100 ml:aan vettä).

- 2.1.2.1.4.4 Tetrametyylibentsidiini/vetyperoksidi (liuotetaan 1 g 3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiiniä (TMB) 100 ml:aan jäätikkää ja 150 ml:aan vettä. Ennen käyttöä 4 osaa TMB-liuosta sekoitetaan yhteen osaan 3-prosenttista vetyperoksidia).

- 2.1.2.1.5 Pesureagenssit
- 2.1.2.1.5.1 Etanoli ≥ 96 % (tekninen laatu).
- 2.1.2.1.5.2 Asetoni (tekninen laatu).
- 2.1.2.1.6 Värinpoistoreagenssi
- 2.1.2.1.6.1 Kaupallinen natriumhypokloriittiliuos (9–14 % aktiivista klooria).
- 2.1.2.2 Laitteet
- 2.1.2.2.1 Analyysivaaka, tarkkuus 0,001 g.
- 2.1.2.2.2 Jauhamisvälineet: mylly tai huhmare.
- 2.1.2.2.3 Seulat, joissa on neliönmuotoiset reiät, silmäkoko 0,25 mm ja 1 mm.
- 2.1.2.2.4 Kartiomainen erotussuppilo, lasia, 250 ml, jonka pohjalla on teflon- tai lasihioshana sulkutulppana. Sulkutulpan halkaisijan on oltava avattuna ≥ 4 mm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kartiopohjaista selkeytysastiaa, jos laboratorio on osoittanut, että toteamisrajat ovat vastaavia kuin lasista kartionmuotoista erotussuppiloa käytettäessä.

Erotussuppilo

▼ M2

2.1.2.2.5 Stereomikroskooppi, jonka suurennusväli on ainakin 6,5×–40×.

2.1.2.2.6 Läpivalaisumikroskooppi, jonka suurennusväli on vähintään 100×–400×. Lisäksi voidaan käyttää polarisoitua valomikroskopiaa ja differentiaali-interferenssikontrastimikroskopiaa.

2.1.2.2.7 Tavanomaiset laboratorion lasiastiat

2.1.2.2.8 Objektilasien valmisteluvälineet: tavalliset objektilasit, objektilasit, joissa on syvennys, peitelasit (20 × 20 mm), pinsetit, ohut spaatteli.

2.1.3 *Näytteenotto ja näytteiden valmistelu*

2.1.3.1 Näytteenotto

Käytetään liitteen I säännösten mukaisesti otettua edustavaa näytettä.

2.1.3.2 Varotoimenpiteet

Ristikontaminaation välttämiseksi laboratoriossa kaikki uudelleen käytettävät välineet on puhdistettava huolellisesti ennen käyttöä. Erotussuppilon osat on irrotettava ennen puhdistusta. Erotussuppilon osat ja lasiastiat on esipestävä käsin ja sen jälkeen pestävä astianpesukoneessa. Seulat on puhdistettava jäykkäharjaksisella synteettisellä harjalla. Rasvaisten aineiden, kuten kalajauhon, seulonnan jälkeen suositetaan, että seulat puhdistetaan asetonilla ja paineilmalla.

2.1.3.3 Muiden kuin rasva- tai öljynäytteiden esikäsittely

2.1.3.3.1 Näytteen kuivaus: Näytteet, joiden kosteuspitoisuus on > 14 %, on kuivattava ennen käsittelyä.

2.1.3.3.2 Näytteen esiseulonta: Suositetaan, että pelletoitu rehu ja jyvät esiseulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 1 mm, ja saadut kaksi fraktiota valmistetaan ja määritetään erillisinä näytteinä.

2.1.3.3.3 Osanäytteen otto ja jauhaminen: Osanäytteeksi otetaan vähintään 50 g näytteestä ja jauhetaan.

2.1.3.3.4 Sedimentin uutto ja valmistus: 10 g:n annos (0,01 g:n tarkkuudella) jauhettua osanäytettä siirretään erotussuppiloon tai kartiopohjaiseen selkeytysastiaan, minkä jälkeen siihen lisätään 50 ml tetrakloorietyleeniä. Erotussuppiloon siirrettävä annos saa olla enintään 3 g, jos kyseessä on kalajauho tai muu puhtaasti eläintuote, kivennäisainesosa tai esiseos, joka tuottaa yli 10 prosenttia sedimenttiä. Seosta ravistetaan voimakkaasti ainakin 30 sekuntia, minkä jälkeen siihen lisätään varovasti vähintään 50 ml tetrakloorietyleeniä samalla kun suppilon sisäpinta pestään siihen mahdollisten tarttuneiden partikkelien poistamiseksi. Saadun seoksen annetaan laskeutua astian pohjalle vähintään viisi minuuttia, minkä jälkeen sedimentti erotetaan avaamalla sulkutulppa.

Jos käytetään kartiopohjasta selkeytysastiaa, seosta sekoitetaan voimakkaasti vähintään 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleeniä. Seoksen annetaan laskeutua kolmen minuutin ajan, minkä jälkeen sitä sekoitetaan taas 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleeniä. Saadun seoksen annetaan laskeutua vähintään 5 minuutin ajan, minkä jälkeen nestemäinen fraktio poistetaan ja heitetään pois huolellisesti dekantoimalla samalla kun huolehditaan siitä, ettei sedimenttiä menetetä.

▼ M2

Sedimentti kuivataan ja punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella. Jos yli 5 prosenttia sedimentistä koostuu > 0,50 mm:n suuruisista partikkeleista, se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm:n, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

2.1.3.3.5 Näytteen kelluvan osan, flotaatin, erottaminen ja esikäsittely: Edellä kuvatulla menetelmällä tehdyn sedimentin talteenoton jälkeen erotussuppiloon pitäisi jäädä kaksi osaa: tetrakloorietyleenistä koostuva nestemäinen osa ja kelluvasta aineksesta muodostuva kiinteä osa. Tätä kiinteää osaa kutsutaan flotaatiksi, ja se otetaan talteen avaamalla suppilon tulppa ja kaatamalla tetrakloorietyleeni pois. Erotussuppilo käännetään ylösalaisin ja flotaatti siirretään suureen petrimaljaan ja kuivataan ilmassa vetokaapissa. Jos yli viisi prosenttia flotaatista koostuu partikkeleista, jotka ovat > 0,50 mm, se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

2.1.3.3.6 Raaka-aineen esikäsittely: Valmistetaan vähintään 5 g:n annos jauhettua osanäytettä. Jos yli viisi prosenttia aineksesta koostuu partikkeleista, jotka ovat > 0,50 mm, se seulotaan 0,25 mm:n seulalla ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

2.1.3.4 Rasvasta tai öljystä koostuvien näytteiden esikäsittely

Rasvasta tai öljystä koostuvien näytteiden esikäsittelyssä on noudatettava seuraavaa menettelyä:

- Jos rasva on kiinteää, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.
- 40 ml rasvaa tai öljyä pipetoidaan näytteen pohjasta sentrifugiputkeen.
- Sentrifugoidaan 10 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).
- Jos rasva on jähmettynyt sentrifugoinnin aikana, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.
- Sentrifugoidaan uudestaan 5 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).
- Puolet dekantoiduista epäpuhtauksista siirretään pienellä lusikalla tai spaattelilla objektilasille mikroskooppista tutkimusta varten; kiinnitysreagenssiksi suositetaan glyserolia.
- Loput epäpuhtauksista käytetään sedimentin valmisteluun 2.1.3.3 kohdassa kuvatulla tavalla.

2.1.3.5 Värjäysreagenssien käyttö

Eläinperäisten ainesosien oikean tunnistamisen helpottamiseksi laboratorio voi käyttää näytteen valmistelussa värjäysreagensseja EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien ohjeiden mukaisesti.

Jos sedimentin värjäämiseen käytetään alitsariinipunaluosta, noudatetaan seuraavaa menettelyä:

- Kuivattu sedimentti siirretään lasiseen koeputkeen ja pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin yhden minuutin ja 30 sekunnin ajan ennen sen dekantointia.
- Sedimentti käsitellään värinpoistoreagenssilla lisäämällä sedimenttiin vähintään 1 ml natriumhypokloriittiliuosta. Reaktion annetaan jatkua 10 minuutin ajan. Putki täytetään vedellä, sedimentin annetaan laskeutua 2–3 minuutin ajan, ja sen jälkeen vesi ja suspendoituneet partikkelit dekantoidaan kevyesti.

▼ **M2**

- Sedimentti pestään vielä kahdesti noin 10 ml:lla vettä (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan, sedimentin annetaan laskeutua putken pohjaan ja vesi dekantoidaan).
- Lisätään alitsariinipunaluosta 2–10 tippaa ja sekoitetaan seosta koeputkisekoittimella. Sedimentin annetaan reagoida liuoksen kanssa 30 sekunnin ajan, ja värjäytynyt sedimentti pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia ja sen jälkeen kerran asetonilla (joka kerta käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin minuutin ajan, minkä jälkeen liuos dekantoidaan).
- Värjäytynyt sedimentti kuivataan.

2.1.4 *Mikroskooppitutkimus*

2.1.4.1 Objektilasin valmistelu

Objektilasit valmistellaan sedimentistä ja laboratorion valinnan mukaan joko flotaatista tai raaka-aineesta. Jos näytteen valmistelussa on käytetty seulontaa, tuloksena saadut kaksi fraktiota (hieno ja karkea) valmistellaan. Objektilasille levitettävien fraktion testinäytteiden on oltava koko fraktiota edustavia.

Objektilaseja on valmisteltava riittävä määrä sen varmistamiseksi, että 2.1.4.2 kohdassa säädettyä tutkimusprotokollaa voidaan noudattaa kokonaisuudessaan.

Objektilaseilla on käytettävä riittävästi kiinnitysreagenssia EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti. Objektilaseilla käytetään peitinlaseja.

2.1.4.2 Tutkimusprotokollat rehuseosten ja rehuaineiden sisältämien eläimestä peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi

Valmisteltuja objektilaseja on tutkittava mikroskoopilla noudattaen muita rehuseoksia ja rehuaineita kuin puhdasta kalajauhoa koskevassa kaaviossa 1 esitettyä tutkimusprotokollaa tai puhdasta kalajauhoa koskevassa kaaviossa 2 esitettyä tutkimusprotokollaa.

