

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

► **B**

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

sellaisena kuin se on muutettuna seuraavilla:

		virallinen lehti		
		N:o	sivu	päivämäärä
► <u>M1</u>	Komission asetus (EU) N:o 278/2012, annettu 28 päivänä maaliskuuta 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Komission asetus (EU) N:o 51/2013, annettu 16 päivänä tammikuuta 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Komission asetus (EU) N:o 691/2013, annettu 19 päivänä heinäkuuta 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Komission asetus (EU) N:o 709/2014, annettu 20 päivänä kesäkuuta 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Komission asetus (EU) 2017/645, annettu 5 päivänä huhtikuuta 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Komission asetus (EU) 2017/771, annettu 3 päivänä toukokuuta 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Komission täytäntöönpanoasetus (EU) 2020/1560, annettu 26 päivänä lokakuuta 2020	L 357	17	27.10.2020
► <u>M8</u>	Komission täytäntöönpanoasetus (EU) 2022/893, annettu 7 päivänä kesäkuuta 2022	L 155	24	8.6.2022
► <u>M9</u>	Komission täytäntöönpanoasetus (EU) 2024/771, annettu 29 päivänä helmikuuta 2024	L 771	1	15.3.2024

▼B

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

▼M3*1 artikla***▼M9**

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

▼M3

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

▼B*2 artikla*

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

3 artikla

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

4 artikla

Siipikarjan rehuseosten energia-arvo on laskettava liitteen VII mukaisesti.

⁽¹⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1831/2003, annettu 22 päivänä syyskuuta 2003, eläinten ruokinnassa käytettävistä lisäaineista (EUVL L 268, 18.10.2003, s. 29).

⁽²⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2002/32/EY, annettu 7 päivänä toukokuuta 2002, haitallisista aineista eläinten rehuissa (EYVL L 140, 30.5.2002, s. 10).

⁽³⁾ EUVL L 70, 16.3.2005, s. 1.



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/EY, 98/64/EY, 1999/27/EY, 1999/76/EY, 2000/45/EY, 2002/70/EY ja 2003/126/EY.

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

7 artikla

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

Sitä sovelletaan 26 päivästä elokuuta 2009.

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

▼ M9

LIITE I

NÄYTTEENOTTOMENETELMÄT

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

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

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

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

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

Näytteenotto voi koskea myös rehua, jota rehualan toimijat tarjoavat myytäväksi etäviestintävälineiden välityksellä Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 767/2009 ⁽¹⁾ 11 artiklan 3 kohdan mukaisesti. Etäviestintävälineiden välityksellä myytäväksi tarjottavan rehun näytteenottoon sovelletaan periaatteessa tässä liitteessä vahvistettuja kohtia. Etämyyntinäytteiden näytteenottoa koskevat erityisnäkökohdat kuvataan 11 kohdassa.

2. MÄÄRITELMÄT

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

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

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

⁽¹⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (EY) N:o 767/2009, annettu 13 päivänä heinäkuuta 2009, rehun markkinoille saattamisesta ja käytöstä, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1831/2003 muuttamisesta sekä neuvoston direktiivin 79/373/ETY, komission direktiivin 80/511/ETY, neuvoston direktiivien 82/471/ETY, 83/228/ETY, 93/74/ETY, 93/113/ETY ja 96/25/EY ja komission päätöksen 2004/217/EY kumoamisesta (EUVL L 229, 1.9.2009, s. 1).

▼ **M9**

- Osanäyte: määrä, joka on otettu tutkittavan erän yhdestä kohdasta.
- Kokoomanäyte: tutkittavan erän eri kohdista otetuista osanäytteistä muodostettu yhteisnäyte.
- Supistettu näyte: kokoomanäytteen osa, joka on saatu kokoomanäytteestä edustavasti supistamalla.
- Lopullinen näyte: kokoomanäytteen osa (sekoitettu) tai supistetun näytteen osa tai homogenoidun kokoomanäytteen osa valvonnan tyyppin mukaan (katso 9.4 kohta).
- Laboratorionäyte: laboratoriolle tarkoitettu näyte (laboratorion vastaanottama näyte), joka voi olla lopullinen näyte, supistettu näyte tai kokoomanäyte.
- Etämyyntinäyte: näyte etäviestintävälineillä myytäväksi tarjottavasta rehuerästä.

3. YLEISET SÄÄNNÖKSET

- Näytteitä ottavat toimivaltaisen viranomaisen tähän tehtävään valtuuttamat henkilöt.
- Etämyyntinäytettä varten toimivaltainen viranomainen pyytää rehualan toimijalta tietyn määrän rehua etäviestintävälineiden välityksellä.
- Näyte on sinetöitävä siten, ettei näytteeseen pääse käsiksi rikkomatta tai poistamatta sinettiä.

Sinetin merkin olisi oltava selvästi tunnistettavissa ja selvästi näkyvillä.

- Näytteen tunnistaminen: näyte on merkittävä pysyvästi ja siten, että yhteys näytteenottopöytäkirjaan on selvä.
- Kustakin kokoomanäytteestä tai supistetusta näytteestä otetaan seuraavat lopulliset näytteet: yksi valvontaa (valvontatoimenpiteitä) varten ja yksi rehualan toimijaa varten (oikeuksien suojaamiseen tarkoitettu näyte). Näiden lisäksi yksi lopullinen näyte voidaan ottaa vertailunäytteeksi. Jos kokoomanäyte homogenoidaan kokonaisuudessaan, niin lopulliset näytteet otetaan homogenoidusta kokoomanäytteestä edellyttäen, että tällainen menettely on jäsenvaltiossa noudatettavien rehualan toimijoiden oikeuksia koskevien sääntöjen mukainen.
- Jos se on tarpeen virallisen näytteenoton suorittamiseksi, asetuksen (EU) 2017/625 15 artiklan 1 ja 2 kohdan mukaisesti rehualan toimijoiden on toimivaltaisen viranomaisen pyynnöstä
 - annettava toimivaltaisen viranomaisen henkilöstölle pääsy toimijoiden valvonnassa oleviin laitteisiin, mukaan lukien mahdollisuus asianmukaisten näytteenottovälineiden ja henkilösuojainten käyttöön;
 - avustettava toimivaltaisen viranomaisen henkilöstöä näytteenoton mahdollistamiseksi, mukaan lukien rehun asettaminen toimivaltaisen viranomaisen henkilöstön saataville.

▼ **M9**

4. VÄLINEISTÖ

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

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

4.2.1.1 Tasapohjainen näytteenottokauha, jossa on pystysuorat sivuseinämät.

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

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

4.2.2 *Mekaaninen näytteenotto*

Asianmukaista mekaanista laitetta voidaan käyttää otettaessa näytteitä liikkeessä olevasta rehuerästä. Mekaanista laitetta pidetään asianmukaisena, kun näytettä otetaan ainakin liikkeessä olevan rehun koko kerrostumasta.

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

4.2.3 *Näytteenjakolaite*

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

5. OSANÄYTTEIDEN LUKUMÄÄRÄÄ KOSKEVAT MÄÄRÄLLISET VAATIMUKSET

— Osanäytteiden lukumäärää koskevia 5.1 ja 5.2 kohdan määrällisiä vaatimuksia sovelletaan tutkittaviin eriin, joiden koko on enintään 500 tonnia ja joista voidaan ottaa näyte edustavasti. Kuvattu näytteenottomenettely pätee myös rehumääriin, jotka ovat suurempia kuin tutkittavalle erälle määrätty enimmäiskoko edellyttäen, että jäljempänä 5.1.1, 5.1.3 ja 5.1.5 kohdan taulukoissa esitetty osanäytteiden enimmäismäärä jätetään huomiotta ja osanäytteiden lukumäärä määritetään menettelyn asianomaisessa osassa (katso 5.3 kohta) annetulla neliöjuurikaavalla ja kokoomanäytteen vähimmäiskokoa korotetaan suhteessa tarkastettavaan rehumäärään. Tämä ei estä suuren rehuerän jakamista pienempiin osiin, joista kustakin otetaan näytteet 5.1 ja 5.2 kohdassa kuvatun menettelyn mukaisesti.

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

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

▼ **M9**

- Toimivaltaisella viranomaisella ei usein ole etämyyntinäytteiden osalta tietoa siitä, kuinka suuresta erästä määrää pyydetään. Sen vuoksi 5.1 ja 5.2 kohdassa tarkoitettuja menettelyjä ei voi käyttää. Tällöin noudatetaan 11 kohdassa esitettyä menettelyä.
- Jos lainsäädännössä edellytetään, että rehualan toimija noudattaa tätä asetusta pakollisen laadunvarmistusmenettelynsä puitteissa, rehualan toimija voi toiminnallisia ominaisuuksia huomioon ottaakseen poiketa tässä kohdassa säädettyistä määrällisistä vaatimuksista, jos rehualan toimija on toimivaltaista viranomaista tyydyttävällä tavalla osoittanut näytteenottomenettelyn vastaavuuden edustavuuden osalta ja jos toimivaltainen viranomainen on antanut siihen luvan.
- Jos edellä kuvattua näytteenottomenetelmää ei poikkeustapauksissa ole mahdollista määrällisten vaatimusten osalta soveltaa ilman erälle aiheutuva kaupallista vahinkoa (esimerkiksi pakkausmuotojen tai kuljetus- tai varastointitapojen vuoksi), joka ei ole hyväksyttävissä, voidaan soveltaa vaihtoehtoista näytteenottomenetelmää edellyttäen, että se on mahdollisimman edustava sekä tarkkaan kuvattu ja dokumentoitu.

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

5.1.1 Kiinteä irtorehu

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

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

5.1.2 Nestemäinen irtorehu

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

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

5.1.3 Pakattu rehu

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

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu yksiköiden lukumäärä, joista on otettava (vähintään) yksi osanäyte (*)
1–20 yksikköä	1 yksikkö (**)
21–150 yksikköä	3 yksikköä (**)

▼ **M9**

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu yksiköiden lukumäärä, joista on otettava (vähintään) yksi osanäyte (*)
151–400 yksikköä	5 yksikköä (**)
> 400 yksikköä	¼ sellaisten yksiköiden $\sqrt[3]{}$ lukumäärästä, joista tutkittava erä koostuu (**), kuitenkin enintään 40 yksikköä

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

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

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

5.1.4 *Rehukakut ja nuolukivet*

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

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

5.1.5 *Karkearehu/nurmirehu*

Tutkittavan erän koko	Pienin vaadittu osanäytteiden lukumäärä (*)
≤ 5 tonnia	5
> 5 tonnia	$\sqrt[3]{}$ (5 x tutkittavan erän tonnimäärä) (**), kuitenkin enintään 40 osanäytettä

(*) Jos vaadittuja osanäytteitä ei ole mahdollista ottaa tietyissä tilanteissa (esim. säilörehu) aiheuttamatta sellaista vahinkoa erälle, jota ei voida hyväksyä, niin näissä tapauksissa voidaan soveltaa vaihtoehtoisia näytteenottomenetelmiä. Tällaisten erien näytteenottoa varten laaditut ohjeet ovat saatavilla osoitteessa https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

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

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

Näitä osanäytteitä koskevia määrällisiä vaatimuksia käytetään seuraavissa tilanteissa:

- rehuaineiden sisältämien aflatoksiinien, torajyvän, muiden mykotoksiinien ja haitallisten kasviperäisten epäpuhtauksien valvonta
- ainesosan, mukaan lukien muuntogeeninen aines, tai sellaisen aineen, jonka odotetaan olevan epätasaisesti jakautuneena rehussa, ristikontaminaation valvonta.

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

▼ M9

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

5.3 Osanäytteitä koskevat määrälliset vaatimukset hyvin suurten erien osalta

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

6. KOKOONANÄYTETTÄ KOSKEVAT MÄÄRÄLLISET VAATIMUKSET

Tutkittavaa erää kohti riittää yksi kokoomanäyte.

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

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

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

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

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

▼ **M9****7. LOPULLISIA NÄYTTEITÄ KOSKEVAT MÄÄRÄLLISET VAA-TIMUKSET***Lopulliset näytteet*

Analyyssi tehdään vähintään yhdestä lopullisesta näytteestä. Analyyssia varten valmistetun lopullisen näytteen määrän on oltava vähintään:

Kiinteä rehu	500 g (*) (**) (***) (****)
Nestemäinen tai puolijuok-seva rehu	500 ml (*)

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

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

(***) Jos näytteet otetaan palkokasveista, viljanjyvistä ja pähkinöistä torjunta-ainejäämien määrittämiseksi, lopullisen näytteen on oltava vähintään 1 kg komission direktiivin 2002/63/EY, annettu 11 päivänä heinäkuuta 2002, yhteisön näytteenottomenettelyistä kasvi- ja eläinperäisten tuotteiden torjunta-ainejäämien virallisessa tarkastuksessa ja direktiivin 79/700/ETY kumoamisesta (EYVL L 187, 16.7.2002, s. 30), säännösten mukaisesti.

(****) Jos kyse on visuaalisesta tarkastuksesta tai mikroskooppitutkimuksesta, tutkittavaksi tarkoitettun lopullisen näytteen on oltava kooltaan 1 kg.

8. NÄYTTEENOTTOMENETELMÄ ERITTÄIN SUURIA ERIÄ TAI SELLAISIA ERIÄ VARTEN, JOTKA VARASTOIDAAN TAI KULJETETAAN SITEN, ETTÄ NÄYTTEENOTTO KOKO ERÄSTÄ EI OLE TOTEUTETTAVISSA**8.1 Yleiset periaatteet**

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

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

Jos sovelletaan tässä kohdassa säädettyjä näytteenottomenettelyjä, rehualan toimijalle tai sen edustajalle on ilmoitettava näytteenottomenettelyistä. Jos rehualan toimija tai sen edustaja kyseenalaistaa tämän näytteenottomenettelyn, rehualan toimijan tai sen edustajan on annettava toimivaltaiselle viranomaiselle mahdollisuus ottaa näytteet koko erästä toimijan kustannuksella.

8.2 Laivalla kuljetettavat suuret erät**8.2.1 Dynaaminen näytteenotto laivalla kuljetettavista suurista eristä**

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

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

▼ **M9**

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

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

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

8.2.2 *Staatinen näytteenotto laivalla kuljetettavista eristä*

Jos näytteenotossa käytetään staattista tapaa, on sovellettava samaa menettelyä kuin ylhäältä käsin päästäviin varastointitiloihin (siilot) on säädetty käytettäväksi (katso 8.4.1 kohta).

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

8.3 **Näytteenotto varastoihin sijoitetuista suurista eristä**

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

8.4 **Näytteenotto varastotiloista (siilot)**

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

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

▼ **M9**

8.4.2 *Näytteenotto siiloista, joihin ei ole pääsyä yläpuolelta (suljetut siilot)*

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

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

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

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

8.5 **Näytteenotto suurissa suljetuissa säiliöissä olevasta irtorehusta**

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

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

9.1 **Yleistä**

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

9.2 **Osanäytteet**

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

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

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

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

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

▼ **M9**

Jos kyse on etämyyntinäytteistä, osanäytteen koko riippuu yksikön koosta ja voi yksittäisissä tapauksissa olla pienempi kuin 100 g tai 100 ml.

9.2.1 *Irtorehu*

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

9.2.2 *Pakattu rehu*

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

9.2.3 *Homogeeniset ja homogenoituvat nestemäiset tai puolijuoksevat rehut*

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

Osanäytteet voidaan ottaa myös sisältöä tyhjennettäessä.

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

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

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

Kummassakin tapauksessa näytteen kokonaismäärän on oltava vähintään 10 litraa.

9.2.5 *Rehukakut ja nuolukivet*

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

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

9.3 **Kokoomanäytteen koostaminen**

Kokoomanäyte muodostetaan sekoittamalla osanäytteet keskenään.

9.4 **Lopullisen näytteen valmistaminen**

Kokoomanäytteen sisältämä näytemateriaali on sekoitettava huolellisesti ⁽¹⁾.

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

9.4.1 *Tasaisesti jakautuneet aineet*

Jos kyse on rehuun tasaisesti jakautuneiden ainesosien tai aineiden valvonnasta, kokoomanäyte voidaan edustavasti supistaa vähintään 2,0 kiloon tai 2,0 litraan (supistettu näyte) ⁽²⁾ ensisijaisesti käyttämällä joko koneellista tai automaattista näytteenjakolaitetta. Jos valvotaan

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

⁽²⁾ Paitsi jos kyse on karkearehusta/nurmirehusta, jonka ominaisuus on pieni.

▼ **M9**

torjunta-ainejäämien esiintymistä palkokasveissa, viljanjyvissä ja pähkinöissä, supistetun näytteen vähimmäiskoko on 3 kiloa. Jos rehutyyppi on sellaista, että näytteenjakolaitetta ei voida käyttää tai laitetta ei ole käytettävissä, näyte voidaan supistaa neljännesmenetelmällä.

Kokoomanäytteestä tai supistetuista näytteistä otetaan sen jälkeen lopulliset näytteet (valvontaa, oikeussuojaa ja mahdollisesti vertaamista varten), jotka ovat likimäärin saman kokoisia ja täyttävät 7 kohdassa vahvistetut määrälliset vaatimukset.

9.4.2 *Epätasaisesti jakautuneet aineet*

Jos kyse on sellaisten ainesosien, muuntogeeninen aines mukaan luki-en, tai aineiden valvonnasta, jotka ovat todennäköisesti epätasaisesti jakautuneina rehussa, kokoomanäytteen on oltava:

- i) täydellisesti homogenoitu. Homogenoidusta kokoomanäytteestä otetaan sen jälkeen lopulliset näytteet (valvontaa, oikeussuojaa ja mahdollisesti vertaamista varten), jotka ovat likimäärin saman kokoisia ja täyttävät 7 kohdassa vahvistetut määrälliset vaatimukset. tai
- ii) supistettu vähintään 2 kiloksi tai 2 litraksi ⁽¹⁾ käyttämällä mekaanista tai automaattista näytteenjakolaitetta. Vain siinä tapauksessa, että rehutyyppi on sellainen, ettei näytteenjakolaitetta voida käyttää, näyte voidaan tarvittaessa supistaa neljännesmenetelmällä. Asetuksen (EU) N:o 619/2011 puiteissa suoritettavan muuntogeenisen aineksen esiintymisen valvontaa varten supistetussa näytteessä on oltava vähintään 35 000 siementä/jyvää, jotta olisi mahdollista ottaa vähintään 10 000 siemenen/jyvän lopulliset näytteet valvontatoimenpiteitä, oikeussuojaa ja mahdollisesti vertaamista varten (katso 6 kohdan alaviite (**)) ja 7 kohdan alaviite (*)).

Supistetusta näytteestä otetaan sen jälkeen lopulliset näytteet, jotka ovat likimäärin saman kokoisia ja täyttävät 7 kohdassa vahvistetut määrälliset vaatimukset.

9.5 **Näytteiden pakkaaminen**

Säiliöt tai pakkaukset sinetöidään ja varustetaan etiketillä siten, ettei niitä voi avata vahingoittamatta sinettiä. Koko etiketin on oltava suljettu sinetillä. Vaihtoehtoisesti näyte voidaan panna astiaan, joka voidaan sulkea siten, ettei sitä voi avata ilman, että astia tai säiliö rikkoutuu pysyvästi; näin estetään astian tai säiliön käyttö uudelleen.

9.6 **Näytteiden toimittaminen laboratorioon**

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

10. **NÄYTTEENOTTOPÖYTÄKIRJA**

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

Näytteenottopöytäkirjassa on mainittava myös mahdolliset poikkeamat tässä asetuksessa säädetystä näytteenottomenettelystä.

