

I

(EY:n ja Euratomin perustamissopimuksia soveltamalla annetut säädökset, joiden julkaiseminen on pakollista)

ASETUKSET

KOMISSIO ASETUS (EY) N:o 152/2009,

annettu 27 päivänä tammikuuta 2009,

näytteenotto- ja määrittämismenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon rehu- ja elintarvikelainsäädännön sekä eläinten terveyttä ja hyvinvointia koskevien sääntöjen mukaisuuden varmistamiseksi suoritettua virallisesta valvonnasta 29 päivänä huhtikuuta 2004 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 882/2004 ⁽¹⁾ ja erityisesti sen 11 artiklan 4 kohdan a, b ja c alakohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Direktiivin 70/373/ETY täytäntöönpanemiseksi annettiin seuraavat säädökset, jotka ovat voimassa asetuksen (EY) N:o 882/2004 61 artiklan 2 kohdan mukaisesti:

- yhteisön määrittämismenetelmästä rehujen virallista tarkastusta varten 15 päivänä kesäkuuta 1971 annettu ensimmäinen komission direktiivi 71/250/ETY ⁽²⁾,
- yhteisön määrittämismenetelmästä rehujen virallista tarkastusta varten 18 päivänä marraskuuta 1971 annettu toinen komission direktiivi 71/393/ETY ⁽³⁾,
- yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 27 päivänä huhtikuuta 1972 annettu kolmas komission direktiivi 72/199/ETY ⁽⁴⁾,

— yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 5 päivänä joulukuuta 1972 annettu neljäs komission direktiivi 73/46/ETY ⁽⁵⁾,

— yhteisön näytteenottomenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 1 päivänä maaliskuuta 1976 annettu ensimmäinen komission direktiivi 76/371/ETY ⁽⁶⁾,

— yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 1 päivänä maaliskuuta 1976 annettu seitsemäs komission direktiivi 76/372/ETY ⁽⁷⁾,

— yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 15 päivänä kesäkuuta 1978 annettu kahdeksas komission direktiivi 78/633/ETY ⁽⁸⁾,

— yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 31 päivänä heinäkuuta 1981 annettu yhdeksäs komission direktiivi 81/715/ETY ⁽⁹⁾,

— yhteisön määrittämismenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 25 päivänä heinäkuuta 1984 annettu kymmenes komission direktiivi 84/425/ETY ⁽¹⁰⁾,

— siipikarjan rehuseosten energia-arvon laskentamenetelmästä 9 päivänä huhtikuuta 1986 annettu komission direktiivi 86/174/ETY ⁽¹¹⁾,

⁽¹⁾ EUVL L 165, 30.4.2004, s. 1, oikaisu EUVL L 191, 28.5.2004, s. 1.

⁽²⁾ EYVL L 155, 12.7.1971, s. 13.

⁽³⁾ EYVL L 279, 20.12.1971, s. 7.

⁽⁴⁾ EYVL L 123, 29.5.1972, s. 6.

⁽⁵⁾ EYVL L 83, 30.3.1973, s. 21.

⁽⁶⁾ EYVL L 102, 15.4.1976, s. 1.

⁽⁷⁾ EYVL L 102, 15.4.1976, s. 8.

⁽⁸⁾ EYVL L 206, 29.7.1978, s. 43.

⁽⁹⁾ EYVL L 257, 10.9.1981, s. 38.

⁽¹⁰⁾ EYVL L 238, 6.9.1984, s. 34.

⁽¹¹⁾ EYVL L 130, 16.5.1986, s. 53.

- yhteisön määrittämenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 28 päivänä heinäkuuta 1993 annettu yhdestoista komission direktiivi 93/70/ETY ⁽¹⁾,
- yhteisön määrittämenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 17 päivänä joulukuuta 1993 annettu kahdestoista komission direktiivi 93/117/ETY ⁽²⁾,
- yhteisön määrittämenetelmistä rehujen aminohappojen, raakarasvan ja olakvindoksin määrittästä varten ja direktiivin 71/393/ETY muuttamisesta 3 päivänä syyskuuta 1998 annettu komission direktiivi 98/64/EY ⁽³⁾,
- yhteisön menetelmien vahvistamisesta amproliumin, diklatsuriilin ja karbadoksin määrittämiseksi rehuista ja direktiivien 71/250/ETY ja 73/46/ETY muuttamisesta sekä direktiivin 74/203/ETY kumoamisesta 20 päivänä huhtikuuta 1999 annettu komission direktiivi 1999/27/EY ⁽⁴⁾,
- yhteisön menetelmistä lasalosid-natriumin määrittämiseksi 23 päivänä heinäkuuta 1999 annettu komission direktiivi 1999/76/EY ⁽⁵⁾,
- yhteisön analyysimenetelmistä rehun A-vitamiinin, E-vitamiinin ja tryptofaanin määrittämiseksi 6 päivänä heinäkuuta 2000 annettu komission direktiivi 2000/45/EY ⁽⁶⁾,
- rehujen dioksiinipitoisuuksien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien määrittämistä koskevista vaatimuksista 26 päivänä heinäkuuta 2002 annettu komission direktiivi 2002/70/EY ⁽⁷⁾,
- analyysimenetelmästä eläinperäisten ainesosien määrittämiseksi rehujen virallista tarkastusta varten 23 päivänä joulukuuta 2003 annettu komission direktiivi 2003/126/EY ⁽⁸⁾.
- (2) Koska direktiivi 70/373/ETY on korvattu asetuksella (EY) N:o 882/2004, on aiheellista korvata kyseisen direktiivin täytäntöönpanosäädökset yhdellä asetuksella. Samalla menetelmät olisi mukautettava tieteen ja tekniikan kehitykseen. Menetelmät, jotka eivät enää täytä alkuperäistä tarkoitustaan, on poistettava. Lainsäädännön mukaisesti näytteenottoa koskevat säännökset päivitetään sopivana ajankohtana, jotta otetaan huomioon rehujen valmistus-, varastointi-, kuljetus- ja markkinointitapojen viimeaikainen kehitys, mutta nykyiset näytteenottoa koskevat säännökset on aiheellista pitää toistaiseksi voimassa.
- (3) Sen vuoksi 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/ETY, 98/64/EY, 1999/27/EY, 1999/76/EY, 2000/45/EY, 2002/70/EY ja 2003/126/EY olisi kumottava.
- (4) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat elintarvikeketjua ja eläinten terveyttä käsittelevän pysyvän komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Rehujen virallisessa tarkastuksessa suoritettava näytteenotto rehun sisältämien aineiden, lisäaineiden sekä haitallisten aineiden määrittämiseksi, lukuun ottamatta torjunta-ainejäämiä ja mikro-organismeja, on suoritettava tämän direktiivin liitteessä I esitettyjen menetelmien mukaisesti.

2 artikla

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

3 artikla

Rehujen virallista tarkastusta varten tehtävissä määrittämissä 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.

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/ETY, 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.

⁽¹⁾ EYVL L 234, 17.9.1993, s. 17.

⁽²⁾ EYVL L 329, 30.12.1993, s. 54.

⁽³⁾ EYVL L 257, 19.9.1998, s. 14.

⁽⁴⁾ EYVL L 118, 6.5.1999, s. 36.

⁽⁵⁾ EYVL L 207, 6.8.1999, s. 13.

⁽⁶⁾ EYVL L 174, 13.7.2000, s. 32.

⁽⁷⁾ EYVL L 209, 6.8.2002, s. 15.

⁽⁸⁾ EUVL L 339, 24.12.2003, s. 78.

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 sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 27 päivänä tammikuuta 2009.

Komission puolesta

Androulla VASSILIOU

Komission jäsen

LIITE I

NÄYTTEENOTTOMENETELMÄT

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

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

2. NÄYTTEENOTTAJAT

Näytteitä ottavat kyseisen jäsenvaltion tähän tehtävään valtuuttamat henkilöt.

3. MÄÄRITELMÄT

Tutkittava erä: tuoteyksikkömäärä, jonka katsotaan olevan ominaisuuksiltaan tasalaatuinen.

Osanäyte: tuotemäärä, joka on otettu tutkittavan erän yhdestä kohdasta.

Kokoomanäyte: tutkittavan erän eri kohdista otetuista osanäytteistä muodostettu yhteisnäyte.

Supistettu näyte: kokoomanäytteen edustava osa, joka on saatu kokoomanäytteestä jakomenettelyn avulla.

Lopullinen näyte: supistetun näytteen tai homogenoidun kokoomanäytteen osa.

4. VÄLINEISTÖ

4.1 Näytteenottovälineiden on oltava valmistettu materiaaleista, jotka eivät aiheuta kontaminaatiota tuotteista otettuihin näytteisiin. Nämä välineet voivat olla jäsenvaltioiden virallisesti hyväksymiä.

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. astian syvyys, säkin mitat) sekä rehun raekokoon.

4.2.2 Koneellinen näytteenotto

Hyväksyttyä koneellista laitetta voidaan käyttää otettaessa näytteitä liikkuvasta rehusta.

4.2.3 Näytteenjakolaite

Osanäytteiden ottamiseen sekä supistettujen ja lopullisten näytteiden valmistamiseen voidaan käyttää laitetta, joka on suunniteltu jakamaan näyte suunnilleen yhtä suuriin osiin.

5. MÄÄRÄÄ KOSKEVAT VAATIMUKSET

5.A	Rehut, joissa aineet tai tuotteet ovat tasaisesti jakaantuneina
5.A.1	Tutkittava erä Tutkittavan erän on oltava sen kokoinen, että näyte voidaan ottaa kaikista erän kohdista.

5.A.2	Osanäytteet	
5.A.2.1	Irtorehu:	Pienin vaadittu osanäytteiden lukumäärä:
5.A.2.1.1	tutkittava erä enintään 2,5 tonnia:	seitsemän
5.A.2.1.2	tutkittava erä yli 2,5 tonnia	$\sqrt{20}$ x tutkittavan erän tonnimäärä (*), kuitenkin enintään 40 osanäytettä
5.A.2.2	Pakattu rehu:	Pienin vaadittu määrä pakkauksia, joista otetaan näyte (**):
5.A.2.2.1	Yli 1 kg:n pakkaukset:	
5.A.2.2.1.1	tutkittavassa erässä 1–4 pakkausta	kaikki pakkaukset
5.A.2.2.1.2	tutkittavassa erässä 5–16 pakkausta	neljä
5.A.2.2.1.3	tutkittavassa erässä yli 16 pakkausta	$\sqrt{20}$ tutkittavassa erässä (*) olevien pakkausten lukumäärä, kuitenkin enintään 20 pakkausta
5.A.2.2.2	Pakkausten paino enintään 1 kg	neljä
5.A.2.3	Nestemäinen tai puolijuokseva rehu:	Pienin vaadittu määrä tutkittavia säiliöitä, joista otetaan näyte (**):
5.A.2.3.1	Säiliön tilavuus yli 1 litra:	
5.A.2.3.1.1	tutkittavassa erässä 1–4 säiliötä	kaikki säiliöt
5.A.2.3.1.2	tutkittavassa erässä 5–16 säiliötä	neljä
5.A.2.3.1.3	tutkittavassa erässä yli 16 säiliötä	$\sqrt{20}$ tutkittavassa erässä (*) olevien säiliöiden lukumäärä, kuitenkin enintään 20 säiliötä
5.A.2.3.2	Säiliön tilavuus enintään yksi litra	neljä
5.A.2.4	Rehukakut ja nuolukivet	Pienin vaadittu tutkittavien rehukakkujen tai nuolukivien lukumäärä, joista otetaan näyte (**): Yksi rehukakku tai yksi nuolukivi tutkittavan erän jokaista 25 yksikköä kohti, kuitenkin enintään 4 rehukakkua tai nuolukiveä
5.A.3	Kokoomanäyte Tutkittavaa erää kohden riittää yksi kokoomanäyte. Yhden kokoomanäytteen muodostavien osanäytteiden kokonaismäärän on oltava vähintään seuraava:	
5.A.3.1	Irtorehu:	4 kg
5.A.3.2	Pakattu rehu:	
5.A.3.2.1	pakkauksen paino yli 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2	pakkauksen paino enintään 1 kg	neljän alkuperäisen pakkauksen sisällön paino
5.A.3.3	Nestemäinen tai puolijuokseva rehu:	
5.A.3.3.1	säiliön tilavuus yli 1 litra:	neljä litraa
5.A.3.3.2	säiliön tilavuus enintään yksi litra	neljän alkuperäisen säiliön sisällön paino
5.A.3.4	Rehukakut ja nuolukivet	
5.A.3.4.1	yksikköpaino yli 1 kg	4 kg
5.A.3.4.2	yksikköpaino enintään 1 kg	neljän alkuperäisen rehukakun tai nuolukiven paino

5.A.4	Lopullinen näyte Lopullinen näyte on kokoomanäyte tarpeen mukaan supistettuna. 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
5.B	Rehut, jotka sisältävät sellaisia haitallisia aineita tai tuotteita, jotka todennäköisesti ovat epätasaisesti jakaantuneina rehuaineessa, kuten aflatoksiinit, torajyvä, risiinikasvi ja crotalaria (**).	
5.B.1	Tutkittava erä: katso 5.A.1	
5.B.2	Osanäytteet	
5.B.2.1	Irtorehu: katso 5.A.2.1	
5.B.2.2	Pakattu rehu:	Pienin vaadittu lukumäärä tutkittavia pakkauksia, joista otetaan näyte:
5.B.2.2.1	tutkittavassa erässä 1–4 pakkausta	kaikki pakkaukset
5.B.2.2.2	tutkittavassa erässä 5–16 pakkausta	neljä
5.B.2.2.3	tutkittavassa erässä yli 16 pakkausta	√ tutkittavan erän (*) pakkauksen lukumäärä, kuitenkin enintään 40 pakkausta
5.B.3	Kokoomanäyte Kokoomanäytteiden lukumäärä vaihtelee tutkittavan erän koon mukaan. Seuraavassa annetaan pienin vaadittu kokoomanäytteiden lukumäärä tutkittavaa erää kohti. Yhden kokoomanäytteen muodostavien osanäytteiden yhteispainon on oltava vähintään seuraava:	
5.B.3.1	Irtorehu:	
	Tutkittavan erän paino (tonnia):	Pienin vaadittu kokoomanäytteiden lukumäärä tutkittavaa erää kohti:
	enintään 1	1
	yli 1 ja enintään 10	2
	yli 10 ja enintään 40	3
	yli 40	4
5.B.3.2	Pakattu rehu	
	Tutkittavan erän koko ilmaistuna pakkauksen lukumääränä:	Pienin vaadittu kokoomanäytteiden lukumäärä tutkittavaa erää kohti:
	1–16	1
	17–200	2
	201–800	3
	yli 800	4
5.B.4	Lopullinen näyte Lopullinen näyte on kokoomanäyte supistettuna. Analyysi tehdään vähintään yhdestä lopullisesta näytteestä <i>kutakin kokoomanäytettä kohti</i> . Analyysia varten valmistetun lopullisen näytteen on oltava massaltaan vähintään 500 g.	

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

(**) Jos pakkauksen tai säiliön sisältö ei ylitä yhtä kiloa tai yhtä litraa ja jos rehukakun tai nuolukiven paino ei ylitä yhtä kiloa, osanäyte on yhden alkuperäisen pakkauksen tai säiliön sisältö, yksi rehukakku tai yksi nuolukivi.

(***) 5.A kohdassa säädettyjä menetelmiä käytetään aflatoksiinien, torajyvän, risiinikasin ja crotalarian valvontaan täysrehuissa ja täydennysrehuissa.

6. NÄYTTEIDEN OTTAMISTA, VALMISTAMISTA JA PAKKAAMISTA KOSKEVAT OHJEET

6.1 Yleistä

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

6.2 Osanäytteet

6.2.A Rehut, joissa aineet tai tuotteet ovat tasaisesti jakaantuneina

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

6.2.A.1 Irtorehu

Tutkittava erä kuvitellaan jaetuksi suunnilleen samankokoisiin osiin. Valitaan satunnaisesti sellainen määrä osia, joka vastaa 5.A.2 kohdan mukaista osanäytteiden määrää, ja jokaisesta osasta otetaan vähintään yksi näyte.

Näytteet voidaan tarvittaessa ottaa tutkittavaa erää siirrettäessä (lastauksen tai purkamisen yhteydessä).

6.2.A.2 Pakattu rehu

Kun 5.A.2 kohdan mukainen lukumäärä pakkauksia on valittu näytteenottoa varten, kunkin pakkauksen sisällöstä otetaan osa kairaa tai kauhaa käyttäen. Tarvittaessa näytteet on otettava vasta sitten, kun pakkaukset on erikseen tyhjennetty. Kaikki kokkareet on hajotettava, jolloin ne erotetaan näytteestä ja pannaan hajotettuina takaisin näytteeseen.

6.2.A.3 Homogeeniset ja homogenoituvat nestemäiset tai puolijuoksevat rehut

Kun 5.A.2 kohdan mukainen lukumäärä säiliöitä on valittu näytteenottoa varten, sisältö on tarvittaessa homogenoitava ja vaadittava määrä näytettä otettava kustakin säiliöstä.

Osanäytteet voidaan ottaa säiliöitä tyhjennettäessä.

6.2.A.4 Nestemäiset tai puolijuoksevat rehut, joita ei voi homogenoida

Kun 5.A.2 kohdan mukainen lukumäärä säiliöitä on valittu näytteenottoa varten, on otettava näytteet rehun eri kerroksista.

Näytteet voidaan ottaa myös säiliötä tyhjennettäessä, kuitenkin siten, että ensimmäisiä jakeita ei oteta talteen.

Kummassakin tapauksessa näytteen kokonaismäärän on oltava vähintään 10 litraa.

6.2.A.5 Rehukakut ja nuolukivet

Kun 5.A.2 kohdan mukainen lukumäärä rehukakkuja tai nuolukiviä on valittu näytteenottoa varten, otetaan pala jokaisesta kakusta tai kivistä.

6.2.B Rehut, jotka sisältävät sellaisia haitallisia aineita tai tuotteita, jotka todennäköisesti ovat epätasaisesti jakaantuneina rehuaineessa, kuten aflatoksiinit, torajyvä, risiinikasvi ja crotalaria

Tutkittava erä kuvitellaan jaetuksi suunnilleen samankokoisiin osiin, joiden lukumäärä vastaa 5.B.3 kohdan mukaista kokoomanäytteiden lukumäärää. Jos kyseinen luku on suurempi kuin yksi, jaetaan tutkittava erä 5.B.2 kohdan mukaista osanäytteiden kokonaislukumäärää vastaavaan määrään suunnilleen samankokoisia osia. Jokaisesta osasta otetaan suunnilleen samankokoinen näyte⁽¹⁾ siten, että kustakin osasta otettujen näytteiden yhteispainon on oltava vähintään jokaiselle kokoomanäytteelle asetettu minimi 4 kg. Tutkittavan erän eri osista otettuja osanäytteitä ei saa yhdistää kokoomanäytteeksi.

⁽¹⁾ Kun kyseessä on pakattu rehu, kunkin tutkittavan pakkauksen sisällöstä otetaan osa kairaa tai kauhaa käyttäen sen jälkeen, kun pakkaukset on tarvittaessa erikseen tyhjennetty.

6.3 Kokoomanäytteen valmistaminen**6.3.A** *Rehut, joissa aineet tai tuotteet ovat tasaisesti jakaantuneina*

Kokoomanäyte muodostetaan sekoittamalla osanäytteet keskenään.