Mikroskooppitutkimus suoritetaan läpivalaisumikroskoopilla tutkimalla sedimenttiä ja laboratorion valinnan mukaan flotaattia tai raaka-ainetta. Karkeita fraktioita voidaan läpivalaisumikroskoopin lisäksi tutkia stereomikroskoopilla. Jokainen objektilasi tutkitaan läpikotaisin eri suurennuksilla.

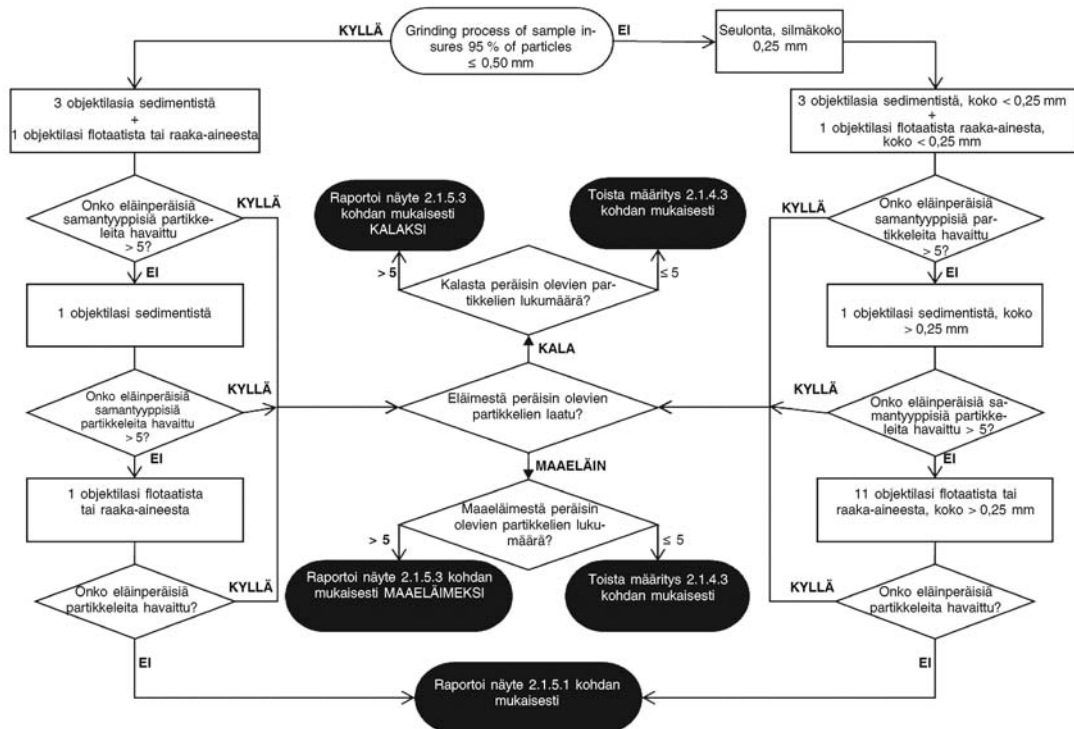
Kussakin tutkimusprotokollan vaiheessa havainnoitavien objektilasien vähimmäismäärää on noudatettava tarkasti, paitsi jos määrättyä objektilasimäärää ei ole mahdollista saavuttaa fraktioaineksen koon vuoksi. Havainnoinnin kohteena saa olla enintään kuusi objektilasia määritystä kohti.

Jotta partikkelien tyyppi ja alkuperä olisi helpompi tunnistaa, laboratorio voi käyttää apuvälineitä, esimerkiksi päätöksentekoa tukevia järjestelmiä, kuvakirjastoja ja vertailunäytteitä.

▼ M2

Kaavio 1

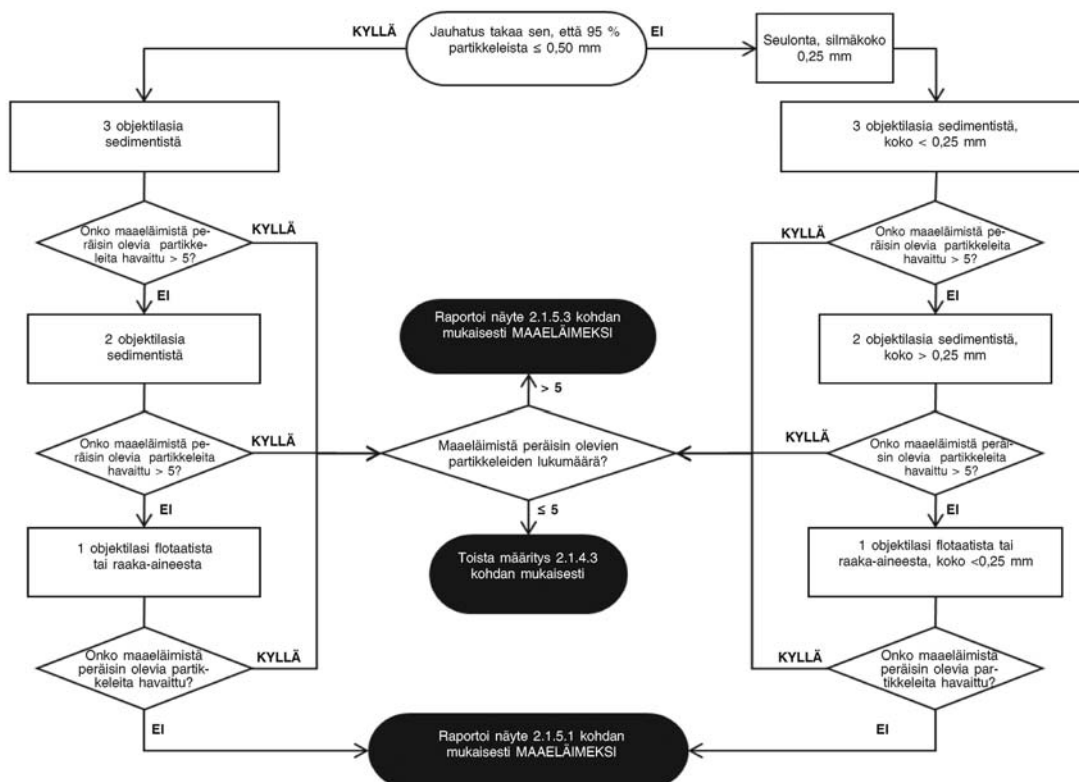
Tutkimusprotokolla muiden rehuseosten ja rehuaineiden kuin kalajauhon sisältämien eläinperäisten partikkelien havaitsemiseksi



▼ M2

Kaavio 2

Tutkimusprotokolla kalajauhon sisältämien eläinperäisten partikkelien havaitsemiseksi



▼ **M2**

2.1.4.3 Määrittysten lukumäärä

Jos kaaviossa 1 tai 2 vahvistetun tutkimusprotokollan mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrittelyn jälkeen ei havaita kyseisentyypisiä eläinperäisiä eli maaeläimestä tai kalasta peräisin olevia partikkeleita, lisämäärittys ei ole tarpeen, ja määrittelyn tulos raportoidaan 2.1.5.1 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen.

Jos kaaviossa 1 tai 2 vahvistetun tutkimusprotokollan mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrittelyn jälkeen kyseisentyypisiä eläinperäisiä eli maaeläimestä tai kalasta peräisin olevia partikkeleita havaitaan yhteensä 1–5, suoritetaan uudesta 50 gramman osanäytteestä toinen määrittys. Jos tämän toisen määrittelyn jälkeen kyseisentyypisten eläinperäisten partikkelien määrän havaitaan vaihtelevan välillä 0–5, analyysin tulos raportoidaan 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen tai tehdään uudesta 50 gramman osanäytteestä kolmas määrittys. Jos kuitenkin ensimmäisen ja toisen määrittelyn jälkeen kahden määrittelyn aikana havaittujen kyseisentyypisten partikkelien summa on suurempi kuin 15, lisämäärittystä ei tarvita, ja määrittelyn tulos raportoidaan suoraan 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen. Jos kolmannen määrittelyn jälkeen kaikissa kolmessa määrittelyssä havaittujen kyseisentyypisten eläinperäisten partikkelien summa on yhteensä suurempi kuin 15, määrittelyn tulos ilmoitetaan 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen. Muussa tapauksessa määrittelyn tulos raportoidaan 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen.

Jos kaaviossa 1 tai kaaviossa 2 vahvistetun tutkimusprotokollan mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrittelyn jälkeen kyseisentyypisiä eläinperäisiä eli maaeläimestä tai kalasta peräisin olevia partikkeleita havaitaan yli viisi, määrittelyn tulos raportoidaan 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen.

2.1.5 *Tulosten ilmoittaminen*

Laboratorion on tuloksista raportoidessaan ilmoitettava mistä aineksesta määrittys on tehty (sedimentti, flotaatti, raaka-aine) ja kuinka monta määrittystä tehtiin.

Laboratorion raportin on sisällettävä ainakin tieto maaeläimistä ja kalasta peräisin olevien ainesosien esiintymisestä.

Eri tuloksista raportoidaan seuraavasti:

2.1.5.1 Kyseisentyypistä eläinperäistä partikkelia ei havaittu:

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu maaeläimistä peräisin olevia partikkeleita.

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu kalasta peräisin olevia partikkeleita.

2.1.5.2 Kyseisentyypisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu keskimäärin 1–5:

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu maaeläimistä peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enempää kuin viisi määrittystä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [luut, rustot, lihas, karva, sarvi ...]. Tämä vähäinen määrä on mikroskooppisen menetelmän toteamisrajan alapuolella, mikä tarkoittaa sitä, että väärä positiivinen tulos on mahdollinen.

▼ **M2**

tai, tapauksen mukaan,

- Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu kalasta peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enempää kuin 5 määritystä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi: ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus ...]. Tämä vähäinen määrä on mikroskooppisen menetelmän toteamisrajan alapuolella, mikä tarkoittaa sitä, että väärä positiivinen tulos on mahdollinen.