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

⁽¹⁾ Paitsi jos kyse on karkearehusta/nurmirehusta, jonka ominaisiheets on pieni.

▼ M9

11. ETÄMYYNINÄYTE

- Etämyyntinäytettä varten rehu pyydetään rehualan toimijalta etäviestintävälineiden välityksellä. Toimivaltaisen viranomaisen ei tässä tapauksessa ole rehua pyydettyä ilmoitettava rehualan toimijalle virallista henkilöllisyyttään, ja se voi myös käyttää valehenkilöllisyyttä.
- Tehtävään valtuutetun henkilön on otettava etämyyntinäytteestä kokoomanäyte ja lopulliset näytteet välittömästi sen jälkeen, kun lähetys on vastaanotettu. Kokoomanäytteen valmistamiseksi on otettava riittävä määrä osanäytteitä sattumanvaraisesti ja tasaisesti koko vastaanotetusta ja huolellisesti sekoitetusta/homogenoidusta määrästä, mahdollisuuksien mukaan 5 kohdassa sekä 9.2 ja 9.3 kohdassa vahvistettujen periaatteiden mukaisesti. Jos rehu on pakattu yksittäisiksi yksiköiksi, olisi hankittava vähintään neljä yksikköä, joista on otettava vähintään yksi osanäyte. Mikäli tapauskohtaisesti ilmenee, että hankitut yksiköt ovat peräisin eri eristä, tutkittavien yksiköiden lukumäärää on vähennettävä ja rajoitettava samasta erästä peräisin oleviin yksiköihin. Jos kyseessä on rehuun epätasaisesti jakautuneiden ainesosien tai aineiden määrittäminen etämyyntinäytteestä, osanäytteiden lukumäärän on oltava vähintään 2,5 kertaa suurempi kuin rehuun tasaisesti jakautuneiden aineiden määrittämiseen tarvittavien näytteiden lukumäärä.

Kokoomanäytteestä otetaan sitä vastaavat lopulliset näytteet (valvontaa, oikeussuojaa ja mahdollisesti vertaamista varten) 9.4 kohdassa vahvistettujen periaatteiden mukaisesti siinä määrin kuin on mahdollista, ja näytteenottopöytäkirjasta ilmenee, että näyte on etämyyntinäyte. Toimivaltainen viranomainen ilmoittaa tämän jälkeen välittömästi rehualan toimijalle näytteen ottamisesta. Rehualan toimijalle ilmoitetaan myös, että toimivaltainen viranomainen säilyttää, aina kun mahdollista, yhden näytteen (oikeussuojaa varten) toimijan saatavilla määritellyssä paikassa, tai että näyte on lähetetty rehualan toimijalle tai tämän nimeämään laboratorioon voimassa olevien kansallisten sääntöjen mukaisesti.

Jos näyte lähetetään suoraan viralliseen laboratorioon, lopullisen näytteen valmistuksen ja sinetöinnin tekevät tähän tehtävään valtuutetut henkilöt tai se tehdään tähän tehtävään valtuutettujen henkilöiden läsnäollessa. Lopullisten näytteiden muodostamisen jälkeen etämyyntinäytteiden näytteenottopöytäkirja on välittömästi lähetettävä toimivaltaiselle viranomaiselle, joka ilmoittaa rehualan toimijalle näytteen ottamisesta.

Määrän, jonka toimivaltainen viranomainen on hankkinut rehualan toimijalta, katsotaan edustavan samaan luokkaan kuuluvan tai samaa kuvausta vastaavan rehuerän osaa. Jos kyseinen erän osa ei täytä EU:n vaatimuksia, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 178/2002 ⁽¹⁾ 15 artiklan mukaisesti on oletettava – myös etämyyntinäytteen osalta –, että sama koskee koko rehuerää, ellei yksityiskohtaisesta arvioinnista (tarvittaessa paikan päällä tehtävässä tarkastuksessa) ilmene, että ei ole mitään näyttöä siitä, että loppuosa erästä ei täyttäisi EU:n vaatimuksia.

⁽¹⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 178/2002, annettu 28 päivänä tammikuuta 2002, elintarvikelainsäädäntöä koskevista yleisistä periaatteista ja vaatimuksista, Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen perustamisesta sekä elintarvikkeiden turvallisuuteen liittyvistä menettelyistä (EYVL L 31, 1.2.2002, s. 1).

▼ **M9***LIITE II***REHUIEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ KOSKEVAT YLEISET SÄÄNNÖKSET****A. NÄYTTEIDEN VALMISTAMINEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN****1. Tarkoitus**

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

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

Tässä liitteessä kuvattujen menettelyjen lisäksi on noudatettava EN ISO 6498 -standardin mukaisia näytteiden valmistelua koskevia suuntaviivoja.

2. Varotoimenpiteet

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

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

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

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

On osoittautunut, että tietyissä tapauksissa näytteen homogeenointi siten, että siitä valmistetaan liete veden kanssa käyttämällä korkean leikkausvoiman sekoitusta, tuottaa homogeenisempiä osanäytteitä kuin kuivana homogeenointi tai jauhaminen, etenkin kun kyseessä ovat heterogeenisesti jakautuneet kemialliset aineet. Myös homogeenointi riittävällä kuivajauhamisella voi kuitenkin tuottaa homogeenisiä alinäytteitä.

Joissain tapauksissa, kuten torajyvän ja haitallisten kasviperäisten epäpuhtauksien määrittämisessä, näytteen homogeenointia ei voi tehdä jauhamalla, vaan se on tehtävä sekoittamalla näytettä riittävästi.

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

3. Menettely**3.1 Yleinen menettely**

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

▼ **M9****3.1.1 Sellaisenaan jauhattavat rehut**

- Lopullinen näyte sekoitetaan ja kerätään tarkoituksenmukaiseen puhtaaseen, kuivaan ja ilmatiiviisti suljettavaan säiliöön. Näyte sekoitetaan uudelleen täydellisen homogenoinnin varmistamiseksi välittömästi ennen määritysmenetelmää varten tehtävää näytteen punnitsemista.

3.1.2 Kuivauksen jälkeen jauhattavat rehut

- Jollei määritysmenetelmissä toisin mainita, lopullinen näyte kuivataan kosteuspitoisuuteen 8–12 prosenttia käyttäen esikuivatusmenettelyä, joka esitetään liitteessä III olevan A osan 4.3 kohdassa kuvatun kosteudenmääritysmenetelyn yhteydessä. Tämän jälkeen käsittelyä jatketaan edellä 3.1.1 kohdassa esitetyllä tavalla.

3.1.3 Nestemäinen tai puolijuokseva rehu

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

3.1.4 Muut rehut

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

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

- Jos kyse on visuaalisesta tarkastuksesta (ilman mikroskooppia), niin tutkitaan kokoomanäyte tai lopullinen näyte kokonaisuudessaan.
- Jos kyse on mikroskooppitutkimuksesta, laboratorio saa supistaa kokoomanäytettä tai siitä supistettua näytettä edelleen. Lopulliset näytteet toimijan oikeussuojan takaamiseksi ja mahdollisesti vertailumittauksia varten otetaan samalla näytteenjakomenettelyllä kuin otetaan vastaavasti lopullinen näyte valvontatoimenpiteitä varten.
- Jos koko kokoomanäyte homogenoidaan, lopulliset näytteet otetaan homogenoidusta kokoomanäytteestä.
- Torajyvän ja haitallisten kasvipörräisten epäpuhtauksien määrittämistä varten lopullinen näyte on jaettava kahdeksi samanpainoiseksi alinäytteeksi, joiden koko on noin 500 grammaa. Yksi alinäyte tutkitaan. Jos alinäytteestä saatu tulos on enintään 50 prosenttia enimmäispitoisuudesta (analyttinen kynnysarvo), näyte on enimmäispitoisuusvaatimuksen mukainen. Jos tulos on yli 50 prosenttia enimmäispitoisuudesta, myös toinen alinäyte on tutkittava, ja näiden kahden alinäytteen tulosten keskiarvoa on käytettävä sen tarkastamiseen, onko näyte enimmäispitoisuusvaatimuksen mukainen.

4. Näytteiden säilytys

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

▼ **M9****B. MÄÄRITYSMENETELMISSÄ KÄYTETTÄVIÄ REAGENSSEJA JA VÄLINEITÄ KOSKEVAT SÄÄNNÖKSET**

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

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

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

2. Puhdistusmenettely

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

3. Määritysten lukumäärä

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

Jos rehun lisäaineiden vähimmäis- tai enimmäispitoisuuksien valvonnassa ensimmäisen määrittäksen tulokset ylittävät vähimmäispitoisuuden tai alittavat enimmäispitoisuuden, lisämäärittäykset eivät ole tarpeen edellyttäen, että asianmukaisia laatumenettelyjä on sovellettu. Muissa tapauksissa rinnakkaismäärittäminen (toinen määrittäminen) on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikontaminaatio tai näytteiden sekoittuminen vahingossa. Tarkempaan arviointiin käytetään näiden kahden määrittäksen keskiarvoa.

Jos kyse on aineen tai ainesosan ilmoitetun pitoisuuden valvonnasta ja jos ensimmäisen määrittäksen tulos vahvistaa ilmoitetun pitoisuuden eli määrittäksen tulos on ilmoitetun pitoisuuden hyväksyttävällä vaihteluvälillä, lisämäärittäykset eivät ole tarpeen edellyttäen, että asianmukaisia laatumenettelyjä on sovellettu. Muissa tapauksissa rinnakkaismäärittäminen (toinen määrittäminen) on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen

▼ **M9**

ristikontaminaatio tai näytteiden sekoittuminen vahingossa. Tarkempaan arviointiin käytetään näiden kahden määrittelyn keskiarvoa (keskimääräinen määrittelytulos on tai ei ole ilmoitetun pitoisuuden hyväksyttävällä vaihteluvälillä).

Joissain tapauksissa hyväksyttävä vaihteluväli määritellään lainsäädännössä, esimerkiksi Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 767/2009 ja (EU) 2019/4 ⁽¹⁾.

4. Käytetyn määrittämenetelmän ilmoittaminen

Tutkimustodistuksessa on mainittava käytetty määrittämenetelmä.

5. Määrittelytuloksen ilmoittaminen

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

Useimmat EU:n rehulainsäädännössä säännellyt tasot (esim. enimmäispitoisuus ja vähimmäispitoisuus) on vahvistettu rehulle, jonka kosteuspitoisuus on 12 prosenttia. Jotta näytteestä mitattua määrittelytulosta voidaan arvioida suhteessa säänneltyyn tasoon, määrittelytulos on sen vuoksi ensin jaettava näytteen kuiva-ainepitoisuudella (prosentteina) ja kerrottava luvulla 88, kuten seuraavassa yhtälössä esitetään:

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

Tässä yhtälössä:

Mc: näytteen kosteuspitoisuus (prosentteina). 100 – *Mc* vastaa näin ollen näytteen kuiva-ainepitoisuutta (prosentteina).

R_{ana}: näytteestä mitattu määrittelytulos

R_{12 %}: tulos rehussa, jonka kosteuspitoisuus on 12 prosenttia; arvioidaan suhteessa säänneltyyn tasoon.

Lisäksi, jos seuraavat edellytykset täyttyvät:

- määrittelyn tulos on merkittävästi (> 50 %) tuotemerkintöjä / valvottavia arvoja alempi tai korkeampi (sen mukaan, onko tuotemerkintä/arvo enimmäispitoisuus vai vähimmäispitoisuus);
- näytteenoton kohteena olevan rehun kosteuspitoisuus on tiedossa ja voidaan varmistaa, että kosteuspitoisuuden korjaus ei muuta arviointia,

siinä tapauksessa – edellyttäen, että asianmukaisia laatumenettelyjä on sovellettu ja määrittelyn ainoana tarkoituksena on todeta säännösten noudattaminen – kosteuspitoisuuden korjaus voidaan jättää tekemättä (esimerkiksi tapauksissa, joissa arvoa tai säädeltyä tasoa ei ole), ellei se ole tarpeen tulkintaa varten.

Jos määrittelytulos korjataan kosteuspitoisuuden mukaan, myös vastaava mittauksen epävarmuus on korjattava saman menettelyn mukaisesti.

⁽¹⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EU) 2019/4, annettu 11 päivänä joulukuuta 2018, lääkerahun valmistuksesta, markkinoille saattamisesta ja käytöstä sekä Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 183/2005 muuttamisesta ja neuvoston direktiivin 90/167/ETY kumoamisesta (EUVL L 4, 7.1.2019, s. 1).

▼ **M9**

Jos kyseessä on torajyvän tai haitallisten kasvipörräisten epäpuhtauksien määrittäminen visuaalisen tarkastuksen tai mikroskooppitutkimuksen avulla, kosteuspitoisuuden korjaus ei ole tarpeen.

6. Mittauksen analyttinen epävarmuus ja saanto haitallisten aineiden määrittämisessä

Direktiivissä 2002/32/EY tarkoitettujen haitallisten aineiden ollessa kyseessä eläinten rehuksi tarkoitettua tuotetta ei pidetä vahvistetun enimmäispitoisuuden mukaisena, kun kyse on kosteuspitoisuudeltaan 12 prosentin rehusta, jos kahden toisistaan riippumattoman määrittäytuloksen keskiarvon katsotaan ylittävän enimmäispitoisuuden, kun otetaan huomioon mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus, joka saadaan käyttämällä kattavuuskerrointa 2 ja jolla saadaan noin 95 prosentin luottamustaso, sekä korjaus saannon suhteen. Tämä tarkoittaa, että vaatimustenmukaisuuden arvioinnissa käytetään määritettyä pitoisuutta, joka on korjattu saannon suhteen ja josta on vähennetty mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus. Tätä menettelyä voidaan soveltaa ainoastaan tapauksiin, joissa määrittämenetelmä on sellainen, että mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus sekä korjaus saannon suhteen voidaan arvioida (ei esimerkiksi vaadita, jos kyse on visuaalisesta tarkastuksesta / mikroskooppitutkimuksesta).

Jos oikeussuojaa varten otetusta näytteestä saatu määrittäytulos ylittää enimmäispitoisuuden (ottamatta huomioon mittaukseen liittyvää laajennettua analyttistä epävarmuutta), se vahvistaa virallista valvontaa varten otetun näytteen vaatimustenmukaisuuden, ellei asiasta ole annettu erityisiä kansallisia sääntöjä.

Määrittäytulos on esitettävä seuraavalla tavalla (sikäli kuin käytetty määrittämenetelmä sallii mittaukseen liittyvän analyttisen epävarmuuden arvioinnin):

- a) tarvittaessa saannon suhteen korjattuna, ja jos korjataan, siitä on ilmoitettava. Saantoaste on ilmoitettava, ellei systemaattisen virheen olennainen korjaaminen ole osa menettelyä, jolloin systemaattinen virhe on mitatun arvon ja vertailupitoisuuden välinen ero. Korjaus saannon suhteen ei ole tarpeen, jos saantoaste on 90–110 prosenttia.
- b) muodossa $x \pm U$, jossa x on määrittäytulos ja U on mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus, käyttäen kattavuuskerrointa 2 ⁽¹⁾, jolloin luottamustaso on noin 95 prosenttia.

Jos määrittäytulos on kuitenkin merkittävästi ($> 50\%$) valvottavaa arvoa alempi ja edellyttäen, että asianmukaisia laatumenettelyjä on sovellettu ja määrittäytuloksen ainoana tarkoituksena on todeta säännösten noudattaminen, saantoasteen ja mittaukseen liittyvän laajennetun analyttisen epävarmuuden ilmoittaminen voidaan jättää pois (esimerkiksi tapauksissa, joissa arvoa tai säädeltyä tasoa ei ole), ellei se ole tarpeen tulkintaa varten.

7. Mittauksen analyttinen epävarmuus ja saanto rehun lisäaineiden määrittämisessä

Rehun lisäaineiden hyväksytyjen vähimmäis- ja enimmäispitoisuuksien noudattamisen toteamista varten lisäaineen määrää ei pidetä vahvistettujen vähimmäis- ja enimmäispitoisuuksien mukaisena, jos katsotaan, että kahden toisistaan riippumattoman määrittäytuloksen keskiarvo, suhteutettuna kosteuspitoisuudeltaan 12 prosentin rehuun, on:

- suurempi kuin enimmäispitoisuus, kun otetaan huomioon mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus sekä korjaus saannon suhteen. Tämä tarkoittaa, että vaatimustenmukaisuuden arvioinnissa

⁽¹⁾ Luottamusväli 95 prosenttia voidaan saavuttaa käyttämällä muuta kerrointa, kuten Studentin kerrointa.

▼ **M9**

käytetään määritettyä pitoisuutta (eli kahden määrittelyn keskiarvoa), joka on korjattu saannon suhteen ja josta on vähennetty mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus.

- pienempi kuin vähimmäispitoisuus, kun otetaan huomioon mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus sekä korjaus saannon suhteen. Tämä tarkoittaa, että vaatimustenmukaisuuden arvioinnissa käytetään määritettyä pitoisuutta (eli kahden määrittelyn keskiarvoa), joka on korjattu saannon suhteen ja johon on lisätty mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus.

Jos oikeussuojaa varten otetusta näytteestä saatu määrittelytulos ylittää enimmäispitoisuuden (ottamatta huomioon mittaukseen liittyvää laajennettua analyttistä epävarmuutta), se vahvistaa virallista valvontaa varten otetun näytteen vaatimustenvastaisuuden, ellei asiasta ole annettu erityisiä kansallisia sääntöjä.

Määrittelytulos on esitettävä seuraavalla tavalla (sikäli kuin käytetty määrittelymenetelmä sallii mittaukseen liittyvän analyttisen epävarmuuden arvioinnin):

- a) tarvittaessa saannon suhteen korjattuna, ja jos korjataan, siitä on ilmoitettava. Saantoaste on ilmoitettava, ellei systemaattisen virheen olennainen korjaaminen ole osa menettelyä, jolloin systemaattinen virhe on mitatun arvon ja vertailupitoisuuden välinen ero. Korjaus saannon suhteen ei ole tarpeen, jos saantoaste on 90–110 prosenttia.
- b) muodossa $x \pm U$, jossa x on määrittelytulos (kahden määrittelyn keskiarvo) ja U on mittaukseen liittyvä laajennettu analyttinen epävarmuus, käyttäen kattavuuskerrointa 2 ⁽¹⁾, jolloin luottamustaso on noin 95 prosenttia.

⁽¹⁾ Luottamustaso 95 prosenttia voidaan saavuttaa käyttämällä muuta kerrointa, kuten Studentin kerrointa.

▼ **M9***LIITE III***REHUAINEDEN 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 pääasiassa maitotuotteista koostuvien rehuaineiden ja rehuseosten analyysiä, eläin- ja kasvirasvojen ja -öljyjen analyysiä eikä öljysiementen ja öljypitoisten hedelmien analyysiä.

Öljysiementen kosteuspitoisuuden määrittäminen tehdään kosteuspitoisuuden ja haihtuvien aineiden pitoisuuden määrittästä koskevan EN ISO 665 -standardin (Determination of moisture and volatile matter content) mukaisen menetelmän mukaisesti sillä oletuksella, että soijapavut on jauhettava ennen kosteuspitoisuuden määrittäystä.

2. Periaate

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

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 vasaramyllyt, vesijäähdytteiset 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; työtaso, jolle testattava näyte voidaan levittää niin, että sitä on noin 0,3 g/cm².
- 3.4 Sähkölämmitteinen, tasalämpöinen ja nopeasti säädettävissä oleva lämpökaappi (± 2 °C), jossa on tuuletusjärjestelmä ⁽¹⁾.
- 3.5 Säädettävä sähkölämmitteinen vakuumlämpökaappi, jossa on öljypumppu ja johon voidaan johtaa kuumaa, kuivaa ilmaa tai jossa voidaan käyttää kuivausainetta (kuten kalsiumoksidia).
- 3.6 Eksikkaattori, jossa on paksu rei'itetty metalli- tai posliinilevy ja joka sisältää tehokasta kuivausainetta.