6.3.B *Rehut, jotka sisältävät sellaisia haitallisia aineita tai tuotteita, jotka todennäköisesti ovat epätasaisesti jakaantuneina rehuaineessa, kuten aflatoksiinit, torajyvä, risiinikasvi ja crotalaria*

Kustakin tutkittavan erän osasta otetut osanäytteet sekoitetaan ja niistä valmistetaan 5.B.3 kohdan mukainen määrä kokoomanäytteitä pitäen huolta siitä, että jokaisen kokoomanäytteen alkuperä on merkitty muistiin.

6.4 Lopullisen näytteen valmistaminen

Kunkin kokoomanäytteen sisältämä aines sekoitetaan huolellisesti, jotta näytteestä tulee homogeeninen.⁽¹⁾ Tarvittaessa kokoomanäyte on ensin pienennettävä vähintään 2 kg:n tai 2 litran suuruisiksi (supistettu näyte) joko käyttämällä koneellista tai automaattista näytteenjakolaitetta tai jakamalla näyte neljännesmenetelmällä.

Tämän jälkeen valmistetaan vähintään kolme lopullista näytettä, jotka ovat suunnilleen samankokoisia ja täyttävät 5.A.4 tai 5.B.4 kohdan määrälliset vaatimukset. Kukin näyte laitetaan asianmukaiseen astiaan. On toteutettava kaikki tarvittavat varotoimenpiteet, jotta vältetään näytteen koostumuksen muuttuminen, saastuminen tai turmeltuminen kuljetuksen tai varastoinnin aikana.

6.5 Lopullisen näytteen pakkaaminen

Näyteastiat tai -pakkaukset sinetöidään ja varustetaan etiketillä siten, ettei niitä voi avata sinettä vahingoittamatta (koko etiketin on oltava kiinni sinetissä).

7. NÄYTTEENOTTOPÖYTÄKIRJA

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

8. NÄYTTEIDEN LÄHETTÄMINEN

Jokaisesta kokoomanäytteestä on lähetettävä vähintään yksi lopullinen näyte mahdollisimman nopeasti viralliseen laboratorioon yhdessä analyysin suorittajan tarvitsemien tietojen kanssa.

⁽¹⁾ Kaikki kokkareet on hajotettava, jolloin ne erotetaan näytteestä ja pannaan hajotettuina takaisin näytteeseen.

LIITE II

REHUIEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ KOSKEVAT YLEISET SÄÄNNÖKSET

A. NÄYTTEIDEN VALMISTAMINEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN

1. Tarkoitus

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

Näytteet on valmistettava siten, että määrittämenetelmien mukaiset punnitut määrät ovat homogeenisia ja edustavia.

2. Varotoimenpiteet

Näytteiden valmistusmenettely riippuu käytettävistä määrittämenetelmistä. Tästä syystä on olennaisen tärkeää varmistaa, että näytteiden valmistusmenettely on käytettävien määrittämenetelmien kannalta asianmukainen.

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

Näyte on jauhettava, sekoitettava ja seulottava mahdollisimman nopeasti altistaen sitä ilmalle ja valolle mahdollisimman vähän. Sellaisia myllyjä ja jauhuslaitteita, joissa näytteen huomattava lämpeneminen on todennäköistä, ei pidä käyttää.

On suositeltavaa jauhaa erityisen lämmönarat rehut käsin. Lisäksi on huolehdittava siitä, ettei itse välineistössä ole kontaminaatiota aiheuttavia hivenainejäämiä.

Jos näytettä ei voi valmistaa muuttamatta merkittävästi sen sisällön kosteuspitoisuutta, on kosteuspitoisuus määritettävä ennen valmistusta ja sen jälkeen liitteessä III olevassa A osassa säädetyn menetelmän mukaisesti.

3. Menettely

Näyte jaetaan sopiviksi eränäytteiksi määrittystä ja vertailua varten käyttäen asianmukaisia jakotekniikoita, kuten vuorottelevaa kahtiointia taikka kiinteän tai pyörivän kourujakajan käyttöä. Kartiomurskaimen ja neljännesmenetelmän käyttöä ei suositella, koska ne aiheuttavat eränäytteisiin suuren jakovirheriskin. Vertailunäyte pannaan sopivaan puhtaaseen, kuivaan ja ilmatiiviisti suljettavaan näyteastiaan, ja määrittäykseen tarkoitetut, vähintään 100 gramman suuruiset eränäytteet valmistetaan jäljempänä esitetyllä tavalla.

3.1 Sellaisenaan jauhettavat rehut

Jollei määrittämenetelmissä toisin mainita, koko näyte seulotaan tarvittaessa jauhamisen jälkeen seulalla, jonka neliönmuotoisten reikien sivu on 1 mm (suosituksen ISO R565 mukaisesti). Liikajauhatusta on vältettävä.

Seulottu näyte sekoitetaan ja pannaan tarkoituksenmukaiseen puhtaaseen, kuivaan ja ilmatiiviisti suljettavaan näyteastiaan. Näyte sekoitetaan uudelleen välittömästi ennen punnitsemista määrittystä varten.

3.2 Kuivauksen jälkeen jauhettavat rehut

Jollei määrittämenetelmissä toisin mainita, näyte kuivataan kosteuspitoisuuteen 8–12 % käyttäen esikuivatusmenetelmää, joka esitetään liitteessä III olevan A osan 4.3 kohdassa kuvatun kosteudenmäärittämenetelmän yhteydessä. Tämän jälkeen jatketaan edellä 3.1 kohdassa esitetyllä tavalla.

3.3 Nestemäiset tai puolijuokevat rehut

Näyte kerätään sopivaan puhtaaseen, kuivaan ja ilmatiiviisti suljettavaan näyteastiaan. Näyte sekoitetaan perusteellisesti välittömästi ennen näytteen ottamista.

3.4 Muut rehut

Jos näytettä ei voi valmistaa jollain edellä esitetyllä tavalla, se on valmistettava millä tahansa muulla tavalla, jolla varmistetaan, että määrittystä varten punnitut ainemäärät ovat homogeenisia ja edustavat lopullisia näytteitä.

4. Näytteiden säilytys

Näytteet on säilytettävä lämpötilassa, jossa niiden koostumus ei muutu. Vitamiinien tai valolle erityisen herkkien aineiden määrittämiseen tarkoitetut näytteet on säilytettävä ruskeasta lasista valmistetuissa näyteastioissa.

B. MÄÄRITYSMENETELMISSÄ KÄYTETTÄVIÄ REAGENSSEJA JA VÄLINEITÄ KOSKEVAT SÄÄNNÖKSET

1. Jollei määrittämissä tosin mainita, kaikkien reagenssien on oltava analyysilaatua (p.a.). Hivenainejäämiä määritettäessä reagenssien puhtaus on tarkistettava nollanäytteellä. Saatujen tuloksien mukaan voi reagenssien lisäpuhdistus olla tarpeen.
2. Määrittämissä mainituissa toimenpiteissä, joihin liittyy liuosten valmistus, laimennus, huuhtelu tai pesu ja joissa käytettävän liuottimen tai laimentimen laatua ei mainita, on käytettävä vettä. Pääsääntöisesti on käytettävä demineralisoitua tai tislattua vettä. Määrittämissä mainituissa erityistapauksissa vesi on puhdistettava erityisillä puhdistusmenetelmillä.
3. Tutkimuslaboratorioissa käytettävistä välineistä määrittämissä mainitaan ainoastaan erikoisinstrumentit ja -välineet tai erityiskäyttöön tarkoitetut instrumentit ja välineet. Niiden on oltava puhtaita etenkin määritettäessä hyvin pieniä ainemääriä.

C. MÄÄRITYSMENETELMIEN KÄYTTÖ JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

1. Uuttomenettely

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

2. Puhdistusmenettely

Useat menetelmät edellyttävät erityistä puhdistusmenetelmää. Pääsääntöisesti voidaan soveltaa myös muita puhdistusmenetelmiä 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. Käytetyn määrittämissä ilmoittaminen

Yleensä kunkin rehun olevan ainesosan määrittämiseksi vahvistetaan vain yksi määrittämissä. Kun useita menetelmiä on mainittu, määrittämissä on mainittava tutkimuslaboratorion käyttämä menetelmä.

4. Määrittämissä lukumäärä

Määrittämissä annetun tuloksen on oltava keskiarvo, joka on saatu ainakin kahdesta määrittämisestä, jotka on tehty erillisistä näytteistä ja joiden toistettavuus on tyydyttävä.

Jos kuitenkin haitallisten aineiden määrittämissä ensimmäisen määrittämissä tulos on merkittävästi (> 50 %) valvottavaa arvoa alempi, lisämäärittämiset eivät ole tarpeen edellyttäen, että asianmukaisia laatumenetelmiä on sovellettu.

Kun kyse on aineen tai ainesosan ilmoitetun pitoisuuden valvonnasta ja jos ensimmäisen määrittämissä tulos vahvistaa ilmoitetun pitoisuuden eli määrittämissä tulos on ilmoitetun pitoisuuden hyväksyttävällä vaihteluvälillä, lisämäärittämiset eivät ole tarpeen edellyttäen, että asianmukaisia laatumenetelmiä on sovellettu.

Joissain tapauksissa hyväksyttävä vaihteluväli on määritelty lainsäädännössä, kuten neuvoston direktiivissä 79/373/ETY⁽¹⁾.

5. Määrittämissä tuloksen ilmoittaminen

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

⁽¹⁾ EYVL L 86, 6.4.1979, s. 30.

6. Mittausepävarmuus ja saanto haitallisten aineiden määrittämisessä

Direktiivissä 2002/32/EY tarkoitettujen haitallisten aineiden, kuten dioksiinien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden, ollessa kyseessä eläinten rehuksi tarkoitettua tuotetta ei pidetä vahvistetun enimmäispitoisuuden mukaisena, jos määrittystuloksen 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 määrittämenetelmässä voidaan arvioida mittausepävarmuus ja korjata tulos saannon suhteen (esimerkiksi mikroskooppitutkimuksessa tämä ei ole mahdollista).

Määrittystulos on esitettävä seuraavalla tavalla (sikäli kuin käytetty määrittämenetelmän 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 %;
- b) muodossa $x \pm U$, jossa x on määrittystulos ja U on mittaukseen liittyvä laajennettu epävarmuus, käyttäen kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 %.

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

LIITE III

**REHUAINIEN 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 kasvivasvoja 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 vesijähdytteiset pienoismyllyt, kartiomyllyt, hitaasti liikkuvat tai hammaspyörillä varustetut hienonnuslaitteet).
- 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 Sähkölämmiteinen, tasalämpöinen ja nopeasti säädettävissä oleva lämpökaappi (± 2 °C), jossa on tuuletusjärjestelmä ⁽¹⁾.
- 3.5 Säädettävä sähkölämmiteinen 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 rinnakkaismäärityksenä.

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.

⁽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 kuivausten tuloksista alle 0,15 %.

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 tarkoitetut 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 viedään 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 viedään 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 vakuu- lämpökaappiin (3.5), joka on kuumennettu 80–85 °C:seen. Kaapin lämpötilan tarpeettoman laskun välttämiseksi astia viedään 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 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 vakuu- lämpökaapissa 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 laboratoriossa tunnin ajan ja punnitaan 10 mg:n tarkkuudella. Näyte jauhetaan välittömästi 4.1.1 kohdassa esitetyllä tavalla ja kuivataan rehutyyppiin 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 jyvää 10 mg:n tarkkuudella sopivaan astiaan (esim. 0,5 cm:n reunalla varustettu 20 × 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,

m₀ = 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,

m₁ = näytteen paino grammoina esikuivauksen jälkeen,

m₂ = näytteen paino grammoina hienontamisen tai jauhamisen jälkeen,

m₀ = näytteen paino grammoina kuivauksen jälkeen.

5.3 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen 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 määritystulokset 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 paisuntaputki 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 jäädyttäen 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:

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

joissa:

m = näytteen paino grammoina,

m₁ = astian paino sisältöineen grammoina ennen kuumennusta,

m₂ = 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, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5 Rikkihappo, standardiliuos, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6 Rikkihappo, standardiliuos, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7 Rikkihappo, standardiliuos, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8 Metyyliipunaindikaattori: 300 g metyyliipunaista liuotetaan 100 ml:aan 95–96 % etanolia (v/v).
- 3.9 Natriumhydroksidiliuos (teknisen laadun käyttö mahdollista) $\beta = 40 \text{ g/100 ml}$ (m/v: 40 %).
- 3.10 Natriumhydroksidi, standardiliuos $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11 Natriumhydroksidi, standardiliuos $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 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 Metyyliipunaindikaattoriliuos: liuotetaan 0,1 g metyyliipunaa 100 ml:aan etanolia tai metanolia.
- 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, boorihappoliuoksiin on lisättävä metyyliipuna- ja bromikresoli-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 hajotuspoltoa 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 keräilyastiaan lisätään oletetun typpipitoisuuden mukaan 25 ml rikkihappoa (3.5) tai (3.7) tarkasti mitattuna. Lisätään muutama pisara metyyliipunaindikaattoria (3.8).

Kolvi yhdistetään tislauslaitteen 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 tislauslaite on täysin automaattinen ja suorittaa ammoniakin 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. Tislauslaite säädetään annostelemaan 50 ml natriumhydroksidiliuosta (3.9). Tislauslaitetta käytetään valmistajan ohjeiden mukaan ja tislataan pois natriumhydroksidiliuoksen lisäyksen tuloksena vapautunut ammoniakki. Tisle kerätään boorihappoa sisältävään vastaanottoliuokseen. Tisleen määrä (vesihöyrytislauksen aika) riippuu näytteen sisältämän typen määrästä. Valmistajan ohjeita noudatetaan.

Huomautus: Puoliautomaattisessa tislauslaitteessa natriumhydroksidylimäärän lisäys ja vesihöyrytislauksen tapahtumat 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) byrettii 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.

Tislauslaitteen tai tislaus/titrauslaitteen käytössä noudatetaan valmistajan ohjeita.

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

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 välille pH 4–7 noudattaen tavanomaisia laboratorioiden pH-kalibrointimenettelyjä.

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

5.4 Nollakoe

Reagenssien typettömyyden varmistamiseksi suoritetaan nollakoe (hajotus, tislauksen ja titrauksen) 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:

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

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

Määrittys (hajotus, tislaukset 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 häviötä tapahdu. Jos tisluslaitteen kolvissa ei ole tiputussuppilaa, lisätään natriumhydroksidi välittömästi ennen kolvin liittämistä jäähdyttimeen kaataen liuos hitaasti kolvin seinämää myöten.
- 8.2 Jos hajotettu tuote kiinteytyy, määrittys 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 rutiinimäärittämissä 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, määrittysselesteessä on mainittava, mitä menetelmää raakavalkuaisen määrittämisessä on käytetty.

D. UREA MÄÄRITYS**1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen ureapitoisuus.

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 (p_{20} 1,19 g/ml). Tämä reagenssi säilyy korkeintaan kahden viikon ajan.
- 3.2 Carrez-liuos I: veteen liuotetaan 21,9 g sinkkiasetaattia $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ja 3 g jäätikkää. Tilavuus säädetään 100 ml:ksi vedellä.
- 3.3 Carrez-liuos II: Liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. 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 Lasihioستولpallisia koeputkia 160 × 16 mm.

4.3 Spektrofotometri.

5. Menettely

5.1 Näytteen määrittäminen

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 2 g näytettä sekä 1 g aktiivihiltä (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 lasihioستولpallisiin 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 nollakoeliuokseen.

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 kontrolliliuokseen, 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.

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 ammoniakkinäytteinä.

2. Periaate

Näyte uutetaan vedellä, liuos kirkastetaan ja suodatetaan. Haihtuvat typpipitoiset emäkset vapautetaan mikrodiffuusiolla 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-prosenttista (v/v) etanolia.
- 3.3 Boorihappoliuos: liuotetaan 10 g boorihappoa 1 litran mittapullossa 200 ml:aan 95–96-prosenttista (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 kiehuvaan 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 mikroyrettejä.

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 näytemalja-suodosta. 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 sekoittuvat. Inkuboidaan vähintään neljä tuntia huoneenlämmössä tai yksi tunti 40 °C:ssa.

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

Nollakoe suoritetaan samalla tavalla, mutta ilman määritettävää näytettä.

6. Tulosten laskeminen

1 ml H₂SO₄: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:

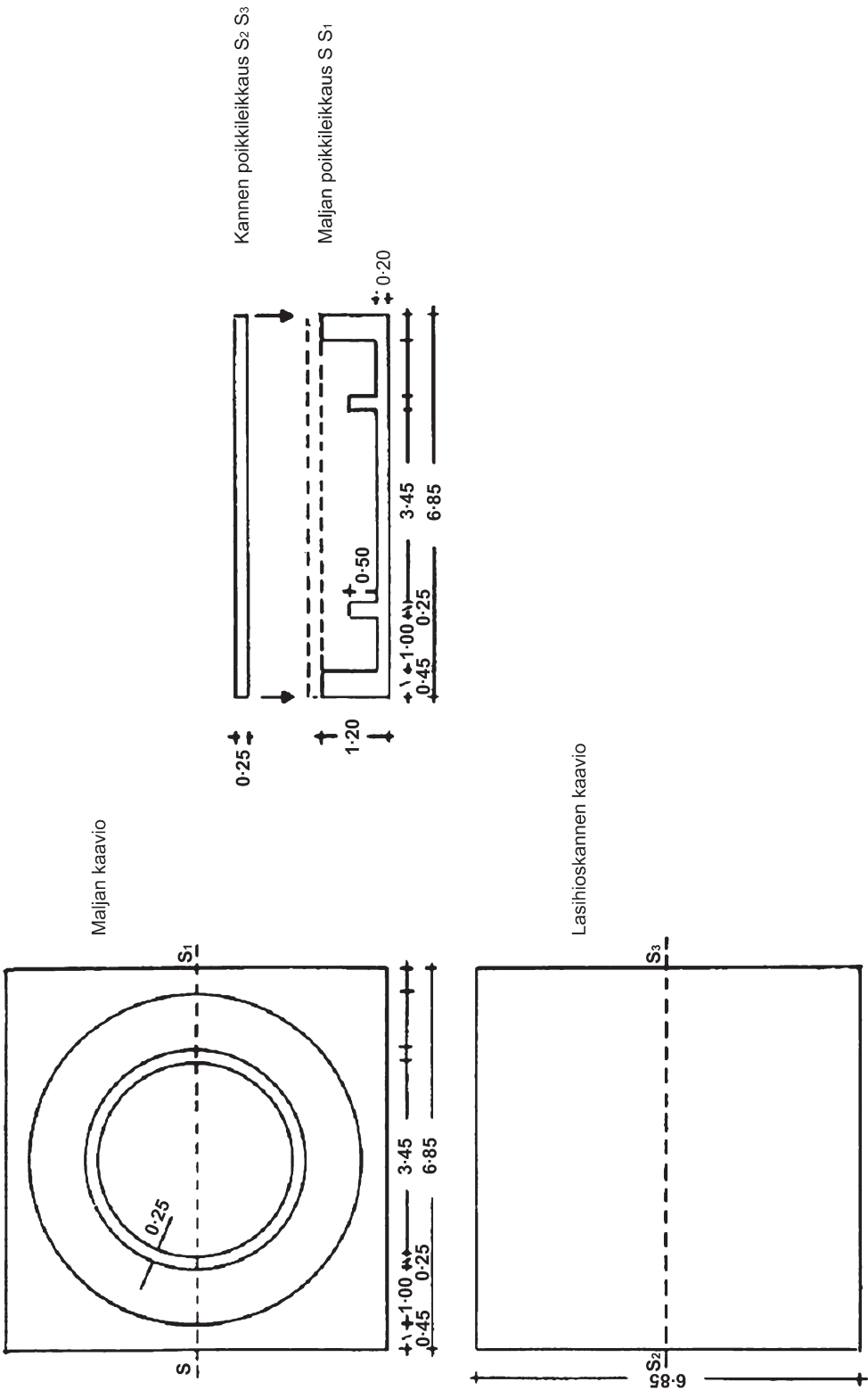
- 10 %:a, suhteellisenä arvona ilmoitettuna, kun ammoniakkipitoisuus on alle 1,0 %,
- 0,1 %:a, absoluuttisena arvona ilmoitettuna, kun ammoniakkipitoisuus on vähintään 1,0 %.