Jos näyte esiseulotaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.

2.1.5.3 Kyseisentyypisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu keskimäärin enemmän kuin viisi

- Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin maaeläimistä peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enemmän kuin viisi määritystä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi: ... [luu, rusto, lihas, karva, sarvi ...].

tai, tapauksen mukaan,

- Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin kalasta peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enemmän kuin viisi määritystä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi: ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus ...].

Jos näyte esiseulotaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.

2.2 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

2.2.1 *Periaate*

Eläinperäisiä deoksiribonukleiinihapon (DNA) fragmentteja, joita rehuaineissa ja rehuseoksissa saattaa esiintyä, havainnoidaan geneettisellä amplifikaatiotekniikalla (PCR-tekniikalla), joka kohdennetaan lajikohtaisiin DNA-sekvensseihin.

PCR-menetelmä edellyttää ensiksi DNA:n eristysvaihetta. Seuraavassa vaiheessa näin eristetty DNA amplifioidaan määrittelyn kohteena olevan eläinlajin havaitsemiseksi.

2.2.2 *Reagenssit ja välineet*

2.2.2.1 Reagenssit

2.2.2.1.1 Reagenssit DNA:n eristysvaihetta varten

Ainoastaan reagensseja, jotka EURL-AP on hyväksynyt ja verkko-sivuillaan julkaissut, saa käyttää.

2.2.2.1.2 Reagenssit geneettistä amplifikaatiovaihetta varten

▼ **M2**

- 2.2.2.1.2.1 Alukkeet ja koettimet
- Ainoastaan alukkeita ja koettimia, joiden oligonukleotidisekvenssit EURL-AP on validoinut, saa käyttää ⁽¹⁾.
- 2.2.2.1.2.2 Master Mix
- Ainoastaan Master Mix -liuoksia, jotka eivät sisällä reagensseja, jotka saattavat johtaa eläin-DNA:n esiintymisen vuoksi väärin tuloksiin, saa käyttää ⁽²⁾.
- 2.2.2.1.2.3 Dekontaminaatioreagenssit.
- 2.2.2.1.2.3.1 Suolahappoliuos (0,1N).
- 2.2.2.1.2.3.2 Natriumhypokloriittiliuos (0,15 % aktiivista klooria).
- 2.2.2.1.2.3.3 Syövyttämättömät reagenssit kalliiden laitteiden, kuten analyysivaakojen (esim. MP Biomedicals -yrityksen tuote DNA EraseTM) dekontaminointiin.
- 2.2.2.2 Laitteet
- 2.2.2.2.1 Analyysivaaka, tarkkuus 0,001 g.
- 2.2.2.2.2 Jauhamisvälineet.
- 2.2.2.2.3 Lämpöblokki, joka mahdollistaa reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion (PCR)
- 2.2.2.2.4 Mikrosentrifugi mikrofugiputkia varten.
- 2.2.2.2.5 Mikropipettejä, joilla voidaan pipetoida tilavuudeltaan 1–1 000 µl:n näytteitä.
- 2.2.2.2.6 Molekyylibiologiassa käytettävät tavanomaiset muoviastiat: mikrofugiputket, suodattimelliset mikropipettien muovikärjet, lämpöblokkiin soveltuvat levyt.
- 2.2.2.2.7 Pakastimet näytteiden ja reagenssien säilytystä varten.
- 2.2.3 *Näytteenotto ja näytteiden valmistus*
- 2.2.3.1 Näytteenotto
- Käytetään liitteen I säännösten mukaisesti otettua edustavaa näytettä.
- 2.2.3.2 Näytteen valmistus
- Laboratorionäytteet on esikäsiteltävä DNA:n eristämistä varten liitteessä II vahvistettujen vaatimusten mukaisesti. Vähintään 50 grammaa näytettä on jauhettava määritystä varten.
- Näytteen valmistus on tehtävä eri huoneissa kuin DNA:n eristys ja geneettinen amplifikaatioreaktio ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla.
- Valmistetaan vähintään kaksi 100 mg:n suuruista testinäytettä.
- 2.2.4 *DNA:n eristäminen*
- DNA eristetään näytteistä, jotka on esikäsitelty EURL-AP:n laa-
timien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti.
- Jokaista DNA:n eristyskertaa kohti tehdään kaksi eristyskontrollia ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla:
- negatiivinen DNA-eristyskontrolli,
- positiivinen DNA-eristyskontrolli.

⁽¹⁾ Luettelo näistä määrittämisestä kohteena oleville kullekin eläinlajille vahvistetuista koettimista ja alukkeista on saatavana EURL-AP:n verkkosivustolla.

⁽²⁾ Esimerkkejä toimivista Master Mix -liuoksista on saatavana EURL-AP:n verkkosivustolla.

▼ **M2**2.2.5 *Geneettinen amplifikaatio*

Geneettinen amplifikaatio suoritetaan kullekin tunnistettavalle lajille validoitua menetelmää käyttäen. Nämä menetelmät on vahvistettu EURL-AP:n laatimissa ja verkkosivullaan julkaisemissa toimintaohjeissa. Kukin eristetty DNA on määritettävä vähintään kahdena eri laimennoksena, jotta inhibitio voidaan arvioida.

Jokaista kohdelajia kohti tehdään kaksi amplifikaatiokontrollia ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla:

- kohteen positiivinen DNA-kontrolli kullekin PCR-ajolle tai PCR-testisarjalle,
- amplifikaation reagenssikontrolli (ilman DNA-templaattia NTC) kullekin PCR-ajolle tai PCR-testisarjalle.

2.2.6 *Tulosten tulkinta ja esittäminen*

Laboratorion on tuloksista raportoidessaan ilmoitettava ainakin käytettyjen testinäytteiden paino, käytetty eristystekniikka, suoritettujen määritysten määrä ja menetelmän toteamisraja.

Tuloksia ei saa tulkita eikä raportoida, jos testin kohteesta ei positiivisessa DNA-eristyskontrollissa ja kohteen positiivisessa DNA-kontrollissa saada positiivisia tuloksia kun taas amplifikaation reagenssikontrolli on negatiivinen.

Jos kahdesta testinäytteestä saadut tulokset eivät ole yhdenmukaisia, ainakin geneettinen amplifikaatio on toistettava. Jos laboratorio epäilee, että epäyhdenmukaisuus voi johtua eristetystä DNA:sta, DNA:n eristys ja geneettinen amplifikaatio on tehtävä uudelleen ennen tulosten tulkitsemista.

Lopullisten raportoitavien tulosten on perustuttava kyseisestä kahdesta testinäytteestä saatujen tulosten yhdistämiseen ja tulkintaan EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti.

2.2.6.1 *Negatiivinen tulos*

Negatiivinen tulos on raportoitava seuraavasti:

Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu yhtään X:n DNA:ta (X on testin kohteena oleva eläinlaji tai eläinlajiryhmä).

2.2.6.2 *Positiivinen tulos*

Positiivinen tulos raportoidaan seuraavasti:

Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin X:n DNA:ta (X on testin kohteena oleva eläinlaji tai eläinlajiryhmä).



LIITE VII

SIIPIKARJAN REHUIJEN ENERGIA-ARVON LASKENTAMENETELMÄ

1. Energia-arvon laskentamenetelmä ja ilmoittaminen

Siipikarjan rehuseosten energia-arvo on laskettava jäljempänä olevan kaavan mukaisesti tiettyjen rehun ravintoaineiden prosenttiosuuksien perusteella. Energia-arvo ilmoitetaan typen suhteen korjattuna muuntokelpoisena energiana (ME) käyttäen yksikköä megajoule (MJ) rehuseoskiloa kohti:

$$\text{MJ/kg ME:tä} = 0,1551 \times \text{raakavalkuaisprosentti} + 0,3431 \times \text{raakarasvaprosentti} + 0,1669 \times \text{tärkkelysprosentti} + 0,1301 \times \text{kokonaissokeriprocentti}$$
 (sakkaroosina ilmaistuna).

2. Sallitut poikkeamat ilmoitetuista energia-arvoista

Jos virallisessa tarkastuksessa käy ilmi, että tarkastuksen perusteella saatu ja ilmoitettu energia-arvo poikkeavat toisistaan (pienempi tai suurempi kuin ilmoitettu energia-arvo), sallitaan ME:ssä 0,4 MJ/kg:n suuruinen enimmäispoikkeama.

3. Tuloksen ilmoittaminen

Edellä olevan laskukaavan mukaisesti saatu energia-arvo ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

4. Näytteenotto- ja määrittämenetelmät

Näytteenotto rehuseoksesta ja laskentakaavassa esiintyvien ravintoainepitoisuuksien määrittäminen on suoritettava yhteisön näytteenottomenetelmien ja virallisen rehuvalvonnan määrittämenetelmien mukaisesti.

Seuraavia menetelmiä on käytettävä:

- raakarasvapitoisuuden määrittäminen: raakarasvan ja -öljyn määrittämisessä käytettävä menettelytapa B sellaisena kuin se on vahvistettu liitteessä III olevassa H osassa,
- tärkkelyspitoisuuden määrittäminen: polarimetrinen menetelmä, joka on vahvistettu liitteessä III olevassa L osassa.



LIITE VIII

**MÄÄRITYSMENETELMÄT SELLAISTEN LISÄAINEIDEN
OSOITTAMISEKSI, JOTKA EIVÄT ENÄÄ OLE SALLITTUJA
REHUISSA**

Tärkeähuomautus:

Sellaisten lisäaineiden osoittamiseksi, jotka eivät enää ole sallittuja rehuissa, voidaan käyttää tässä liitteessä vahvistettuja määrittämenetelmiä herkempiä menetelmiä.

Tässä liitteessä esitetyt määrittämenetelmät on käytettävä varmistustarkoituksiin

A. METYYLIBENTSOKVAATTIPITOISUUDEN MÄÄRITYS

*7-Bentsyloksi-6-butyli-3-metoksikarbonyyli-4-kinoloni*1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen metyylibentsokvaattipitoisuus. Määrittäysraja on 1 mg/kg.