⁽¹⁾ Viljan, jauhojen, suurimoiden ja rouheiden kuivaamiseen lämpökaapin lämpökapasiteetin on oltava sellainen, että 131 °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 suoritettua kuivausta tuloksista alle 0,15 %.

▼ **M9****4. Menettely**

Huom. Tässä jaksossa kuvatut toimenpiteet on suoritettava välittömästi näytelähetysten avaamisen jälkeen. Määritykset on suoritettava ainakin kahtena rinnakkaismäärityksenä.

4.1 Valmistaminen**4.1.1 Muut kuin 4.1.2 ja 4.1.3 kohdassa tarkoitetut rehut**

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

4.1.2 Vilja ja suurimot

Punnitaan vähintään 50 g näytettä. Se jauhetaan niin hienoksi, että vähintään 50 prosenttia näytteestä läpäisee seulan, jonka reikien koko on 0,5 mm, ja enintään 10 prosenttia näytteestä ei läpäise 1 mm:n pyöreäreikäistä seulaa.

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

Näyteastia (3.3) kuivataan kansineen 103 °C:seen asetetussa lämpökaapissa 30 minuuttia +/- 1 minuutti. Astia poistetaan lämpökaapista ja annetaan jäähtyä ympäristön lämpötilaan eksikkaattorissa (3.6).

4.2.1 Muut kuin 4.2.2 ja 4.2.3 kohdassa tarkoitetut rehut

Näyteastia 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. Lämpökaappi avataan, astia suljetaan välittömästi kannella, otetaan pois lämpökaapista, annetaan jäähtyä 30–45 minuuttia eksikkaattorissa (3.6) ja punnitaan 1 mg:n tarkkuudella.

Pääasiassa (> 50 %) eläimistä ja kasveista peräisin olevista öljyistä ja rasvoista koostuvia rehuja kuivataan lämpökaapissa 103 °C:ssa vielä 30 minuutin ajan. Kahden punnituksen välinen ero saa olla enintään 0,1 prosenttia kosteudesta.

4.2.2 Vilja, jauhot, suurimot ja rouheet

Näyteastia 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. Lämpökaappi avataan, astia suljetaan välittömästi kannella, otetaan pois lämpökaapista, annetaan jäähtyä 30–45 minuuttia eksikkaattorissa (3.6) ja punnitaan 1 mg:n tarkkuudella.

▼ **M9**

- 4.2.3 Rehuseokset, jotka sisältävät yli 4 prosenttia sakkaroosia tai laktoosia: rehuaineet, kuten johanneksenleipäpuun palot, hydrolysoidut viljatuotteet, maltaat, kuivatut juurikasleikkeet, kala ja liukoisia sokereita sisältävät rehut

Näyteastia 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 vakuu­m­ilämpökaappiin (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, astia suljetaan välittömästi kannella, otetaan pois lämpökäapista, annetaan jäähtyä 30–45 minuuttia eksikkaattorissa (3.6) ja punnitaan 1 mg:n tarkkuudella. Näytteen annetaan kuivua vielä 30 minuuttia vakuu­m­ilämpökaapissa 80–85 °C:ssa ja se punnitaan uudelleen. Kahden punnituksen välinen ero saa olla enintään 0,1 prosenttia kosteudesta.

- 4.3 *Esikuivaus (osittainen kuivaus)*

Alle 85 prosenttia kuiva-ainetta sisältävät ”märät” rehut (esim. nurmi-rehu, seosrehut, (ei)-nestemäiset rehut) on tarpeen kuivata osittain, ennen kun ne jauhetaan pysyvien aineiden määrittystä varten; hajoavien aineiden osalta osittainen kuivaus ei ole mahdollista.

Osittainen kuivaus voidaan suorittaa käyttämällä kiertoilma- tai mikroaaltouunia tai pakastekuivaamalla. Tarkoitus on – pakastekuivaamalla tehtävää osittaista kuivausta lukuun ottamatta – kuivattaa rehua siten, että näytteen lämpötila pysyy alle 60 °C:ssa, jotta vaikutus kemialliseen koostumukseen on mahdollisimman vähäinen. Kuivaus yli 60 °C:n lämpötiloissa aiheuttaa kemiallisia muutoksia rehussa (esimerkiksi proteiinien hajoamista). Kuivattu rehu tasapainotetaan huoneenlämpötilassa noin 15 minuutin ajan ennen osittaisen kuiva-ainepitoisuuden mittaamista, jotta jauhamisen ja säilyttämisen aikana tapahtuvan kosteus­pitoisuuden muutoksen mahdollisuus on mahdollisimman vähäinen. Kuivaus alle 60 °C:n lämpötiloissa ei poista rehusta kaikkea vettä; sen vuoksi (alustava) osittainen kuivaus ei anna kuvaa rehun kuiva-aineen kokonaispitoisuudesta. Kuivauksen jälkeen alinäyte jauhetaan ja analysoitavan aineen (lopullinen) kuiva-ainepitoisuus osittain kuivatusta näytteestä (jäljellä oleva kosteus­pitoisuus 3–15 %) analysoidaan ja siitä määritetään muut kemialliset ainesosat.

Sen vuoksi kuiva-aineen määrittämiseen suositellaan kaksivaiheista menettelyä. Ensinnä määritetään osittainen kuiva-ainepitoisuus (jos kuiva-ainepitoisuus on alle 85 %), sen jälkeen määritetään jäljellä olevan kuiva-aineen pitoisuus jauhetusta näytteestä. Kuiva-aineen kokonaispitoisuuden määrittämiseksi osittainen kuiva-ainepitoisuus kerrotaan jäljellä olevan kuiva-aineen pitoisuudella.

5. Tulosten laskeminen

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

▼ **M9**5.1 *Kosteuspitoisuus ilman esikuivausta*

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

jossa:

m = näytteen alkuperäinen paino grammoina,

m_0 = näytteen paino grammoina kuivauksen jälkeen.

5.2 *Kosteuspitoisuus esikuivausta käyttäen ⁽¹⁾*

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

jossa:

m = näytteen alkuperäinen paino grammoina,

m_1 = näytteen paino grammoina esikuivauksen jälkeen,

m_2 = näytteen paino grammoina hienontamisen tai jauhamisen jälkeen,

m_0 = näytteen paino grammoina kuivauksen jälkeen.

5.3 *Toistettavuus*

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa olla suurempi kuin 0,2 prosenttia kosteuden absoluuttisesta arvosta, paitsi lemmikkieläinten märkäruoan ja koiran puruluiden osalta, jolloin ero ei saa olla suurempi kuin 0,5 prosenttia 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 enintään 1 mg). Painohäviö määritetään punnitsemalla.

3. **Välineistö**

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

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

3.3 Hiekkahaude tai sähkölevy.

⁽¹⁾ Laskennan lisätietojen osalta viitataan EN ISO 6498 -standardiin (Rehut. Näytteen valmistusta koskevat ohjeet).

▼ M9

3.4 Eksikkaattori, jossa on tehokasta kuivausainetta.

3.5 Analyysivaaka.

4. Menettely

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella noin 20 g homogenoitua 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. Sekoittamista jatketaan astian pohjaa raaputtaen, kunnes kuplien muodostus lakkaa.

Kosteuden täydellisen poistumisen varmistamiseksi kuumennetaan useita kertoja 103 ± 2 °C:seen jäähdyttäen peräkkäisten kuumennusten välillä 93 °C:seen. Sen jälkeen astian sisältöineen annetaan jäähtyä huoneen lämpötilaan eksikkaattorissa (3.4) ja punnitaan. Tämä menetelmä 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:

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

jossa:

m = näytteen paino grammoina;

m_1 = astian paino sisältöineen grammoina ennen kuumennusta;

m_2 = astian paino sisältöineen grammoina kuumennuksen jälkeen.

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

Toistettavuus

Samasta näytteestä suoritettujen kahden samanaikaisen rinnakkaismäärityksen ero absoluuttisena arvona ilmoitettuna saa olla enintään 0,1 prosenttia.

C. TYYPITOISUUDEN MÄÄRITYS JA RAAKAVALKUAISPITOISUUDEN LASKENTA

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan laskea Kjeldahlin menetelmän mukaan saadusta tyypipitoisuudesta rehujen raakavalkuaispitoisuus ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Tyypipitoisuus voidaan määrittää kaikissa rehuissa, mutta raakavalkuaispitoisuuden laskentaan käytettävä muuntokerroin 6,25 ei välttämättä sovellu hyönteisistä saatuihin (matala muuntokerroin) eikä tiettyihin lemmikkieläinruokiin ja plasmaproteiineihin (korkea muuntokerroin).

▼ **M9****2. Periaate**

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

Vapautunut ammoniakki voidaan vaihtoehtoisesti tislata ylimäärään boorihappoliuosta, jonka jälkeen se titrataan kloorivetyhappo- tai rikkihappoliuoksella.

3. Reagenssit

3.1 Kaliumsulfaatti.

3.2 Katalyytti: 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 Metyylipunaindikaattori: 300 mg metyyliipunaista liuotetaan 100 ml:aan etanolia, $\sigma = 95\text{--}96 \text{ \% (v/v)}$

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, kloorivetyhapossa pestyjä ja hehkutettuja.

3.13 Asetanilidi (sulamispiste = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, typpipitoisuus = $10,36 \text{ \%}$).

3.14 Typetön sakkaroosi.

3.15 Boorihappo (H_3BO_3).

3.16 Metyylipunaindikaattoriliuos: liuotetaan 100 mg metyyliipunaa 100 ml:aan etanolia tai metanolia.

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

3.18 Boorihappoliuos ($10\text{--}40 \text{ g/l}$, 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).

Sen mukaan, millaista vettä on käytetty, boorihappoliuoksen pH saattaa vaihdella erien välillä. Boorihappoliuoksen pH:n on oltava $4,3\text{--}4,7$. Usein on lisättävä vähän emästä, jotta nollanäyte saadaan positiiviseksi.

▼ **M9**

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

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

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

4. Välineistö

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

5. Menettely

5.1 Hajotus

Punnitaan 1 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella Kjeldahl-kolviin hajotuspolttoa varten. Lisätään 15 g kaliumsulfaattia (3.1), sopiva määrä katalyyttiä (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 metyylipuna-indikaattoria (3.8).

Kolvi yhdistetään tislauslaitteen jäähdytimeen ja jäähdyttimen pää upotetaan keräilyastiassa olevaan liuokseen vähintään 1 cm:n syvyyteen (ks. huomautus 8.3). 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 titraataan ammoniakki manuaalisesti, noudatetaan alla olevaa menetelyä. Jos tislauslaitte on täysin automaattinen ja suorittaa ammoniakin titraamisen tisleestä, noudatetaan valmistajan käyttöohjeita.

▼ **M9**

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 natriumhydroksidiylimäärän lisäys ja vesihöyrytislauk tapahtuvat automaattisesti.

5.3 *Titraus*

Jatketaan 5.3.1 tai 5.3.2 kohdan mukaisesti.

5.3.1 *Rikkihappo*

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

5.3.2 *Boorihappo*

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

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

Tämä voidaan tehdä automaattisesti vesihöyrytislaimella, jossa on automaattinen titraus.

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 laboratorioden pH-kalibrointimenettelyjä.

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

5.4 *Nollakoe*

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

▼ **M9****6. Tulosten laskeminen**

Tulokset lasketaan 6.1 tai 6.2 kohdan mukaisesti.

6.1 Tuloksen laskeminen 5.3.1 kohdan mukaisessa titrauksessa

Raakavalkuaispitoisuus ilmaistuna painoprosenteina lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

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 painoprosenteina 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 painoprosenteina 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).

▼ M9**7. Menetelmän varmistus****7.1 Toistettavuus**

Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä saa olla suurempi kuin

- 0,4 % absoluuttisena arvona, kun raakavalkuaispitoisuus on alle 20 %,
- 2,0 %, suhteellisenä arvona suuremmasta tuloksesta, kun raakavalkuaispitoisuus on 20–40 %,
- 0,8 % absoluuttisena arvona, kun raakavalkuaispitoisuus on yli 40 %.

7.2 Uusittavuus

Samasta näytteestä eri laboratorioissa tehdyn kahden määrittelyn välinen ero ei saa olla suurempi kuin

- 1,8 % absoluuttisena arvona, kun raakavalkuaispitoisuus on alle 20 %,
- 9,0 %, suhteellisenä arvona suuremmasta tuloksesta, kun raakavalkuaispitoisuus on 20–40 %,
- 3,6 % absoluuttisena arvona, kun raakavalkuaispitoisuus on yli 40 %.

7.3 Tarkkuus

Määrittely (hajotus, tislaukset ja titraus) tehdään riittävällä määrällä asetaniidia (3.13) (esim. 0,2–0,3 g) siten, että läsnä on 1 gramma sakkaroosia (3.14); 1 g asetaniidia kuluttaa 14,80 ml rikkihappoa (3.5). Saannon on oltava vähintään 99 prosenttia.

8. Huomautukset

- 8.1 Välineet voivat olla käsikäyttöisiä, puoliautomaattisia tai automaattisia. Jos liuos joudutaan siirtämään astiasta toiseen hajotuksen ja tislauksen välillä, siirto on suoritettava siten, ettei häviöitä tapahdu. Jos tislauksen kolvin ei ole tiputussuppiloina, lisätään natriumhydroksidi välittömästi ennen kolvin liittämistä jäähdytimeen kaataen liuos hitaasti kolvin seinämää myöten.
- 8.2 Jos hajotettu tuote kiinteytyy, määrittely on aloitettava alusta käyttämällä suurempaa määrää rikkihappoa (3.4) kuin 5.1 kohdassa 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 rutiinimäärittelyissä 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, määrittelyselosteessa on mainittava, mitä menetelmää raakavalkuaisen määrittelyssä on käytetty.

▼ **M9****D. UREAN MÄÄRITYS**

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**
Menetelmällä voidaan määrittää märehitijöiden rehussa lisäaineena käytetyn urean pitoisuus.
2. **Periaate**
Näyte suspendoidaan veteen sellaisen aineen läsnä ollessa, joka saa suspension kirkastumaan. Suspensio suodatetaan. Suodoksen ureamäärä määritetään sen jälkeen kun siihen on lisätty 4-dimetyyliaminobentsaldehydiä (4-DMAB) mittaamalla liuoksen absorbanssi 420 nm:n aallonpituudella.
3. **Reagenssit**
 - 3.1 4-Dimetyyliaminobentsaldehydiliuos: 1,6 g 4-DMAB:ta liuotetaan 100 ml:aan 96-prosenttista etanolia ja siihen lisätään 10 ml kloorivetyhappoa (ρ_{20} 1,19 g/ml). Tämä reagenssi säilyy korkeintaan kahden viikon ajan.
 - 3.2 Carrez-liuos I: 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. Tilavuus säädetään 100 ml:ksi vedellä.
 - 3.3 Carrez-liuos II: liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Tilavuus säädetään 100 ml:ksi vedellä.
 - 3.4 Aktiivihili, joka ei absorboi ureaa (tarkastettava).
 - 3.5 Urealiuos 0,1 % (w/v).
4. **Välineistö**
 - 4.1 Sekoitin: noin 35–40 kierr./min.
 - 4.2 Lasihioistulpallisia koeputkia 160×16 mm.
 - 4.3 Spektrofotometri.
5. **Menettely**
 - 5.1 *Näytteen määrittäminen*
Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 2 g näytettä sekä 1 g aktiivihiliä (3.4) 500 ml:n mittapulloon. Lisätään 400 ml vettä ja 5 ml Carrez I -liuosta (3.2), sekoitetaan noin 30 sekunnin ajan ja lisätään 5 ml Carrez II -liuosta (3.3). Pidetään sekoittimessa 30 minuutin ajan. Lisätään vettä merkkiin asti, sekoitetaan ja suodatetaan.

Läpinäkyvästä, värittömästä suodoksesta pipetoidaan 5 ml lasihioistulpallisiin koeputkiin, lisätään 5 ml 4-DMAB -liuosta (3.1) ja sekoitetaan. Putket asetetaan 20 °C:ssa (± 4 °C) olevaan vesihauteeseen. Viiden toista 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 koeputkisiin 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.

▼ **M9****6. Tulosten laskeminen**

Urean määrä näytteessä määritetään kalibrintikäyrää käyttäen.

Tulokset ilmoitetaan milligrammoina ureaa näytekiloa kohti.

7. Menetelmän arviointi**7.1 Toistettavuus**

Samasta näytteestä saman henkilön samassa laboratorioissa tekemän kahden määrittelyn tulosten välinen ero ei saa olla suurempi kuin:

— 420 nm:ssä

— 50 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 3 000 mg/kg mutta alle 5 000 mg/kg.

— 25 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 5 000 mg/kg mutta alle 7 000 mg/kg.

— 20 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 7 000 mg/kg;

— 435 nm:ssä

— 40 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 3 000 mg/kg mutta alle 5 000 mg/kg.

— 25 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 5 000 mg/kg mutta alle 9 000 mg/kg.

— 5 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 9 000 mg/kg.

7.2 Uusittavuus

Samasta näytteestä eri laboratorioissa tehdyn ja/tai eri henkilöiden tekemän kahden määrittelyn tulosten välinen ero ei saa olla suurempi kuin

— 420 nm:ssä

— 3 000 mg/kg absoluuttisena arvona, kun ureapitoisuus on vähintään 3 000 mg/kg mutta alle 12 000 mg/kg.

— 4 500 mg/kg absoluuttisena arvona, kun ureapitoisuus on vähintään 12 000 mg/kg;

— 435 nm:ssä

— 50 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 3 000 mg/kg mutta alle 8 000 mg/kg.

— 25 % suuremmasta tuloksesta, kun ureapitoisuus on vähintään 8 000 mg/kg.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

EU:n laboratorioiden välillä järjestettyyn vertailuun osallistui 18 laboratoriota. Viisi positiivista märehäytäjälle tarkoitettua rehuseosnäytettä (taulukossa 1 ja 2 ”MAT”) analysoitiin (1 analyysi) kaksoissokkonäytteinä, ja yksi nollanäyte analysoitiin kerran.

Kansainvälisten ohjeistuksien mukaiset toistettavuuden (r) ja uusittavuuden (R) raja-arvojen laskelmat suoritettiin sen jälkeen, kun poikkeavat arvot oli poistettu pätevien arvojen varianssianalyysin avulla.

▼ **M9**

Seuraavissa taulukoissa esitetään menetelmän suorituskyvylle lasketut arvot (toistettavuus ja uusittavuus) Testatuista näytteistä, nollanäyte mukaan lukien, ei saatu yhtäkään virheellisesti positiivista tai virheellisesti negatiivista tulosta.