7. Huomautus

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

CONWAY CELL

Scale 1/1



II TISLAUSMENETELMÄ

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää haihtuvien typpipitoisten 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 typpipitoiset emäkset vapautuvat keitetessä 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 typpipitoisten emästen oletetun pitoisuuden kannalta (100 ml on yleensä sopiva määrä). Laimennetaan 200 ml:ksi ja lisätään 2 g magnesiumoksidia (3.2) ja muutama pisara kuohunestoinetta (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 suoritetun rinnakkaismäärittäyksen 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: kyst(e)iini, metioniini, lyysiini, treoniini, alaniini, arginiini, asparagiinihappo, glutamiinihappo, glysiini, histidiini, isoleusiini, leusiini, fenyylialaniini, proliini, seriini, tyrosiini ja valiini.

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

2. Periaate

2.1 Vapaat aminohapot

Vapaat aminohapot uutetaan laimealla kloorivetyhapolla. Mukana uuttuneet typpipitoiset makromolekyylit saostetaan sulfosalisyylillä ja poistetaan suodattamalla. Suodatetun liuoksen pH säädetään arvoon 2,20. Aminohapot erotetaan ioninvaihtokromatografialla ja määritetään fotometrillä ninhydiini johdoksina 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 ninhydiini johdoksina 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-Sulfosalisylihappo-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 Ninhydiini.

3.12 Petrolieetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.

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

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, $\beta = 6 \%$:
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 näytteeseen 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 Ninhydiinireagenssi, valmistetaan analysaattorin vaatimusten mukaisesti (4.9).
- 3.27 Aminohappojen standardiliuokset. Nämä liuokset säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa.
- 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 metioniinisulfonylin standardin kantaliuos, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

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

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

Liutetaan 0,6560 g norleusiinia (3.13) sitraattipuskuriin (3.24) mittapullossa ja täytetään 250,0 ml:ksi sitraattipuskurilla (3.24). Säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa enintään 6 kuukautta.

- 3.27.4 Aminohappojen kalibrointiliuos hydrolysaateille: kysteinihappo ja metioniinisulfony, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$, muut aminohapot $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$. Liutetaan 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 kysteinihapon ja metioniinisulfonyn 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 °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 uutteille (5.2). Kalibrointiliuos valmistetaan 3.27.4 kohdan mukaisesti kuitenkin jättäen natriumkloridi pois.

Säilytetään alle 5 °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/teflonttiivisteinen 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 μm).
- 4.6 Sentrifugi.
- 4.7 Vakuumipyöröhaihdutin.
- 4.8 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.
- 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 stabiilisuden tulee olla $\pm 0,5 \%$ ajanjaksona, jona analysoidaan sekä standardiliuos että näyte.

Tiettyissä aminohappoanalysaattoreissa voidaan käyttää hydrolyysimenetelmää, jossa hydrolysaatin natriumpitoisuus on $c = 0,8 \text{ mol/l}$ 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 ilmakeiuvattava 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 uuttoseosta (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. Suodatetaan 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
- 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-vesihaute 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 Hapettettujen 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 jäähäuteessa.

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.

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 saatuaan hydrolysaattiin.

Haihdutetaan näyte 5–10 ml:aan pyöröhaihduttimella (4.7), jonka hauteen 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 huoneenlämpöiseksi 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.

Kalibrointiajojen tiheys riippuu ninhydriinireagenssin ja analysaattorin toiminnan stabiilisuudesta. Standardi- tai näyteliuosta laimennetaan sitraattipuskurilla (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 tyyppin ja käytetyn hartsin mukaan. Valitun menetelmän on mahdollistettava aminohappojen erottaminen toisistaan ja muista ninhydriinin kanssa reagoivista aineista. Pylväaseen ruiskutettujen yhdisteiden pitoisuuden muutosten on käyttöalueella annettava lineaarinen vaste.

Analysoitaessa 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 aminohappoanalyysaattorilla (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.

Kromatografijärjestelmän 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 hydrolysaattissa tai uutteen

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 kokonaishydrolysaattia (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 × 240,30 g/mol).

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

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.

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

Vertailuaine	Aminohappo			
	Treoniini	Kyst(e)iini	Metioniini	Lysiini
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
Broilareiden 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 välisistä standardipoikkeamista (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
Broilareiden 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.

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 bariumhydroksidiliuoksella 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 uutteenä määritetään HPLC:llä käyttäen fluoresenssidektektoria.

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 Bariumhydroksidihydraatti (on varottava, ettei Ba(OH)₂ · 8 H₂O joudu liaksi kosketuksiin ilman kanssa; tällöin muodostuisi BaCO₃:a, joka voi häiritä määrittystä) (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-laatuista vastaava.
- 3.9 Petrolieetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.
- 3.10 Natriumhydroksidiliuos, c = 1 mol/l:
- Liuotetaan 40,0 g NaOH:ta (3.5) veteen ja täytetään 1 litraksi vedellä (3.1).
- 3.11 Kloorivetyhappo, c = 6 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), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:

Liuotetaan 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, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:

Liuotetaan 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 $w(w) > 98 \%$.

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.

4.5 Kalvosuodatin 0,45 μm .

4.6 Autoklaavi, 110 ($\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 1,4 ($\pm$ 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 ilmakuivattava korkeintaan 50 °C:n lämpötilassa tai kylmäkuivattava ennen jauhamista. Näytteet, joilla on suuri rasvapitoisuus, on uutettava petrolicetterillä (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 kalibrintistandardiliuoksella (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 näyttemäärän tyyppipitoisuuden on oltava noin 10 mg. Lisätään 8,4 g bariumhydroksidihydraattia (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/jäähauteessa 15 minuuttia.

Lisätään 5 ml ortofosforihappoa (3.14). Pullo pidetään jäähdytyshauteessa 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.

Suodatetaan muutama ml liuosta 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.5) läpi ennen HPLC-kolonnein 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):

Nestekromatografia-kolonnein (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.
Injektio-tilavuus:	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 rinnakkaismäärityksen välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin 10 % suuremmasta tuloksesta.

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, %.

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

	Näyte 1 Sikarehuseos (CRM 117)	Näyte 2 Vähärasvainen kala- jauho (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 gradienteilla:

Nestekromatografia-kolonni:	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 täytemateriaalin mukaan. Valitun järjestelmän on pystyttävä erottamaan tryptofaanin piikki ja sisäisen standardin piikki pohjaviivalle asti. Lisäksi on tärkeää, että hajoamistuotteet eroavat hyvin tryptofaanista ja sisäisestä 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 eluotuvat; myöhään eluotuvat piikit saattavat muuten häiritä myöhempiä kromatografia-ajoja.

Kromatografijärjestelmän vasteen on oltava lineaarinen toiminta-alueella. Lineaarinen vaste on mitattava sisäisen standardin vakiopitoisuudella (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 samea, minkä vuoksi voidaan saada alhaisia tryptofaanituloksia.

H. RAAKARASVAN JA RAAKAÖLJYN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä määritetään rehuissa olevan raakasvan ja -öljyn määrä. Se ei koske öljysiementen ja öljypitoisten hedelmien määrittäksiä.

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

1.1 Menettelytapa A — Suoraan uutettavissa oleva raakasva ja -öljy

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

1.2 Menettelytapa B — Raakasvan ja -öljyn kokonaismäärä

Menetelmää voidaan soveltaa eläinperäisiin rehuihin sekä kaikkiin rehuseoksiin. Sitä käytetään kaikkiin sellaisiin rehuihin, joista rasvaa ja öljyä ei voida täysin uuttaa ilman sitä edeltävää hydrolysointia (esim. gluteenit, 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 petrolieetterillä. Liuotin tislataan pois ja jäännös kuivataan ja punnitaan.

2.2 Menettelytapa B

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

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 $\pm 1 \text{ mg:n}$ 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 jäännöksineen 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 $\pm 1 \text{ mg:n}$ 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 palautusjäähdyttimeen. 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. Suodatukseen 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.

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

Jäännöksen sisältävä kaksinkertainen suodatinpaperi asetetaan kellonlasille ja sen annetaan kuivua puolitoista tuntia 100 ± 3 °C:ssa lämpökaapissa (4.3).

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 rinnakkaismäärittelyn tulosten välinen ero ei saa olla yli:

- 0,2 %:a absoluuttisena arvona, kun raakasva- ja -öljypitoisuus on alle 5 %,
- 4,0 %:a suhteellisenä 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 petroleetterillä (3.1) 5.1 kohdassa esitetyllä tavalla. Saadun uutteen tilavuus täydennetään 500 ml:ksi petroleetterillä (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.

Liuottimen 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 uutteesta) 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.

8.6 Ennen hydrolysointia tapahtuvaa menettelytavan A mukaista esiuuttoa ja menettelytavan B mukaista uudelleen uuttoa suositellaan, jos raakasvan/öljyn pitoisuus on yli 15 %. Tämä riippuu jossakin määrin rehun tai rehuseoksen 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 tuhkaksi 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 käyttöönottoa 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 Termostaattisäätöinen lämpökaappi.

4.5 Termostaattisäätöinen 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).

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

Neste saatetaan kiehuvaaksi 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 kiehuvaa vettä huolehtien siitä, että jäännös suodatetaan kuivaksi jokaisen pesukerran jälkeen.

Suljetaan tyhjennysventtiili, kaadetaan 150 ml kiehuvaa kaliumhydroksidiliuosta (3.7) sylinteriupokasyhdistelmään ja lisätään muutama pisara kuohunestoainetta (3.2). Neste saatetaan kiehuvaaksi 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 asetonia (3.4) huolehtien siitä, että jäännös kuivuu jokaisen pesukerran jälkeen.

Annetaan upokkaan kuivua vakiopainoon lämpökaapissa, jonka lämpötila on 130 °C. Jokaisen kuivauksen jälkeen jäähdytetään eksikkaattorissa ja punnitaan nopeasti. Upokas asetetaan muhveliuuniin, jossa näytteen annetaan palaa tuhaksi 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 eksikkaattorissa 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,

m_0 = määrittämisen aikana näytteen polttamisesta aiheutuva painohäviö grammoina,

m_1 = nollakokeesta 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 petrolieetterillä (3.5). Liitetään suodatinupokas (4.2) sisältöineen kylmäuuttoyksikköön (4.6), poistetaan ilma ja pestään 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 öljyä 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 tyhjässä kunnes jäännös on kuiva ja jatketaan määrittämistä 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 kiehuttamisen jälkeen happamien ja emäksisten liuosten suodatus osoittautuu vaikeaksi, käytetään lämmityslaitteiston tyhjennysletkun kautta annettavaa paineilmaa, minkä jälkeen jatketaan suodatusta.
- 8.6 Tuhkauspöytä ei saa olla yli 500:aa °C lasisten suodatinupokkaiden käyttöänsä pidentämiseksi. Kuumennus- ja jäähdytysjaksojen aikana on vältettävä suuria lämpötilanvaihteluja.

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 fenoliftaleiinilla 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 jäätikkää. 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 Metyylioranssiliuos 0,1 % (w/v).
- 3.5 Kloorivetyhappo 4 mol/l.
- 3.6 Kloorivetyhappo 0,1 mol/l.
- 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; Na_2CO_3 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, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 ml:aan vettä.

- 3.8.2 Sitruunahappoliuos: liuotetaan 50 g sitruunahappoa, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 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 kiehuva vettä. Keitetään kolme minuuttia, annetaan jäähtyä ja tarvittaessa lisätään 10 mg elohopeajodidia säilyteaineeksi.
- 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 tislattulla 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 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 glukoosina ilmoitettuja pelkistäviä sokereita. Tarvittaessa tilavuus säädetään 25 ml:ksi tislattulla vedellä, ja pelkistävien sokerien pitoisuus määritetään Luff-Schoorl-menetelmällä. Tulos ilmoitetaan glukoosiprosenttina tai tarvittaessa sakkaroosina kertomalla kertoimella 0,95.

5.4 Titraus Luff-Schoorl-menetelmällä

Pipetoidaan 25 ml Luff-Schoorl-reagenssia (3.8) 300 ml:n erlenmeyerkolviin, lisätään tarkalleen 25 ml kirkastettua sokeriliuosta. Lisätään kaksi kiehumakiveä (3.13), lämmitetään keskikokoisen liekin yläpuolella käsin ravistaen ja 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 natriumtiosulfaattiliuoksella (3.9) kunnes väri muuttuu samean keltaiseksi, lisätään tärkkelysindikaattori (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 glukoosimäärä, 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-prosenttisella (v/v) etanolilla.

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

- 7.2 Melassista ja runsaasti sokeria sisältävistä ja tärkkelysköyhistä 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.
- 8.2 Invertoinnin jälkeen saadun glukoosina ilmoitetun kokonaissokeripitoisuuden ja glukoosina ilmoitetun pelkistävien sokerien pitoisuuden välisestä erosta 0,95:lla 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 määrittystä samasta näytteestä. Toinen määrittysistä suoritetaan liuokselle, joka saadaan osasta 5.1 kohdan mukaisesti saatua liuosta, ja toinen määrittysistä suoritetaan osasta liuosta, joka saadaan laktoosimäärityksen yhteydessä tähän tarkoitukseen kehitetyn 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, invert- tisokerit 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

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. Selkeyttämisen 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 (CH₃COO)₂·2H₂O ja 3 g jäätikkää. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.
- 3.3 Carrez-liuos II: liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia K₄Fe(CN)₆·3H₂O. 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; Na₂CO₃ 1 mol/l) konsentraatio tarkistetaan. Liuoksen pH:n on oltava noin 9,4.

- 3.4.1 Kuparisulfaattiliuos: liuotetaan 25 g raudatonta kuparisulfaattia, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 ml:aan vettä.
- 3.4.2 Sitruunahappoliuos: liuotetaan 50 g sitruunahappoa, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 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 kiehuvaan vettä. Keitetään kolme minuuttia, annetaan jäähtyä ja tarvittaessa lisätään 10 mg elohopeajodidia säilyteaineeksi.

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. 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 tärkkelysindikaattori (3.9) ja titraus suoritetaan loppuun.

Sama titraus suoritetaan liuoksesta, johon pipetoidaan tarkalleen mitattuna 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-reagenssiaml Na₂S₂O₃, 0,1 mol/l, kahden minuutin kuumennus, 10 minuutin keitto

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukoosi, fruktoosi, invert- tisokerit 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

L. TÄRKKELYKSEN MÄÄRITYS

POLARIMETRINEN MENETELMÄ1. **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.

⁽¹⁾ EYVL L 125, 23.5.1996, s. 35.

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 kokonaiskiertokyvyn (*P* tai *S*) määrittäminen (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 ravistellaan voimakkaasti ja yhtäjaksoisesti ensimmäisten kolmen minuutin ajan kokkaroitumisen estämiseksi. Vesihautteen vesimäärän on oltava riittävän suuri, jotta haude pysyy kiehuvana kun pullo upotetaan siihen. Pulloa ravisteltaessa sitä ei saa ottaa pois hauteesta. Tarkalleen 15 minuutin kuluttua pullo otetaan hauteesta, lisätään 30 ml kylmää vettä ja jäähdytetään välittömästi 20 °C: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 uusitaan 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 vesihauteeseen. Tarkalleen 15 minuutin kuluttua erlenmeyerkolvi otetaan hauteesta ja liuos siirretään 100 ml:n mittapulloon huuhtomalla 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

Täikkelyspitoisuus (%) lasketaan seuraavalla tavalla:

6.1 Polarimetriset mittaukset

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

P = optinen kokonaiskiertokyky asteina

P' = 40-prosenttiseen etanoliin (V/V) liukoisten yhdisteiden optinen kiertokyky asteina
 $[\alpha]_D^{20^\circ}$ = puhtaan tärkkelyksen ominaiskiertokyky. Tälle on sovittu seuraavat numeeriset arvot:

- + 185,9°: riisitärkkelys
- + 185,7°: perunatärkkelys
- + 184,6°: maissitärkkelys
- + 182,7°: vehnätärkkelys
- + 181,5°: ohratärkkelys
- + 181,3°: kauratärkkelys
- + 184,0°: muut tärkkelyslajit sekä tärkkelysseokset rehuseoksissa.

6.2 Sakkarimetriset mittaukset

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

S = optinen kokonaiskiertokyky sakkarimetrin asteina

S' = 40-prosenttiseen (v/v) etanoliin liukoisten yhdisteiden optinen kiertokyky asteina

N = sellainen sakkarooisin 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.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = puhtaan tärkkelyksen ominaiskiertokyky (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 kokonaiskiertokyvyn määrittämistä hajotettava juuri tarkalleen sopivalla määrällä laimeaa rikkihappoa.

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

7.3 Seuraavien rehuissa merkittävänä määränä esiintyvien rehuaineiden tiedetään häiritsevän tärkkelyspitoisuuden määrittämistä 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,
- rypsinsiemenet, rypsikakku, rypsirouhe, rypsinsiementen kuoret,
- auringonkukansiemenet, auringonkukkarouhe, auringonkukkarouhe osaksi kuorituista siemenistä,
- kookoskakku, kookosrouhe,
- perunapulppa,
- kuivahiiva,

- runsaasti inuliinia sisältävät tuotteet (esim. maa-artisokkaleike ja -jauho),
- rasvan sulatuksessa muodostuva valkuaisjäännös.

M. RAAKATUHKAN MÄÄRITYS

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen raakatuhkapitoisuus.

2. Periaate

Näyte poltetaan tuhkaksi 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 hiiltyy. 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 valkea, 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 tuhkaksi 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 tuhkaksi, on alustava tuhkaksi 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 tuhkatoman suodattimen läpi. Suodatin ja sen sisältö poltetaan tuhkaksi alkuperäisessä upokkaassa. Suodos siirretään jäähtyneeseen upokkaaseen, haihdutetaan kuivaksi, poltetaan tuhkaksi ja punnitaan.

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

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 tuhaksi, tuhka keitetään kloorivetyhapossa ja liukenematon jäännös suodatetaan ja punnitaan.
- 2.2 *Menetelmä B:* näytettä käsitellään kloorivetyhapolla. Liuos suodatetaan, jäännös poltetaan tuhaksi 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 tuhaksi raakatuhkan määrittystä varten esitettyä menetelmää käyttäen. Myös tästä määrittäyksestä 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 tuhaksi 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 hydrolysoiduksi. Liuos suodatetaan lämpimänä käyttäen tuhkatonta suodatinpaperia, joka pestään 50 ml:lla lämmintä vettä (ks. 7 kohdan huomautus). Suodatinpaperi jäännöksineen siirretään hehkutus-upokkaaseen, kuivataan ja poltetaan tuhaksi 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 metyyliipunalla.