2. **Periaate**

Metyylibentsokvaatti uutetaan näytteestä metanolisella metaanisulfonihappoliuoksella. Uute puhdistetaan dikloorimetaanilla, sitten ioninvaihtokromatografialla ja sen jälkeen uudelleen dikloorimetaanilla. Metyylibentsokvaattipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) ja UV-detektorilla.

3. **Reagenssit**

3.1 Dikloorimetaani.

3.2 Metanoli, HPLC-laatua vastaava.

3.3 HPLC:n liikkuva faasi.

Metanolin (3.2) ja veden (HPLC-laatua vastaava) seos 75 + 25 (v + v).

Suodatetaan 0,22 µm:n suodattimen (4.5) läpi ja poistetaan liuoksesta kaasut (esimerkiksi 10 minuutin ultraäänikäsittelyllä).

3.4 Metaanisulfonihappoliuos, c = 2 %.

Laimennetaan 20,0 ml metaanisulfonihappoa 1 000 ml:ksi metanolilla (3.2).

3.5 Kloorivetyhappoliuos, c = 10 %.

Laimennetaan 100 ml kloorivetyhappoa (ρ₂₀ noin 1,18 g/ml) 1 000 ml:ksi vedellä.

3.6 Kationinvaihtoharts Amberlite CG-120 (Na), 100–200 mesh.

Harts esikäsitellään ennen käyttöä: sekoitetaan 100 g hartsia 500 ml:aan kloorivetyhappoliuosta (3.5) ja saatetaan seos kiehuvaan lämpölevyllä koko ajan sekoittaen. Annetaan jäähtyä ja dekantoidaan happo pois. Suodatetaan tyhjiössä suodatinpaperin läpi. Pestään harts kahdesti 500 ml:n annoksella vettä ja sen jälkeen 250 ml:lla metanolia (3.2). Huuhdellaan harts uudelleen 250 ml:lla metanolia (3.2) ja kuivataan johtamalla ilmavirta suodatuskakan läpi. Kuivattu harts säilytetään suljetussa pullossa.

3.7 Standardiyhdiste: puhdas metyylibentsokvaatti (7-bentsyloksi-6-butyli-3-metoksikarbonyyli-4-kinoloni).

▼B

- 3.7.1 Metyylibentsokvaattistandardin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 50 mg standardiyhdistettä (3.7) 0,1 mg:n tarkkuudella, liuotetaan metaanisulfonihappoliuokseen (3.4) 100 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti ja sekoitetaan.

- 3.7.2 Metyylibentsokvaattistandardin välimuotoliuos, 50 µg/ml

Siirretään 5,0 ml standardin kantaliuosta (3.7.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.2) ja sekoitetaan.

- 3.7.3 Kalibrointiliuokset

Siirretään 25 ml:n mittapulloihin 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 ml standardin välimuotoliuosta (3.7.2). Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.3) ja sekoitetaan. Näiden liuosten metyylibentsokvaattipitoisuudet ovat vastaavasti 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ja 10,0 µg/ml. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

4. Välineistö

- 4.1 Laboratorioravistelijä.
- 4.2 Pyörivä kalvohaihdutin.
- 4.3 Lasikolnni (250 mm × 15 mm), jossa on hana ja noin 200 ml:n säiliö.
- 4.4 HPLC-laitteisto, jossa on vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektorin tai diodirividetektorin.
- 4.4.1 Nestekromatografiakolnni: 300 mm x 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava.
- 4.5 Kalvosuodattimia, 0,22 µm.
- 4.6 Kalvosuodattimia, 0,45 µm.

5. Menettely

- 5.1 Yleistä
- 5.1.1 Nollarehu on analysoitava, jotta varmistetaan, ettei se sisällä metyylibentsokvaattia tai mittausta häiritseviä aineita.
- 5.1.2 Saantokoe on suoritettava analysoimalla nollarehu, johon on tehty näytteen metyylibentsokvaattipitoisuutta vastaava lisäys. Pitoisuuden 15 mg/kg aikaan saamiseksi lisätään 600 µl standardin kantaliuosta (3.7.1) 20 grammaan nollarehua, sekoitetaan ja annetaan seistä 10 minuuttia ennen uuttamista (5.2).

Huomautus: Tätä menetelmää käytettäessä nollarehun on vastattava tyyppitään näytettä, ja metyylibentsokvaattia ei saa havaita määrittäksessä.

- 5.2 Uutto

Punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella noin 20 g valmistettua näytettä ja siirretään 250 ml:n erlenmeyerkolviin. Lisätään 100,0 ml metaanisulfonihappoa (3.4) ja ravistellaan mekaanisesti (4.1) 30 minuutin ajan. Suodatetaan liuos suodatinpaperin läpi ja suodos säilytetään neste-neste-erostusta (5.3) varten.

- 5.3 Neste-neste-erotus

Siirretään 25 ml suodosta (5.2) 500 ml:n erotussuppiloon, joka sisältää 100 ml kloorivetyhappoliuosta (3.5). Lisätään 100 ml dikloorimetaania (3.1) suppiloon ja ravistellaan yhden minuutin ajan. Faasien erottumisen

▼B

jälkeen valutetaan alempi faasi (dikloorimetaani) 500 ml:n pyörökolviin. Toistetaan vesifaasin uutto vielä kahdella 40 ml:n annoksella dikloorimetaania ja yhdistetään nämä ensimmäiseen uutteeeseen pyörökolvissa. Dikloorimetaaniuute haihdutetaan täysin kuivaksi pyöröhaihduuttimessa (4.2), joka toimii 40 °C:n lämpötilassa ja alennetussa paineessa. Liuotetaan jäännös 20–25 ml:aan metanolia (3.2), suljetaan kolvi tulpalla ja säilytetään koko uute ioninvaihtokromatografiaa (5.4) varten.

5.4 *Ioninvaihtokromatografia*5.4.1 *Kationinvaihtokolonnin valmistelu*

Laitetaan pieni tuppo lasivillaa lasikolonnin (4.3) alapäähän. Valmistetaan 5 grammasta käsiteltyä kationinvaihtohartsia (3.6) ja 50 ml:sta vetykloridihappoa (3.5) seos, joka kaadetaan kolonniin; annetaan asettua. Annetaan ylimääräisen hapon valua kolonnista siten, että sen pinta jää juuri ja juuri hartsipinnan yläpuolelle ja pestään kolonni vedellä, kunnes ulos virtaava liuos on lakmuspaperilla mitattuna neutraalia. Siirretään 50 ml metanolia (3.2) kolonniin ja annetaan valua, kunnes se saavuttaa hartsipinnan.

5.4.2 *Pylväskromatografia*

Pipetoidaan saatua uutetta (5.3) varovasti kolonniin. Huuhdellaan pyörökolvi kahdella 5–10 ml:n annoksella metanolia (3.2) ja siirretään nämä pesuliuokset kolonniin. Annetaan uutteen valua hartsipintaan ja pestään kolonni 50 ml:lla metanolia valvoen, ettei virtausnopeus ylitä 5 ml:aa minuutissa. Heitetään ulos valunut liuos pois. Metylibentsokvaatti eluoidaan kolonnista käyttäen 150 ml:aa metaanisulfonihappoliuosta (3.4) ja kerätään eluaatti kolonnista 250 ml:n erlenmeyerkolviin.

5.5 *Neste-neste-erotus*

Siirretään saatu eluaatti (5.4.2) 1 litran erotussuppiloon. Huuhdellaan erlenmeyerkolvi 5–10 ml:lla metanolia (3.2) ja yhdistetään pesuliuos erotussuppilon sisällön kanssa. Lisätään 300 ml kloorivetyhappoliuosta (3.5) ja 130 ml dikloorimetaania (3.1). Ravistellaan yhden minuutin ajan ja annetaan faasin erottua. Valutetaan alempi faasi (dikloorimetaani) 500 ml:n pyörökolviin. Toistetaan vesifaasin uutto kahdella uudella 70 ml:n annoksella dikloorimetaania ja yhdistetään nämä uutteen ensimmäisen, pyörökolvissa olevan uutteen kanssa.

Dikloorimetaaniuute haihdutetaan täysin kuivaksi pyöröhaihduuttimessa (4.2), joka toimii 40 °C:n lämpötilassa ja alennetussa paineessa. Liuotetaan kolvin jäännös noin 50 ml:aan metanolia (3.2) ja siirretään tämä liuos kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon. Pyörökolvi huuhdellaan kahdella uudella 1–2 ml:n annoksella metanolia ja siirretään liuos mittapulloon. Täytetään merkkiin asti metanolilla ja sekoitetaan. Suodatetaan määräosa kalvosuodattimen (4.6) läpi. Tämä liuos säilytetään HPLC-määrittystä (5.6) varten.

5.6 *HPLC-määrittäminen*5.6.1 *Muuttujat*

Seuraavat olosuhteet annetaan viitteeksi; muita olosuhteita voidaan käyttää, jos niillä saadaan vastaavat tulokset.

— nestekromatografiakolonni (4.4.1),

— HPLC:n liikkuva faasi: metanoli-vesiseos (3.3),

— virtausnopeus: 1–1,5 ml/minuutti,

— detektioaallonpituus: 265 nm,

— injektio-tilavuus: 20–50 µl.

▼B

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus on tarkastettava injektoimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.7.3), jonka pitoisuus on 4 µg/ml, kunnes saadaan piikkejä, joiden korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.6.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan useita kertoja kutakin kalibrointiliuosta (3.7.3) ja mitataan kunkin pitoisuuden piikkien korkeudet (pinta-alat). Piirretään kalibrointikäyrä siten, että y-akselilla ovat kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot (µg/ml).

5.6.3 Näyteliuos

Injektoidaan useita kertoja näyteutetta (5.5) käyttäen samaa tilavuutta kuin kalibrointiliuksille, ja määritetään metyylibentsokvaattipiikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen metyylibentsokvaattipiikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta määritetään näyteliuoksen pitoisuus µg/ml:na käyttäen kalibrointikäyrää (5.6.2).