Taulukko 1

Menetelmän suorituskykyominaisuudet urean osalta, mitattu $\lambda = 420$ nm kaikissa aineissa

	Aine 2	Aine 5	Aine 3	Aine 4	Aine 6
	Lampaat	Nautaeläimet	Lampaat	Lampaat	Nautaeläimet
Tavoitemassaosuus (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Keskimääräinen massaosuus (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Uusittavuuden keskihajonta s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Toistettavuuden keskihajonta s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Uusittavuuden raja-arvo, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Toistettavuuden raja-arvo, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Taulukko 2

Menetelmän suorituskykyominaisuudet urean osalta, mitattu $\lambda = 435$ nm kaikissa aineissa

	Aine 2	Aine 5	Aine 3	Aine 4	Aine 6
	Lampaat	Nautaeläimet	Lampaat	Lampaat	Nautaeläimet
Tavoitemassaosuus (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Keskimääräinen massaosuus (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Uusittavuuden keskihajonta s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Toistettavuuden keskihajonta s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Uusittavuuden suhteellinen keskihajonta RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Uusittavuuden raja-arvo, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Toistettavuuden raja-arvo, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ **M9****9. Huomautukset**

- 9.1 Kun urean määrä ylittää 3 prosenttia, näytteen määrä vähennetään 1 g: ksi tai alkuperäinen liuos laimennetaan siten, ettei siinä ole yli 50 mg ureaa 500 ml:ssa.
- 9.2 Kun ureapitoisuus on alhainen, näytteen kokoa suurennetaan, kunhan suodos säilyy läpinäkyvänä ja värittömänä.
- 9.3 Edellä olevat laboratorioden välisen vertailun tulokset eivät viittaa merkittävään tarkkuuseroon urean määrittämisessä 420 nm:ssä ja 435 nm:ssä.

E. AMINOHAPPOJEN MÄÄRITYS (TRYPTOFAANIA LUKUUN OTTAMATTA)

Aminohappojen määrittämiseen (tryptofaania lukuun ottamatta) käytettävät menetelmät ovat

- EN ISO 13903 -standardi (Animal feeding stuffs – Determination of amino acids content), joka koskee aminohappopitoisuuksien määrittämistä rehusta
- EN ISO 17180 -standardi (Animal feeding stuffs – Determination of lysine, methionine, and threonine in commercial amino acid products and premixtures), joka koskee lysiinin, metioniinin ja treoniinin määrittämistä rehujen kaupallisissa aminohappotuotteissa ja esi-seoksissa ⁽¹⁾
- jäljempänä 1–10 kohdassa kuvattu määrittämenetelmä.

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää vapaat aminohapot (synteettiset ja luonnon aminohapot) ja kokonaisaminohapot (peptideihin kiinnittyneet ja vapaat) aminohappoanalyysointilaboratoriolle rehuaineissa, rehuseoksissa ja esiseoksissa, joissa kutakin aminohappoa on alle 10 prosenttia ⁽²⁾. Se sopii seuraaviin aminohappoihin: kyst(e)iini, metioniini, lysiini, treoniini, alaniini, arginiini, asparagiinihappo, glutamiinihappo, glysiini, histidiini, isoleusiini, leusiini, fenyyylalaniini, proliini, seriini, tyrosiini ja valiini.

Menetelmä ei erota toisistaan aminohappojen eri 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 uutuneet typpipitoiset makromolekyylit saostetaan sulfosalisyylisulfaattilla ja poistetaan suodattamalla. Suodatetun liuoksen pH säädetään arvoon 2,20. Aminohapot erotetaan ioninvaihtokromatografialla ja määritetään fotometrillä ninhydrinijohdoksina 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 (Tarkoitus ja soveltamisala) mainitut aminohapot voidaan määrittää joko hapetetusta tai hapettamattomasta näytteestä.

⁽¹⁾ EN 17180 -standardin mukaiseen määrittämenetelmään viitataan vaihtoehtoisena menetelmänä käytettäväksi virallisessa valvonnassa aminohappojen määrittämiseen rehusta, jonka aminohappopitoisuus on yli 10 prosenttia.

⁽²⁾ Menetelmää ei ole validoitu laboratorioden välisellä tutkimuksella sellaisten esiseosten osalta, jotka sisältävät rehun lisäaineita yli 10 prosenttia. Sitä voidaan kuitenkin soveltaa näihin matriiseihin asianmukaisin pienin muutoksien edellyttäen, että menetelmä validoidaan sisäisesti. Lisätietoja on saatavilla verkkosivulla <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>

▼ **M9**

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

3. **Reagenssit**

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

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

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

3.3 Fenoli.

3.4 Natriumdisulfiitti.

3.5 Natriumhydroksidi.

3.6 5-Sulfosalisyylihappodihydraatti.

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

3.8 Trinatriumsitraattidihydraatti.

3.9 2,2'-Tiodietanoli (tiodiglykoli).

3.10 Natriumkloridi.

3.11 Ninhydriini.

3.12 Petrolieetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.

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

3.14 Typpikaasu (< 10 ppm happea).

3.15 1-Oktanoli.

3.16 Aminohapot.

3.16.1 Edellä 1 kohdassa (Tarkoitus ja soveltamisala) lueteltujen aminohappojen standardina käytettävät yhdisteet. Puhtaat yhdisteet, jotka eivät sisällä kidevettä. Kuivataan tyhjiössä P₂O₅:n tai H₂SO₄:n päällä viikon ajan ennen käyttöä.

3.16.2 Kysteiinihapo.

3.16.3 Metioniinisulfoni.

3.17 Natriumhydroksidiliuos, c = 7,5 mol/l:

liuotetaan 300 g NaOH:ta (3.5) veteen ja laimennetaan 1 litraksi.

3.18 Natriumhydroksidiliuos, c = 1 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).

▼ **M9**

- 3.20 Hydrolyysiseos, $c = 6 \text{ mol HCl} / \text{l}$ ja 1 g fenolia litrassa:
- lisätään 1 g fenolia (3.3) 492 ml :aan HCl (3.7) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.21 Uttoseos, $c = 0,1 \text{ mol HCl} / \text{l}$ ja 2% tiodiglykolia: laimennetaan $8,2 \text{ ml HCl}$:ää (3.7) noin 900 ml :aan vettä, lisätään $20 \text{ ml tiodiglykolia}$ (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 $0,5 \text{ ml}$ vetyperoksidia (3.1) $4,5 \text{ ml}$:aan muurahaishappo-fenoliliuosta (3.19) pienessä dekanterilasissa. Inkuboidaan $20\text{--}30 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa tunnin ajan, jotta saadaan permuurahaishappoa, annetaan sitten jäähtyä jäävesihauteessa (15 min) ennen näytteeseen lisäämistä.
- Varoitus: vältettävä ihokosketusta ja käytettävä suojavaatteita.
- 3.24 Sitraattipuskuriliuos, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+ / \text{l}$, $\text{pH } 2,20$:
- liuotetaan $19,61 \text{ g}$ natriumsitraattia (3.8), 5 ml tiodiglykolia (3.9), 1 g fenolia (3.3) ja $16,50 \text{ ml HCl}$:ää (3.7) noin 800 ml :aan vettä. Säädetään pH arvoon $2,20$. Täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.25 Eluointipuskurit, valmistetaan analysaattorin vaatimusten mukaisesti (4.9).
- 3.26 Ninhydiiriireagenssi, valmistetaan analysaattorin vaatimusten mukaisesti (4.9).
- 3.27 Aminohappojen standardiliuokset. Nämä liuokset säilytetään alle $5 \text{ }^\circ\text{C}$: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 metioniinisulfonin standardin kantaliuos, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
- Liuotetaan $0,2115 \text{ g}$ kysteiinihappoa (3.16.2) ja $0,2265 \text{ g}$ metioniinisulfonia (3.16.3) sitraattipuskuriin (3.24) litran mittapullossa ja täytetään merkkiin asti sitraattipuskurilla. Säilytetään alle $5 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa enintään 12 kuukautta . Tätä liuosta ei tarvita, jos standardin kantaliuos (3.27.1) sisältää kysteiinihappoa ja metioniinisulfonia.
- 3.27.3 Sisäisen standardin kantaliuos, esimerkiksi norleusiini, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
- Liuotetaan $0,6560 \text{ g}$ norleusiinia (3.13) sitraattipuskuriin (3.24) mittapullossa ja täytetään 250 ml :ksi sitraattipuskurilla. Säilytetään alle $5 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa enintään 6 kuukautta .

▼ **M9**

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

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

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

Katso myös huomautus 9.1.

- 3.27.5 Aminohappojen kalibroitiliuos 5.3.3.1 kohdan mukaisesti valmistetuille hydrolysaateille ja uutteille (5.2). Kalibroitiliuos valmistetaan 3.27.4 kohdan mukaisesti kuitenkin jättäen natriumkloridi pois.

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

4. Välineistö

- 4.1 100 ml :n tai 250 ml :n pyörökolvi, joka on varustettu palautusjäähdyttimellä.
- 4.2 Borosilikaattilasinen 100 ml :n pullo, jossa on kumi/teflonttiivisteinen kierrettävä uuninkestävä korkki (esimerkiksi Duran, Schott).
- 4.3 Koneellisella ilmanvaihdoilla 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 ($0,22 \text{ } \mu\text{m}$).
- 4.6 Sentrifugi.
- 4.7 Vakuumipyöröhaihdutin.
- 4.8 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.
- 4.9 Aminohappoanalysaattori tai HPLC-laitteisto, jossa on ioninvaihtokolonni, välineistö kolonnin jälkeistä ninhydiiniderivointia varten ja fotometri.

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

Tietyissä 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 haihuttamalla hydrolysaatti noin 5 ml :aan ennen pH:n säätämistä. Haihuttamisen on tapahduttava tyhjiössä enintään $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.

▼ **M9****5. Menettely****5.1 Näytteen valmistaminen**

Näyte jauhetaan siten, että se läpäisee 0,5 mm:n seulan. Näytteet, joiden kosteuspitoisuus on suuri, on ilmakeivattava enintään 50 °C:ssa tai pakastekuivattava ennen jauhamista. Näytteet, joiden rasvapitoisuus on suuri, on uutettava petrolieetterillä (3.12) ennen jauhamista.

5.2 Vapaiden aminohappojen määrittäminen

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

Lisätään koko ajan sekoittaen 5,0 ml sulfosalisyyliliuosta (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 (5.3.2.3) varten, 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 (5.3.2.4) varten.

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.

▼ **M9**

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

5.3.2.3 Avoin hydrolyysi

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

Jatketaan 5.3.3 kohdan mukaisesti.

5.3.2.4 Suljettu hydrolyysi

Asetetaan 5.3.2.1 tai 5.3.2.2 kohdan mukaisesti valmistettua näytetä 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 dekanterilasiin tai 250 ml:n pyörökolviin.

Jatketaan 5.3.3 kohdan mukaisesti.

5.3.3 pH:n säätäminen

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

5.3.3.1 Kromatografitt (4.9), jotka edellyttävät alhaista natriumpitoisuutta

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

Tässä tapauksessa lisätään 2,00 ml sisäisen standardin kantaliuosta (3.27.3) hydrolysaattiin ennen haihdutusta.

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

▼ **M9**

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

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

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 0,22 µm:n kalvosuodattimen (4.5) läpi. Saatu kirkas liuos analysoidaan aminohappoanalysaattorilla käyttäen ioninvaihtokromatografiaa (4.9).

Injektio voidaan suorittaa käsin tai automaattisesti. On tärkeää, että kolonniin lisätään aina sama määrä ($\pm 0,5\%$) 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 prosenttia 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.

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

▼ **M9**

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 lysiniä, vierekkäisten piikkien riittämätön erottuminen toisistaan häiritsee määrittystä.) Muiden aminohappojen osalta erottumisen on oltava parempi kuin 1:10.

Kromatografijärjestelmän on pystyttävä erottamaan lysini lysiniartefaktoista ja ornitiinistä.

6. **Tulosten laskeminen**

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

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

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

A = analysoitavan piikin pinta-ala, hydrolysaatti tai uute

B = analysoitavan piikin pinta-ala, standardiliuos

C = sisäisen standardin piikin pinta-ala hydrolysaatissa tai uutteen

D = sisäisen standardin piikin pinta-ala kalibrintiliuksessa

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 (= $0,5 \times 240,30$ 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 laboratorioden välisessä vertailussa käyttäen neljää eri rehua (sikojen täysrehu, broilereiden täysrehu, valkuaistiiviste ja esiseos).

▼ **M9**

Huomautus: Menetelmä on testattu toisen kansainvälisen vertailututkimuksen aikana vuonna 2003 käyttäen kaksoissokkopareja, joissa näytteet olivat broilereiden loppukasvatusrehusta, broilereiden aloitusrehusta, maissista, kalajauhusta ja siipikarjasta valmistetusta jauhosta. Lisätietoja varten katso EN ISO 13903 -standardi.

Vuoden 1990 vertailututkimuksen tulosten keskiarvo ja standardipoikkeama poikkeavien arvojen poissulkemisen jälkeen on esitetty tämän kohdan taulukoissa.

Vertailuaine	Keskiarvot g/kg			
	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 laboratorioden lukumäärä.

7.1 *Toistettavuus*

Edellä olevassa taulukossa esitetyn laboratorioden välisen vertailun toistettavuus on ilmaistu alla olevissa taulukoissa muodossa ”laboratorion sisäinen standardipoikkeama”:

Variaatiokerroin (%) laskettuna toistettavuudesta (CV_r)

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

n = osallistuneiden laboratorioden lukumäärä.

7.2 *Uusittavuus*

Laboratorioden välisten standardipoikkeamien tulokset edellä mainitussa vertailussa on esitetty seuraavassa taulukossa.

▼ **M9****Variaatiokerroin (%) laskettuna uusittavuudesta (CV_R)**

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 laboratorioiden lukumäärä.

8. Vertailumateriaalin käyttö

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

9. Huomautukset

- 9.1 Aminohappoanalysaattoreiden välisten erojen vuoksi annettuja aminohappojen kalibrointiliuosten (ks. 3.27.4 ja 3.27.5 kohta) ja hydrolysaattien (ks. 5.3.4 kohta) 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 rehuseoksiin tai esiseoksiin, jotka sisältävät enemmän kuin yhden prosentin kloridia (tiiviste, kivennäisaineita sisältävät ravinteet tai täydennysrehut), sillä saatetaan saada metioniinille liian pieniä arvoja, ja erityiskäsittely on tarpeen.

10. Suorituskykyvaatimukset

Yhdistämällä tulokset (muiden kuin tyrosiinin osalta) näistä kahdesta vertailututkimuksesta (edellä 7 kohdassa esitetystä vuoden 1990 tutkimuksesta ja EN/ISO 13903 -standardissa esitetystä vuoden 2005 tutkimuksesta) saadaan seuraavat toistettavuutta ja uusittavuutta koskevat vaatimukset. Näistä kahdesta laboratorioiden välisestä testistä saatuja arvoja ei välttämättä voi soveltaa muihin kuin esitettyihin pitoisuusalueisiin ja -matriiseihin.

10.1 Toistettavuus

Samasta näytteestä saman henkilön samassa laboratorioissa tekemän kahden määrittelyn tulosten välinen ero ei saa olla suurempi kuin:

- 6 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohappojen kokonaismäärästä glysiinin, alaniinin, lysiinin, proliinin, glutamiinihapon, isoleusiinin ja histidiinin osalta.
- 8 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohappojen kokonaismäärästä treoniinin, fenyylialaniinin, metioniinin, asparagiinihapon ja leusiinin osalta.

▼ M9

- 10 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohappojen kokonaismäärästä arginiinin ja valiinin osalta.
- 12 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohapon seriini kokonaismäärästä.
- 15 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohapon kyst(e)iini kokonaismäärästä.

10.2 Usittavuus

Samasta näytteestä eri laboratorioissa tehdyn ja/tai eri henkilöiden tekemän kahden määrittelyn tulosten välinen ero ei saa olla suurempi kuin

- 15 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohappojen kokonaismäärästä glysiinin, alaniinin ja treoniinin osalta.
- 20 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohappojen kokonaismäärästä lysiinin, proliinin, fenyylialaniinin, metioniinin ja asparagiinihapon osalta.
- 22 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohappojen kokonaismäärästä glutamiinihapon ja leusiinin osalta.
- 27 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohapon arginiini kokonaismäärästä.
- 32 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohapon isoleusiini kokonaismäärästä.
- 35 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohappojen kokonaismäärästä valiinin ja seriinin osalta.
- 40 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohapon histidiini kokonaismäärästä.
- 50 % suuremmasta tuloksesta, kun kyse on aminohapon kyst(e)iini kokonaismäärästä.

F. TRYPTOFAANIN MÄÄRITYS

Tryptofaanin määrittämiseen käytettävät menetelmät ovat

- EN ISO 13904 -standardi (Animal feeding stuffs – Determination of tryptophan content), joka koskee tryptofaanipitoisuuden määrittämistä rehusta
- jäljempänä 1–9 kohdassa kuvattu määrittämenetelmä.

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 kyllästetyllä bariumhydroksidiliuoksella emäksisissä olosuhteissa ja kuumennetaan 110 °C:ssa 20 tuntia. Hydrolyysin jälkeen lisätään sisäinen standardi.

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

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

3. Reagenssit

- 3.1 Veden on oltava kaksoistislattua tai vastaavan laatuista (johtokyky < 10 µS/cm).

▼ **M9**

- 3.2 Standardiyhdiste: tryptofaani (puhtaus/pitoisuus $\geq 99\%$), kuivattu tyhjiössä fosforipentoksidin päällä.
- 3.3 Sisäinen standardi: α -metyylitryptofaani (puhtaus/pitoisuus $\geq 99\%$), kuivattu tyhjiössä fosforipentoksidin päällä.
- 3.4 Bariumhydroksidioktahydraatti (on varottava, ettei $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ joudu liaksi kosketuksiin ilman kanssa; tällöin muodostuisi BaCO_3 :a, joka voi häiritä määrittystä) (ks. huomautus 9.3).
- 3.5 Natriumhydroksidi.
- 3.6 Ortofosforihappo, w (w/w) = 85 %
- 3.7 Kloorivetyhappo, ρ_{20} 1,19 g/ml.
- 3.8 Metanoli, HPLC-laatua vastaava.
- 3.9 Petrolieetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.
- 3.10 Natriumhydroksidiliuos, c = 1 mol/l:
- Liutetaan 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 mol/l:
- Mitataan 82 ml HCl:ää (3.7) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.13 Kloorivetyhappo, c = 0,1 mol/l:
- Mitataan 8,2 ml HCl:ää (3.7) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.14 Ortofosforihappo, c = 0,5 mol/l:
- Mitataan 34 ml ortofosforihappoa (3.6) ja täytetään 1 litraksi vedellä (3.1).
- 3.15 Väkevä tryptofaaniliuos (3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:
- Liutetaan 500 ml:n mittapullossa 0,2553 g tryptofaania (3.2) kloorivetyhappoon (3.13) ja täytetään merkkiin asti kloorivetyhapolla (3.13). Säily -18 °C:ssa enintään 4 viikkoa.
- 3.16 Konsentroitua sisäisen standardin liuos, c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:
- Liutetaan 500 ml:n mittapullossa 0,2728 g α -metyylitryptofaania (3.3) kloorivetyhappoon (3.13) ja täytetään merkkiin asti kloorivetyhapolla (3.13). Säily -18 °C:ssa enintään 4 viikkoa.
- 3.17 Tryptofaenin ja sisäisen standardin kalibrointistandardiliuos:
- Mitataan 2,00 ml konsentroitua tryptofaaniliuosta (3.15) ja 2,00 ml konsentroitua sisäisen standardin (α -metyylitryptofaenin) 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.

▼ M9

- 3.18 Etikkahappo.
- 3.19 1,1,1-Trikloori-2-metyyli-2-propanoli.
- 3.20 Etanoliamiini w (w/w) > 98 %.
- 3.21 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 liuosta (3.21), jossa on 1,1,1-trikloori-2-metyyli-2-propanolia (3.19) metanolissa (3.8) (1 g / 100 ml). pH säädetään arvoon 5,00 etanoliamiinilla (3.20). Täytetään 1 000 ml:ksi vedellä (3.1).