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 nollamerkkiin. 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).

6. Tulosten laskeminen

Karbonaattipitoisuus kalsiumkarbonaattina ilmaistuna lasketaan kaavasta:

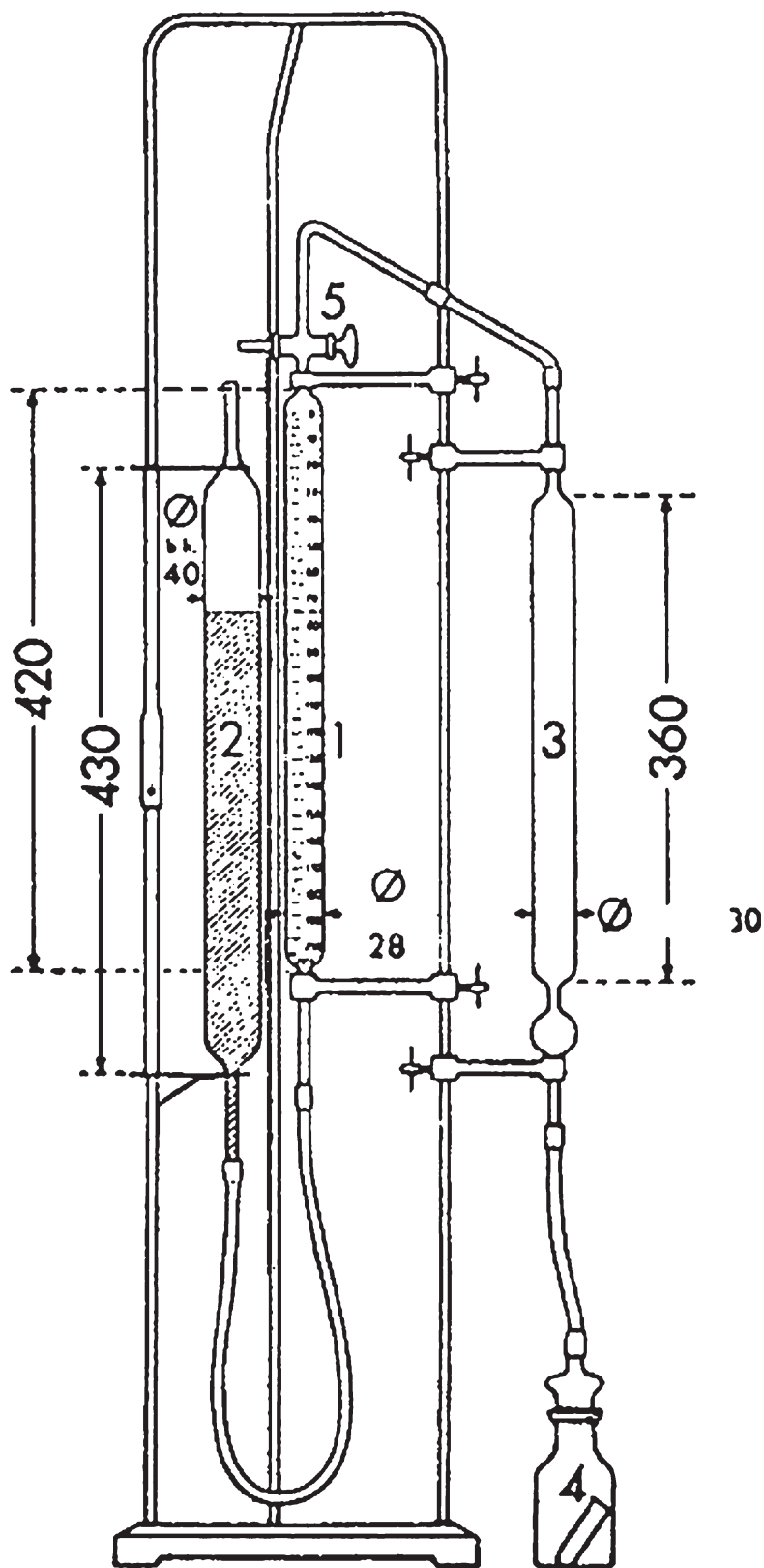
$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

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 vesitulavuutta.
- 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)

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 (mineraalilyhdisteet ja nestemäiset rehut), ja se siirretään happamaan liuokseen. Liuos käsitellään molybdovanadaattireagensilla. 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, ρ_{20} 1,38–1,42 g/ml.

3.5 Rikkihappo, ρ_{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 Sähkölämmiteinen muhveliuuni, jossa on 550 °C:seen säädetty termostaatti.

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 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 magnesium-divetyfosfaatteja

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 dekanterilasiin. Lisätään 20 ml vettä ja kloorivetyhappoa (3.2) kunnes kuohuminen lakkaa. Lisätään vielä 10 ml kloorivetyhappoa (3.2). Dekanterilasi asetetaan hiekkahauteelle ja haihdutetaan kuivaksi piin saostamiseksi. Jäänös 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 dekanterilasi useaan kertaan kuumalla vedellä. Annetaan jäähtyä, täytetään merkkiin asti vedellä, homogenoidaan ja suodatetaan.

5.2 Värin kehitys ja optisen tiheyden mitta

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.

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 Liuksen 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.

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. Byrettä 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 öljyjä ja rasvoja, öljyt ja rasvat on ensin poistettava dietyylieetterillä tai petroolieetterillä.

7.3 Kalajauhon osalta titraus voidaan suorittaa Mohrin menetelmällä.

LIITE IV

REHUJEN SISÄLTÄMIEN SALLITTUJEN LISÄAINEIDEN VALVONNASSA KÄYTETTÄVÄT
MÄÄRITYSMENETLMÄT

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.

Määritysraja 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 pitoisuus-alueelle. A-vitamiinipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (RP-HPLC) UV- tai fluoresenssidetektoria käyttäen. 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, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).

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 Fenolftaleiiniliuos, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ 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 määrityy 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. $1,80 \times 10^6 \text{ ky/g}$.

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.

3.1.3 2,6-Di-*tert*-butyyli-4-metyylifenoli (BHT) (ks. 7.5 huomautukset).

4. Välineistö

4.1 Vakuumipyöröhaihdutin.

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

4.5 HPLC-laitteisto, jossa injektor.

4.5.1 Nestekromatografiakolonni, 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 erotussuppiloon.

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 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 punnitusta ja saippuointia A-vitamiinin hajoamisen välttämiseksi.

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 (3.1.3), 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.

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 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), 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 fenoltaleiiniliuosta (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 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 typpeä 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-ajoja 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 pyöröhaihduksella (4.1) alennetussa paineessa; vesihauteen lämpötila saa olla korkeintaan 40 °C. Ilmanpaine palautetaan normaaliksi tyypellä (3.10) ja kolvi otetaan pois pyöröhaihduksista. 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-käänteisfaasikolonnilla (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-ajo-olosuhteet

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

Nestekromatografiakoloni (4.5.1): 250 mm × 4 mm, C₁₈, 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).

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:

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

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

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:

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

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

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:

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

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

6. Tulosten laskeminen

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

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),

V₁ = näyteliuoksen (5.4) tilavuus (ml),

V₂ = 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 petrolietteriuutteet (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 normaalifaasikolonnia retinoli-isomeerit voivat erottua toisistaan. Siinä tapauksessa kaikkien cis- ja trans-isomeeripiikkien 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 %, määrittäksen tulosta on korjattava saannon suhteen.

8. Toistettavuus

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

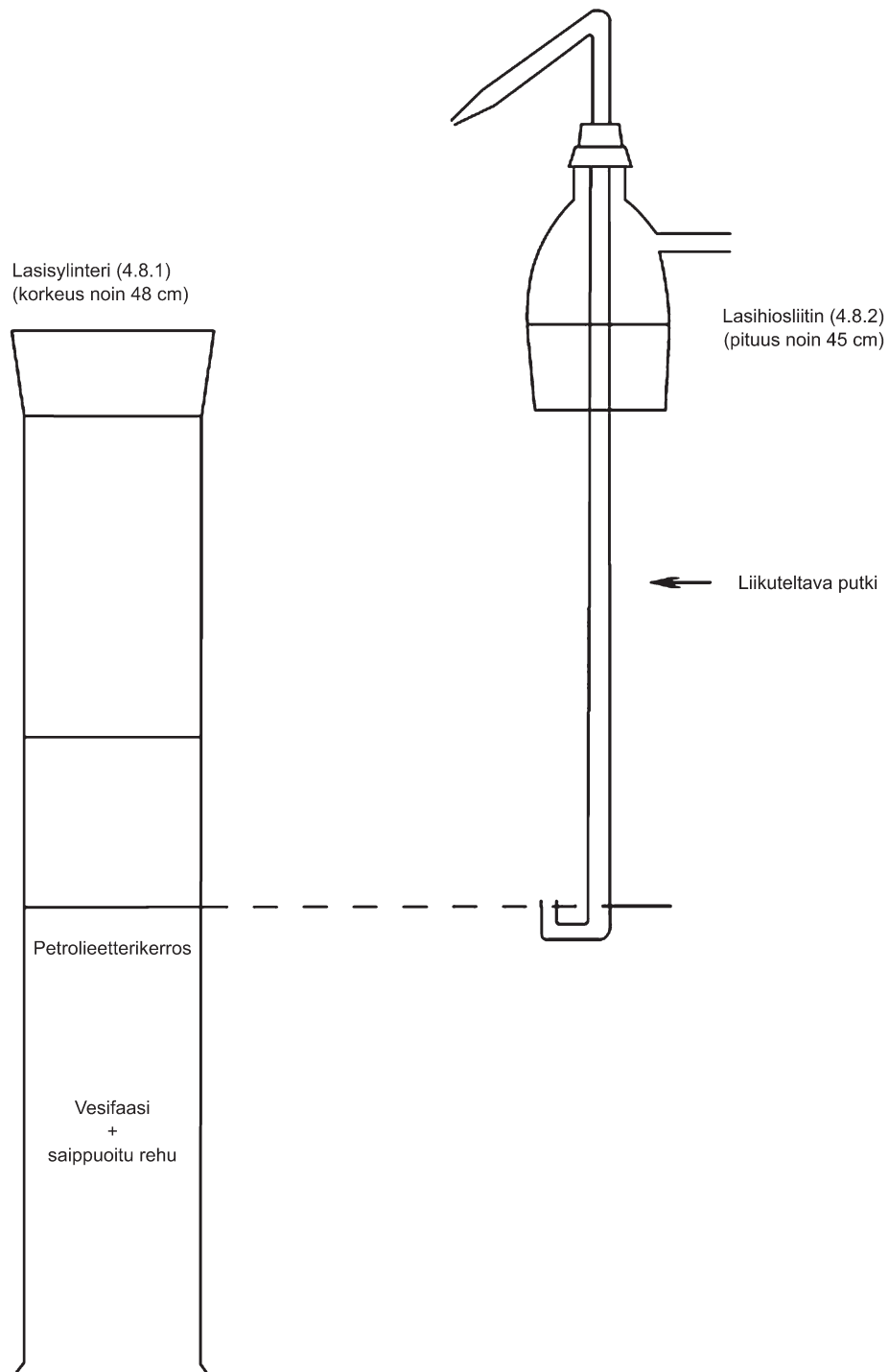
9. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset ⁽¹⁾**

	Esiseos	Esiseosvalmiste	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.

Kuva 1: Uuttolaitteisto (4.8)



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 petrolieetteriin. Liuotin haihdutetaan pois, haihdutusjäännös liuotetaan metanoliin ja laimennetaan tarvittaessa halutulle pitoisuus-alueelle. E-vitamiinipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (RP-HPLC) fluoresenssi- tai UV-detektoria käyttäen.

3. **Reagenssit**

- 3.1 Etanoli, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2 Petrolieetteri, 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, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).
- 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 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi: metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (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.
- 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 injektori.
- 4.5.1 Nestekromatografiakolonni, 250 mm × 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava.
- 4.5.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen fluoresenssi- tai UV- detektori.
- 4.6 Spektrofotometri ja 10 mm:n kvartsikyvettejä.
- 4.7 Vesihaude, jossa on magneettisekoitin.
- 4.8 Uuttolaitteisto, 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 punnitusta 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.

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 uutteen 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 fenoltaleiiniliuosta (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 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 tyyppä 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 faasin 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-ajaja 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; 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 $\mu\text{g/ml}$).

5.5 Määritys HPLC:llä

E-vitamiini erotetaan C_{18} -käänteisfaasikolonnilla (4.5.1) ja sen pitoisuus mitataan fluoresenssidetektorilla (eksitaatio: 295 nm, emissio: 330 nm) tai UV-detektorilla (292 nm) (4.5.2).

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-ajo-olosuhteet

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

Nestekromatografiakolonne (4.5.1):	250 mm $\times$ 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):	Fluoresenssidetektori (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 metanolia (3.3). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 45,5 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tokoferolia, mikä vastaa 50 $\mu\text{g/ml}$: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 mittapulloihin, 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 etanolia (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.

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 µg/ml DL-α-tokoferolia, mikä vastaa 44,0 µg/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 µg/ml DL-α-tokoferolia eli 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml ja 22,0 µg/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 µg/ml (laskettuna α-tokoferoliasetaattina) määritetään näyteliuoksen E-vitamiinipiikkien korkeuden (pinta-alan) 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) (µg/ml);

V₁ = näyteliuoksen (5.4) tilavuus (ml);

V₂ = 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.
- 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 normaalifaasikolonnia 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	Esiseosvalmiste	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

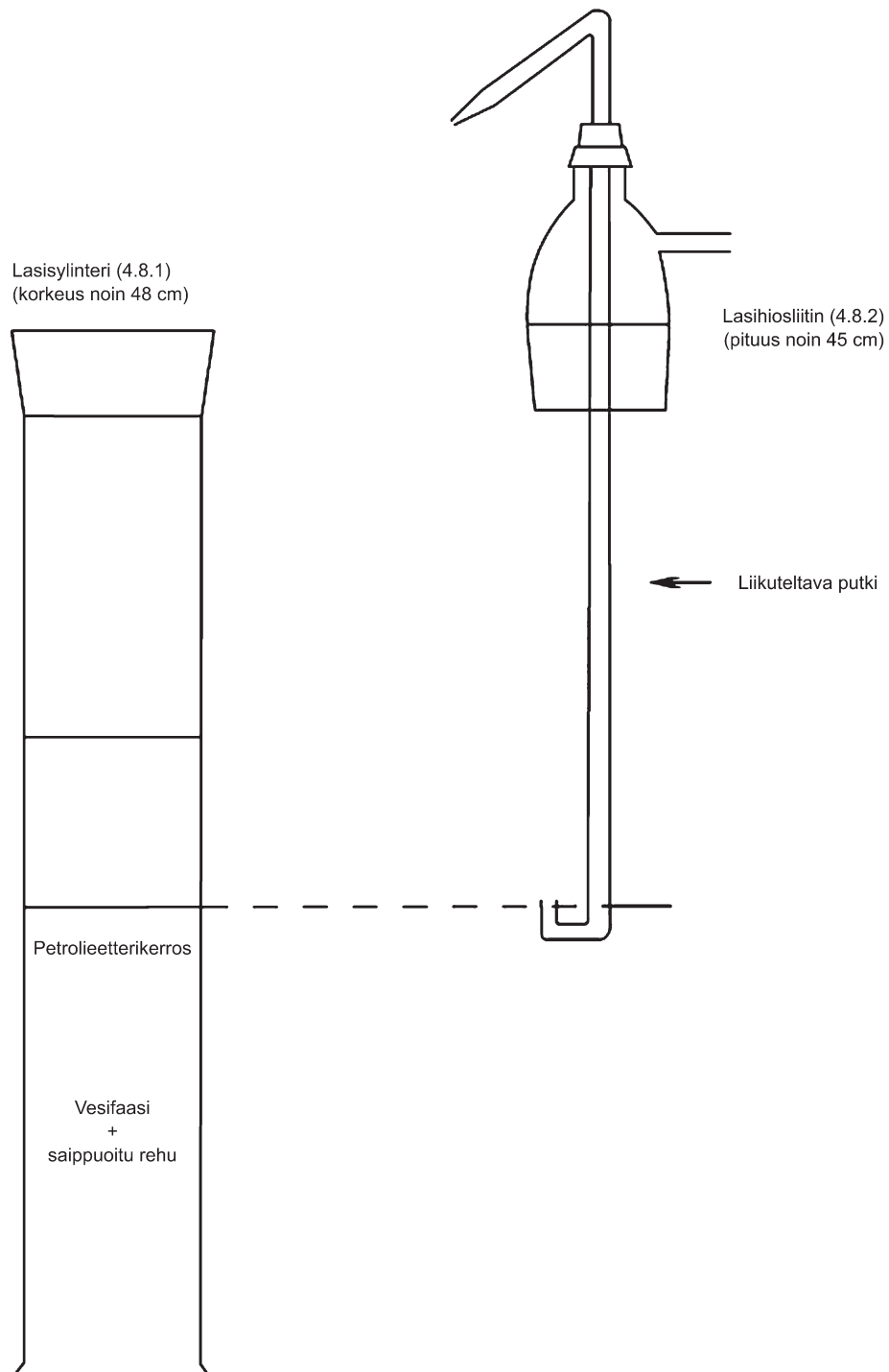
R = uusittavuus

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.

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

Kuva 1: Uuttolaitteisto (4.8)



C. RAUDAN, KUPARIN, MANGAANIN JA SINKIN MÄÄRITYS

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehuista hivenaineet rauta, kupari, mangaani ja sinkki. Määritysrajat 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.
- 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 määrittäksi.
- 4.3 Atomiabsorbtiospektrofotometri, 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).

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.

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

⁽²⁾ Vihreisiin rehuihin (tuoreisiin tai kuivattuihin) oletetaan sisältyvän suuria määriä kasvisperäisiä 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 muutamaa 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.

Jäännökseen lisätään 15 ml kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2), ja noin 120 ml vettä. Sekoitetaan lasisauvalla, joka jätetään dekantterilasiin, ja peitetään astia kellonlasilla. Kuumennetaan varovasti kiehumispisteeseen ja pidetään kiehumispisteessä kunnes enempää tuhkaa ei havaita liukenevan. Suodatetaan tuhkatommalla suodatinpaperilla ja suodos kerätään talteen 250 ml:n mittapulloon. Dekantterilasi 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 ulkonaöltään mustaa (hiiltä), se vietään 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 ulkonaöltään 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 kontaminaation 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) Tuhaksi poltettavan näytteen paino lasketaan rehun likimääräisestä hivenainepitoisuudesta käytetyn spektrofotometrin herkkyteen suhteutettuna. Tiettyjen pieniä hivenainemääriä sisältävien rehujen määrittäminen on ehkä aloitettava 10–20 g:n näytteellä ja valmistettava lopullista liuosta vain 100 ml.
- c) Tuhaksi 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 standardiliuostumuuksia; käytetyn spektrofotometrin tyypistä ja herkyydestä riippuen voi kuitenkin olla tarpeen valita muita pitoisuuksia.