Näytteessä olevan metyylibentsokvaatin määrä w (mg/kg) lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

jossa:

c = näyteliuoksen metyylibentsokvaattipitoisuus µg/ml:na,

m = näyte-erän paino grammoina.

7. Tulosten validointi

7.1 Tunnistaminen

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla tai diodirividetektorilla, joilla näyteutteen ja 10 µg/ml metyylibentsokvaattia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.7.3) spektrejä voidaan verrata.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteutteeseen lisätään sopiva määrä standardin välimuotoliuosta (3.7.2). Lisätyn metyylibentsokvaatin määrän on vastattava näyteutteenä olevan metyylibentsokvaatin arvioitua määrää.

Ainoastaan metyylibentsokvaatin piikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimeneminen. Piikin leveyden on oltava sen puolikorkeudella noin 10 % sen alkuperäisestä leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimäärittäminen

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- a) kromatogrammin piikin huipun kohdalla näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorptioaallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorimäärittäyksessä tämä on yleensä noin ± 2 nm;

▼ **B**

- b) välillä 220–350 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajetut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden kahden spektrin välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 %:a standardina olevan tutkitavan aineen absorbanssista;
- c) välillä 220–350 nm näyteliuoksesta ajetut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa kohdissa spektrien välinen poikkeama ei ole suurempi kuin 15 % huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkitavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 *Toistettavuus*

Kahden rinnakkaismäärityksen välinen ero samasta näytteestä ero ei saa olla suurempi kuin 10 % suuremmasta tuloksesta, kun metyylibentsokvaattipitoisuudet ovat välillä 4–20 mg/kg.

7.3 *Saanto*

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 90 %.

8. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset**

Laboratorioiden välisessä tutkimuksessa analysoitiin viisi näytettä 10 laboratoriossa. Kukin näyte määritettiin kaksi kertaa.

	Nollanäyte	Jauho 1	Rae 1	Jauho 2	Rae 2
Keskiarvo [mg/kg]	Ei hav.	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	-	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	-	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	-	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R [%]	-	8,90	11,10	10,10	11,50
Saanto [%]	-	92,00	93,00	92,00	89,00

Ei hav. = Ei havaittu

s_r = toistettavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

s_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

B. OLAKVINDOKSIN MÄÄRITYS

(2-[N-2'-(hydroksietyyli)karbamoyyli]-3-metyylikinoksaliini- N^d , N^d -dioksidi

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen olakvindoksipitoisuus. Määritysraja on 5 mg/kg.

2. **Periaate**

Näyte uutetaan vesi-metanoliseoksella. Olakvindoksipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

▼B**3. Reagenssit**

3.1 Metanoli.

3.2 Metanoli, HPLC-laatua vastaava.

3.3 Vesi, HPLC-laatua vastaava.

3.4 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi.

Vesi (3.3)-metanoli (3.2)-seos, 900 + 100 (V + V).

3.5 Standardiyhdiste: puhdas olakvindoksi, 2-[N-2'-(hydroksietyyli)karbamoyyli]-3-metyylikinoksaliini-N¹,N⁴-dioksidi, E 851.

3.5.1 Olakvindoksistandardin kantaliuos, 250 µg/ml

Punnitaan 50 mg olakvindoksia (3.5) 0,1 mg:n tarkkuudella 200 ml:n mittapulloon ja lisätään noin 190 ml vettä. Asetetaan pullo 20 minuutiksi ultraäänihauteeseen (4.1). Ultraäänikäsittelyn jälkeen liuoksen annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan, täytetään merkkiin asti vedellä ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään jääkaapissa. Liuos on valmistettava kuukausittain.

3.5.2 Olakvindoksistandardin välimuotoliuos, 25 µg/ml

Pipetoidaan 10,0 ml kantaliuosta (3.5.1) 100 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.4) ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään jääkaapissa. Liuos on valmistettava päivittäin.

3.5.3 Kalibrointiliuokset

Pipetoidaan 50 ml:n mittapulloihin 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 ja 20,0 ml standardin välimuotoliuosta (3.5.2). Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.4) ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon. Nämä liuokset sisältävät vastaavasti 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 ja 10,0 µg/ml olakvindoksia.

Liuokset on valmistettava päivittäin.

4. Välineistö

4.1 Ultraäänihaude.

4.2 Mekaaninen ravistelija.

4.3 HPLC-laitteisto, jossa on vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektorin tai diodirividetektorin.

4.3.1 Nestekromatografiakolonne, 250 mm x 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava.

4.4 Kalvosuodattimia, 0,45 µm.

5. Menettely

Huomautus: Olakvindoksi on valoherkkää. Kaikki toimenpiteet on tehtävä himmennetyssä valaistuksessa tai ruskeita lasiastioita käyttäen.

5.1 Yleistä

5.1.1 Nollanäyte on analysoitava, jotta varmistetaan, ettei se sisällä olakvindoksia tai mittausta häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe suoritetaan analysoimalla nollanäyte, johon on lisätty näytteessä esiintyvää määrää vastaava määrä olakvindoksia. Lisäyksen saamiseksi tasolle 50 mg/kg pipetoidaan 10,0 ml standardin kantaliuosta

▼B

(3.5.1) 250 ml:n erlenmeyerkolviin ja haihdutetaan liuos noin 0,5 ml:ksi. Lisätään 50 g nollanäytettä, sekoitetaan huolellisesti ja annetaan tasoittua 10 min sekoittaen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

Huomautus: Tätä menetelmää käytettäessä nollanäytteen on oltava tyy-piltään samanlaista kuin näyte, eikä siinä saa esiintyä ha-vaittavaa määrää olakvindoksia.

5.2 *Uutto*

Punnitaan noin 50 g näytettä 0,01 g:n tarkkuudella. Siirretään 1 000 ml:n erlenmeyerkolviin, lisätään 100 ml metanolia (3.1) ja asetetaan kolvi 5 minuutiksi ultraäänihauuteeseen (4.1). Lisätään 410 ml vettä ja annetaan olla ultraäänihauuteessa vielä 15 minuuttia. Otetaan kolvi ultraäänihau-teesta, ravistellaan 30 minuutin ajan ravistelijassa (4.2) ja suodatetaan taitellun suodatinpaperin läpi. Pipetoidaan 10,0 ml suodosta 20 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti vedellä ja sekoitetaan. Suodatetaan näyte kalvosuodattimen (4.4) läpi (ks. huomautus 9). Jatketaan HPLC-määrittelyksellä (5.3).

5.3 *HPLC-määrittely*

5.3.1 *Muuttujat:*

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia ja niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaiset tulokset.

Analyysikolonni (4.3.1)

Liikkuva faasi (3.4):	vesi (3.3) — metanoli (3.2.) seos, 900 + 100 (V + V)
Virtausnopeus:	1,5–2 ml/min
Detektioaallonpituus:	380 nm
Injektiotilavuus:	20–100 µl.

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektioimalla useita kertoja 2,5 µg/ml olakvindoksia sisältävää kalibrointiliuosta (3.5.3), kun-nes piikkien korkeudet ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.3.2 *Kalibrointikäyrä*

Injektoidaan kutakin kalibrointiliuosta (3.5.3) useita kertoja ja lasketaan kutakin konsentraatiota vastaavat piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrointikäyrä siten, että y-akselilla ovat kalib-rointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot (µg/ml).

5.3.3 *Näyteliuos*

Injektoidaan useita kertoja näyteliuosta (5.2) sama määrä kuin kalibroin-tiliuoksia ja lasketaan olakvindoksiikkien korkeuden (pinta-alan) keski-arvo.

6. *Tulosten laskeminen*

Näyteliuoksen olakvindoksipitoisuus (µg/ml) lasketaan olakvindoksin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.3.2) avulla.

Näytteen olakvindoksipitoisuus w (mg/kg) saadaan seuraavasta kaavasta:

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

▼B

jossa:

c = näyteliuoksen (5.2) olakvindoksipitoisuus ($\mu\text{g/ml}$),

m = näyte-erän paino grammoina (5.2).

7. Tulosten validointi

7.1 Tutkittavan aineen tunnistaminen

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla tai diodirividetektorilla vertaamalla näyteliuoksen (5.2) ja 5,0 $\mu\text{g/ml}$ olakvindoksia sisältävän kalibrintiliuoksen (3.5.3) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteliuokseen (5.2) lisätään sopiva määrä kalibrintiliuosta (3.5.3). Lisätyn olakvindoksimäärän on oltava samaa luokkaa kuin näyteliuoksesta analysoitu olakvindoksin määrä.

Vain olakvindoksiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että olakvindoksin näyteliuoksen laimeneminen. Piikin leveyden puolivälissä sen korkeutta on oltava ± 10 prosenttia alkuperäisen näyteliuoksen olakvindoksiikin leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- a) Näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorption aallonpituuden, mitattuna kromatogrammin piikin kärjestä, on oltava sama detektorin erotuskyvyn määrittämässä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti ± 2 nm.
- b) Välillä 220–400 nm näytteen ja standardin spektrit, kromatogrammin piikin kärjestä mitattuna, eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % standardianalyysin absorbanssista.
- c) Välillä 220–400 nm näyteuutteesta ajetut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % piikin huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kun olakvindoksipitoisuus on 10–200 mg/kg, näytteen kahden rinnakkaisen määrittelyn välinen ero ei saa olla suurempi kuin 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 90 %.

▼B

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

EY:n laboratorioiden välisessä menetelmävertailussa 13 laboratoriossa analysoitiin neljä porsaanrehunäytettä, joista yksi oli nollanäyte. Tulokset olivat seuraavat:

	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
keskiarvo [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
nimellispitoisuus [mg/kg]	—	15	50	100
saanto %	—	97,3	96,0	95,4

L = laboratorioiden lukumäärä
n = yksittäisten arvojen lukumäärä
S_r = toistettavuuden keskihajonta
S_R = uusittavuuden keskihajonta
CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin
CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.