4. Välineistö

- 4.1 HPLC-laitteisto, jossa on spektrofluorimetri-detektori.
- 4.2 Nestekromatografiakolonni, 125 mm × 4 mm, C₁₈, hartsin (pakkausai-
neen) hiukkaskoko 3 µm, tai vastaava.
- 4.3 pH-mittari.
- 4.4 Polypropyleenipullo, tilavuus 125 ml, jossa on leveä kaula ja kierre-
tulppa.
- 4.5 Kalvosuodatin, 0,45 µm.
- 4.6 Autoklaavi, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.
- 4.8 Vortex-sekoitin.

5. Menettely**5.1 Näytteiden valmistaminen**

Näyte jauhetaan siten, että se läpäisee 0,5 mm:n seulan. Näytteet, joi-
den kosteuspitoisuus on suuri, on ilmakeiuvattava enintään 50 °C:ssa tai
pakastekuivattava ennen jauhamista. Näytteet, joiden rasvapitoisuus on
suuri, on uutettava petrolietterillä (3.9) ennen jauhamista.

5.2 Vapaan tryptofaanin määrittäminen (uutteesta)

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

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

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

▼ **M9**5.3 *Tryptofaanin kokonaismäärän määrittäminen (hydrolysaattista)*

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

Lämpötila on laskettava juuri alle 100 °C:een 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-metyylitryptofaania, 3.16). Jäähdytetään pulloja vesi/jäähäuteessa 15 minuuttia.

Lisätään 5 ml ortofosforihappoa (3.14). Pullo pidetään jäähdytyshäuteessa 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 prosenttia metanolia. Siirretään liuos sopivan kokoiseen 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-kolonneihin injektointia. Siirrytään kromatografiavaiheeseen 5.4 kohdan mukaisesti.

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

5.4 *HPLC-määrittäminen*

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

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

▼ M9**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 = kalibrointiliuokseen (3.17) lisätyn konsentroidun tryptofaaniliuoksen (3.15) tilavuus ml (2 ml)

c = kalibrointiliuokseen (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 = kalibrointiliuokseen (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 prosenttia suuremmasta tuloksesta.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Järjestetyssä EU-vertailussa (4. vertailututkimus) 12 laboratoriota analysoi kolme näytettä hydrolyysimenetelmän varmentamiseksi. Kustakin näytteestä tehtiin viisi rinnakkaismääritystä. Tulokset esitetään 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

▼ **M9**

	Näyte 1 Sian rehu	Näyte 2 Sian rehu, johon on lisätty L- tryptofaania	Näyte 3 Sian rehtiiviste
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 EU-vertailussa (3. vertailututkimus) 13 laboratoriota analysoi kaksi näytettä vapaan tryptofaanin uuttomenetelmän varmentamiseksi. Kustakin näytteestä tehtiin viisi rinnakkaismääritystä. Tulokset esitetään 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 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 EU-vertailututkimus, jossa seitsemän laboratoriota analysoi neljä näytettä, tarkoituksena tryptofaanin varmentaminen hydrolyysissä. Tulokset esitetty seuraavassa taulukossa. Kustakin näytteestä tehtiin viisi rinnakkaismääritystä.

▼ **M9**

	Näyte 1 Sikarehuseos (CRM 117)	Näyte 2 Vähärasvainen kalajauho (CRM 118)	Näyte 3 Soijajauho (CRM 119)	Näyte 4 Rasvaton maito- jauhe (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 poikkeavat arvot (tunnistettu Cochranin ja Dixonin poikkeavien arvojen testillä)

s_r = toistettavuuden keskihajonta

S_R = uusittavuuden keskihajonta

r = toistettavuus

R = uusittavuus

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

9. **Huomautukset**

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

Isokraattinen erotus, jonka jälkeen kolonni puhdistetaan gradientteilla:

Nestekromatografiakolonni: 125 mm × 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 5 µm, tai vastaava

Kolonnin lämpötila: 32 °C

Liikkuva faasi: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/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 tryptofaenin 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

▼ **M9**

standardin kohdalla olevan pohjaviivan avulla. On tärkeää, että ajoaika on riittävän pitkä, jotta kaikki hajoamistuotteet eluoiutuvat; myöhään eluoiutuvat 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 samaa, minkä vuoksi voidaan saada alhaisia tryptofaanituloksia.

G. RAAKARASVAN JA RAAKAÖLJYN MÄÄRITYS

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä määritetään rehuissa olevan raakasvan ja -öljyn määrä.

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

Raakasvan ja raakaöljyn määrittämiseen öljysiemenistä ja öljypitoisista hedelmistä sekä rehusta, jonka raakasva-/raakaöljypitoisuus on yli 15 prosenttia, tulisi uutto tehdä menettelytavan A mukaisesti ja uudelleen uutto menettelytavan B mukaisesti (5.3).

1.1 Menettelytapa A – Suoraan uutettavissa oleva raakasva ja -öljy

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

1.2 Menettelytapa B – Raakasvan ja -öljyn kokonaismäärä

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

1.3 *Tulosten tulkitseminen*

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

2. **Periaate**2.1 *Menettelytapa A*

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

2.2 *Menettelytapa B*

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

▼ **M9****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. Kiesलगur, Hyflo-supercel.

4. Välineistö

- 4.1 Uttolaitteisto. 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 Uttohylsyjä, joissa ei ole petrolieetteriin liukenevaa materiaalia ja joiden huokoisuus täyttää 4.1 kohdassa esitetyt vaatimukset.
- 4.3 Lämpökaappi, joko vakuumikaappi, joka on säädetty $75 \pm 3 \text{ °C}$:seen tai kiertoilmakaappi, joka on säädetty $100 \pm 3 \text{ °C}$:seen.

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

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

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

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

5.2 Menettelytapa B

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

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

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

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

▼ **M9**

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

5.3 *Menettelytapa A ja uudelleen uutto menettelytavan B mukaisesti*

Raakasvan ja raakaöljyn määrittämiseen öljysiemenistä ja öljypitoisista hedelmistä sekä rehusta, jonka raakasva-/raakaöljypitoisuus on yli 15 prosenttia, tulisi uutto tehdä menettelytavan A mukaisesti ja uudelleen uutto menettelytavan B mukaisesti.

Tämä tarkoittaa, että petrolietterillä uuttamisen (menettelytapa A) jälkeen jäännös tai osa jäännöksestä uutetaan uudelleen kloorivetyhapolla (menettelytapa B). Raakasvan ja -öljyn pitoisuus on menettelytapojen A ja B tuloksen summa.

6. **Tuloksen ilmoittaminen**

Jäännöksen paino ilmoitetaan prosentteina näytteen painosta.

7. **Toistettavuus**

Samasta näytteestä saman henkilön tekemän 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 suuremmasta tuloksesta, 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 petrolietterillä (3.1) 5.1 kohdassa esitetyllä tavalla. Saadun uutteen tilavuus täydennetään 500 ml:ksi petrolietterillä (3.1) ja se sekoitetaan. Liuosta otetaan 50 ml ja kaadetaan pieneen, kuivaan, punnittuun pulloon, joka sisältää kiehumakiviä. Liuotin tislataan pois, jäännös kuivataan ja määritystä 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 määritystä 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.

▼ **M9**

- 8.2 Joidenkin (esimerkiksi pieniä rasva- ja öljymääriä sisältävien) tuotteiden osalta näytteiden määrää voidaan nostaa.
- 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.

H. 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.

Menetelmää ei voida soveltaa lignoselluloosan ja kasvishiilen tapauksessa (aines liian hienojakoista).

2. Periaate

Näyte, josta tarvittaessa on poistettu rasva, käsitellään peräkkäin tietyn väkevyisillä kiehuvilla rikkihappo- ja kaliumhydroksidiliuoksilla. Jäännös erotetaan suodattamalla näyte lasisintterisuodattimella, 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-oktanolili).
- 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 Lasinen suodatinupokas, jossa on huokoisuudeltaan 40–90 µm:n lasisintterisuodatin. Ennen ensimmäistä käyttökertaa upokasta kuumennetaan 500 °C:ssa muutaman minuutin ajan ja jäähdytetään (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 Uttoyksikkö, johon kuuluu suodatinupokkaan jalusta (4.2) ja poistoletku, jossa on ilmanpoisto- ja tyhjennysventtiili.

▼ **M9**

- 4.7 Osia lämmityslaitteiston (4.1), upokkaan (4.2) ja sylinterin (4.3) kokoaamiseen sekä kylmäuuttoyksikön (4.6) ja upokkaan liittämiseen.

5. **Menettely**

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 1 g esikäsiteltyä näytettä upokkaaseen (4.2) (ks. huomautukset 9.1, 9.2 ja 9.3) 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 tyhjiössä 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 jäädytetään eksikkaattorissa ja punnitaan nopeasti. Upokas asetetaan muhveliuuniin, jossa näytteen annetaan palaa tuhkaksi vakiopainoon (kahden peräkkäisen punnituksen välinen painoero saa olla enintään 2 mg) 475–500 °C:ssa vähintään 30 minuuttia.

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

Nollakoe suoritetaan ilman näytettä. Tuhkaamisesta johtuva painohäviö saa olla enintään 4 mg.

6. **Tulosten laskeminen**

Raakakuitupitoisuus prosentteina näytteestä saadaan seuraavasti:

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

jossa:

m = näytteen paino grammoina,

m₀ = määrittelyn aikana näytteen polttamisesta aiheutuva painohäviö grammoina,

m₁ = nollakokeessa polttamisesta aiheutuva painohäviö grammoina.

▼ M9**7. Toistettavuus**

Kahden samasta näytteestä suoritettujen määrittysten 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. Uusittavuus

Samasta näytteestä eri laboratorioissa tehdyn kahden määrittelyn välinen ero ei saa olla suurempi kuin

- 1,0 %:a absoluuttisena arvona, kun raakakuitupitoisuus on alle 10 %,
- 10 %:a suhteellisenä arvona suuremmasta tuloksesta, kun raakakuitupitoisuus on vähintään 10 %.

9. Huomautukset

- 9.1 Rehuista, jotka sisältävät yli 10 prosenttia raakarasvaa, on rasva ennen määrittystä 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.
- 9.2 Rehuista, jotka sisältävät öljyjä ja rasvoja, joita ei voida uuttaa suoraan petrolieetterillä (3.5), rasva on poistettava 8.1 kohdassa esitetyllä tavalla ja tämän jälkeen rasva on poistettava vielä uudelleen hapolla kiehumisen jälkeen. Hapolla kiehumisen ja sitä seuraavien pesujen jälkeen upokas sisältöineen yhdistetään kylmäuuttoyksikköön (4.6) ja jäännöstä pestään kolme kertaa 30 ml:lla asetonia ja tämän jälkeen kolme kertaa 30 ml:lla petrolieetteriä. Suodatetaan tyhjiössä kunnes jäännös on kuiva ja jatketaan määrittystä kaliumhydroksidikäsitteilyllä 5 kohdassa esitetyllä tavalla.
- 9.3 Jos näyte sisältää yli 5 prosenttia 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.
- 9.4 Jos käytetään telineenmuotoista laitteistoa (useita upokkaita on liitetty samaan lämmityslaitteistoon), kahta koetta samasta näytteestä ei saa suorittaa samalla kertaa.
- 9.5 Jos kiehumisen jälkeen happamien ja emäksisten liuosten suodatus osoittautuu vaikeaksi, käytetään lämmityslaitteiston tyhjennysletkun kautta annettavaa paineilmaa, minkä jälkeen jatketaan suodatusta.
- 9.6 Tuhkanlämpötila ei saa olla yli 500:aa °C lasisten suodatinupokkaiden käyttöä pidentämiseksi. Kuumennus- ja jäähdytysjaksojen aikana on vältettävä suuria lämpötilanvaihteluja.

▼ **M9****I. SOKERIN MÄÄRITYS****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää pelkistävien sokerien ja kokonaissokerien määrä invertoinnin jälkeen glukosina, 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.

Menetelmää käytetään sokeripitoisuuden määrittämiseen rehun energiasisällön laskemista varten.

Jos sokeripitoisuus määritetään muuta tarkoitusta varten, voidaan käyttää muita määrittämenetelmiä.

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 fenolftaleiinilla 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, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 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.

▼ **M9**

- 3.11 Rikkihappo, 3 mol/l.
- 3.12 Kaliumjodidiliuos, 30 % (w/v).
- 3.13 Kiehumakiviä, jotka keitetään kloorivetyhappossa, 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 kiehumakivettä (3.13), lämmitetään keskikokoisen liekin yläpuolella käsin sekoittaen ja kuumennetaan neste kiehumapisteeseen noin kahdessa minuutissa. Erlenmeyerkolvi asetetaan välittömästi asbestiverkolle, jossa on noin 6 cm:n läpimittainen reikä ja verkon alla on etukäteen sytytetty liekki. Säädetään liekki sellaiseksi, että erlenmeyerkolvi kuumenee ainoastaan pohjastaan. Tämän jälkeen erlenmeyerkolviin kiinnitetään pystyjäähdytin. Keitetään tarkalleen 10 minuutin ajan. Jäähdytetään välittömästi kylmässä vedessä ja noin viiden minuutin kuluttua titrataan seuraavasti:

▼ **M9**

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 millilitroina 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-liuos I- (3.2) ja Carrez-liuos 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-liuos I- (3.2) ja Carrez-liuos II (3.3) -reagensseja 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 määritystä samasta näytteestä. Toinen määrityksistä suoritetaan liuokselle, joka saadaan osasta 5.1 kohdan mukaisesti saatua liuosta, ja toinen määrityksistä suoritetaan osasta liuosta, joka saadaan laktoosimäärityksen yhteydessä tähän tarkoitukseen kehitetyn menetelmän mukaisesti (sen jälkeen kun muut sokerit on fermentoitu ja liuos kirkastettu).

▼ **M9**

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 määrittämiä.

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

Na₂ S₂ O₃, 0,1 mol/l, millilitroina, kahden minuutin kuumennus, kymmenen minuutin keitto

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

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

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

▼ **M9****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 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ja 3 g jääetikkaa. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

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

3.4 Luff-Schoorl-reagenssi:

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

3.4.1 Kuparisulfaattiliuos: liuotetaan 25 g raudatonta kuparisulfaattia, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 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 kloorivetyhapossa, 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 (korkeintaan 25 ml), joka sisältää 40–80 mg laktoosia. Tarvittaessa täytetään vedellä 25 ml:ksi.

▼ **M9**

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 kiehumakivettä (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 titraataan seuraavasti:

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

1. Yli 40 prosenttia fermentoituvaa sokeria sisältäville tuotteille käytetään yli 5 ml hiivasuspensiota (3.1).
2. Tuotteissa, joissa laktoosin määrää on vähennetty (esim. kissanmaito), laktoosi on muunnettu fruktoosiksi, joka ei fermentoidu täysin kahdessa tunnissa, mikä johtaa korkeampiin tai virheellisesti positiivisiin tuloksiin (koska uutteenä on jäljellä fruktoosin jäämiä).

Taulukko 25 ml:lle Luff-Schoorl-reagenssia

Na₂ S₂ O₃, 0,1 mol/l, millilitroina, kahden minuutin kuumennus, kymmenen minuutin keitto

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

▼ **M9**

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

K. TÄRKKELYKSEN MÄÄRITYS**POLARIMETRINEN MENETELMÄ****1. Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää tärkkelyksen ja tärkkelyksen suurimolekyylisten pilkkoutumistuotteiden pitoisuus rehuissa tarkoituksena todeta, onko niiden ilmoitettu energiamäärä liitteen VII mukainen ja ovatko ne asetuksen (EY) N:o 767/2009 säännösten mukaisia.

Menetelmää käytetään tärkkelyspitoisuuden määrittämiseen rehun energiasisällön laskemista varten.

Jos tärkkelyspitoisuus määritetään muuta tarkoitusta varten, voidaan käyttää muita määrittämenetelmiä.

2. Periaate

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

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

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

3. Reagenssit

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

3.2 Kloorivetyhappoliuos 1,13 % (w/v)

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

3.3 Carrez-liuos I: liuotetaan veteen 21,9 g sinkkiasetaattia Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O ja 3 g jäätikkää. Täytetään 100 ml:ksi vedellä.

▼ **M9**

3.4 Carrez-liuos II: Liuotetaan veteen 10,6 g kaliumferrosyanidia $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. 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. Vesihauteen 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:een.

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 palautusjäähdytin ja kolvi 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:een.

▼ **M9**

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

6. **Tulosten laskeminen**

Tärkkelyspitoisuus (%) lasketaan seuraavalla tavalla:

6.1 *Polarimetriset mittaukset*

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

P = optinen kokonaiskiertokyky asteina

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

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = puhtaan tärkkelysten 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*

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

S = optinen kokonaiskiertokyky sakkarimetrin asteina

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

N = sellainen sakkarooosin 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 tärkkelysten ominaiskiertokyky (ks. 6.1).

▼ **M9**6.3 *Toistettavuus*

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärittelyn tulosten välinen ero saa olla enintään 0,4 absoluuttisena arvona, jos tärkkelyspitoisuus on alle 40 prosenttia, ja 1 prosentti suhteessa tärkkelyspitoisuuteen, jos tärkkelyspitoisuus on vähintään 40 prosenttia.

7. **Huomautukset**

7.1 Jos näyte sisältää yli 6 prosenttia karbonaatteja, kalsiumkarbonaattina laskettuna, on ne ennen optisen kokonaiskiertokyvyn määrittystä hajotettava juuri tarkalleen sopivalla määrällä laimeaa rikkihappoa.

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

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

— (sokeri)juurikastuotteet, kuten (sokeri)juurikasleike, (sokeri)juurikasmelassi, melassoitu (sokeri)juurikasleike, (sokeri)juurikasranki, (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;

— soijatuotteet.

Näiden osalta voidaan soveltaa komission asetuksen (EY) N:o 121/2008 ⁽¹⁾ mukaista määrittymenetelmää. Kyseistä menetelmää voi käyttää myös rehuun, jonka tärkkelyspitoisuus on alle 1 prosentti.

⁽¹⁾ Komission asetus (EY) N:o 121/2008, annettu 11 päivänä helmikuuta 2008, eläinten ruokintaan käytettävien valmisteiden (CN-koodi 2309) tärkkelyspitoisuuden määrittymenetelmästä (EUVL L 37, 12.2.2008, s. 3).

▼ **M9****L. 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 20–40 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 hiilttyy. 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-prosentista 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 tuhkatottoman 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 tuhkatottomalla suodatinpaperiliuskalla. Palamisen jälkeen näytettä kositetaan mahdollisimman pienellä määrällä vettä. Kuivataan ja poltetaan tuhkaksi 5 kohdan mukaisesti.