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 hapettavalla ilma-asetyleenilielillä seuraavilla aallonpituuksilla:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

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 tuhkakksi. 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 rinnakkaismäärityksen 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 määrittystä. Tällainen häiriö on korjattava lantaanikloridiliuosta (3.11) lisäämällä. Jos näytteessä painosuhde $\text{Ca} + \text{Mg} / \text{P}$ 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-piperidyyli)asetonyyli]-kinatsoliini-4-(3H)-oni-hydrobromidi

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen halofuginonipitoisuus. Määritysraja 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.
- 3.6 Halofuginonistandardi (DL-trans-7-bromi-6-kloori-3-[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 ammoniumasetaattipuskuriliuokseen (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 lisätään 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 Ammoniumasetaattipuskuriliuos, noin 0,25 mol/l.
- Liuotetaan 19,3 g ammoniumasetaattia (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 ammoniumasetaattipuskuriliuosta (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.
4. **Välineistö**
- 4.1 Ultraäänihaude.
- 4.2 Pyörivä kalvohaihdutin.
- 4.3 Sentrifugi.
- 4.4 HPLC-laitteisto, jossa on vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetkatori.
- 4.4.1 Nestekromatografiakolonni, 300 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , hiukkaskoko 10 μm , tai vastaava kolonni.
- 4.5 Lasikolonni (300 mm $\times$ 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 uuttamista (5.2).

Huomautus: Tätä menetelmää käytettäessä nollarehun on vastattava koostumukseltaan näytettä, ja halofuginonia ei saa havaita määrittäksessä.

5.2 Uutto

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 vesihauteseen (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 ultraäänihauteseen (4.1) ja korkkia höllennetään. Sentrifugoidaan 2 minuuttia ja dekantoidaan etyyliasetaattifaasi lasikuitusuodattimen (4.6) läpi 500 ml:n erotussuppiloon. Toistetaan näytteen uutto toisella 100 ml:n etyyliasetaattiannoksella. Pestään yhdistettyjä uutteita 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. Juoksetetaan alempi happokerros 250 ml:n erotussuppiloon. Uutetaan orgaanista kerrosta vielä 50 ml:lla kloorivetyhappoa 1,5 minuutin ajan ja yhdistetään uutteet. Pestään yhdistetyt happouutteet heiluttamalla niitä noin 10 sekunnin ajan 10 ml:n etyyliasetaattimäärän kanssa (3.4).

Siirretään vesikerros kvantitatiivisesti 250 ml:n pyörökolviin ja heitetään orgaaninen faasi pois. Haihdutetaan pyörivällä kalvohaihduttimella (4.2) kaikki etyyliasetaattijäämät happoliuoksesta. Vesihautteen lämpötila ei saa olla yli 40:tä °C. Noin 25 mbar:n tyhjiössä 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) lasikolooniin (4.5). Lisätään pieni lasivillatuppo hartsikerroksen päälle. Juoksetetaan 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 happoliuosjäämät ilmavirralla. Heitetään pesuliukset pois. Lisätään kolooniin 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) huolehtien siitä, että vesihautteen 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

Injektioalavuus: 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-ala) ja retentioajat eivät muutu.

5.4.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan jokaista kalibrointiliuosta (3.6.2) useita kertoja ja mitataan piikkien korkeudet (pinta-ala) jokaiselle pitoisuudelle. 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 tilavuutta kuin kalibrointiliuksille ja määritetään halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-ala) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Määritetään näyteliuoksen pitoisuus (µg/ml) näyteliuoksen halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-ala) keskiarvosta kalibrointikäyrän (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 yhteiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla voidaan verrata näyteuutteen ja halofuginonia 6,0 µg/ml sisältävän kalibrointiliuoksen (3.6.2) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.6.2). Lisätyn halofuginonimäärän on vastattava näyteuutteen 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 $\pm 10\%$ lähtöleveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorptioaallonpituuksien on kromatogrammin piikin huipun kohdalla mitattuna oltava samat ilmaisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirivimäärityksessä se on yleensä ± 2 nm;
- välillä 225–300 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajettujen näyte- ja standardispektrien ei 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;
- välillä 225–300 nm näyteliuoksesta ajettujen spektrien piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla ei 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 rinnakkaismäärityksen välinen ero samasta näytteestä ei saa olla yli 0,5 mg/kg, kun halofuginonipitoisuudet 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. Määritysraja on 5 mg/kg.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, s. 1 252–1 256.

2. Periaate

Näyte uutetaan happamoidulla metanolilla. Uute kuivataan ja määräosa puhdistetaan alumiinioksidikolonissa. Robenidiini eluoidaan kolonnista metanolilla, konsentroidaan ja saatetaan sopivaksi tilavuudeksi liikkuvalla faasilla. Robenidiinipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

3. Reagenssit**3.1 Metanoli.****3.2 Happamoitu metanoli.**

Siirretään 4,0 ml kloorivetyhappoa ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$) 500 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin asti metanolilla (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.3 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.**3.4 Molekyyliaseula.**

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, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Liutetaan 3,40 g kaliumdivetyfosfaattia veteen (HPLC-laatua) 1 000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti ja sekoitetaan.

3.7 Dinatriumvetyfosfaattiliuos, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Liutetaan 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). Liutetaan 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 µg/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 µg/ml. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.10 Vesi, HPLC-laatua vastaava.

4. Välineistö

4.1 Lasikolonni.

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 diodirividetektori, detektioaallonpituusalue 250–400 nm.

4.4.1 Nestekromatografiakolonni: 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 tyypiltään 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 molekyyliseulaa (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 tuppo 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.

5.3.2 Näytteen puhdistus

Pipetoidaan kolonniin 5,0 ml valmistettua näyteuutetta (5.2). Annetaan pipetin kärjen levätä kolonnin seinää vasten ja liuoksen absorboitua alumiinioksidiin. 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 huuhteluliuokset 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 kalibrointiliuoksille, ja määritetään robenidiinihiukkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen robenidiinipitoisuus µg/ml lasketaan robenidiinihiukkien 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.

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 näyteuutteenä 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 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- kromatogrammin hiikin huipun kohdalla näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorptioaallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorimäärityksessä tämä on yleensä noin ± 2 nm;
- 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;
- välillä 250–400 nm näyteliuksesta ajettujen spektrit 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 määrityksen 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:

	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 määrittämisraja 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 käänteisfaasitekromatografialla (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, $\rho_{20} = 1,19$ 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)fenyli]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 kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

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 kääritään 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-diokso-1,2,4-triatsin-2-(3H)-yyli)- α -metyyli-bentseeniasetonitriili.

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 kääritään 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 kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.9.3 Sisäinen standardiliuos esiseoksille, p/1 000 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 käärätään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy $\leq 4^{\circ}\text{C}$: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).

4. Välineistö

4.1 Mekaaninen ravistelija.

4.2 Ternaarigradientti HPLC -laitteisto.

4.2.1 Nestekromatografiakolonni, 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, hiukkaskoko 3 µm, tai vastaava.

4.2.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetektor.

4.3 Pyörivä kalvohaihdutin.

4.4 Kalvosuodatin, 0,45 µm.

4.5 Tyhjiösuodatuslaite.

4.6 Ultraäänihäute.

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 Uttu

5.2.1 Rehut

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 vakuuilla (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-määrittys (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 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 pyöröhaihduttimella (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-määrittys (5.3).

5.3 HPLC-määrittys

5.3.1 Muuttujat

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia ja niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaiset tulokset.

Nestekromatografiakolvi (4.2.1):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, hiukkaskoko 3 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi:	Eluentti A (3.13.1): ammoniumasetaatin ja tetrabutyyliammoniumvetysulfaatin vesiliuos
	Eluentti B (3.13.2): asetonitriili
	Eluentti C (3.13.3): metanoli
Eluointi:	— lineaarinen gradientti — alku: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — 10 min kuluttua gradientteluointi 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 injektoidulla 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:

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

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:

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

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 Diodirividetektorimäärittäminen

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- Kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määrättyissä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti ± 2 nm.
- Välillä 230–320 nm kromatogrammin piikkien huipun kohdalla ajatut 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 % standardianalyytin absorbanssista.

- c) Välillä 230–320 nm näyteuutteesta ajatut 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 rinnakkaistuloksesta, kun diklatsuriilipitoisuus on 0,5–2,5 mg/kg
- 0,75 mg/kg, kun diklatsuriilipitoisuus on 2,5–5 mg/kg
- 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta, 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
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 polyeetterimonokarboksyylihapon natriumsuola

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää lasalosid-natriumin pitoisuus rehuissa ja esiseoksissa. Toteamisraja on 5 mg/kg ja määrittysraja 10 mg/kg.

2. Periaate

Lasalosid-natrium uutetaan näytteestä happamoituun metanoliin ja määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) käyttäen spektrofлуorimetridetektoria.

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-laatua 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-metanoliliuos 5 + 95 (V + V).

Sekoitetaan 5 ml fosfaattipuskuriliuosta (3.7) ja 95 ml metanolia (3.5).

3.10 Lasalosid-natriumstandardi, jonka puhtaus on taattu, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (*Streptomyces lasaliensis* -bakteerin tuottama polyeetterimonokarboksyylihapon 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.

3.10.2 Lasalosid-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 lasalosid-natriumia. Nämä liuokset on valmistettava aina juuri ennen käyttöä.

3.11. Vesi, HPLC-laatuja 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 Nestekromatografiakolonne, 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 lasalosid-natriumia tai mittausta häiritseviä aineita. Nollanäytteen on oltava näytteen kaltainen, eikä siinä saa olla havaittavia määriä lasalosid-natriumia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe

Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on lisätty näytteen lasalosid-natriumia vastaava määrä lasalosid-natriumia. Jotta saadaan liuos, jossa on 100 mg/kg lasalosid-natriumia vastaava lisäys, siirretään 10,0 ml standardin kantaliuosta (3.10.1) 250 ml:n erlenmeyerkolviin 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 lasalosid-natriumia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto

5.2.1 Rehut

Punnitaan 5–10 g näytettä 0,01 gramman tarkkuudella 250 ml:n tulpalliseen erlenmeyerkolviin. Lisätään pipetillä 100,0 ml happamoitua metanolilla (3.8). Suljetaan löyhästi tulpalla ja sekoitetaan kunnes näyte on liennut. Asetetaan pullo noin 40-asteiseen ultraäänihauteeseen (4.1) 20 minuutiksi, otetaan pois ja jäädytetään huoneenlämpöiseksi. Täytetään merkkiin asti happamoidulla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan hyvin. Annetaan laskeutua tunnin ajan ja suodatetaan määräraosa 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.2) läpi sopivaan astiaan. Tehdään HPLC-määrittäminen (5.3).

5.2.2 Esiseokset

Punnitaan 2 g jauhamatonta esiseosta 0,001 gramman tarkkuudella 250 ml:n mittapulloon. Lisätään 100,0 ml happamoitua metanolilla (3.8) ja sekoitetaan kunnes esiseos on liennut. Laitetaan pullo sisältöineen noin 40-asteiseen ultraäänihauteeseen (4.1) 20 minuutiksi, otetaan pois ja jäädytetään huoneenlämpöiseksi. Täytetään merkkiin asti happamoidulla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan hyvin. Annetaan laskeutua tunnin ajan ja suodatetaan määräraosa 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.2) läpi sopivaan astiaan. Laimennetaan sopiva määrä kirkasta suodosta happamoidulla metanolilla (3.8) siten, että lopullisessa koeliuoksessa on lasalosid-natriumia noin 4 µg/ml. Tehdään HPLC-määrittäminen (5.3).

5.3 *HPLC-määrittäminen*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
Liikkuvaa 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 injektoiden 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 kalibrointiliuoksille ja määritetään lasalosid-natriumpiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. **Tulosten laskeminen**

Näyteliuosta (5.3.3) injektoiden saatujen piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvosta määritetään lasalosid-natriumkonsentraatio (µg/ml) kalibrointikäyrän avulla.

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*

Spektrofotometriaan perustuvissa menetelmissä on vähemmän häiriömahdollisuuksia kuin UV-mittauksissa. Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeseen (5.2.1 tai 5.2.2) lisätään sopiva määrä kalibrintiliuosta (3.10.3). Lisätyn lasalosisid-natriummäärän on oltava suunnilleen sama kuin näyteliuksesta määritetty lasalosisid-natriummäärä. Ainoastaan lasalosisid-natriumpiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä lasalosisid-natriumia että näyteliuksen laimeneminen. Piikin leveyden tulisi olla puolikorkeudessa $\pm 10\%$ sellaisen näyteliuksen piikin leveydestä, johon ei ole lisätty lasalosisid-natriumia.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärityksen välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin

- 15 % lasalosisid-natriumpitoisuuden korkeammasta arvosta välillä 30–100 mg/kg,
- 15 mg/kg lasalosisid-natriumpitoisuuden ollessa 100–200 mg/kg,
- 7,5 % lasalosisid-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 %.

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 Kalkkunanre- hun esiseos	Näyte 3 Kalkkunanre- hupelletit	Näyte 4 Kananrehura- keet	Näyte 5 Kalkkunan- rehu	Näyte 6 Siipikarjan- rehu A	Näyte 7 Siipikarjan- rehu 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
Nimellispitoi- suus [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, %.

LIITE V

**REHUIEN SISÄLTÄMIEN HAITALLISTEN AINEIDEN VALVONNASSA KÄYTETTÄVÄT
MÄÄRITYSMENETELMÄT****A. VAPAAN GOSSYPOLIN JA KOKONAISGOSSYPOLIN MÄÄRITYS****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää vapaan gossypolin, kokonaisgossypolin ja niitä kemiallisesti lähellä olevien aineiden pitoisuus puuvillansiemenissä, puuvillansiemenjauhossa ja puuvillansiemenkakussa sekä näitä rehuaeineita sisältävissä rehuseoksissa; vapaan gossypolin, kokonaisgossypolin 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 dimetyyliformamidilla kokonaisgossypolin määrittämiseksi. Gossypoli muutetaan 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 jäätetikkaa ja 50 ml vettä 1 litran mittapulloon. Mittapullo täytetään merkkiin asti isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1). Säilyy yhden viikon ajan.
- 3.3 Liuotinseos B: Pipetoidaan 2 ml 3-amino-1-propanolia ja 10 ml jäätetikkaa 100 ml:n mittapulloon. Annetaan jäähtyä huoneenlämpöön ja täytetään 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 säilytettyä reagenssiliuos säilyy useiden kuukausien ajan.
- 3.5 Gossypolin standardiliuos A: 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 liuoksen gossypolikonsentraatio on 0,02 mg/ml. Annetaan seistä yhden tunnin ajan huoneenlämmössä ennen käyttöä.
- 3.6 Gossypolin standardiliuos B: Punnitaan 27,9 g gossypoliasetaattia 50 ml:n mittapulloon. Liuotetaan liuotinseokseen B, täytetään merkkiin asti samalla liuotinseoksella (3.3). Tämän liuoksen gossypolikonsentraatio on 0,5 mg/ml.

Gossypolin standardiliuokset A ja B säilyvät 24 tuntia valolta suojattuina.

4. Välineistö

- 4.1 Sekoittaja: noin 35 kierr./min.
- 4.2 Spektrofotometri.

5. Menettely**5.1 Näyte**

Punnitusmäärä riippuu näytteen oletetusta gossypolipitoisuudesta. On suositeltavaa käyttää pientä punnitusmäärää ja suhteellisen suurta suodasmäärää, 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 suodatimen 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 referenssiluoksena näyteliuoksen mittauksessa.

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 referenssiluoksena nollakoeliuoksen mittauksessa.

Pipetoidaan mittapulloihin D ja B 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.

Mitataan nollakoeliuoksen (D) optinen tiheys spektrometrillä 440 nm:ssä 1 cm:n lasikyvettiä 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

Näytettä, 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 vesihautteelle 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 vesihautteelle 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 kalibroitikäyrää (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 kokonaosgossypolin pitoisuus lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

E = korjattu optinen tiheys määritettynä 5.2 kohdan mukaisesti,

p = punnittu näytemäärä grammoina,

a = suodosmäärä 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 liuotineseoksella A (3.2). Molempiin sarjoihin otetaan mukaan 25 ml:n mittapullo, joka sisältää vain 10 ml liuotineseosta A (3.2) (nollakoe).

Toinen sarja mittapulloja (myös nollakokeessa käytettävä pullo) täytetään 25 ml:aan isopropanoli-heksaaniseoksella (3.1) (vertailusarja).

Toiseen mittapullosarjaan (myös nollakokeeseen) lisätään 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 (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 Kokonaosgossypoli

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 vesihautelle 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 vesihautelle 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.

B. DIOKSIINIEN (PCDD/PCDF) JA DIOKSIININ KALTAISTEN PCB-YHDISTEIDEN PITOISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN

I. NÄYTTEENOTTOMENETELMÄT JA MÄÄRITYSTULOSTEN TULKINTA

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Rehun dioksiinipitoisuuksien (polykloorattujen dibentso-p-dioksiinien (PCDD) ja polykloorattujen dibentsofuraanien (PCDF) pitoisuuksien) ja dioksiinin kaltaisten polykloorattujen bifenyyliden (PCB-yhdisteiden) ⁽¹⁾ pitoisuuksien viralliseen valvontaan tarkoitetut näytteet on otettava liitteen I säännösten mukaisesti. Rehuun tasaisesti jakautuneiden aineiden tai tuotteiden valvontaan on sovellettava liitteessä I olevassa 5.A kohdassa säädettyjä määriä koskevia vaatimuksia. Tällä tavoin saatujen kokoomanäytteiden katsotaan edustavan eriä tai osaeriä, joista ne on otettu. Laboratorionäytteistä määritettyjen pitoisuuksien perusteella arvioidaan, ovatko tutkittavat erät Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivissä 2002/32/EY ⁽²⁾ vahvistettujen enimmäismääriä koskevien vaatimusten mukaisia.

2. Erän tai osaerän säännöstenmukaisuus

Erä hyväksytään, jos yhden määrittelyn tulos ei ylitä direktiivissä 2002/32/EY vahvistettua enimmäismäärää, kun otetaan huomioon mittausepävarmuus.

Katsotaan, että erä ei ole asetuksessa (EY) N:o 2002/32/EY vahvistettujen enimmäismääriä koskevien vaatimusten mukainen, jos kaksoismäärittelyllä ⁽³⁾ vahvistettu suurempi määrittelytulos ⁽⁴⁾ ylittää enimmäismäärän selvästi, kun otetaan huomioon mittaukseen liittyvä epävarmuus.

⁽¹⁾ Dioksiinien, furaanien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden toksisuusekvivalenssikertoimia (Toxic Equivalency Factor, TEF) koskeva taulukko

Yhdiste	TEF-arvo	Yhdiste	TEF-arvo
Dibentso-para-dioksiinit (PCDD:t)		Dioksiinin kaltaiset PCB:t:	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ei-orto-PCB-yhdisteet	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001	Mono-orto-PCB-yhdisteet	
Dibentsofuraanit (PCDF:t)		PCB 105	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,0005
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 118	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 123	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Käytetyt lyhenteet: T = tetra, Pe = penta, Hx = heksa, Hp = hepta, O = okta, CDD = klooridibentso-p-dioksiini, CDF = klooridibentsofuraani, CB = klooribifenyyl.

⁽²⁾ EYVL L 140, 30.5.2002, s. 10.