9. Huomautus

Vaikka menetelmää ei ole validoitu rehuille, joissa on yli 100 mg/kg olakvindoksia, sillä on mahdollista saada tyydyttäviä tuloksia käyttämällä pienempää näytemäärää ja/tai laimentamalla näyteliuosta (5.2), jotta päästäisiin kalibrointikäyrän pitoisuusalueelle (5.3.2).

C. AMPROLIUMIN MÄÄRITYS

1 [(4-amino-2-propyyli)pyrimidin-5-yyli)metyyli]-2-metyliipyridiniumkloridihydrokloridi

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää amproliumin pitoisuus rehuissa ja esi-seoksissa. Toteamisraja on 1 mg/kg ja määritysraja 5 mg/kg.

2. Periaate

Näyte uutetaan metanoli-vesiseoksella. Uute laimennetaan liikkuvalla faasilla, suodatetaan kalvosuodattimella, ja amprolium määritetään korkean erotuskyvyn kationinvaihtonestekromatografialla (HPLC) ja UV-detektorilla.

3. Reagenssit

3.1 Metanoli.

3.2 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.

3.3 Vesi, HPLC-laatua vastaava.

3.4 Natriumdivetyfosfaattiliuos, c = 0,1 mol/l.

Liutetaan 13,80 g natriumdivetyfosfaattimonohydraattia veteen (3.3) 1 000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti vedellä (3.3) ja sekoitetaan.

3.5 Natriumperklooraattiliuos, c = 1,6 mol/l.

Liutetaan 224,74 g natriumperklooraattimonohydraattia veteen (3.3) 1 000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti vedellä (3.3) ja sekoitetaan.

▼B

- 3.6 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi (katso huomautus 9.1).

Asetonitriliin (3.2), natriumdivetyfosfaattiliuoksen (3.4) ja natriumperkloraatiliuoksen (3.5) seos, 450 + 450 + 100 (v + v + v). Suodatetaan ennen käyttöä 0,22 µm:n kalvosuodattimella (4.3) ja poistetaan kaasut (esim. ultraäänihauteessa (4.4) vähintään 15 min).

- 3.7 Standardiyhdiste: puhdas amproliumi, 1-[(4-amino-2-propyyli)pyrimidin-5-yyli]-2-metyyli-pyridi-niumkloridihydrokloridi, E 750 (katso kohta 9.2).

- 3.7.1 Amproliumstandardin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella 50 mg amproliumia (3.7) 100 ml:n mittapulloon, liuotetaan 80 ml:aan metanolia (3.1), ja pullo pannaan 10 minuutiksi ultraäänihauteeseen (4.4). Ultraäänikäsittelyn jälkeen liuoksen annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan, täytetään merkkiin asti vedellä ja sekoitetaan. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

- 3.7.2 Amproliumstandardin välimuotoliuos, 50 µg/ml

Pipetoidaan 5,0 ml standardin kantaliuosta (3.7.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti uuttoliuoksella (3.8) ja sekoitetaan. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

- 3.7.3 Kalibrointiliuokset

Siirretään 0,5, 1,0 ja 2,0 ml standardin välimuotoliuosta (3.7.2) 50 ml:n mittapulloiin. Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.6) ja sekoitetaan. Nämä liuokset vastaavat 0,5, 1,0 ja 2,0 µg/ml amproliumia. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

- 3.8 Uuttoliuos.

Metanoli (3.1) -vesiseos 2 + 1 (v + v).

4. Välineistö

- 4.1 HPLC-laitteisto, jossa voidaan injektoida 100 µl:n näytteitä.

- 4.1.1 Nestekromatografiakolonni, 125 mm × 4 mm, kationinvaihto Nucleosil 10 SA, hiukkaskoko 5 µm tai 10 µm, tai vastaava.

- 4.1.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetektor.

- 4.2 Kalvosuodatin, PTFE:tä, 0,45 µm.

- 4.3 Kalvosuodatin, 0,22 µm.

- 4.4 Ultraäänihaute.

- 4.5 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.

5. Menettely

- 5.1 Yleistä

- 5.1.1 Nollarehu

Saantokokeen (5.1.2) toimivuuden määrittämiseksi on analysoitava nollarehu (nollanäyte), jotta varmistetaan, ettei se sisällä amproliumia tai mittausta häiritseviä aineita. Nollanäytteen on oltava näytteen kaltainen, eikä siinä saa olla havaittavia määriä amproliumia tai häiritseviä aineita.

▼B**5.1.2 Saantokoe**

Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on lisätty näytteen amproliumia näytteen amproliumpitoisuutta vastaava määrä. Jotta saadaan 100 mg/kg amproliumia vastaava näyteliuos, siirretään 10,0 ml standardin kantaliuosta (3.7.1) 250 ml:n erlenmeyerkolviin, ja liuos haihdutetaan noin 0,5 ml:ksi. Lisätään 50 g nollanäytettä, sekoitetaan huolellisesti ja annetaan tasoittua 10 min sekoittaen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (katso 5.1.1), voidaan saantokoe suorittaa vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään suunnilleen näytteiden jo sisältämä määrä amproliumia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto**5.2.1 Esiseokset (amproliumpitoisuus < 1 %) ja rehut**

Punnitaan 0,01 gramman tarkkuudella 5–40 g näytettä, riippuen sen amproliumpitoisuudesta, 500 ml:n erlenmeyerkolviin ja lisätään 200 ml uuttoliuosta (3.8). Kolvi pannaan ultraäänihauteeseen (4.4) 15 minuutiksi. Otetaan kolvi ultraäänihauteesta, ravistellaan 1 minuutin ajan ravistelijassa tai sekoitetaan magneettisekoittimella (4.5). Uutteesta otettu erä laimennetaan liikkuvalla faasilla (3.6) siten, että sen amproliumpitoisuus on 0,5–2 µg/ml, ja sekoitetaan (katso 9.3). Suodatetaan 5–10 ml tätä laimennettua liuosta kalvosuodattimella (4.2). Tehdään HPLC-määrittäminen (5.3).

5.2.2 Esiseokset (amproliumpitoisuus ≥ 1 %)

Punnitaan 0,01 gramman tarkkuudella 1–4 g esiseosta, riippuen sen amproliumpitoisuudesta, 500 ml:n erlenmeyerkolviin ja lisätään 200 ml uuttoliuosta (3.8). Kolvi pannaan ultraäänihauteeseen (4.4) 15 minuutiksi. Otetaan kolvi ultraäänihauteesta, ravistellaan 1 minuutin ajan ravistelijassa tai sekoitetaan magneettisekoittimella (4.5). Uutteesta otettu erä laimennetaan liikkuvalla faasilla (3.6) siten, että sen amproliumpitoisuus on 0,5–2 µg/ml, ja sekoitetaan. Suodatetaan 5–10 ml tätä laimennettua liuosta kalvosuodattimella (4.2). Tehdään HPLC-määrittäminen (5.3).

5.3 HPLC-määrittäminen**5.3.1 Muuttujat:**

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia ja niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaiset tulokset.

Nestekromatografiakolonni (4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationinvaihtaja Nucleosil 10 SA, hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi (3.6):	Asetonitriliin (3.2), natriumdivetyfosfaattiliuoksen (3.4) ja natriumperklooraattiliuoksen (3.5) seos, 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Virtausnopeus:	0,7–1 ml/min
Detektioaallonpituus:	264 nm
Injektioalavuus:	100 µl

▼B

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektoimalla useita kertoja kalibrintiliuosta (3.7.3), jonka konsentraatio on 1,0 µg/ml, kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.3.2 Kalibrintikäyrä

Injektoidaan kutakin kalibrintiliuosta (3.7.3) useita kertoja ja lasketaan kutakin konsentraatiota vastaavat piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrintikäyrä siten, että y-akselilla ovat kalibrintiliuosten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot (µg/ml).

5.3.3 Näyteliuos

Injektoidaan näyteliuosta (5.2) useita kertoja käyttäen samaa injektioilavuutta kuin kalibrintiliuksille ja määritetään amproliumpiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuksen amproliumkonsentraatio (µg/ml) lasketaan piikkien korkeuksien (pinta-alaan) keskiarvosta kalibrintikäyrän (5.3.2) avulla.

Näytteen amproliumpitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

V = uuttoliuksen (3.8) tilavuus (ml) 5.2 kohdan mukaisesti (ts. 200 ml),

c = näyteliuksen (5.2) amproliumpitoisuus (µg/ml),

f = 5.2 kohdan mukainen laimennuskerroin,

m = näyte-erän paino (g).

7. Tulosten validointi

7.1 Tunnistaminen

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla verrataan näyteuutteen (5.2) ja 2,0 µg/ml sisältävän kalibrintiliuksen (3.7.3) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen (5.2) lisätään sopiva määrä kalibrintiliuosta (3.7.3). Lisätyn amproliumin määrän on oltava samaa suuruusluokkaa kuin näyteuutteessa todettu amproliumin määrä.

Ainoastaan amproliumin piikki saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimennus. Piikin leveyden puolivälissä sen korkeutta on oltava $\pm 10 \%$ alkuperäisen näyteuutteen olakvindoksipiikin leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- a) Kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti ± 2 nm.

▼B

- b) Välillä 210–320 nm kromatogrammin piikkien huipun kohdalla saadut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % standardianalyysin absorbanssista.
- c) Välillä 210–320 nm näyteuutteesta saadut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % piikin huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin

— 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta, kun amproliumpitoisuus on 25–500 mg/kg,

— 75 mg/kg, kun amproliumpitoisuus on 500–1 000 mg/kg,

— 75 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta, kun amproliumpitoisuus on yli 1 000 mg/kg.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 90 %.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Eri laboratorioissa analysoitiin kolme siipikarjan rehua (näytteet 1–3), yksi kivennäisrehu (näyte 4) ja yksi esiseos (näyte 5). Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

	Näyte 1 (nollarehu)	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
keskiarvo [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
nimellispitoisuus [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = laboratorioiden lukumäärä
n = yksittäisten arvojen lukumäärä
 s_r = toistettavuuden keskihajonta
 CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin
 s_R = uusittavuuden keskihajonta
 CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.