▼ **M9****M. 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 rehuaineisiin ja useimpiin rehuseoksiin;
 - 1.2 *Menetelmä B:* soveltuu kivennäisrehuihin ja kivennäisrehuseoksiin sekä rehuseoksiin, joiden kloorivetyhappoon liukenemattomien ainesten pitoisuus menetelmällä A määritettynä on suurempi kuin 1 prosentti.
2. **Periaate**
 - 2.1 *Menetelmä A:* näyte poltetaan tuhkaksi, tuhka keitetään kloorivetyhappossa ja liukenematon jäännös suodatetaan ja punnitaan.
 - 2.2 *Menetelmä B:* näytettä käsitellään kloorivetyhapolla. Liuos suodatetaan, jäännös poltetaan tuhkaksi ja näin saatu tuhka käsitellään menetelmän A mukaan.
3. **Reagenssit**
 - 3.1 Kloorivetyhappo, 3 mol/l.
 - 3.2 Trikloorietikkahappoliuos, 20 % (w/v).
 - 3.3 Trikloorietikkahappoliuos, 1 % (w/v).
4. **Välineistö**
 - 4.1 Sähkölevy.
 - 4.2 Sähkökäyttöinen muhveliuuni, jossa on termostaatti.
 - 4.3 Hehkutusupokkaita, jotka on valmistettu kvartsista, posliinista tai platinasta, joko suorakulmaisia (noin 60 × 40 × 25 mm) tai pyöreitä (läpimitta 60–75 mm, korkeus 20–40 mm).
 - 4.4 Tuhkattomia suodattimia
5. **Menettely**
 - 5.1 *Menetelmä A:*
 Näyte poltetaan tuhkaksi 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 tuhkaton suodatinpaperin läpi ja jäännös pestään lämpimällä vedellä kunnes pesuvesi ei enää ole hapan. Jäännöksen sisältävä suodatinpaperi kuivataan ja poltetaan tuhkaksi taaratussa upokkaassa 550–700 °C:n lämpötilassa. Sen annetaan jäähtyä eksikkaattorissa ja se punnitaan.
 - 5.2 *Menetelmä B:*
 Punnitaan 5 g näytettä 1 mg:n tarkkuudella 250–400 ml:n dekanterilasiin. Siihen lisätään ensin 25 ml vettä ja sen jälkeen 25 ml kloorivetyhappoa (3.1), sekoitetaan ja odotetaan kunnes kuohuminen lakkaa. Lisätään vielä 50 ml kloorivetyhappoa (3.1). Kun kaasuja ei enää muodostu, dekanterilasi asetetaan kiehuvaan vesihauteeseen ja pidetään siinä 30 minuuttia tai tarvittaessa pitempään, jotta mahdollinen jäljellä oleva tarkkelys tulisi kokonaan hydrolysoiduksi. Liuos suodatetaan lämpimänä käyttäen tuhkatonta suodatinpaperia, joka pestään 50 ml:lla

▼ **M9**

lämmintä vettä (ks. 7 kohdan huomautus). Suodatinpaperi jäännöksiin siirretään hehkutusupokkaaseen, kuivataan ja poltetaan tuhkaksi 550–700 °C:n lämpötilassa. Tuhka siirretään 250–400 ml:n dekanterilasiin käyttäen 75 ml kloorivetyhappoa (3.1), 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 (3.1) 50 ml:lla 20-prosenttista trikloorietikkahappoliuosta (3.2) ja suodatinpaperin pesuun käytetään lämmintä 1-prosenttista trikloorietikkahappoliuosta (3.3).

N. KOKONAISFOSFORIN MÄÄRITYS

Kokonaisfosforin määrittäminen tehdään

- EN 15510 -standardin (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES), joka koskee kalsiumin, natriumin, fosforin, magnesiumin, kaliumin, raudan, sinkin, kuparin, mangaanin, kobolttin, molybdeenin ja lyijyn määrittäystä rehusta ICP-AES:llä, mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN 15621 -standardin (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES), joka koskee kalsiumin, natriumin, fosforin, magnesiumin, kaliumin, rikin, raudan, sinkin, kuparin, mangaanin ja kobolttin määrittäystä rehusta ICP-AES:llä painehajoituksen jälkeen, mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- jäljempänä esitetyllä fotometrisellä menetelmällä.

FOTOMETRINEN MENETELMÄ1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

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

2. **Periaate**

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

3. **Reagenssit**

- 3.1 Kalsiumkarbonaatti.
- 3.2 Kloorivetyhappo, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (noin 6 mol/l).
- 3.3 Typpihappo, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4 Typpihappo, $\rho_{20} = 1,38$ – $1,42$ g/ml.
- 3.5 Rikkihappo, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6 Molybdovanadaattireagenssi: sekoitetaan 200 ml ammoniumheptamolybdaattiliuosta (3.6.1), 200 ml ammoniummonovanadaattiliuosta (3.6.2) ja 134 ml typpihappoa (3.4) 1 litran mittapullossa. Täytetään merkkiin asti vedellä.

▼ **M9**

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 Ammoniummonovanaadaattiliuos: liuotetaan 2,35 g ammoniummonovanaadaattia 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 termos-taatti.

4.3 250 ml:n Kjeldahl-kolvi.

4.4 Mittapulloja ja tarkkuuspipettejä.

4.5 Spektrofotometri.

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

5. Menettely

5.1 *Liuksen 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 magnesiumdivetyfosfaatteja

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

▼ M9**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 sellaiseen liuokseen nähden, 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 rinnakkaismäärittelyn 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.

O. KLOORIN MÄÄRITYS KLOORIDEISTA**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 (NH₄)Fe(SO₄)₂.
- 3.4 Typpihappo, tiheys 1,38 g/ml.

▼ **M9**

- 3.5 Dietyylieetteri.
- 3.6 Asetoni.
- 3.7 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.
- 3.8 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**

Sekoitin: noin 35–40 kierr./min.

5. **Menettely**5.1 *Liuoksen valmistaminen*

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

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

5.1.1 *Näytteet, joissa ei ole orgaanista ainesta*

Punnitaan 1 mg:n 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-liuosta I (3.7), sekoitetaan 30 sekunnin ajan ja tämän jälkeen lisätään 5 ml Carrez-liuosta II (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), 2 ml kyllästettyä ammoniumferrisulfaattiliuosta (3.3) ja kaksi tippaa ammoniumtiosyanaattiliuosta (3.1), joka annostellaan nollamerkkiin täytetystä byretistä. Byrettiä 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.

▼ M9**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 = titraukseen käytetyn ammoniumtiosyanaatin 0,1 mol/l määrä millilitroina.

m = näytteen määräosan paino grammoina.

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 tai amperometrisesti.

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.

▼ **M9***LIITE IV***REHUIJEN SISÄLTÄMIEN SALLITTUIJEN LISÄAINEIDEN
VALVONNASSA KÄYTETTÄVÄT MÄÄRITYSMENETELMÄT****A. A-VITAMIININ MÄÄRITYS**

A-vitamiinin määrittäminen tehdään

- EN 17547 -standardin (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of vitamin A, E and D ⁽¹⁾ content – Method using solid phase extraction (SPE) clean-up and high-performance liquid chromatography (HPLC)), joka koskee A-, E- ja D-vitamiinipitoisuuden määrittäystä rehusta käyttäen erotusta kiinteäfasieksraktiolla (SPE) ja korkean suorituskäyvyn nestekromatografiaa (HPLC), mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- korkean erotuskäyvyn käänteisfaasinestekromatografiolla (RP-HPLC) UV- tai fluoresenssidetektoria käyttäen, kuten jäljempänä 1–9 kohdassa on kuvattu.

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää A-vitamiinin (retinolin) pitoisuus rehuissa. 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.

Määrittäsräjä on 2 000 ky A-vitamiinia/kg.

2. Periaate

Näyte hydrolysoidaan etanoli-kaliumhydroksidiliuoksella, ja A-vitamiini uutetaan petroleetteriin. Liuotin haihdutetaan pois, haihdutusjäännös liuotetaan metanoliin ja laimennetaan tarvittaessa halutulle pitoisuusalueelle. A-vitamiinipitoisuus määritetään korkean erotuskäyvyn käänteisfaasinestekromatografiolla (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).

⁽¹⁾ EN 17547 -standardin mukaiseen määrittämenetelmään viitataan vaihtoehtoisena menetelmänä, jota voidaan käyttää virallista valvontaa varten A- ja E-vitamiinien määrittäseen A-vitamiinin osalta tämän liitteen A osassa ja E-vitamiinin osalta tämän liitteen B osassa kuvatun menetelmän sijaan.

▼ **M9**

- 3.8 2-Propanoli.
- 3.9 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi: metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (v + v). Tarkka suhde määräytyy käytetyn kolonnin ominaisuuksien perusteella.
- 3.10 Typpi, happivapaa.
- 3.11 All-*trans*-A-vitamiiniasetaatti, erikoispuhdasta, jonka aktiivisuus on sertifioitu, esim. $2,80 \times 10^6$ 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. $1,80 \times 10^6$ 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.
- 3.13 2,6-Di-*tert*-butyyli-4-metyylifenoli (BHT) (ks. 7.5 huomautukset).

4. **Välineistö**

- 4.1 Vakuumpiöröhaihdutin.
- 4.2 Ruskeita lasiastioita.
- 4.2.1 Tasapohjaisia kolveja tai erlenmeyerkolveja, 500 ml, joissa on lasihios.
- 4.2.2 Mittapulloja, joissa on lasihiostulpat, kapeakaulaisia, 10, 25, 100 ja 500 ml.
- 4.2.3 Erotussupiloita, kartiomaisia, 1 000 ml, joissa on lasihiostulpat.
- 4.2.4 Kartiopohjaisia kolveja, 250 ml, joissa on lasihios.
- 4.3 Allihn-jäähdytin, vaipan pituus 300 mm, jossa on lasihios ja liitin kaasunsyöttöputkelle.
- 4.4 Laskostettua suodatinpaperia faasien erotukseen, halkaisija 185 mm (esim. Schleicher & Schüll 597 HY 1/2).
- 4.5 HPLC-laitteisto, jossa injektor.
- 4.5.1 Nestekromatografiakolonne, 250 mm x 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):

▼ **M9**

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 typellä (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. Näytettä (näytteitä) ei saa jauhaa, jos hiukkaskokojakauma on sopiva (esim. esiseokset ja rehun lisäaineet).

5.2 Saippuointi

A-vitamiinipitoisuudesta riippuen punnitaan 1 mg:n tarkkuudella 2–25 g näytettä 500 ml:n tasapohjaiseen kolviin tai erlenmeyerkolviin (4.2.1). Jos pitoisuus on alhainen, näytteen paino voi olla suurempi, jotta partikkelien määrä testinäytteessä on riittävä. Lisätään peräkkäin kolvia pyörittäen 130 ml etanolia (3.1), noin 100 mg BHT:tä (3.13), 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) jäähdytimen (4.3) läpi ja annetaan kiehua vielä 25 minuuttia sekoittaen hitaassa typpivirrassa. Jäähdytin huuhdellaan noin 20 ml:lla vettä ja kolvin sisältö jäähdytetään huoneenlämpötilaan.

5.3 Utto

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 lopputilavuuk-sien suhteen pitää olla noin 2:1. Ravistellaan voimakkaasti 2 minuuttia ja annetaan laskeutua 2 minuuttia.

5.3.1 Utto erotussuppiloa (4.2.3) käyttäen

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

Yhdistetyt uutteen pestään erotussupissa, pyörittäen varovasti (emulsion muodostumisen välttämiseksi), kahdesti 100 ml:lla vettä ja sitten toistuvasti ravistelemalla edelleen 100 ml:lla vettä kerrallaan, kunnes pesuvesi on väritön lisättäessä fenolftaleiiniliuosta (3.7) (neljä pesukertaa riittää yleensä). Pesty uute suodatetaan suspendoitujen vesijäämien

▼ **M9**

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 tyypeä sivuputkeen siirretään ylempi petrolieetterikerros 1 000 ml:n erotussuppiloon (4.2.3). Lisätään 100 ml petrolieetteriä (3.2) lasisylinteriin, suljetaan tulpalla ja ravistellaan hyvin. Annetaan faasien erottua ja siirretään ylempi kerros erotussuppiloon kuten edellä. Uutto toistetaan vielä 100 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja kahdesti 50 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja petrolieetterikerrokset siirretään erotussuppiloon.

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

5.4 **Näyteliuoksen valmistaminen HPLC-ajoja varten**

Pipetoidaan tietty määrä petrolieetteriliuosta (joka on saatu 5.3.1 tai 5.3.2 kohdassa) 250 ml:n kartiopohjaiseen kolviin (4.2.4). Liuotin haihdutetaan lähes kuiviin pyöröhaihduttimella (4.1) alennetussa paineessa; vesihauteen lämpötila saa olla korkeintaan 40 °C. Ilmanpaine palauteetaan normaaliksi tyypellä (3.10) ja kolvi otetaan pois pyöröhaihduttimesta. Jäljellä oleva liuotin haihdutetaan typpivirrassa (3.10) ja jäännös liuotetaan välittömästi tunnettuun tilavuuteen (10–100 ml) metanolia (3.3) (A-vitamiinipitoisuuden on oltava välillä 5–30 ky/ml).

5.5 **Määrittäminen HPLC:llä**

A-vitamiini erotetaan C₁₈-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) 5.4 kohdassa saatua metanoliliuosta ja eluoidaan liikkuvalla faasilla (3.9). 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 × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava
------------------------------------	--

Liikkuva faasi (3.9):	Metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (v + v)
-----------------------	---

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

Detektori (4.5.2):	UV-detektori (325 nm) tai fluoresenssidetektori (eksitaatio: 325 nm, emissio: 475 nm)
--------------------	---

▼ **M9**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 kolviin tai erlenmeyerkolviin (4.2.1) ja hydrolysoidaan kuten 5.2 kohdassa, mutta ilman BHT-lisäystä. Tämän jälkeen uutetaan petrolieetterillä (3.2) 5.3 kohdan mukaisesti ja täytetään 500 ml:aan petrolieetterillä (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 5.6.3.3 kohdan 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 A-vitamiinipitoisuus on 56 ky/ml. 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:

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

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ A - vitamiiniasetaatin osalta} = 1530 \text{ aallonpituudella } 326 \text{ nm } 2 - \text{propanolissa})$$

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 A-vitamiinipitoisuus on 56 ky/ml. Pipetoidaan 3,0 ml tätä laimennettua A-vitamiinipalmitaattiliuosta 25 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin asti 2-propanolilla (3.8). Tämän liuoksen

▼ M9

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:

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

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

5.6.3.3 A-vitamiinin käyttöstandardiliuos

Pipetoidaan 3,0 ml laimentamatonta A-vitamiinin käyttöstandardiliuosta, joka on valmistettu 5.6.1 kohdan 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:

$$\text{ky/ml A – vitamiinia} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ A – vitamiiniasetaatin osalta} = 1821 \text{ aallonpituudella } 326 \text{ nm } 2 - \text{propanolissa})$$

6. Tulosten laskeminen

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

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

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

jossa:

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

V₁ = näyteliuoksen (5.4) tilavuus (ml),

V₂ = 5.4 kohdassa otetun näyteliuoksen tilavuus (ml),

m = näyte-erän paino (g).

7. Huomautukset

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

▼ **M9**

- 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
- saippuoinnin (5.2) yhteydessä: näytteen sisältämän rasvamäärän vuoksi kaliumhydroksidiliuoksen (3.4) määrää voi olla tarpeen lisätä;
 - uuttamisen (5.3) yhteydessä: 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 prosenttia, määrittäksen tulosta on korjattava saannon suhteen.

8. **Toistettavuus**

Kahden rinnakkaismäärittäksen välinen ero samasta näytteestä saa olla enintään 15 prosenttia suuremmasta arvosta.

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

	Esiseos	Esiseosvalmiste	Kivennäisrehu	Valkuaisrehu	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
sr [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
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [ky/kg]	$1,36 \times 106$	$0,069 \times 106$	46 300	23 060	3 614

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

▼ **M9**

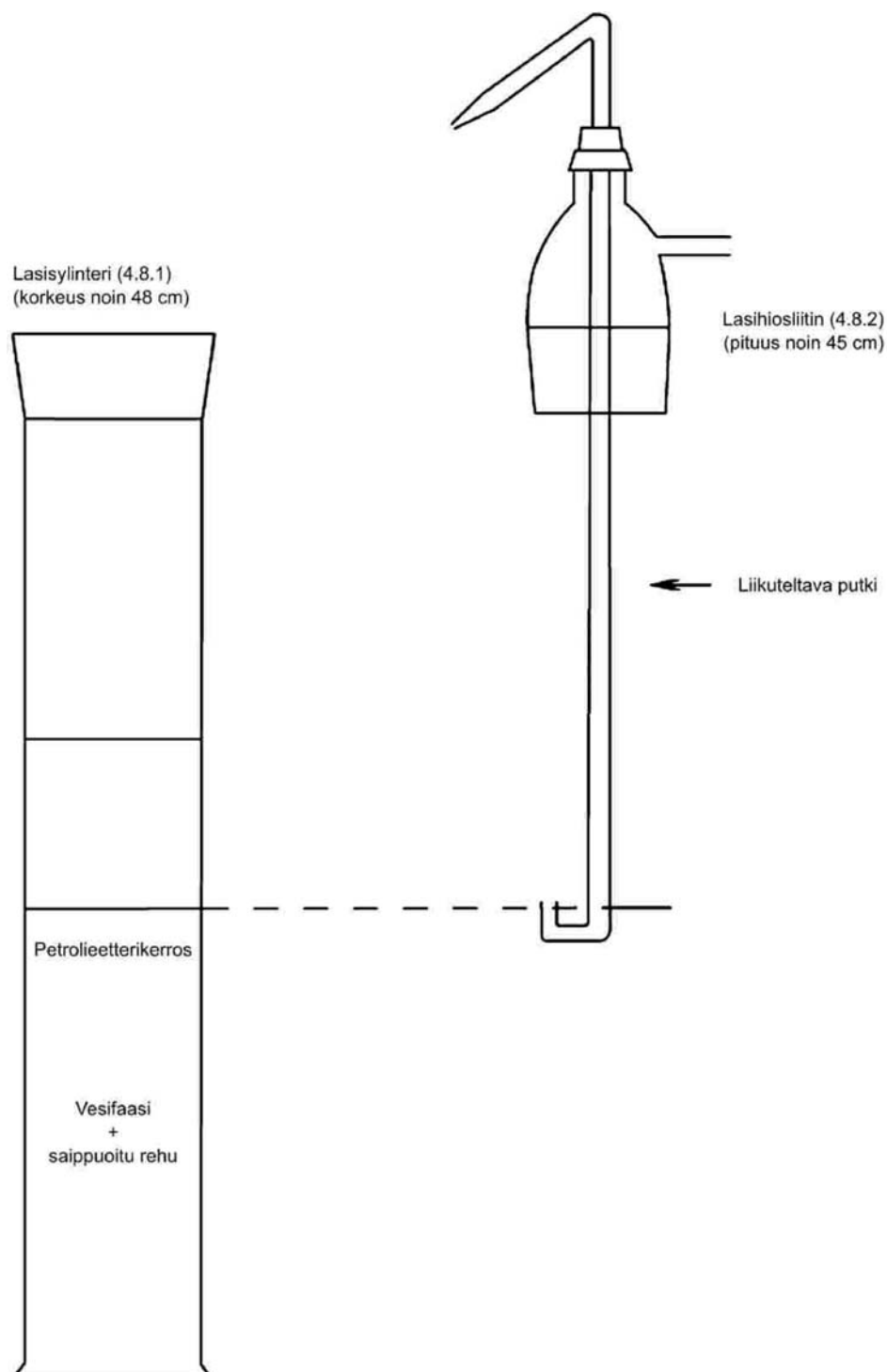
	Esiseos	Esiseosvalmiste	Kivennäisrehu	Valkuaisrehu	Porsasrehu
R [ky/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: laboratorioden lukumäärä
n: yksittäisten arvojen lukumäärä
sr: toistettavuuden keskihajonta
sR: uusittavuuden keskihajonta
r: toistettavuus
R: uusittavuus
CVr: toistettavuuden variaatiokerroin
CVR: uusittavuuden variaatiokerroin.

▼ **M9**

Kuva 1

Uuttolaitteisto, jossa on (4.8)



▼ **M9****B. E-VITAMIININ MÄÄRITYS**

E-vitamiinin määrittäminen tehdään

- EN 17547 -standardin (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of vitamin A, E and D ⁽¹⁾ content – Method using solid phase extraction (SPE) clean-up and high-performance liquid chromatography (HPLC)), joka koskee A-, E- ja D-vitamiinipitoisuuden määrittäystä rehusta käyttäen erotusta kiinteäfasiekstraktiolla (SPE) ja korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa (HPLC), mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (RP-HPLC) UV- tai fluoresenssidetektoria käyttäen, kuten jäljempänä 1–9 kohdassa on kuvattu.