⁽³⁾ Kaksoismäärittely on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikontaminaatio tai näytteiden sekoittuminen vahingossa. Säännöstenmukaisuus varmistetaan ensimmäisen määrittelyn perusteella ja huomioon otetaan mittausepävarmuus. Jos määrittely suoritetaan dioksiinikontaminaatiotapauksen yhteydessä, varmennus kaksoismäärittelyllä voidaan jättää tekemättä, mikäli määrittelyyn valitut näytteet liittyvät dioksiinikontaminaatiotapaukseen jäljitettävyyden perusteella.

⁽⁴⁾ Suurimmat arvot: toksisuusekvivalenttia TEQ laskettaessa oletetaan kunkin määrittämättä jääneen yhdisteen arvoksi määrittelyrajaa vastaava arvo. Pienimmät arvot: TEQ:ta laskettaessa oletetaan kunkin määrittämättä jääneen yhdisteen arvoksi nolla. Väliarvot: TEQ:ta laskettaessa oletetaan kunkin määrittämättä jääneen yhdisteen arvoksi puolet määrittelyrajaa vastaavasta arvosta.

Mittausepävarmuus voidaan ottaa huomioon jollakin seuraavista tavoista:

- laskemalla laajennettu epävarmuus käyttäen kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 %. Erä ei ole säännösten mukainen, jos mitattu arvo, josta on vähennetty mittausepävarmuus U, ylittää enimmäismäärän. Jos dioksiinipitoisuudet ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet määritetään erikseen, on dioksiinipitoisuuksien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien yhteydessä käytettävä dioksiinipitoisuuksien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden erillisten määrittystulosten yhteenlaskettua, arvioitua ja laajennettua epävarmuutta.
- vahvistamalla päätöksen tekoon vaadittava raja-arvo (päästöraja) (CCa) komission päätöksen 2002/657/EY ⁽¹⁾ mukaisesti (liitteen 3.1.2.5 kohta – aineet, joille on vahvistettu sallittu raja). Erä ei ole säännösten mukainen, jos mitattu arvo on yhtä suuri tai suurempi kuin CCa.

Näitä tulkintasääntöjä sovelletaan virallista tarkastusta varten otettujen näytteiden määrittystuloksiin. Ne eivät vaikuta jäsenvaltioiden oikeuteen soveltaa kansallisia sääntöjä oikeustoimia ja kiistanratkaisumenettelyjä varten tehtyihin määrittäksiin.

II. NÄYTTEIDEN VALMISTUS SEKÄ DIOKSIINIEN (PCDD/PCDF) JA DIOKSIININ KALTAISTEN PCB-YHDISTEIDEN VIRALLISESSA VALVONNASSA KÄYTETTÄVIÄ MÄÄRITYSMENETELMIÄ KOSKEVAT VAATIMUKSET

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Näitä vaatimuksia on sovellettava analysoitaessa rehuaineita ja rehuja dioksiinin (polykloorattujen dibentso-p-dioksiinien (PCDD-yhdisteet) ja polykloorattujen dibentsofuraanien (PCDF-yhdisteet)) ja dioksiinin kaltaisten polykloorattujen bifenyylien (PCB-yhdisteiden) määrittämiseksi.

Dioksiinien esiintymistä rehuissa voidaan valvoa strategialla, johon kuuluu seulontamenetelmä niiden näytteiden valitsemiseksi, joissa on vähemmän kuin 25 prosentilla tietyt tason alittavia tai sen ylittäviä määriä dioksiineja tai dioksiinin kaltaisia PCB-yhdisteitä. Merkittäviä dioksiinimääriä sisältävien näytteiden dioksiinipitoisuudet on määritettävä tai vahvistettava varmistavan menetelmän avulla.

Seulontamenetelmät ovat menetelmiä, joita käytetään osoittamaan dioksiinien tai dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden esiintyminen tietyllä tasolla. Menetelmien näytteenkäsittelykapasiteetti on suuri, ja niillä seulotaan suuria määriä näytteitä mahdollisesti positiivisten näytteiden havaitsemiseksi. Menetelmät on erityisesti suunniteltu välttämään väärit negatiiviset tulokset.

Varmistusmenetelmät ovat menetelmiä, joilla saadaan täydelliset tiedot tai lisätietoja, joiden avulla dioksiinit ja dioksiinin kaltaiset PCB-yhdisteet voidaan tunnistaa ja kvantifioida yksiselitteisesti tietyllä tasolla.

2. Taustaa

Koska ympäristönäytteet ja biologiset näytteet (rehuaineista ja rehuista otetut näytteet mukaan luettuina) sisältävät yleensä eri dioksiiniyhdisteiden monenlaisia seoksia, riskinarvioinnin helpottamiseksi on kehitetty toksisuus-ekvivalenssikertoimen (Toxic Equivalency Factor, TEF) käsite. Toksisuusekvivalenssikertoimet on kehitetty sitä varten, että niillä voidaan esittää 2,3,7,8-substituoitujen PCDD-yhdisteiden ja PCDF-yhdisteiden seoksien ja myös joidenkin muuhun kuin orto-asemaan substituotujen tai toisaalta mono-orto-asemaan substituotujen PCB-yhdisteiden — joilla on dioksiinin kaltaista aktiivisuutta — konsentraatioita 2,3,7,8-TCDD:n (2,3,7,8-tetraklooridibentso-p-dioksiinin) toksisuusekvivalentteina (TEQ). Tietyissä erässä olevien yksittäisten aineiden konsentraatiot kerrotaan kunkin aineen toksisuusekvivalenssikertoimella, ja saadut määrät lasketaan yhteen, jolloin tulokseksi saadaan dioksiinin kaltaisten yhdisteiden kokonaiskonsentraatio toksisuusekvivalentteina ilmaistuna.

Tässä asetuksessa yksittäisen yhdisteen hyväksytty määritysraja on se näytteessä olevan analyytin pitoisuus, joka tuottaa mitattaville kahdelle ionille mittauslaitteessa vasteen, jossa vähemmän herkän signaalin signaali-kohinasuhde on 3:1, ja joka täyttää EPA-menetelmän 1613 versiossa B kuvatus määritysmenetelmän vaatimukset, jotka koskevat esimerkiksi retentioaikaa ja isotooppisuhdetta.

3. Näytteen valmistamista koskevat laadunvarmistusvaatimukset

Tässä yhteydessä sovelletaan liitteessä II vahvistettuja yleisiä säännöksiä näytteiden valmistamisesta määrittystä varten.

Lisäksi on noudatettava seuraavia vaatimuksia:

- Näytteet on säilytettävä ja kuljetettava lasista, alumiinista, polypropyleenistä tai polyetyleenistä valmistetuissa säiliöissä. Paperipölyjäämät on poistettava säiliöistä. Lasitavarat on huuhdeltava liuottimella, josta on ennalta tarkastettu, ettei niissä ole dioksiinijäämiä.

⁽¹⁾ EYVL L 221, 17.8.2002, s. 8.

- On tehtävä ilman näytettä nolla-analyysi, jossa tehdään kaikki analyysin vaiheet.
- Uuttamisessa käytettävän näytteen määrän on oltava riittävä herkkyysvaatimusten täyttämiseksi.

4. Laboratorioita koskevat vaatimukset

- Laboratorioiden on osoitettava menetelmän suorituskyky tarkoituksenmukaisella mittausalueella, esimerkiksi $0,5 \times$, $1 \times$ ja $2 \times$ tärkeäksi katsottu taso, ja toistettujen mittausten hajonnan on oltava hyväksyttävä. Ks. hyväksymisvaatimuksia koskevat tiedot 5 kohdasta.
- Varmistusmenetelmän määritysrajan on oltava noin yksi viidesosa tärkeäksi katsotusta tasosta, jotta varmistetaan, että vaihtelukertoimet ovat hyväksyttävät kyseisellä mittausalueella.
- Sisäistä laadunvalvontaa varten on mitattava säännöllisesti nollanäytteitä tai näytteitä, joihin on lisätty analyyttejä, tai erityisiä kontrollinäytteitä mieluiten sertifioiduilla vertailuaineilla.
- Paras tapa osoittaa pätevyys analyysien tekemisessä on osallistua menestyksekkäästi laboratorioiden välisiin laboratorioiden pätevyyttä arvioiviin tutkimuksiin. Menestyksekkäs osallistuminen esimerkiksi maaperä- tai viemärinäytteitä koskeviin laboratorioiden välisiin tutkimuksiin ei kuitenkaan välttämättä osoita laboratorion pätevyyttä myös elintarvike- ja rehunäytteiden analysoinnin alalla, koska kyseisten näytteiden kontaminaatiotaso on alempi. Jatkuva osallistuminen laboratorioiden välisiin tutkimuksiin, jotka koskevat dioksiinien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden määrittämistä rehu- tai elintarvikematriiseissa, on siksi välttämätöntä.
- Laboratorioiden on oltava ISO-oppaan 58 mukaisesti toimivan tunnustetun laitoksen hyväksymiä, millä varmistetaan, että laboratoriot soveltavat analyttististä laadunvarmistusta. Laboratorioiden hyväksyntä on tehtävä ISO/IEC 17025-standardin mukaisesti.

5. Dioksiinien ja dioksiinin kaltaisten pcb-yhdisteiden määrittämenettelyjä koskevat vaatimukset

Määrittämenettelyjä koskevat perusvaatimukset:

- **Hyvä herkkyys ja matalat toteamisrajat.** PCDD- ja PCDF-yhdisteet on pystyttävä havaitsemaan jo määrinä, joiden suuruus on pikogrammoja TEQ (pikogramma = 10^{-12} g), sillä jotkin näistä yhdisteistä ovat erittäin myrkyllisiä. PCB-yhdisteiden tiedetään esiintyvän suurempina pitoisuuksina kuin PCDD- ja PCDF-yhdisteiden. Useimpien PCB-yhdisteiden osalta herkkyudeksi riittää jo nanogrammoina (10^{-9} g) ilmaistava alue. Niitä toksisempien dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden (erityisesti ei-orto-yhdisteiden) mittauksessa herkkyys on oltava samaa luokkaa kuin PCDD- ja PCDF-yhdisteiden kohdalla.
- **Hyvä selektiivisyys (spesifisyys).** PCDD- ja PCDF-yhdisteet sekä dioksiinin kaltaiset PCB:t on voitava erottaa lukuisista muista uuttamisessa mukana tulevista ja mahdollisesti häiriöitä aiheuttavista yhdisteistä, joiden pitoisuudet voivat olla moninkertaisia verrattuna näiden yhdisteiden pitoisuuksiin. Kaasukromatografia-massaspektrometriamenetelmissä (GC-MS) on pystyttävä tarvittaessa erottelemaan eri yhdisteet, kuten esimerkiksi 17 toksista 2,3,7,8-substituoitua PCDD- ja PCDF-yhdistettä ja dioksiinin kaltaista PCB-yhdistettä, ja muut näiden aineiden sukulaisaineet. Biotestien pitää pystyä määrittämään TEQ-arvot valikoiden PCDD- ja PCDF-yhdisteiden ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden summana.
- **Hyvä tarkkuus (oikeellisuus ja täsmällisyys).** Määrittäksessä pitää pystyä antamaan pätevä ja luotettava arvio aineen todellisesta pitoisuudesta näytteessä. Hyvä tarkkuus (mittauksen tarkkuus: mittauksen tuloksen ja mittaussuureen todellisen tai annetun arvon läheisyys) on välttämätöntä, jotta voidaan välttää näytteen määrittäytuloksen hylkääminen TEQ-arvion heikon luotettavuuden perusteella. Tarkkuus ilmaistaan oikeellisuutena (sertifioidusta materiaalista mitatun tutkittavan aineen määrän keskiarvon ja sertifioidun arvon erotus prosentteina tästä arvosta) ja täsmällisyytenä (RSD_R on uusittavissa olosuhteissa saaduista tuloksista laskettu suhteellinen standardipoikkeama).

Seulontamenetelmiin voi kuulua biotestejä ja GC-MS-menetelmiä; varmistusmenetelmät ovat korkean erotuskyvyn kaasukromatografia-massaspektrometriamenetelmiä (HRGC-HRMS-menetelmiä).

TEQ-arvon kokonaismäärän osalta on noudatettava seuraavia vaatimuksia:

	Seulontamenetelmät	Varmistusmenetelmät
Väärien negatiivisten tulosten osuus	< 1 %	
Oikeellisuus		- 20 % - + 20 %
Tarkkuus RSD _R	< 30 %	< 15 %

6. Seulonnassa tai varmistuksessa käytettäviä gc-ms-menetelmiä koskevat erityisvaatimukset

- Määrittäminen menetelmän validoimiseksi on aivan menetelmän alussa eli esimerkiksi ennen uuttamista lisättävä ¹³C-merkittyjä 2,3,7,8-kloorisubstituoituja sisäisiä PCDD/F-standardeja ja ¹³C-merkittyjä dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden sisäisiä standardeja. Vähintään yhtä näistä yhdisteistä on lisättävä kutakin tetra- ja oktakloorattua PCDD/F-homologiryhmää kohden ja vähintään yhtä näistä yhdisteistä kutakin dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden homologiryhmää kohden (tai vaihtoehtoisesti vähintään yhtä näistä yhdisteistä kutakin PCDD/F:ien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden valvonnassa käytettyä massaspektrillä määritettyä ionia kohden.) Ainakin varmistusmenetelmien yhteydessä on käytettävä kaikkia 17:ää ¹³C-merkittyä 2,3,7,8-kloorisubstituoitua sisäistä PCDD/F-standardia ja kaikkia 12:tä ¹³C-merkittyä dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden sisäistä standardia.
- Suhteelliset vastekertoimet olisi asianmukaista kalibrointiliuosta käyttäen määritettävä myös niille aineille, joiden määrittämisessä ei lisätä ¹³C-merkittyä analogia.
- Kasviperäisistä rehuista ja alle 10 % rasvaa sisältävistä eläinperäisistä rehuista otettuihin näytteisiin on sisäiset standardit on lisättävä ennen uuttamista. Yli 10 % rasvaa sisältävistä eläinperäisistä rehuista otettuihin näytteisiin ne voidaan lisätä joko ennen uuttamista tai rasvojen 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.
- Ennen GC-MS-analyysia on lisättävä 1 tai 2 saantostandardia.
- Saantojen valvonta on välttämätöntä. Varmistusmenetelmissä sisäisten standardien saantojen pitää olla 60–120 %. Pienemmät tai suuremmat saantoarvot voidaan hyväksyä erityisesti hepta- ja oktakloorattujen dibentsodioksiinin ja dibentsofuraanien osalta, kunhan niiden vaikutus TEQ-arvoon on enintään 10 % TEQ-arvon kokonaismäärästä (perustana PCDD/F:ien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden summa). Seulontamenetelmissä saantojen on oltava 30–140 %.
- Dioksiinit on erotettava häiriöitä aiheuttavista klooratuista yhdisteistä, esimerkiksi muista kuin dioksiinin kaltaisista PCB-yhdisteistä ja klooratuista bifenyylieettereistä, soveltuvilla kromatografiatekniikoilla (mieluiten florisil-, alumiinioksidi- ja/tai hiilikolonneilla).
- Isomeerien erotuksen kaasukromatografian avulla pitää olla riittävä (1,2,3,4,7,8-HxCDF:n ja 1,2,3,6,7,8-HxCDF:n välisen laakson korkeus ei saa olla yli 25 %:a).
- Dioksiinien määrittämiseen on käytettävä EPA-menetelmän 1613 versiota B (Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS) tai vastaavat tehokkuuskriteerit täyttävää menetelmää.
- Suurimman ja pienimmän arvon välinen ero saa olla enintään 20 % rehuilla, joiden dioksiinipitoisuus on enimmäismäärän rajoissa tai ylittää sen. Sellaisten rehujen osalta, joiden dioksiinipitoisuudet alittavat selvästi enimmäismäärät, ero voi olla 25–40 %.

7. Seulovat analyysimenetelmät

7.1 Johdanto

Seulontaa voidaan käyttää erilaisiin analyysiin: puhtaaseen seulontaan tai kvantitatiiviseen analyysiin.

Seulonta

Näytteiden vastetta verrataan vertailunäytteen vasteeseen kyseessä olevalla mittausalueella. Vertailunäytettä vähäisemmän vasteen antavia näytteitä pidetään negatiivisina, suuremman vasteen antaneita mahdollisesti positiivisina. Vaatimukset:

- Kussakin koesarjassa on käytettävä nollanäytettä ja vertailunäytettä (-näytteitä), jotka uutetaan ja testataan samaan aikaan identtisissä oloissa. Vertailunäytteen vasteen on oltava selvästi kohonnut verrattuna nollanäytteeseen.
- Lisäksi on käytettävä mitattavan tason 0,5- ja 2-kertaista arvoa edustavia vertailunäytteitä, joilla osoitetaan testin toimivuus halutulla mittausalueella mitattavan tason kontrollia varten.
- Muita matriiseja testattaessa on osoitettava vertailunäytteiden sopivuus mieluiten ottamalla mukaan näytteitä, joiden TEQ-arvoksi on korkean resoluution kaasukromatografia-massaspektrometrialla määritetty vertailunäytteen arvoa lähellä oleva arvo, taikka käyttämällä arvoltaan vastaavaksi säädettyä nollanäytettä.
- Koska sisäisiä standardeja ei voida käyttää biotesteissä, on erittäin tärkeää tehdä toistettavuustestejä, jotta saadaan tietoja yksittäisen koesarjan keskihajonnasta. Vaihtelukertoimen on oltava pienempi kuin 30 %.
- Biotestien osalta on määriteltävä kohdeyhdisteet, mahdolliset häiriöt sekä suurimmat hyväksyttävät nollatasot.

Kvantitatiivinen analyysi

Kvantitatiivisissa analyysissä tarvitaan standardilaimennussarja, kaksin- tai kolminkertainen puhdistus sekä mittaus-, nolla- ja saantokontrollit. Tulos voidaan ilmoittaa TEQ:na, jolloin oletetaan signaalista vastaavien yhdisteiden olevan TEQ-periaatteen mukaisia. Tämä voidaan tehdä tuottamalla TCDD:n (tai dioksiinin, furaanin tai dioksiinin kaltaisten PCP-yhdisteiden standardiseoksen) avulla kalibrointikuvaaja, jonka perusteella lasketaan TEQ-taso uutteen ja sitä kautta näytteessä. Arvo korjataan nollanäytteelle (jotta otetaan huomioon epäpuhtaudet käytetyistä liuottimista ja kemikaaleista) lasketun TEQ-arvon ja saannon (lasketaan pitoisuudeltaan noin kyseessä olevaa tasoa edustavan laadunvalvontanäytteen TEQ-arvosta) perusteella. On huomattava, että osa ilmeisestä saantohäviöstä voi johtua matriisivaikutuksista ja/tai biotestien TEF-arvojen ja WHO:n virallisten TEF-arvojen eroista.