▼B**9. Huomautukset**

- 9.1 Jos näytteessä on tiamiinia, tiamiinipiikki näkyy kromatogrammissa hiukan ennen amproliumpiikkiä. Tässä menetelmässä amproliumin ja tiamiinin on erotuttava toisistaan. Jos ne eivät erotu tässä menetelmässä käytetyllä kolonnilla (4.1.1), korvataan enintään 50 % liikkuvan faasin (3.6) asetonitriiliosuudesta metanolilla.
- 9.2 British Pharmacopoeian mukaan kloorivetyhappoon ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) tehdyn amproliumliuoksen ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) spektrissä on maksimit aallonpituuksilla 246 nm ja 262 nm. Absorbanssin on saavutettava arvo 0,84 aallonpituudella 246 nm ja 0,80 aallonpituudella 262 nm.
- 9.3 Uute on aina laimennettava liikkuvalla faasilla, koska muuten amproliumpiikin retentioaika voi muuttua merkittävästi ionivahvuuden muuttumisen johdosta.

D. KARBADOKSIN MÄÄRITYS

Metyyli-3-(2-kinoksalinyylimetyleni)-karbatsaatti- N^d, N^d -dioksidi

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää karbadoksin pitoisuus rehuissa ja esiseoksissa. Toteamisraja on 1 mg/kg. Määritysraja on 5 mg/kg.

2. Periaate

Näytteeseen lisätään vettä ja se uutetaan metanoli-asetonitriilillä. Rehu-seosnäytteiden suodatetusta uutteesta puhdistetaan tietty tilavuusosa alumiinioksidikolonnilla. Esiseosnäytteiden ja rehun lisäainevalmistenäytteiden suodatetusta uutteesta tietty tilavuusosa laimennetaan sopivalle pitoisuusalueelle vedellä, metanolilla ja asetonitriilillä. Karbadoksipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

3. Reagenssit

- 3.1 Metanoli.
- 3.2 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.
- 3.3 Etikkahappo, $w = 100 \text{ \%}$.
- 3.4 Alumiinioksidi: neutraali, aktiivisuusaste I.
- 3.5 Metanoli-asetonitriili 1 + 1 ($v + v$).
- Sekoitetaan 500 ml metanolia (3.1) ja 500 ml asetonitriiliä (3.2).
- 3.6 Etikkahappo, $\sigma = 10 \text{ \%}$.
- Laimennetaan 10 ml etikkahappoa (3.3) 100 ml:aan asti vedellä.
- 3.7 Natriumasetaatti.
- 3.8 Vesi, HPLC-laatua vastaava.
- 3.9 Asetaattipuskuriliuos, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.

Liuetetaan 0,82 g natriumasetaattia (3.7) 700 ml:aan vettä (3.8) ja pH säädetään arvoon 6,0 etikkahapolla (3.6). Siirretään 1 000 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti vedellä (3.8) ja sekoitetaan.

3.10 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi.

Sekoitetaan 825 ml asetaattipuskuriliuosta (3.9) ja 175 ml asetonitriiliä (3.2).

Suodatetaan 0,22 μm :n suodattimen (4.5) läpi ja poistetaan liuoksesta kaasut (esimerkiksi 10 minuutin ultraäänikäsittelyllä).

▼B

3.11 Standardiyhdiste.

Puhdas karbadoksi: Metyyli-3-(2-kinoksalinyylimetyleeni)-karbatsaatti-N1,N4-dioksidi, E 850.

3.11.1 Karbadoksistandardin kantaliuos, 100 µg/ml (katso huomautus 5 kohdasta: Menettely)

Punnitaan 25 mg karbadoksia (3.11) 0,1 mg:n tarkkuudella 250 ml:n mittapulloon. Liotetaan metanoli-asetonitriiliin (3.5) käsittelemällä ultraäänihauhteessa (4.7). Ultraäänikäsitteilyn jälkeen liuos jäädytetään huoneen lämpötilaan, täytetään merkkiin asti metanoli-asetonitriilillä (3.5) ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.11.2 Kalibrointiliuokset

Pipetoidaan 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 ml standardin kantaliuosta (3.11.1) 100 ml:n mittapulloihin. Lisätään 30 ml vettä, täytetään merkkiin asti metanoli-asetonitriilillä (3.5) ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon. Nämä liuokset sisältävät vastaavasti 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 µg/ml karbadoksia.

Kalibrointiliuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

Huomautus: Kun määritetään karbadoksia rehuista, jotka sisältävät vähemmän kuin 10 mg/kg karbadoksia, on valmistettava kalibrointiliuos, jonka konsentraatio on pienempi kuin 2,0 µg/ml.

3.12 Vesi-[metanoli-asetonitriili] (3.5) -seos, 300 + 700 (v + v)

Sekoitetaan 300 ml vettä ja 700 ml metanoli-asetonitriiliseosta (3.5).

4. Välineistö

4.1 Laboratorioravistelijä tai magneettisekoitin.

4.2 Lasikuitusuodatinpaperia (Whatman GF/A tai vastaava).

4.3 Lasikolonni (pituus 300–400 mm, sisähalkaisija noin 10 mm), jossa on sintterilasifritti ja poistohana.

Huomautus: Voidaan käyttää myös tulpalla varustettua lasikolonnia tai lasikolonnia, jonka pää suippenee; tällöin kolonnin alapäähän pannaan pieni lasivillatuppo, joka tiivistetään lasisauvalla.

4.4 HPLC-laitteisto, jossa voidaan injektoida 20 µl:n näytteitä.

4.4.1 Nestekromatografiakolonni: 300 mm x 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava.

4.4.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektor tai diodirividetektor, mittausaallonpituusalue 225–400 nm.

4.5 Kalvosuodatin, 0,22 µm.

4.6 Kalvosuodatin, 0,45 µm.

4.7 Ultraäänihauhte.

▼B**5. Menettely**

Huomautus: Karbadoksi on valonarkaa. Kaikki toimenpiteet on suoritettava himmennetyssä valaistuksessa, tai on käytettävä ruskeita tai alumiinifolioon käärittyjä lasitavaroita.

5.1 Yleistä**5.1.1 Nollarehu**

Saantokokeen (5.1.2) suorittamista varten analysoidaan nollarehu, jotta varmistetaan, ettei se sisällä karbadoksia tai häiritseviä aineita. Nollarehun on oltava näytteen kaltainen, eikä siinä saa olla havaittavia määriä karbadoksia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe

Saantokoe suoritetaan analysoimalla nollarehu (5.1.1), johon on lisätty näytteessä esiintyvää määrää vastaava määrä karbadoksia. Lisäyksen saamiseksi tasolle 50 mg/kg karbadoksia pipetoidaan 5,0 ml standardin kantaliuosta (3.11.1) 200 ml:n erlenmeyerkolviin. Liuos haihdutetaan noin 0,5 ml:ksi typpivirrassa. Lisätään 10 g nollarehua, sekoitetaan ja odotetaan 10 minuuttia ennen siirtymistä uuttovaiheeseen (5.2).

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (katso 5.1.1), voidaan saantokoe suorittaa vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään suunnilleen näytteiden ennestään sisältämä määrä karbadoksia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto**5.2.1 Rehu**

Punnitaan 10 g näytettä 0,01 gramman tarkkuudella ja siirretään 200 ml:n erlenmeyerkolviin. Lisätään 15,0 ml vettä, sekoitetaan ja annetaan seistä 5 minuuttia. Lisätään 35,0 ml metanoli-asetonitriliseosta (3.5), suljetaan tulpalla ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijalla tai sekoitetaan magneettisekoittimella (4.1). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatinpaperin läpi (4.2). Tämä liuos säilytetään puhdistusta (5.3) varten.

5.2.2 Esiseokset (karbadoksipitoisuus 0,1–2,0 %)

Punnitaan 1 g jauhamatonta näytettä 0,001 gramman tarkkuudella ja siirretään 200 ml:n erlenmeyerkolviin. Lisätään 15,0 ml vettä, sekoitetaan ja annetaan seistä 5 minuuttia. Lisätään 35,0 ml metanoli-asetonitriliseosta (3.5), suljetaan tulpalla ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijalla tai sekoitetaan magneettisekoittimella (4.1). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatinpaperin läpi (4.2).

Pipetoidaan määräraosa suodoksesta 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 15,0 ml vettä, täytetään merkkiin asti metanoli-asetonitrilillä (3.5) ja sekoitetaan. Lopullisen liuoksen karbadoksipitoisuuden pitää olla noin 10 µg/ml. Suodatetaan osa 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.6).

Tehdään HPLC-määrittäminen (5.4).

5.2.3 Lisäainevalmisteet (karbadoksipitoisuus > 2 %)

Punnitaan 0,2 g jauhamatonta näytettä 0,001 gramman tarkkuudella ja siirretään 250 ml:n erlenmeyerkolviin. Lisätään 45,0 ml vettä, sekoitetaan ja annetaan seistä 5 minuuttia. Lisätään 105,0 ml metanoli-asetonitriliseosta (3.5), suljetaan tulpalla ja homogenoidaan. Pidetään näytettä

▼B

ultraäänihauteessa (4.7) 15 minuuttia, minkä jälkeen liuosta ravistellaan tai sekoitetaan 15 minuuttia (4.1). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatin-paperin läpi (4.2).

Laimennetaan määräosa suodosta vesi-metanoli-asetonitriliseoksella (3.12) siten, että lopullisen liuoksen karbadoksipitoisuus on 10–15 µg/ml (10-prosenttisen lisäainevalmisteen laimennuskerroin on 10). Suodatetaan osa 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.6).

Tehdään HPLC-määrittys (5.4).

5.3 *Puhdistus*

5.3.1 *Alumiinioksidikolonnin valmistus*

Punnitaan 4 g alumiinioksidia (3.4) ja siirretään se lasikolonnein (4.3).

5.3.2 *Näytteen puhdistus*

Lisätään 15 ml suodatettua uutetta (5.2.1) alumiinioksidikolonnein; ensimmäiset 2 ml eluaattia heitetään pois. Seuraavat 5 ml otetaan talteen ja suodatetaan osa 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.6).