1. Tarkoitus ja soveltamisala

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

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

2. Periaate

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

3. Reagenssit

- 3.1 Etanoli, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2 Petroleetteri, kiehumislämpötila 40–60 °C.
- 3.3 Metanoli.
- 3.4 Kaliumhydroksidiliuos, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 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 HPLC:ssä käytettävä liikkuva faasi: metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (v + v). Tarkka suhde määrityy käytetyn kolonnin ominaisuuksien perusteella.
- 3.9 Typpi, happivapaa.
- 3.10 DL- α -tokoferoliasetaatti, erikoispuhdas, sertifioitu aktiivisuus.

⁽¹⁾ EN 17547 -standardin mukaiseen määrittämenetelmään viitataan vaihtoehtoisena menetelmänä, jota voidaan käyttää virallista valvontaa varten A- ja E-vitamiinien määrittämiseen A-vitamiinin osalta tämän liitteen A osassa ja E-vitamiinin osalta tämän liitteen B osassa kuvatun menetelmän sijaan.

▼ M9

- 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 kolveja tai erlenmeyerkolveja, 500 ml, joissa on lasihios.
- 4.2.2 Mittapulloja, joissa on lasihostulpat, kapeakaulaisia, 10, 25, 100 ja 500 ml.
- 4.2.3 Erotussuppiloita, kartiomaisia, 1 000 ml, joissa on lasihostulpat.
- 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 injektori.
- 4.5.1 Nestekromatografiakolonni, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 5 tai 10 μ m, 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 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.

▼ **M9****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 kolviin tai erlenmeyerkolviin (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). Kuumentetaan kiehumispisteeseen ja annetaan kiehua 5 minuuttia. Lisätään 25 ml kaliumhydroksidiliuosta (3.4) jäähdyttimen (4.3) läpi ja annetaan kiehua vielä 25 minuuttia sekoittaen hitaassa typpivirrassa. Jäähdytin huuhdellaan noin 20 ml:lla vettä ja kolvin sisältö jäähdytetään huoneenlämpötilaan.

5.3 Utto

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

5.3.1 Utto erotussuppiloa (4.2.3) käyttäen

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

Yhdistetyt uutteet pestään erotussuppilossa, pyörittäen varovasti (emulsion muodostumisen välttämiseksi), kahdesti 100 ml:lla vettä ja sitten toistuvasti ravistelemalla edelleen 100 ml:lla vettä kerrallaan, kunnes pesuvesi on väritön lisättäessä fenolfaleiiniliuosta (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 Utto 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 typeä sivuputkeen siirretään ylempi petrolieetterikerros 1 000 ml:n erotussuppiloon (4.2.3). Lisätään

▼ **M9**

100 ml petrolieetteriä (3.2) lasisylinteriin, suljetaan tulpalla ja ravistellaan hyvin. Annetaan faasien erottua ja siirretään ylempi kerros erotussuppiloon kuten edellä. Uutto toistetaan vielä 100 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja kahdesti 50 ml:lla petrolieetteriä (3.2) ja petrolieetterikerrokset siirretään erotussuppiloon.

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

5.4 *Näyteliuoksen valmistaminen HPLC-ajaja varten*

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

5.5 *Määrittäminen HPLC:llä*

E-vitamiini erotetaan C₁₈-käänteisfaasikolonilla (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) 5.4 kohdassa 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.

Nestekromatografiakoloni (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , hiukkaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava
Liikkuva faasi (3.8):	Metanolin (3.3) ja veden seos, esim. 980 + 20 (v + v).
Virtausnopeus:	1–2 ml/min
Detektori (4.5.2):	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 kolviin tai erlenmeyerkolviin (4.2.1) ja hydrolysoidaan kuten 5.2 kohdassa. Tämän jälkeen uutetaan petrolieetterillä (3.2) 5.3 kohdan mukaisesti ja täytetään 500 ml:aan petrolieetterillä. Haihdutetaan 25 ml tätä uutetta pyöröhaihduksella (ks. 5.4) lähes kuiviin, jäljellä oleva liuotin poistetaan typpivirralla (3.9) ja jäännös liuotetaan

▼ **M9**

25,0 ml:aan metanolia (3.3). Tämän liuoksen nimellinen pitoisuus on 45,5 µg/ml DL-α-tokoferolia, mikä vastaa 50 µg/ml:aa DL-α-tokoferoliasetaattia. Käyttöstandardiliuos valmistetaan juuri ennen käyttöä.

5.6.1.2 Kalibrointiliuosten valmistaminen ja kalibrointikäyrä

Pipetoidaan 1,0, 2,0, 4,0 ja 10,0 ml kantastandardiliuosta 20 ml:n 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:

▼ **M9**

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

Tällä laimennuksella pitää saada ekstinktioarvo 0,6.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen E-vitamiinipitoisuus $\mu\text{g/ml}$ (laskettuna DL- α -tokoferoliasetaattina) määritetään näyteliuoksen E-vitamiinipikien 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 (DL- α -tokoferoliasetaattina) ($\mu\text{g/ml}$)

V_1 = näyteliuoksen (5.4) tilavuus (ml)

V_2 = pipetoidun liuoksen (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 petroleetteriutteet (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.

▼ **M9**

8. **Toistettavuus**

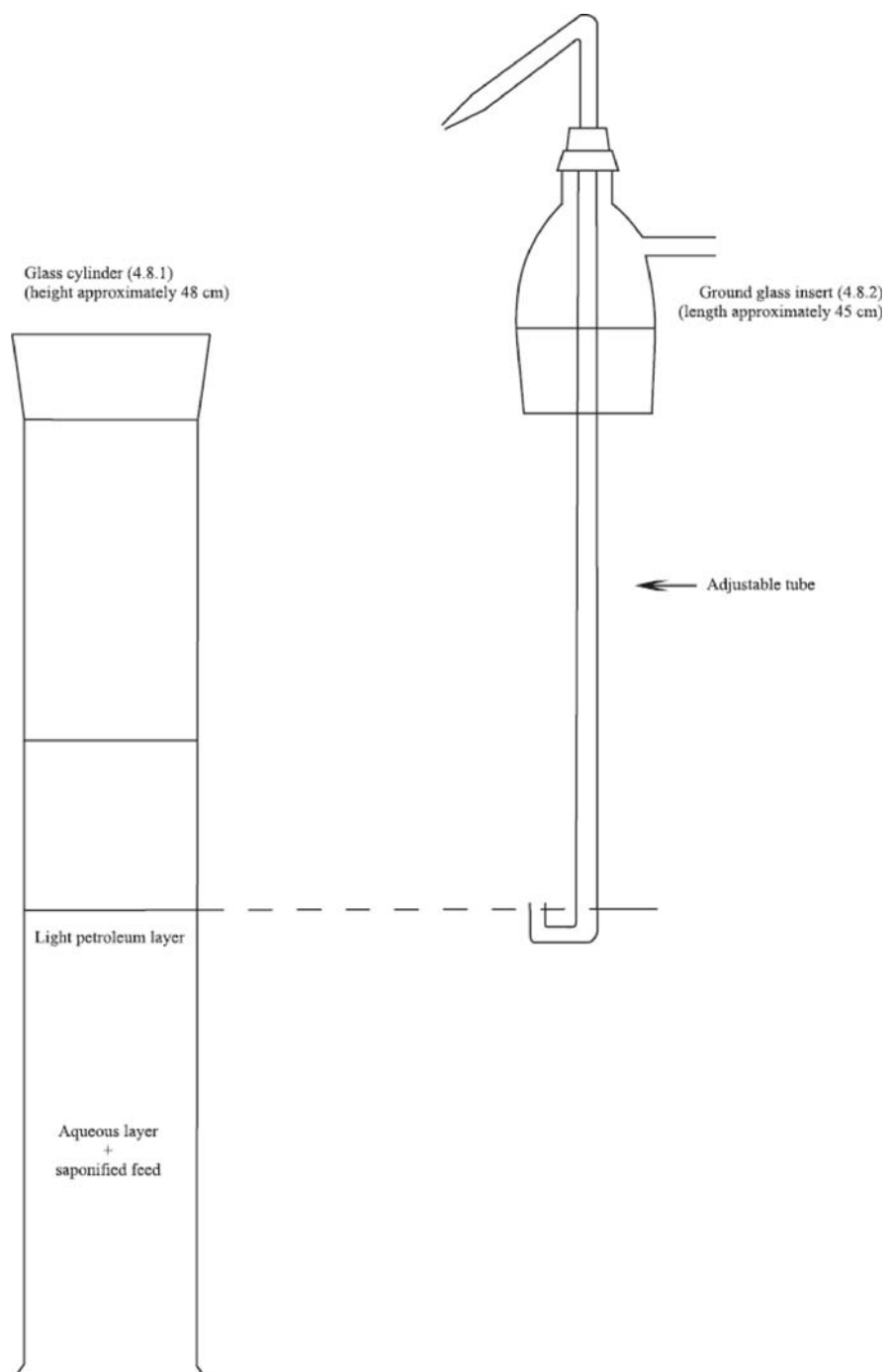
Kahden rinnakkaismäärittelyn välinen ero samasta näytteestä saa olla enintään 15 prosenttia suuremmasta arvosta.

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

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

L:	laboratorioiden lukumäärä
n:	yksittäisten arvojen lukumäärä
s _r :	toistettavuuden keskihajonta
s _R :	uusittavuuden keskihajonta
r:	toistettavuus
R:	uusittavuus
CV _r :	toistettavuuden variaatiokerroin
CV _R :	uusittavuuden variaatiokerroin.

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

▼ **M9***Kuva 2***Uuttolaitteisto (4.8)**

▼ **M9****C. RAUDAN, KUPARIN, MANGAANIN JA SINKIN MÄÄRITYS**

Raudan, kuparin, mangaanin ja sinkin pitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 15510 -standardin (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES), joka koskee kalsiumin, natriumin, fosforin, magnesiumin, kaliumin, raudan, sinkin, kuparin, mangaanin, koboltin, molybdeenin ja lyijyn määrittäystä rehusta ICP-AES:llä, mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN 15621 -standardin (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES), joka koskee kalsiumin, natriumin, fosforin, magnesiumin, kaliumin, raudan, sinkin, kuparin, mangaanin ja koboltin määrittäystä rehusta ICP-AES:llä painehajotuksen jälkeen, mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN 17053 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Hivenaineiden, raskasmetallien ja muiden vastaavien alkuaineiden määrittäminen rehusta ICP-MS:llä (multimenetelmä)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN ISO 6869 -standardin (Animal feeding stuffs: Determination of the contents of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium and zinc. Method using atomic absorption spectrometry), joka koskee kalsiumin, kuparin, raudan, magnesiumin, kaliumin, natriumin ja sinkin pitoisuuden määrittäystä rehusta atomiabsorptiospektrometriaa käyttävän menetelmän avulla, mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- liekkiatomiabsorptiospektrometriaan (FAAS) perustuvalla menetelmällä, kuten jäljempänä 1–8 kohdassa on kuvattu

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää rehuista hivenaineet rauta, kupari, mangaani ja sinkki ⁽¹⁾. Määrittärajat 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 atomiabsorptiospektrometrillä.

3. Reagenssit

Alustavat huomautukset

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

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

⁽¹⁾ Menetelmä on validoitu eri rehumatriiseilla tehdyllä laboratorioiden välisellä tutkimuksella. Lisätietoja on saatavilla verkkosivulla <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

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)/l.
- 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 rautalan-
kaa 200 ml:aan kloorivetyhappoa, 6 mol/l (3.2) lisätään 16 ml vetype-
roksidia (3.6) ja täytetään 1 litraksi vedellä.
- 3.7.1 Rautakäyttöstandardiliuos (100 µg Fe/ml), joka on valmistettu laimen-
tamalla 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 lit-
raksi vedellä.
- 3.8.1 Kuparikäyttöstandardiliuos (10 µg Cu/ml), joka on valmistettu laimen-
tamalla 1 osa standardiliuosta (3.8) 9 osalla vettä ja sen jälkeen lai-
mentamalla 1 osa saatua liuosta 9 osalla vettä.
- 3.9 Mangaanistandardiliuos (1 000 µg Mn/ml), joka on valmistettu seuraa-
vasti, 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 lai-
mentamalla 1 osa standardiliuosta (3.9) 9 osalla vettä ja sen jälkeen lai-
mentamalla 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 laimen-
tamalla 1 osa standardiliuosta (3.10) 9 osalla vettä ja sen jälkeen lai-
mentamalla 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.

▼ M9

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 määrittäykseen.
- 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) pisaroitain samalla sekoittaen kunnes kupliminen on kokonaan lakannut. Haihdutetaan kuivaksi ajoittain lasisauvalla sekoittaen.

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

- 5.1.1.2 Jos suodatinpaperissa oleva jäännös on ulkonäöltään mustaa (hiiltä), se vietään takaisin uuniin ja poltetaan uudelleen tuhkaksi 450–475 °C:ssa. Tämä poltto kestää vain muutaman tunnin (noin 3–5 tuntia) ja on suoritettu loppuun silloin, kun tuhka on ulkonäöltään valkeaa tai lähes

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

⁽²⁾ Vihreisiin rehuihin (tuoreisiin tai kuivattuihin) oletetaan sisältyvän suuria määriä kasvisperäisiä piiyhdisteitä, jotka saattavat sitoa hivenaineita, 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 aines 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 piiyhdisteitä, se liuotetaan uudelleen muutamaan millilitraan fluorivetyhappoa (3.4) ja haihdutetaan kuivaksi. Lisätään viisi tippaa rikkihappoa (3.5) ja kuumennetaan kunnes valkoinen savu on haihtunut. Lisätään 5 ml 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 menetelyä 5.1.2 kohdasta alkaen.

▼ **M9**

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 kontaminaatoriskit. Tästä syystä näytteiden valmistuksessa käytetyt välineet eivät saa sisältää näitä metalleja.

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

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

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

- d) Pyrometrin osoittama lämpötila saa olla enintään 475 °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 3.10.1 kohdassa mainituista käyttöstandardiliuoksista sarja kalibrointiliuoksia siten, että kunkin kalibrointiliuoksen HCl-konsentraatio on noin 0,5 mol/l ja (raudan, mangaanin ja sinkin tapauksessa) lantanikloridikonsentraatio sellainen, joka vastaa 0,1 prosenttia (w/v) lantania.

Valittujen hivenainekonsentraatioiden on oltava käytetyn spektrofotometrin herkkyysalueella. Seuraavissa taulukoissa annetaan esimerkiksi erilaisia kalibrointiliuoskoostumuksia; käytetyn spektrofotometrin tyyppistä ja herkkyydestä 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 lantanikloridiliuosta (3.11) ja täytetään 100 ml:ksi vedellä

▼ **M9****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 kalibroitiliuosten 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. Kalibroitiliuosta ”0” ei saa käyttää nollanäytteenä.

5.1.2.4 Atomiabsorptiomittaus

Kalibroitiliuosten 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.

▼ **M9**5.2 *Kivennäisrehut*

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

6. **Tulosten laskeminen**

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

7. **Toistettavuus**

Samasta näytteestä saman henkilön tekemän kahden 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 määrittäystä. Tällainen häiriö on korjattava lantaanikloridiliuosta (3.11) lisäämällä. Jos näytteessä painosuhte $\text{Ca} + \text{Mg} / \text{P}$ on > 2 , voidaan lantaanikloridiliuoksen (3.11) lisäys määritettävään liuokseen ja kalibrointiliuoksiin jättää pois.

D) HALOFUGINONIN MÄÄRITTÄMINEN

DL-trans-7-bromi-6-kloori-3-[3-(3-hydroksi-2-piperidyyli)asetonyyli]-kinatsolin-4-(3H)-onihydrobromidi

Halofuginonipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien eirekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografia – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämis menetelmällä, tai
- korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen, kuten jäljempänä 1–8 kohdassa on kuvattu.

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää halufuginonin pitoisuus rehuissa. 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 korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

▼ **M9****3. Reagenssit**

3.1 Asetonitrili, HPLC-laatua vastaava.

3.2 Amberlite XAD-2 -harts.

3.3 Ammoniumasetaatti.

3.4 Etyyliasetaatti.

3.5 Jäätikka.

3.6 Halofuginonistandardi (DL-trans-7-bromi-6-kloori-3-[3-(3-hydroksi-2-piperidyli)asetonyyli]-kinatsolin-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.

▼ **M9**

3.19 Amberlite XAD-2 -hartsin valmistaminen

Pestään sopiva määrä Amberlitea (3.2) vedellä, kunnes pesuun käytetyssä vesifaasissa hopeanitraatilla (3.20) tehtävä koe osoittaa, että kloridi-ioneja 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

Liutetaan 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 ammoniumasetaatipuskuriliuosta (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 ultraäänikäsitteilyllä). 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-detektorin tai diodirividetektorin.

4.4.1 Nestekromatografiakolonni, 300 mm × 4 mm, C₁₈, hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava kolonni.

4.5 Lasikolonni (300 mm × 10 mm), joka on varustettu lasisinterisuodattimella 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 alkalisissa 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 määrittävä 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 määrittämisessä.

▼ **M9**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 vesihauteeseen (80 °C) 5 minuutiksi. Annetaan jäähtyä huoneen lämpötilaan, jonka jälkeen lisätään 20 ml natriumkarbonaattiliuosta (3.15) ja sekoitetaan. Lisätään viipymättä 100 ml etyyliasetaattia (3.4) ja ravistellaan käsin voimakkaasti 15 sekunnin ajan. Tämän jälkeen putki sijoitetaan kolmeksi minuutiksi ultraäänihauteeseen (4.1) ja korkkia höllennetään. Sentrifugoidaan 2 minuuttia ja dekantoidaan etyyliasetaattifaasi lasikuitusuodattimen (4.6) läpi 500 ml:n erotussuppiloon. Toistetaan näytteen 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. Juoksutetaan 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 (3.4) kanssa.

Siirretään vesikerros kvantitatiivisesti 250 ml:n pyörökolviin ja heitetään orgaaninen faasi pois. Haihdutetaan pyörivällä kalvohaihduttimella (4.2) kaikki etyyliasetaattijäämät happoliuoksesta. Vesihauteen lämpötila saa olla enintään 40 °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) lasikolonneihin (4.5). Lisätään pieni lasivillatuppo hartsikerroksen päälle. Juoksutetaan metanoli kolonnista ja pestään hartsi 100 ml:lla vettä ja pysäytetään virtaus, kun neste yltää hartsikerroksen yläosaan. Annetaan kolonnin stabiloitua 10 minuuttia ennen sen käyttöä. Kolonnin ei saa koskaan antaa kuivua.

5.3.2 *Näytteen puhdistaminen*

Siirretään uute (5.2) kvantitatiivisesti valmistetun Amberlite-kolonnin (5.3.1) yläosaan, eluoidaan ja heitetään eluaatti pois. Eluointinopeus saa olla enintään 20 ml minuutissa. Huuhdellaan pyörökolvi 20 ml:lla kloorivetyhappoa (3.17) ja käytetään tätä liuosta hartsikolonnin pesemiseen. Poistetaan happoliuosjäämä ilmapirralla. Heitetään pesuliuokset pois. Lisätään kolonneihin 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 vesihauteen lämpötila on enintään 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.

▼ M95.4 *HPLC-määritys*5.4.1 *Muuttujat*

Seuraavat edellytykset ovat ohjeellisia; muita määritysolosuhteita voidaan käyttää sillä edellytyksellä, että niillä saadaan vastaavat tulokset.