7.2 Seulontaan käytettäviä analyysimenetelmiä koskevat vaatimukset

- Seulontaan voidaan käyttää GC-MS-menetelmiä ja biotestimenetelmiä. GC-MS-menetelmien vaatimukset annetaan 6 kohdassa. Solupohjaisten biotestien erityisvaatimukset esitetään 7.3 kohdassa ja testisarjapohjaisten biotestien erityisvaatimukset 7.4 kohdassa.
- On myös ilmoitettava väärin positiivisten ja väärin negatiivisten tulosten määrä suuressa määrässä näytteitä, joiden pitoisuudet ovat enimmäismäärien tai toimintarajojen ala- ja yläpuolella, ja niitä on verrattava varmistavalla analyysimenetelmällä määritettyyn TEQ-arvoon. Todellisten väärin negatiivisten tulosten osuuden pitää olla alle 1 %. Väärin positiivisten tulosten määrän pitää olla niin pieni, että seulontavälineen käytöstä on hyötyä.
- Positiiviset tulokset on aina vahvistettava varmistavalla analyysimenetelmällä (HRGC/HRMS). Lisäksi laajaa TEQ-vaihtelualueita edustavat näytteet on vahvistettava HRGC/HRMS:llä (noin 2–10 % negatiivisista näytteistä). Tiedot biotestin ja HRGC/HRMS:n tulosten vastaavuudesta on ilmoitettava.

7.3 Solupohjaisia biotestejä koskevat erityisvaatimukset

- Biotestiä suoritettaessa on kussakin testauksessa käytettävä TCDD-yhdisteiden tai dioksiini-furaaniseoksen viitepitoisuussarjaa (kattava annos-vastekuvaaja, jossa $R^2 > 0,95$). Seulonnassa voidaan kuitenkin käyttää matalien pitoisuuksien näytteitten analysointiin laajennettua matalien pitoisuuksien kuvaajaa.
- Biotestin tulosten valvomiseen vakiomittaisella ajanjaksolla on käytettävä laadunvalvontalomakkeessa TCDD-viitepitoisuutta (noin 3 kertaa määrittäjä). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää vertailunäytteen suhteellista vastetta verrattuna TCDD-kalibrointikäyrään, sillä solukohtainen vaste voi riippua useista eri tekijöistä.
- Kullekin vertailumateriaalille on luotava laadunvalvontakortti, joka on tarkastettava; näin varmistetaan, että tulokset vastaavat ohjeita.

- Erityisesti kvantitatiivisissa laskelmissa on käytetyn näytelaimennuksen oltava vastekäyrän lineaarisella osuudella. Pitoisuudeltaan vastekäyrän lineaarisen osuuden ylittävät näytteet on laimennettava ja testattava uudelleen. Onkin suositeltavaa testata kerralla vähintään kolme laimennosta.
- Prosentuaalinen keskihajonta saa olla enintään 15 % kunkin näytelaimennoksen kolminkertaisessa määrittäyksessä ja enintään 30 % kolmen erillisen kokeen välillä.
- Toteamisrajan arvoksi voidaan asettaa kolme kertaa liuotinnollan tai taustavasteen keskihajonnan arvo. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää tausta-arvoa suurempaa vastetta (5 kertaa liuotinnollan vaste) laskettuna kyseisen päivän kalibrointikäyrältä. Määrittämisrajaksi voidaan asettaa 5–6 kertaa liuotinnollan tai tausta-arvon keskihajonta, tai sitten voidaan käyttää selvästi tausta-arvoa suurempaa vastetta (10 kertaa liuotinnollan vaste) laskettuna kyseisen päivän kalibrointikäyrältä.

7.4 Testisarjapohjaisia biotestejä koskevat erityisvaatimukset

- On varmistettava, että testisarjapohjaiset biotestit ovat riittävän herkkiä ja luotettavia rehujen testaukseen.
- Valmistajan ohjeita näytteen valmistamiseen ja analyysiin on noudatettava.
- Viimeisen käyttöpäivän ohittaneita testisarjoja ei pidä käyttää.
- Muiden testisarjojen yhteydessä käytettäviksi tarkoitettuja tarvikkeita tai komponentteja ei pidä käyttää.
- Testisarjoja on säilytettävä annetuissa säilytyslämpötilarajoissa ja käytettävä annetuissa käyttölämpötiloissa.
- Toteamisraja on immunomäärityksissä summa, joka saadaan laskemalla yhteen keskiarvo sekä 3 kertaa keskihajonta, joka on määritetty 10:llä nollanäytteen toistoanalyysillä, ja joka jaetaan lineaarisen regressiokuvaajan kulmakertoimella.
- Laboratoriotesteissä on käytettävä vertailustandardeja, jotta taataan, että vaste standardiin on hyväksyttävissä rajoissa.

8. Tulosten ilmoittaminen

Mikäli analyttinen menetelmä sallii, analyysin tuloksissa on ilmoitettava yksittäisten PCDD/F:ien ja PCB-yhdisteiden pitoisuudet, ja analyysin tulokset on ilmoitettava pienimpinä, suurimpina ja väliarvoina, jotta tulosten raportointiin saadaan mukaan mahdollisimman paljon tietoja, ja tuloksia pystytään tulkitsemaan erityisten vaatimusten mukaisesti.

Raportissa on ilmoitettava myös näytteen rasvapitoisuus sekä rasvan uuttamiseen käytetty menetelmä.

Yksittäisten sisäisten standardien saantotiedot on toimitettava, jos saantojen arvo on kohdassa 6 mainitun alueen ulkopuolella tai jos enimmäismäärä ylittyy; muissa tapauksissa ne on toimitettava pyydettyä.

Koska mittausepävarmuus on otettava huomioon päätettäessä näytteen säännöstenmukaisuudesta, kyseisen muuttujan on myös oltava saatavissa. Siksi määrittäytulos on raportoitava muodossa $x \pm U$, jossa x on määrittäytulos ja U on mittaukseen liittyvä laajennettu epävarmuustekijä, jossa käytetään kattavuuskerrointa 2, jolloin luotettavuustaso on noin 95 %. Jos dioksiinipitoisuudet ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet määritetään erikseen, dioksiinin ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden erillisten määrittäytulosten yhteenlaskettua, arvioitua ja laajennettua epävarmuutta on käytettävä dioksiinipitoisuuksien ja dioksiinin kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien yhteydessä.

Jos mittausten epävarmuus otetaan huomioon soveltamalla päätösrajaa CCa (tämän B osan I luvun 2 kohdassa kuvatulla tavalla), tiedot tästä muuttujasta on ilmoitettava.

LIITE VI

REHUIJEN SISÄLTÄMIEN ELÄINPERÄISTEN AINESOSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT REHUIJEN VIRALLISTA VALVONTAA VARTEN

Rehujen eläinperäisten ainesosien mikroskooppiseen toteamiseen, tunnistamiseen tai arviointiin sovellettavat vaatimukset

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Näitä vaatimuksia on sovellettava, kun eläinperäisiä ainesosia (jotka on määritelty nisäkkäiden, siipikarjan ja kalojen ruhojen tai ruhon osien käsittelystä saataviksi tuotteiksi) tutkitaan mikroskooppisesti Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 882/2004 ⁽¹⁾ mukaisen rehujen yhteensovitettun tarkastusohjelman yhteydessä. Mikäli tässä liitteessä kuvattuja menetelmiä käytetään kaikissa virallisissa testeissä, voidaan tehdä myös toinen testi jotain menetelmän muunnosta tai vaihtoehtoista menetelmää käyttäen, jotta voitaisiin parantaa tiettyjen eläinperäisten ainesosien havaitsemista tai täsmentää eläinperäisten ainesosien alkuperää. Muunnettua menetelmää voidaan lisäksi käyttää tutkittaessa erityisiä eläinperäisiä ainesosia, esimerkiksi talissa olevaa plasmatai luita (ks. myös 9 kohta), kunhan nämä analyysit tehdään yhteensovitettussa tarkastusohjelmassa määrättyjen analyysien lisäksi.

2. Herkkyys

Eläinperäisten ainesosien luonteesta riippuen niitä voidaan havaita rehuista hyvinkin pieniä määriä (< 0,1 %).

3. Periaate

Tunnistukseen käytetään asianmukaisesti valmistettua, edustavaa näytettä, joka on otettu liitteen I säännösten mukaisesti. Seuraavassa esitettävä analyysimenetelmä soveltuu rehunäytteille, joiden kosteuspitoisuus on alhainen. Jos rehun kosteuspitoisuus on yli 14 %, se on ennen käsittelyä kuivattava (kondensoitava). Eräitä rehuja tai rehuaineita (esim. rasvoja ja öljyjä) varten tarvitaan erityiskäsittelyä (ks. 9 kohta). Eläinperäiset ainesosat tunnistetaan tyypillisten mikroskooppisesti tunnistettavissa olevien ominaisuuksien (lihassäikeiden ja muiden lihan palojen, ruston, luiden, sarvien, karvojen, harjasten, veren, höyhenten, munankuorten, kalanluiden ja suomujen) perusteella. Tutkimus on tehtävä sekä näytteen siiviläfraktiosta (6.1) että konsentroidusta sedimentistä (6.2).

4. Reagenssit

4.1 Mikroskopointireagenssit

4.1.1 Klooraaliyhdraatti (60-prosenttinen vesiliuos, w/v).

4.1.2 Lipeä (NaOH 2,5 % w/v tai KOH 2,5 % w/v) siiviläfraktiota varten.

4.1.3 Parafiiniöljy tai glyseroli (viskositeetti 68–81) sedimentistä tehtäviä mikroskopointia varten.

4.2 Pesureagenssit

4.2.1 Alkoholi, 96 %.

4.2.2 Asetoni.

4.3 Konsentroidut reagenssit

4.3.1 Tetrakloorietyleeni (tiheys 1,62).

⁽¹⁾ EUVL L 165, 30.4.2004, s. 1, oikaisu EUVL L 191, 28.5.2004, s. 1.

4.4 Värjäysreagenssit

- 4.4.1 Jodi-kaliumjodidiliuos (2 g kaliumjodidia liuotetaan 100 ml:aan vettä ja lisätään 1 g jodia, ja sekoitetaan useita kertoja).
- 4.4.2 Alitsariinipunainen (2,5 ml 1 M kloorivetyhappoa laimennetaan 100 ml:aan vettä ja liuokseen lisätään 200 mg alitsariinipunaista).
- 4.4.3 Kystiiniireagenssi (2 g lyijyasetaattia ja 10 g NaOH:ta liuotetaan 100 ml:aan vettä).
- 4.4.4 Jodi-kaliumjodidiliuos (liuotettu 70-prosenttiseen etanoliin).

4.5 Värinpoistoreagenssi

- 4.5.1 Kaupallista natriumhypokloriittiliuosta (9,6 % aktiivista klooria).

5. Laitteet ja tarvikkeet

- 5.1 Analyysivaaka (tarkkuus 0,01 g, paitsi konsentroitua sedimenttiä varten 0,001 g).
- 5.2 Jauhamisvälineet (mylly tai huhmare, erityisesti rehulle, jonka rasvapitoisuus analyysissa on yli 15 %).
- 5.3 Seula, jossa on neliönmuotoiset reiät, silmäkoko enintään 0,50 mm.
- 5.4 Erotussuppilo tai kartiopohjainen selkeytysastia.
- 5.5 Stereomikroskooppi (vähintään 40-kertainen suurennus).
- 5.6 Valomikroskooppi (vähintään 400-kertainen suurennus), jossa on läpivalaisu- tai polarisaatio-optiikka.
- 5.7 Tavanomaiset laboratorion lasiastiat.

Kaikki välineet on puhdistettava huolellisesti. Erotussuppilot ja lasiastiat on pestävä pesukoneessa. Seulat on puhdistettava jäykkäharjaksella harjalla.

6. Menettely

Pelletöidyt rehut voidaan esiseuloa, jos molemmat fraktiot analysoidaan erillisinä näytteinä.

Näytettä käsitellään vähintään 50 g (tarvittaessa se jauhetaan varovasti sopivilla jauhamisvälineillä (5.2) sopivan rakenteen aikaansaamiseksi). Jauhetusta materiaalista otetaan kaksi edustavaa osanäytettä, yksi seulafraktiota (vähintään 5 g, ks. 6.1 kohta) ja yksi konsentroitua sedimenttiä varten (vähintään 5 g, ks. 6.2 kohta). Lisäksi voidaan käyttää värjäysreagenssia (6.3) tunnistamista varten.

Eläinproteiinien luonteen ja partikkelien alkuperän osoittamiseksi voidaan käyttää päätöksentekoa tukevaa järjestelmää (kuten ARIES) ja vertailunäytteet voidaan dokumentoida.

6.1 Eläinperäisten ainesosien osoittaminen seulafraktioista

Vähintään 5 g näytettä seulotaan (seula, ks. 5.3 kohta) kahteen fraktioon.

Karkea(t) seulafraktio(t) (tai edustava osa sitä) levitetään ohuena kerroksena sopivalle alustalle ja tutkitaan järjestelmällisesti stereomikroskoopilla (5.5) eri suurennuksilla eläinperäisten ainesosien osoittamiseksi.

Hienosta seulafraktiosta valmistetaan objektilasinäyte, joka tutkitaan järjestelmällisesti valomikroskoopissa (5.6) eri suurennuksilla eläinperäisten ainesosien osoittamiseksi.

6.2 Eläinperäisten ainesosien osoittaminen konsentroidusta sedimentistä

Vähintään 5 g näytettä punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella erotussuppiloon tai kartiopohjaiseen selkeytysastiaan ja käsitellään vähintään 50 ml:lla tetrakloorietyleniä (4.3.1). Seosta ravistetaan tai sekoitetaan toistuvasti.

- Käytettäessä suljettua erotussuppiloa sedimentin annetaan laskeutua astian pohjalle riittävän kauan (vähintään 3 minuuttia), ennen kuin se erotetaan. Suppiloa ravistetaan uudelleen, ja sedimentin annetaan jälleen laskeutua vähintään 3 minuuttia. Sedimentti erotetaan jälleen.
- Käytettäessä avointa selkeytysastiaa sedimentin annetaan laskeutua astian pohjalle vähintään 5 minuuttia, minkä jälkeen se erotetaan.

Koko sedimentti kuivataan ja punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella. Punnitus on tarpeen vain, jos eläinperäisten ainesosien osuus on arvioitava. Jos sedimentti koostuu useista suurista partikkeleista, se voidaan seuloa (seulasta ks. 5.3 kohta) kahteen fraktioon. Kuivattu sedimentti tutkitaan stereomikroskooppilla (5.5) tai valomikroskooppilla (5.6) luuaineksen toteamiseksi.

6.3 Petaus- ja värjäysreagenssien käyttö

Eläinperäisten ainesosien mikroskooppisissa tunnistuksissa voidaan käyttää erityisiä petaus- ja värjäysreagensseja.

Kloraalihydraatti (4.1.1): Varovainen kuumennus helpottaa solurakenteiden tarkastelua, koska tärkkelysyyvät gelatinoituvat ja ei-toivottu solun sisältö häviää.

Lipeä (4.1.2): Natrium- tai kaliumhydroksidi kirkastaa rehumateriaalia, mikä helpottaa lihassäikeiden, karvojen ja muiden keratiinirakenteiden havaitsemista.

Parafiniöljy ja glyseroli (4.1.3): Luuaines voidaan tunnistaa tässä petausaineessa helposti, koska useimmat luun ontelot (lakuunat) jäävät täyteen ilmaa ja näkyvät mustina noin 5–15 mikrometrin kokoisina reikinä.

Jodi-kaliumjodidiliuos (4.4.1): Liuosta käytetään tärkkelyksen (sinivioletti väri) ja valkuaisen (keltaoranssi väri) osoittamiseen. Liuosta voidaan tarvittaessa laimentaa.

Alitsariinipunaliuos (4.4.2): Liuos värjää luut, ruodot ja suomet punaisiksi tai vaaleanpunaisiksi. Ennen sedimentin kuivaamista (ks. 6.2 kohta) koko sedimentti siirretään lasiseen koeputkeen ja pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia (4.2.1) (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta ja annetaan liuottimen selkeytyä noin minuutin ajan ennen sen dekantointia). Ennen alitsariinipunaliuoksen käyttöä sedimentti käsitellään värinpoistoreagenssilla lisäämällä sedimenttiin vähintään 1 ml natriumhypokloriittiliuosta (4.5.1). Reaktion annetaan jatkua 10 minuutin ajan. Putki täytetään vedellä, sedimentin annetaan laskeutua 2–3 minuuttia, ja sen jälkeen vesi ja suspendoituneet partikkelit dekantoidaan. Sedimentti pestään vielä kahdesti noin 10 ml:lla vettä (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta, sedimentin annetaan laskeutua putken pohjaan ja vesi dekantoidaan). Lisätään alitsariinipunaliuosta vähintään kahdesta kymmeneen tippaa (sedimentin määrän mukaan). Seosta ravistetaan ja sedimentin annetaan reagoida liuoksen kanssa muutaman sekunnin ajan. Värjäytynyt sedimentti pestään kahdesti noin 5 ml:lla alkoholia (4.2.1) ja sen jälkeen kerran asetonilla (4.2.2) (joka kerta käytetään koeputkisekoitinta ja sedimentin annetaan laskeutua noin minuutin ajan, minkä jälkeen liuos dekantoidaan). Tämän jälkeen sedimentti on valmista kuivattavaksi.

Kystiiniareagenssi (4.4.3): Varovainen kuumennus muuttaa kystiiniä sisältävät ainesosat (karvat, höyhenet jne.) mustanruskeiksi.

6.4 Kalajauhoa mahdollisesti sisältävän rehun tutkiminen

Vähintään yksi objektilasi hienosta seulafraktiosta ja hienosta sedimenttifraktiosta tutkitaan valomikroskooppilla (ks. kohdat 6.1 ja 6.2).

Jos rehu pakkausmerkintöjen mukaan sisältää kalajauhoa tai jos kalajauhon esiintymistä epäillään tai sitä havaitaan alustavassa tutkimuksessa, mikroskopoidaan lisäksi vähintään kaksi uutta objektilasia alkuperäisen näytteen hienosta seulafraktiosta ja koko sedimenttifraktiosta.

7. Laskutoimitukset ja arviointi

Kun virallisella analyysillä arvioidaan eläinperäisten ainesosien määrää (eikä vain niiden esiintymistä), jäsenvaltioiden on varmistettava, että käytetään tässä kohdassa kuvattuja menettelyjä.

Laskutoimitukset voidaan tehdä vain, jos eläinperäiset ainesosat sisältävät luupartikkeleita.

Läminveristen maalla elävien lajien (ts. nisäkkäiden ja lintujen) luupartikkelit voidaan erottaa erityyppisistä kalanluista mikroskooppisesti tyypillisten ontelomuodostelmien (lakuunoiden) perusteella. Näytteen sisältämän eläinperäisen aineksen osuus arvioidaan ottamalla huomioon

- luupartikkelien arvioitu osuus (painoprosenttia) konsentroidussa sedimentissä ja
- luun osuus (painoprosenttia) eläinperäisissä ainesosissa.

Arvion on perustuttava vähintään kolmeen (jos mahdollista) objektilasinäytteeseen ja vähintään viiteen näkökenttään objektilasia kohti. Rehuseoksista saatu konsentroidu sedimentti sisältää yleensä maaeläinten luupartikkelien ja kalanluupartikkelien lisäksi muita raskaita partikkeleita kuten mineraaleja, hiekkaa, ligniiniä sisältäviä kasvinosia yms.

7.1 Luupartikkelien osuuden arvioitu määrä

prosenttia maaeläinten luupartikkeleita = $(S \times c) / W$

prosenttia kalanluu- ja suomupartikkeleita = $(S \times d) / W$

(S = sedimentin paino (mg), c = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien maaeläimistä peräisin olevien luiden arvioitua osuutta varten, d = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien kalanruotojen ja suomujen arvioitua osuutta varten ja W = sedimentointia varten punnittu näyte (mg)).