Tehdään HPLC-määrittys (5.4).

5.4 *HPLC-määrittys*

5.4.1 *Muuttujat*

Seuraavat olosuhteet ovat ohjeellisia, ja myös muita muuttujia voidaan käyttää, jos niillä saadaan vastaavat tulokset:

Nestekromatografiakolonni (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi (3.10):	Asetaattipuskuriliuoksen (3.9) ja asetonitriliin (3.2) seos, 825 + 175 (v + v)
Virtausnopeus:	1,5–2 ml/min
Detektioaallonpituus:	365 nm
Injektioilavuus:	20 µl.

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektioimalla useita kertoja 5,0 µg/ml karbadoksia sisältävää kalibrointiliuosta (3.11.2), kunnes piikkien korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.4.2 *Kalibrointikäyrä*

Injektoidaan jokaista kalibrointiliuosta (3.11.2) useita kertoja ja mitataan kutakin konsentraatiota vastaavat karbadoksipiikkien korkeudet (pinta-alat). Kalibrointikäyrä piirretään siten, että y-akselilla ovat kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot µg/ml.

5.4.3 *Näyteliuos*

Injektoidaan näyteuutetta (rehuseosten (5.3.2), esiseosten (5.2.2) ja lisäainevalmisteiden (5.2.3)) useita kertoja ja määritetään karbadoksipiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

▼B**6. Tulosten laskeminen**

Näyteliuoksen karbadoksipitoisuus $\mu\text{g/ml}$ lasketaan karbadoksiipikkien korkeuksien (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.4.2) avulla.

6.1 Rehut

Näytteen karbadoksipitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

c = näyteuutteen (5.3.2) karbadoksipitoisuus ($\mu\text{g/ml}$),

V_1 = uuttoliuoksen tilavuus (ml) (ts. 50),

m = näyte-erän paino (g).

6.2 Esiseokset ja lisäainevalmisteet

Näytteen karbadoksipitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

c = näyteuutteen (5.2.2 tai 5.2.3) karbadoksipitoisuus ($\mu\text{g/ml}$),

V_2 = uuttoliuoksen tilavuus (ml) (ts. 50 esiseoksille, 150 lisäainevalmisteille),

f = laimennuskerroin 5.2.2 kohdan (esiseokset) tai 5.2.3 kohdan (lisäainevalmisteet) mukaisesti,

m = näyte-erän paino (g).

7. Tulosten validointi**7.1 Tutkittavan aineen tunnistaminen**

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla tai diodirividetektorilla, mikä mahdollistaa näytteen uuttoliuoksen ja $10,0 \mu\text{l/ml}$ karbadoksia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.11.2) spektrien vertailun.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näytteen uuttoliuokseen lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.11.2). Lisätyn karbadoksimäärän on oltava suunnilleen sama kuin näyteliuoksen karbadoksin määrä.

Ainoastaan karbadoksiipiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä karbadoksia että näyteliuoksen laimeneminen. Piikin leveyden on oltava sen puolikorkeudella noin 10 % sen alkuperäisestä leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviontiperusteiden mukaisesti:

- a) kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorilla se on yleensä $\pm 2 \text{ nm}$;

▼B

- b) välillä 225–400 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajetusnäyte- ja standardispektrit eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden kahden spektrin välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 %:a standardina olevan tutkitavan aineen absorbanssista;
- c) välillä 225–400 nm näyteliuoksesta ajetusnäyte- ja standardispektrit eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 %. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa kohdissa spektrien välinen poikkeama ei ole suurempi kuin 15 % huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkitavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kun karbadoksipitoisuus on 10 mg/kg tai suurempi, kahden rinnakkaisen samasta näytteestä tehdyn määrittelyn tulosten ero ei saa olla suurempi kuin 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 90 %.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Laboratorioiden välisessä tutkimuksessa analysoitiin 6 rehuseosta, 4 esiseosta ja 3 lisäainevalmistetta kahdeksassa laboratoriossa. Kukin näyte määritettiin kaksi kertaa. (Tarkempia tietoja tästä laboratorioiden välisestä tutkimuksesta löytyy julkaisusta Journal of AOAC International, Volume 71, 1988, s. 484–490.) Tulokset (lukuun ottamatta poikkeavia arvoja) olivat seuraavat:

Taulukko 1

Laboratorioiden välisen vertailun tulokset: rehut

	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Keskiarvo (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S _r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV _r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S _R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV _R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nimellispitoisuus (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Taulukko 2

Laboratorioiden välisen vertailun tulokset: esiseokset ja lisäainevalmisteet

	Esiseokset				Lisäainevalmisteet		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Keskiarvo (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S _r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV _r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S _R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7

▼B

	Esiseokset				Lisäainevalmisteet		
	A	B	C	D	A	B	C
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nimellispitoisuus (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = laboratorioiden lukumäärä

n = yksittäisten arvojen lukumäärä

S_r = toistettavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin

S_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.



LIITE IX

6 ARTIKLASSA TARKOITETUT VASTAAVUUSTAULUKOT

1. **Direktiivi 71/250/ETY**

Direktiivi 71/250/ETY	Tämä asetus
1 artiklan ensimmäinen alakohta	3 artikla
1 artiklan toinen alakohta	2 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liitteessä oleva 1 osa	Liite II
Liitteessä oleva 2 osa	—
Liitteessä oleva 3 osa	—
Liitteessä oleva 4 osa	Liitteessä III oleva O osa
Liitteessä oleva 5 osa	Liitteessä III oleva M osa
Liitteessä oleva 6 osa	Liitteessä III oleva N osa
Liitteessä oleva 7 osa	Liitteessä III oleva Q osa
Liitteessä oleva 9 osa	Liitteessä III oleva K osa
Liitteessä oleva 10 osa	—
Liitteessä oleva 11 osa	—
Liitteessä oleva 12 osa	Liitteessä III oleva J osa
Liitteessä oleva 14 osa	Liitteessä III oleva D osa
Liitteessä oleva 16 osa	—

2. **Direktiivi 71/393/ETY**

Direktiivi 71/393/ETY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liitteessä oleva I osa	Liitteessä III oleva A osa
Liitteessä oleva II osa	Liitteessä III oleva E osa
Liitteessä oleva III osa	Liitteessä III oleva P osa
Liitteessä oleva IV osa	Liitteessä III oleva H osa

3. **Direktiivi 72/199/ETY**

Direktiivi 72/199/ETY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
4 artikla	—
Liitteessä I oleva 1 osa	Liitteessä III oleva L osa
Liitteessä I oleva 2 osa	Liitteessä III oleva C osa
Liitteessä I oleva 3 osa	—
Liitteessä I oleva 4 osa	—
Liitteessä I oleva 5 osa	Liitteessä V oleva A osa
Liite II	—

4. **Direktiivi 73/46/ETY**

Direktiivi 73/46/ETY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
3 artikla	—
4 artikla	—
Liitteessä I oleva 1 osa	Liitteessä III oleva B osa
Liitteessä I oleva 2 osa	—
Liitteessä I oleva 3 osa	Liitteessä III oleva I osa

▼B

5. **Direktiivi 76/371/ETY**

Direktiivi 76/371/ETY	Tämä asetus
1 artikla	1 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	Liite I

6. **Direktiivi 76/372/ETY**

Direktiivi 76/372/ETY	Tämä asetus
1 artikla	—
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	—

7. **Direktiivi 78/633/ETY**

Direktiivi 78/633/ETY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liitteessä oleva 1 osa	—
Liitteessä oleva 2 osa	—
Liitteessä oleva 3 osa	Liitteessä IV oleva C osa

8. **Direktiivi 81/715/ETY**

Direktiivi 81/715/ETY	Tämä asetus
1 artikla	—
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	—

9. **Direktiivi 84/425/ETY**

Direktiivi 84/425/ETY	Tämä asetus
1 artikla	—
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	—

10. **Direktiivi 86/174/ETY**

Direktiivi 86/174/ETY	Tämä asetus
1 artikla	4 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	Liite VII

11. **Direktiivi 93/70/ETY**

Direktiivi 93/70/ETY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	Liitteessä IV oleva D osa

▼B**12. Direktiivi 93/117/EY**

Direktiivi 93/117/EY	Tämä asetus
1 artikla	3 ja 5 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liitteessä oleva 1 osa	Liitteessä IV oleva E osa
Liitteessä oleva 2 osa	Liitteessä VIII oleva A osa

13. Direktiivi 98/64/EY

Direktiivi 98/64/EY	Tämä asetus
1 artikla	3 ja 5 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
4 artikla	—
Liitteessä oleva A osa	Liitteessä III oleva F osa
Liitteessä oleva C osa	Liitteessä VIII oleva B osa

14. Direktiivi 1999/27/EY

Direktiivi 1999/27/EY	Tämä asetus
1 artikla	3 ja 5 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
4 artikla	—
5 artikla	—
6 artikla	—
7 artikla	—
Liitteessä oleva A osa	Liitteessä VIII oleva C osa
Liitteessä oleva B osa	Liitteessä IV oleva F osa
Liitteessä oleva C osa	Liitteessä VIII oleva D osa

15. Direktiivi 1999/76/EY

Direktiivi 1999/76/EY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
4 artikla	—
Liite	Liitteessä IV oleva G osa

16. Direktiivi 2000/45/EY

Direktiivi 2000/45/EY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
4 artikla	—
Liitteessä oleva A osa	Liitteessä IV oleva A osa
Liitteessä oleva B osa	Liitteessä IV oleva B osa
Liitteessä oleva C osa	Liitteessä III oleva G osa

▼B**17. Direktiivi 2002/70/EY**

Direktiivi 2002/70/EY	Tämä asetus
1 artikla	1 artikla
2 artikla	2 ja 3 artikla
3 artikla	—
4 artikla	—
5 artikla	—
Liite I	Liite I ja liitteessä V olevan B osan I luku
Liite II	Liite II ja liitteessä V olevan B osan II luku

18. Direktiivi 2003/126/EY

Direktiivi 2003/126/EY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
4 artikla	—
5 artikla	—
6 artikla	—
Liite	Liite VI