7.2 Eläinperäisten ainesosien arvioitu osuus

Luun osuus eläinkunnan tuotteissa voi vaihdella paljon. (Luu jauho sisältää luuta tavallisesti 50–60 % ja lihajauho 20–30 %; kalajauhossa luiden ja suomujen osuus vaihtelee kalajauhon tyyppin ja alkuperän mukaan ja on tavallisesti 10–20 %.)

Jos näytteen sisältämän eläinperäisen jauhon tyyppi tiedetään, sen osuus näytteestä voidaan arvioida:

Maaeläinperäisten ainesosien arvioitu osuus (%) = $(S \times c) / (W \times f) \times 100$

Kalatuotteiden ainesosien arvioitu osuus (%) = $(S \times d) / (W \times f) \times 100$

(S = sedimentin paino (mg), c = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien maaeläimistä peräisin olevien luiden arvioitua osuutta varten, d = korjauskerroin (%) sedimentin sisältämien kalanruotojen ja suomujen arvioitua osuutta varten, f = korjauskerroin näytteen eläinperäisten ainesosien sisältämien luiden osuutta varten ja W = sedimentointia varten punnittu näyte (mg)).

8. Tutkimuksen tulosten esittäminen

Raportissa on vähintään esitettävä tieto maaeläimistä ja kalajauhasta peräisin olevien ainesosien esiintymisestä. Tulokset esitetään seuraavasti:

8.1 Maaeläimistä peräisin olevien ainesosien esiintyminen:

- Mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu maaeläimistä peräisin olevia ainesosia,
- tai
- mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin maaeläimistä peräisin olevia ainesosia.

8.2 Kalajauhon esiintyminen:

- Mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu kaloista peräisin olevia ainesosia,
- tai
- mikroskooppisten havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu kaloista peräisin olevia ainesosia.

Jos kaloista tai maaeläimistä peräisin olevia ainesosia todetaan, tutkimusraportissa voidaan tarvittaessa esittää arvio havaittujen ainesosien määrästä (x %, < 0,1 %, 0,1–0,5 %, 0,5–5 % tai > 5 %), ja täsmentää — jos mahdollista — kyseessä olevan maaeläimen tyyppi ja havaitut eläinperäiset ainesosat (lihassäikeet, rusto, luu, sarvet, karvat, harjakset, höyhenet, veri, munankuoret, kalanluut, suomet).

Esitettäessä arvio eläinperäisten ainesosien määrästä käytetty korjauskerroin f on mainittava.

Kun tunnistetaan maaeläinten luuainesta, raporttiin on lisättävä seuraava maininta:

"Ainesosat voivat olla peräisin nisäkkäistä."

Tämä maininta ei ole tarpeen, jos maaeläinten luupartikkelit on täsmennetty siipikarjan tai nisäkkäiden luupartikkeleiksi.

9. **Vaihtoehtoinen menettely rasvan tai öljyn analysointiin**

Seuraavaa menettelyä voidaan käyttää rasvan tai öljyn analysoinnissa:

- Jos rasva on kiinteää, sitä lämmitetään esimerkiksi mikroaaltouunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.
- 40 ml rasvaa pipetoidaan näytteen pohjaosasta sentrifugiputkeen.
- Sentrifugoidaan 4 000 kierrosta minuutissa (rpm) 10 minuuttia.
- Jos rasva on jähmettynyt sentrifugoinnin aikana, sitä lämmitetään taas mikroaaltouunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi. Sentrifugoidaan uudestaan 4 000 kierrosta minuutissa (rpm) 5 minuuttia.
- Puolet dekantoiduista epäpuhtauksista siirretään pienellä lusikalla tai spaattelilla petrimaljaan tai objektilasille mahdollisten eläinperäisten ainesosien (lihassäikeiden, höyhenten, luunpalasten jne.) mikroskooppista tutkimusta varten. Mikroskopoinnissa käytettäväksi petausaineeksi suositellaan parafiiniöljyä tai glyserolia.
- Loput epäpuhtauksista käytetään sedimentointiin 6.2 kohdassa kuvatulla tavalla.

LIITE VII

SIIPIKARJAN REHUIEN ENERGIA-ARVON LASKENTAMENETELMÄ

1. Energia-arvon laskentamenetelmä ja ilmoittaminen

Siipikarjan rehuseosten energia-arvo on laskettava jäljempänä olevan kaavan mukaisesti tiettyjen rehun ravintoainien 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 suuruisen enimmäispoikkeama.

3. Tuloksen ilmoittaminen

Edellä olevan laskukaavan mukaisesti saatu energia-arvo ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

4. Näytteenotto- ja määritysmenetelmät

Näytteenotto rehuseoksesta ja laskentakaavassa esiintyvien ravintoainepitoisuuksien määrittäminen on suoritettava yhteisön näytteenottomenetelmien ja virallisen rehuvalvonnan määritysmenetelmien mukaisesti.

Seuraavia menetelmiä on käytettävä:

- raakarasvapitoisuuden määrittäminen: raakarasvan ja -öljyn määrityksessä 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

Tärkeä huomautus:

Sellaisten lisäaineiden osoittamiseksi, jotka eivät enää ole sallittuja rehuissa, voidaan käyttää tässä liitteessä vahvistettuja määritysmenetelmiä herkempiä menetelmiä.

Tässä liitteessä esitetyt määritysmenetelmät on käytettävä varmistustarkoituksiin

A. METYYLIBENTSOKVAATTIPITOISUUDEN MÄÄRITYS

*7-Bentsyloksi-6-butyli-3-metoksikarbonyyli-4-kinoloni*1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen metyylibentsokvaattipitoisuus. Määritysraja 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 ultraäänikäsitteilyllä).

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).
- 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 Lasikolonni (250 mm × 15 mm), jossa on hana ja noin 200 ml:n säiliö.
- 4.4 HPLC-laitteisto, jossa on vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetkatori.
- 4.4.1 Nestekromatografiakolonni: 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 tyypiltään näytettä, ja metyylibentsokvaattia ei saa havaita määrittelyssä.
- 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-erotusta (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 jälkeen valutetaan alempi faasi (dikloorimetaani) 500 ml:n pyörökolviin. Toistetaan vesifaasin uutto vielä kahdella 40 ml:n annoksella dikloorimetaania ja yhdistetään nämä ensimmäiseen uutteeseen pyörökolvissa. Dikloorime-taaniuute haihdutetaan täysin kuivaksi pyöröhaihduttimessa (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 tuppola 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 pesuliukset kolonniin. Annetaan uutteen valua hartsipintaan ja pestään kolonni 50 ml:lla metanolia valuen, ettei virtausnopeus ylitä 5 ml:aa minuutissa. Heitetään ulos valunut liuos pois. Metyyli-bentsokvaatti 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 faasien erottua. Valutetaan alempi faasi (dikloorimetaani) 500 ml:n pyörökolviin. Toistetaan vesifaasin uutto kahdella uudella 70 ml:n annoksella dikloorimetaania ja yhdistetään nämä uutteet ensimmäisen, pyörökolvissa olevan uutteen kanssa.

Dikloorimetaaniliuute haidutetaan täysin kuivaksi pyöröhaihduttimessa (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.

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus on tarkastettava injektioimalla 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 näyteuutetta (5.5) käyttäen samaa tilavuutta kuin kalibrointiliuksille, ja määritetään metyylibentsokvaatti-piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen metyylibentsokvaatti-piikkien 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 näyteuutteen ja 10 µg/ml metyylibentsokvaattia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.7.3) spektrejä voidaan verrata.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen lisätään sopiva määrä standardin välimuotoliuosta (3.7.2). Lisätyn metyylibentsokvaatin määrän on vastattava näyteuutteeessä 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 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- kromatogrammin piikin huipun kohdalla näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorptioaallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorimäärityksessä tämä on yleensä noin ± 2 nm;
- 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 tutkittavan aineen absorbanssista;
- 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, tutkittavan 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

	Nollanäyte	Jauho 1	Rae 1	Jauho 2	Rae 2
CV _r [%]	–	6,70	4,40	6,70	5,70
s _R [mg/kg]	–	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R [%]	–	8,90	11,10	10,10	11,50
Saanto [%]	–	92,00	93,00	92,00	89,00

E_i = E_i havaittu

hav.

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-N¹,N⁴-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 käänteisfaasi-nestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

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 pullot 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-detektori tai diodirividetkatori.
- 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 (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 tyyppiltään samanlaista kuin näyte, eikä siinä saa esiintyä havaittavaa 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 ultraäänihauteeseen (4.1). Lisätään 410 ml vettä ja annetaan olla ultraäänihauteessa vielä 15 minuuttia. Otetaan kolvi ultraäänihauteesta, 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-määrityksellä (5.3).

5.3 HPLC-määritys**5.3.1 Muuttujat:**

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia ja niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaiset tulokset.

Analyysikolonne (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 kalibrintiliuosta (3.5.3), kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.3.2 Kalibrintikäyrä

Injektoidaan kutakin kalibrintiliuosta (3.5.3) 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 useita kertoja näyteliuosta (5.2) sama määrä kuin kalibrintiliuoksia ja lasketaan olakvindoksi-piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen olakvindoksipitoisuus ($\mu\text{g/ml}$) lasketaan olakvindoksin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.3.2) avulla.

Näytteen olakvindoksipitoisuus w (mg/kg) saadaan seuraavasta kaavasta:

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

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 kalibrointiliuoksen (3.5.3) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteliuokseen (5.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (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 Diodirividetektorimäärittäminen

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- Näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorption aallonpituuden, mitattuna kromatogrammin piikin kärjestä, on oltava sama detektorin erotuskyvyn määrittämässä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti $\pm 2 \text{ nm}$.
- Välillä $220\text{--}400 \text{ nm}$ näytteen ja standardin spektrit, kromatogrammin piikin kärjestä mitattuna, eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on $10\text{--}100 \%$. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15% standardianalyysin absorbanssista.
- Välillä $220\text{--}400 \text{ nm}$ näyteuutteesta ajatut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on $10\text{--}100 \%$. 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 $10\text{--}200 \text{ mg/kg}$, näytteen kahden rinnakkaisen määrittäksen 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% .

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-propyyliipyrimidin-5-yyli)metyyli]-2-metyylipyridiniumkloridihydrokloridi

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää amproliumin pitoisuus rehuissa ja esiseoksissa. 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.

Liuetetaan 13,80 g natriumdivetyfosfaattimonohydraattia veteen (3.3) 1 000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti vedellä (3.3) ja sekoitetaan.

3.5 Natriumperkloraattiliuos, $c = 1,6 \text{ mol/l}$.

Liuetetaan 224,74 g natriumperkloraattimonohydraattia veteen (3.3) 1 000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti vedellä (3.3) ja sekoitetaan.

3.6 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi (katso huomautus 9.1).

Asetonitriliin (3.2), natriumdivetyfosfaattiliuoksen (3.4) ja natriumperkloraattiliuoksen (3.5) seos, $450 + 450 + 100 \text{ (v + v + v)}$. Suodatetaan ennen käyttöä $0,22 \text{ }\mu\text{m}$:n kalvosuodattimella (4.3) ja poistetaan kaasut (esim. ultraäänihauuteessa (4.4) vähintään 15 min).

3.7 Standardiyhdiste: puhdas amproliumi, 1-[(4-amino-2-propyylipyrimidin-5-yyli)-metyyli]-2-metyylipyridi-niumkloridihydrokloridi, E 750 (katso kohta 9.2).

3.7.1 Amproliumstandardin kantaliuos, $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$

Punnitaan $0,1 \text{ mg}$:n tarkkuudella 50 mg amproliumia (3.7) 100 ml :n mittapulloon, liuetetaan 80 ml :aan metanolia (3.1), ja pullo pannaan 10 minuutiksi ultraäänihauuteeseen (4.4). Ultraäänikäsittelyn jälkeen liuoksen annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan, täytetään merkkiin asti vedellä ja sekoitetaan. Liuos säilyy $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.7.2 Amproliumstandardin välimuotoliuos, $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$

Pipetoidaan $5,0 \text{ ml}$ standardin kantaliuosta (3.7.1) 50 ml :n mittapulloon, täytetään merkkiin asti uuttoliuksella (3.8) ja sekoitetaan. Liuos säilyy $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.7.3 Kalibrointiliuokset

Siirretään $0,5$, $1,0$ ja $2,0 \text{ ml}$ standardin välimuotoliuosta (3.7.2) 50 ml :n mittapulloihin. Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.6) ja sekoitetaan. Nämä liuokset vastaavat $0,5$, $1,0$ ja $2,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$ amproliumia. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.8 Uuttoliuos.

Metanoli (3.1) -vesiseos $2 + 1 \text{ (v + v)}$.

4. Välineistö

4.1 HPLC-laitteisto, jossa voidaan injektoida $100 \text{ }\mu\text{l}$:n näytteitä.

4.1.1 Nestekromatografiakolonni, $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, kationinvaihto Nucleosil 10 SA, hiukkaskoko $5 \text{ }\mu\text{m}$ tai $10 \text{ }\mu\text{m}$, tai vastaava.

4.1.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektor tai diodirividetektor.

4.2 Kalvosuodatin, PTFE:tä, $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

4.3 Kalvosuodatin, $0,22 \text{ }\mu\text{m}$.

4.4 Ultraäänihauute.

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.

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.

Nestekromatografiakoloni (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), natriumdiveityfosfaattiliuoksen (3.4) ja natriumperklooraattiliuoksen (3.5) seos, 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Virtausnopeus:	0,7–1 ml/min
Detektioaallonpituus:	264 nm
Injektiotilavuus:	100 µl

Kromatografijärjestelmän stabiiliisuus tarkistetaan injektioimalla 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 injektiotilavuutta kuin kalibrintiliuksille ja määritetään amproliumpiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen amproliumkonsentraatio (µg/ml) lasketaan piikkien korkeuksien (pinta-ala) 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 = uuttoliuoksen (3.8) tilavuus (ml) 5.2 kohdan mukaisesti (ts. 200 ml),

c = näyteliuoksen (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 näyteutteen (5.2) ja 2,0 µg/ml sisältävän kalibrointiliuoksen (3.7.3) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteutteeeseen (5.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.7.3). Lisätyn amproliumin määrän on oltava samaa suuruusluokkaa kuin näyteutteeessa 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 näyteutteen olakvindoksiipiikin leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- Kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määrytyvissä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti ± 2 nm.
- 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 % standardianalytin absorbanssista.
- Välillä 210–320 nm näyteutteeesta 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 rinnakkaismäärityksen 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 (nol-larehu)	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.

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) asetonitriiliolosuudesta metanolilla.
- 9.2 British Pharmacopoeian mukaan kloorivetyhappoon (c = 0,1 mol/l) tehdyn amproliumliuoksen (c = 0,02 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-N¹,N⁴-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. Rehuseosnäytteiden 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-detektorilla käyttäen.

3. **Reagenssit**

3.1 Metanoli.

3.2 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.

- 3.3 Etikkahappo, $w = 100 \%$.
- 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, $\sigma = 10 \%$.
- Laimennetaan 10 ml etikkahappoa (3.3) 100 ml:aan asti vedellä.
- 3.7 Natriumasetaatti.
- 3.8 Vesi, HPLC-laatua vastaava.
- 3.9 Asetaattipuskuriliuos, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.
- Liuotetaan 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).
- 3.11 Standardiyhdiste.
- Puhdas karbadoksi: Metyyli-3-(2-kinoksalinyylimetyleni)-karbatsaatti-N1,N4-dioksidi, E 850.
- 3.11.1 Karbadoksistandardin kantaliuos, 100 $\mu\text{g/ml}$ (katso huomautus 5 kohdasta: Menettely)
- Punnitaan 25 mg karbadoksia (3.11) 0,1 mg:n tarkkuudella 250 ml:n mittapulloon. Liuotetaan metanoli-asetonitriiliin (3.5) käsittelemällä ultraäänihauhteessa (4.7). Ultraäänikäsittelyn jälkeen liuos jäähdytetään huoneen lämpötilaan, täytetään merkkiin asti metanoli-asetonitriilillä (3.5) ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$: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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$.
- 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 Ultraäänihaude.

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 (3.1.1) 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 näytteen ennestään sisältämä määrä karbadoksia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto

5.2.1 Rehut

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 määräosa suodoksesta 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 15,0 ml vettä, täytetään merkkiin asti metanoli-asetonitriilillä (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-määritys (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-asetonitriiliseosta (3.5), suljetaan tulpalla ja homogenoidaan. Pidetään näytettä ultraäänihäuteessa (4.7) 15 minuuttia, minkä jälkeen liuosta ravistellaan tai sekoitetaan 15 minuuttia (4.1). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatinpaperin läpi (4.2).

Laimennetaan määräosa suodosta vesi-metanoli-asetonitriiliseoksella (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-määritys (5.4).

5.3 Puhdistus

5.3.1 Alumiinioksidikolonnin valmistus

Punnitaan 4 g alumiinioksidia (3.4) ja siirretään se lasikoloniin (4.3).

5.3.2 Näytteen puhdistus

Lisätään 15 ml suodatettua uutetta (5.2.1) alumiinioksidikoloniin; ensimmäiset 2 ml eluaattia heitetään pois. Seuraavat 5 ml otetaan talteen ja suodatetaan osa 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.6).

Tehdään HPLC-määritys (5.4).

5.4 HPLC-määritys

5.4.1 Muuttujat

Seuraavat olosuhteet ovat ohjeellisia, ja myös muita muuttujia voidaan käyttää, jos niillä saadaan vastaavat tulokset:

Nestekromatografia-kolonne (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi (3.10):	Asetaattipuskuriliuoksen (3.9) ja asetonitriilin (3.2) seos, 825 + 175 (v + v)
Virtausnopeus:	1,5–2 ml/min
Detektioaallonpituus:	365 nm
Injektioalavuus:	20 µl.

Kromatografiajärjestelmän 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 karbadoksiipikkien 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 karbadoksiipikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen karbadoksipitoisuus µg/ml lasketaan karbadoksiipikkien korkeuksien (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.4.2) avulla.

6.1 *Rehut*

Näytteen karbadoksidipitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

c = näyteutteen (5.3.2) karbadoksidipitoisuus (µg/ml),

V_1 = uuttoliuoksen tilavuus (ml) (ts. 50),

m = näyte-erän paino (g).

6.2 *Esiseokset ja lisäainevalmisteet*

Näytteen karbadoksidipitoisuus w (mg/kg) lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

c = näyteutteen (5.2.2 tai 5.2.3) karbadoksidipitoisuus (µg/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 µl/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 karbadoksiin 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 *Diodirividetektorimäärittäminen*

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 ± 2 nm;
- b) välillä 225–400 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajatut 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 tutkittavan aineen absorbanssista;
- c) välillä 225–400 nm näyteliuoksesta ajatut 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, tutkittavan 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
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

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/EY**

Direktiivi 84/425/EY	Tämä asetus
1 artikla	—
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	—

10. **Direktiivi 86/174/EY**

Direktiivi 86/174/EY	Tämä asetus
1 artikla	4 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	Liite VII

11. **Direktiivi 93/70/EY**

Direktiivi 93/70/EY	Tämä asetus
1 artikla	3 artikla
2 artikla	—
3 artikla	—
Liite	Liitteessä IV oleva D osa

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

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