Nestekromatografiakoloni (4.4.1)

HPLC:n liikkuva faasi (3.21)

Virtausnopeus: 1,5–2 ml/min

Detektioaallonpituus: 243 nm

Injektioilavuus: 40–100 µl.

Kromatografijärjestelmän stabiilisuus on tarkistettava injektioimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.6.2), jonka pitoisuus on 3,0 µg/ml, kunnes piikkien korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat eivät muutu.

5.4.2 *Kalibrointikäyrä*

Injektoidaan jokaista kalibrointiliuosta (3.6.2) useita kertoja ja mitataan piikkien korkeudet (pinta-alat) jokaiselle pitoisuudelle. Piirretään kalibrointikäyrä 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 kalibrointiliuoksille ja määritetään halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6. **Tulosten laskeminen**

Määritetään näyteliuoksen pitoisuus (µg/ml) näyteliuoksen halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-alan) 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 *Tutkittavan aineen tunnistaminen*

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmistaa yhteiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla voidaan verrata näyteuutteen ja 6,0 µg/ml halofuginonia 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.

▼ M9

Ainoastaan halofuginonipiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä halofuginonia että näyteliuoksen laimeneminen. Piikin leveys puolivälissä enimmäiskorkeutta on oltava ± 10 prosenttia alkuperäisestä leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimäärittäminen

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määritetyissä rajoissa. Diodirivimäärittäyksessä se on yleensä ± 2 nm;
- välillä 225–300 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajettujen näyte- ja standardispektrien eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden kahden spektrin välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 prosenttia standardina olevan tutkittavan aineen absorbanssista;
- välillä 225–300 nm näyteliuksesta ajettujen spektrien piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa spektrien välinen poikkeama ei ole suurempi kuin 15 prosenttia huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärittäyksen välinen ero samasta näytteestä saa olla enintään 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 prosenttia.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Laboratorioiden välisessä tutkimuksessa ⁽¹⁾ analysoitiin kolme näytettä kahdeksassa laboratoriossa.

Tulokset

	Näyte A (nollanäyte) Vastaanotettaessa	Näyte B (jauhona)		Näyte C (rakeina)	
		Vastaanotettaessa	2 kuukauden kuluttua	Vastaanotettaessa	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

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

▼ M9

	Näyte A (nollanäyte) Vastaanotettaessa	Näyte B (jauhona)		Näyte C (rakeina)	
		Vastaanotettaessa	2 kuukauden kuluttua	Vastaanotettaessa	2 kuukauden kuluttua
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = ei havaittu

S_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = usittavuuden variaatiokerroin, %

Rec. = saanto (%).

E. ROBENIDIININ MÄÄRITTÄMINEN

1,3-bis[(4-klooribentsylideeni)amino]guanidiinihydrokloridi

Robenidiinipitoisuuden määrittäminen tehdään

— EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografia – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai

— korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen, kuten jäljempänä 1–8 kohdassa on kuvattu.

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää robenidiinin pitoisuus rehuissa. Määritysraja on 5 mg/kg.

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 Asetonitrili, HPLC-laatua vastaava.

3.4 Molekyyliseula

Tyyppiä 3A, 8–12 meshin helmiä (1,6–2,5 mm:n helmiä, kiteistä alumiinisilikaattia, huokosten halkaisija 0,3 mm).

3.5 Alumiinioksidi, hapan, aktiviteettiluokka I pylväskromatografiaa varten

▼ **M9**

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

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

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

Liuotetaan 3,55 g vedetöntä (tai 4,45 g dihydraattia tai 8,95 g dodekahydraattia) dinatriumvetyfosfaattia veteen (HPLC-laatua vastaava) litran mittapullossa, täytetään merkkiin asti ja sekoitetaan.

- 3.8 HPLC:n liikkuva faasi

Sekoitetaan seuraavat reagenssit:

650 ml asetonitriiliä (3.3),

250 ml vettä (HPLC-laatua vastaava),

50 ml kaliumdivetyfosfaattiliuosta (3.6),

50 ml dinatriumvetyfosfaattiliuosta (3.7).

Suodatetaan $0,22 \mu\text{m}$: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 $0,1 \text{ mg:n}$ tarkkuudella robenidiinin standardiyhdistettä (3.9). Liuotetaan happamoituun metanoliin (3.2) 100 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin asti samalla liuottimella ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään valolta suojattuna.

- 3.9.2 Robenidiinistandardin välimuotoliuos: $12 \mu\text{g/ml}$

Siirretään 10,0 ml standardikantaliuosta (3.9.1) 250 ml:n pulloon, täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.8) ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään valolta suojattuna.

- 3.9.3 Kalibrointiliuokset

Siirretään sarjassa 50 ml:n mittapulloihin 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ja 25,0 ml standardin välimuotoliuosta (3.9.2). Täytetään merkkiin asti liikkuvalla faasilla (3.8) ja sekoitetaan. Näiden liuosten robenidiinipitoisuudet ovat vastaavasti 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 ja $6,0 \mu\text{g/ml}$. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

- 3.10 Vesi, HPLC-laatua vastaava

4. Välineistö

- 4.1 Lasikolonne

Valmistettu ruskeasta lasista, varustettu hanalla ja säiliöllä, jonka tilavuus on noin 150 ml, sisähalkaisija 10–15 mm, pituus 250 mm.

▼ M9

- 4.2 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.
- 4.3 Pyörivä kalvohaihdutin.
- 4.4 Vaihtuva-aallonpituuksinen HPLC-laitteisto tai diodirividetektor, dektektioaallonpituusalue 250–400 nm.
- 4.4.1 Nestekromatografiakolonne: 300 mm x 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 molekyyliaseulaa (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 tuppolaasivillaa 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.

▼ **M9****5.3.2 Näytteen puhdistus**

Pipetoidaan kolonniin 5,0 ml valmistettua näyteuutetta (5.2). Annetaan pipetin kärjen levätä kolonnin seinää vasten ja liuoksen absorboitua alumiinioksidisiin. Eluoidaan robenidiini kolonnista 100 ml:lla metanolia (3.1) virtausnopeudella 2–3 ml/min ja kerätään eluaatti 250 ml:n pyörökolviin. Haihdutetaan metanoliliuos kuiviin alipaineessa pyöröhaihduttimessa (4.3) lämpötilan ollessa 40 °C. Liuotetaan jäännös uudelleen 3–4 ml:aan liikkuvaa faasia (3.8) ja siirretään kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon. Huuhdellaan pullo usealla 1–2 ml:n annoksella liikkuvaa faasia ja siirretään nämä huuhteluliukset mittapulloon. Täytetään merkkiin asti samalla liuottimella ja sekoitetaan. Suodatetaan näyte 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.7) läpi. Tämä liuos säilytetään HPLC-määrittystä (5.4) varten.

5.4 HPLC-määrittäminen**5.4.1 Muuttujat**

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

Nestekromatografiakolonne (4.4.1)

HPLC:n liikkuva faasi (3.8)

Virtausnopeus: 1,5–2 ml/min,

Detektioaallonpituus: 317 nm,

Injektioalavuus: 20–50 µl.

Kromatografisen järjestelmän stabiilisuus tarkastetaan injektoiden useamman kerran kalibrointiliuosta (3.9.3), jonka pitoisuus on 3,6 µg/ml, kunnes saadaan piikkejä, joiden korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.4.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan useita kertoja kutakin kalibrointiliuosta (3.9.3) ja mitataan kunkin pitoisuuden piikkien korkeudet (pinta-alat). Kalibrointikäyrä piirretään siten, että y-akselilla ovat kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot µg/ml.

5.4.3 Näyteliuos

Injektoidaan useita kertoja näyteuutetta (5.3.2) käyttäen samaa määrää kuin kalibrointiliuksille, ja määritetään 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:

▼ **M9**

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

jossa:

c = näyteliuoksen robenidiinipitoisuus, µg/ml,

m = näyte-erän paino grammoina.

7. Tulosten validointi

7.1 Tutkittavan aineen tunnistaminen

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmistaa yhteiskromatografialla tai diodirividetektorilla, joka mahdollistaa näyteuutteen ja 6 µg/ml robenidiinia sisältävän kalibrintiliuoksen (3.9.3) spektrien vertailun.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen lisätään sopiva määrä kalibrintiliuosta (3.9.3). Lisätyn robenidiinin määrän on vastattava näyteuutteessa olevan robenidiinin arvioitua määrää.

Ainoastaan robenidiinipiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimeneminen. Piikin leveys puolivälissä enimmäiskorkeutta on oltava noin 10 prosenttia sen alkuperäisestä leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektorimäärittäminen

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- a) kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorimäärittämisessä tämä on yleensä noin ± 2 nm;
- b) välillä 250–400 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajetut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden kahden spektrin välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 prosenttia standardina olevan tutkittavan aineen absorbanssista;
- c) välillä 250–400 nm näyteliuoksesta ajetut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa kohdissa spektrien välinen poikkeama ei ole suurempi kuin 15 prosenttia huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaisen, samasta näytteestä tehdyn määrittäksen tulosten välinen ero saa olla enintään 10 prosenttia suuremmasta tuloksesta, kun robenidiinipitoisuus on yli 15 mg/kg.

▼ **M9**7.3 *Saanto*

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 85 prosenttia.

8. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset**

EU:n laboratorioiden välisessä tarkastelussa 12 laboratoriota määritteli neljä jauhon tai rakeiden muodossa olevaa kani- ja siipikarjarehunäytettä. Kukin näyte määritettiin kaksi kertaa. Tulokset esitetään seuraavassa 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-kloorifenyyli-[2,6-dikloori-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triaziin-2-yyli)fenyyli]asetonitriili

Diklatsuriilipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografiassa – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) käyttäen ternaarigradiienttia ja UV-detektoria, kuten jäljempänä 1–9 kohdassa on kuvattu.

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä voidaan määrittää diklatsuriilin pitoisuus rehuseoksissa ja esiseoksissa ⁽¹⁾. Toteamisraja on 0,1 mg/kg ja määrittämisraja 0,5 mg/kg. Alhaisemmat määrittämisrajat ovat saavutettavissa, mutta käyttäjän on valittava ne.

2. **Periaate**

Sisäisen standardin lisäyksen jälkeen näyte uutetaan happamoidulla metanolilla. Osa rehunäytteen uutteesta puhdistetaan C18-kiinteäfaasi-uuttopylväällä. Diklatsuriili eluoidaan pylvästä happamoidun metanolin ja veden seoksella. Haihdutuksen jälkeen jäännös liuotetaan DMF-vesiseokseen. Esiseoksista saadut uutteen haihdutetaan ja jäännös

⁽¹⁾ Menetelmää voidaan soveltaa myös diklatsuriilin määrittämiseen rehuaeineissa.

▼ **M9**

liuotetaan DMF-vesiseokseen. Diklatsuriilipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) käyttäen ternaarigradiienttia 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: (+)-4-kloorifenyyli-[2,6-dikloori-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triaziin-2-yyli)-fenyyli]asetonitriili, jonka puhtaus on taattu.

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 enintään 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden ⁽¹⁾.

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 enintään 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.9 Sisäinen standardi: 2,6-dikloori- α -(4-kloorifenyyli)-4-(4,5-dihydro-3,5-diokso-1,2,4-triaziin-2-(3H)-yyli)- α -metyylibentseeniasetonitriili (metyylidiklatsuriili).

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 enintään 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 enintään 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) ultraäänihauuteessa (4.7), täytetään merkkiin asti DMF:llä ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy enintään 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

⁽¹⁾ Pidempi säilyvyys (yhteen vuoteen asti) voi olla mahdollinen, mutta kyseisen laboratorion on vahvistettava se.

▼ **M9**

3.10 Kalibrintiliuokset

3.10.1 Kalibrintiliuos, 1 µg/ml (diklatsuriilia)

Pipetoidaan 1,00 ml diklatsuriilin standardiliuosta (3.8.2) ja 2,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2) 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 17 ml DMF:ää (3.6), täytetään merkkiin asti vedellä (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.10.2 Kalibrintiliuos, 2 µg/ml (diklatsuriilia)

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 (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.10.3 Kalibrintiliuos, 3 µg/ml (diklatsuriilia)

Pipetoidaan 3,00 ml diklatsuriilin standardiliuosta (3.8.2) ja 2,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2) 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 15 ml DMF:ää (3.6), täytetään merkkiin asti vedellä (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.10.4 Kalibrintiliuos, 4 µg/ml (diklatsuriilia)

Pipetoidaan 4,00 ml diklatsuriilin standardiliuosta (3.8.2) ja 2,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2) 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 14 ml DMF:ää (3.6), täytetään merkkiin asti vedellä (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.10.5 Kalibrintiliuos, 5 µg/ml (diklatsuriilia)

Pipetoidaan 5,00 ml diklatsuriilin standardiliuosta (3.8.2) ja 2,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2) 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 13 ml DMF:ää (3.6), täytetään merkkiin asti vedellä (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

Huomautus: Kalibrintiliuokset (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4, ja 3.10.5) kattavat nykyistä protokollaa käytettäessä rehun diklatsuriilipitoisuudet 0,5–2,5 mg/kg.

3.11 C₁₈-kiinteäfaasiuuttopylväs, esim. Mega Bond Elut, koko: 20 ml, sorbentin paino: 5 000 mg (esikäsittely toimittajan ohjeiden mukaisesti)

3.12 Uuttoliuos: happamoitu metanoli

Pipetoidaan 5,0 ml kloorivetyhappoa (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).

▼ **M9****4. Välineistö**

- 4.1 Mekaaninen ravistelija.
- 4.2 Ternaarigradietti 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 diodirividetektori.
- 4.3 Pyörivä kalvohaihdutin.
- 4.4 Kalvosuodatin (esim. kemikaalinkestävä nailon), 0,45 µm.
- 4.5 Kertakäyttöruisku, 5 ml.
- 4.6 Tyhjiösuodatuslaite.
- 4.7 Ultraäänihaude.

5. Menettely**5.1 Yleistä****5.1.1 Nollarehu**

Nollanäyte on analysoitava, jotta varmistetaan, ettei se sisällä diklatsuriilia tai mittausta häiritseviä aineita. Nollanäytteen on oltava näytteen kaltainen, eikä siinä saa olla havaittavia määriä diklatsuriilia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe

Saanto on määrittävä 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 (5.2) siirtymistä.

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (katso 5.1.1), voidaan saantokoe suorittaa vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään suunnilleen näytteiden jo sisältämä määrä diklatsuriilia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto**5.2.1 Rehuseokset**

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 (3.1). Siirretään liuos uuttohylsyyn (3.11) ja imeetään liuos sen läpi vakuumilla (4.6). Pestään hylsy 25 ml:lla uuttoliuoksen (3.12) ja veden (3.1) seosta, 65 + 35 (V + V). Kerätyt fraktiot heitetään pois ja määrittävät 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 kertakäyttöruiskuun (4.5) asennetulla kalvosuodattimella (4.4). Tehdään HPLC-määrittys (5.3).

▼ **M9**

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-määritys (5.3).

5.3 *HPLC-määritys*

5.3.1 Muuttujat

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

— Nestekromatografiakolonne (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

— Injektio-tilavuus: 20 µl.

— Detektioaallonpituus: 280 nm

Kromatografiajärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektioimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.10.2), jonka konsentraatio on 2 µl/ml diklatsuriilia ja sisäistä standardia, kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat ovat vakiot.

5.3.2 Kalibrointiliuosten kromatografinen analyysi

Injektoidaan 20 µl kutakin kalibrointiliuosta (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) kaksi kertaa, tunnistetaan ja integroidaan diklatsuriilin ja sisäisen standardin piikit ja piirretään kalibrointikäyrä, jonka perustana on diklatsuriilin piikin korkeuden tai pinta-alan keskiarvon ja sisäisen standardin piikin korkeuden tai pinta-alan keskiarvon suhde verrattuna kalibrointiliuosten diklatsuriilipitoisuuteen (µg/ml).

5.3.3 Näyteliuosten kromatografinen analyysi

Injektoidaan 20 µl näyteliuosta (5.2.1 tai 5.2.2) kaksi kertaa ja määritetään diklatsuriilin ja sisäisen standardin piikkien korkeuksien tai pinta-alojen keskiarvot.

▼ **M9****6. Tulosten laskeminen****6.1 Rehuseokset**

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

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

jossa:

- Korkeus(d,s) on näyteliuoksen (5.2.1) diklatsuriilin piikin korkeus
- Pinta-ala(d,s) on näyteliuoksen (5.2.1) diklatsuriilin piikin pinta-ala
- Korkeus(i,s) on näyteliuoksen (5.2.1) sisäisen standardin piikin korkeus
- Pinta-ala(i,s) on näyteliuoksen (5.2.1) sisäisen standardin piikin pinta-ala
- b on 5.3.2 kohdan mukaisesti kalibrointiliuoksista (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) piirretyn kalibrointikäyrän leikkauspiste.
- a on 5.3.2 kohdan mukaisesti kalibrointiliuoksista (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) piirretyn kalibrointikäyrän kulmakerroin.
- m on näyte-erän massa grammoina.
- V = näyteutteen lopullinen tilavuus millilitroina 5.2.1 kohdan mukaisen uudelleen liuotuksen jälkeen (esim. 2,5 ml).

6.2 Esiseokset

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

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

jossa:

- Korkeus(d,s) on näyteliuoksen (5.2.2) diklatsuriilin piikin korkeus
- Pinta-ala(d,s) on näyteliuoksen (5.2.2) diklatsuriilin piikin pinta-ala
- Korkeus(i,s) on näyteliuoksen (5.2.2) sisäisen standardin piikin korkeus
- Pinta-ala(i,s) on näyteliuoksen (5.2.2) sisäisen standardin piikin pinta-ala
- b on 5.3.2 kohdan mukaisesti kalibrointiliuoksista (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) piirretyn kalibrointikäyrän leikkauspiste.
- a on 5.3.2 kohdan mukaisesti kalibrointiliuoksista (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ja 3.10.5) piirretyn kalibrointikäyrän kulmakerroin.
- m on näyte-erän massa grammoina.
- V = näyteutteen lopullinen tilavuus millilitroina 5.2.2 kohdan mukaisen uudelleen liuotuksen jälkeen (esim. 25 ml).
- p on diklatsuriilin nimellispitoisuus esiseoksessa, mg/kg.

▼ **M9****7. Tulosten validointi****7.1 Tutkittavan aineen tunnistaminen**

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla verrataan näyteuutteen (5.2.1 tai 5.2.2) ja kalibroitiliuoksen (3.10.2) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen (5.2.1 tai 5.2.2) lisätään sopiva määrä kalibroitiliuosta (3.10.2). 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 ± 10 prosenttia sellaisen näyteuutteen alkuperäisen diklatsuriilipiikin tai sisäisen standardin piikin leveydestä, johon ei ole tehty lisäystä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

- a) Kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti ± 2 nm.
- b) Välillä 230–320 nm kromatogrammin piikkien huipun kohdalla ajettut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 prosenttia standardianalyysin absorbanssista.
- c) Välillä 230–320 nm näyteuutteen ajettujen spektrien piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 prosenttia piikin huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä edellytyksistä ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Kahden erillisen määrittelyn välinen ero kahdesta osanäytteestä 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.

▼ M9

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 80 prosenttia.

8. Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

Laboratorioiden välillä järjestettiin kaksi vertailua. Ensimmäisen vertailun toteutti toinen laboratorioiden ryhmä vuonna 1994, ja siinä analysoitiin kaksi esiseosnäytettä (O 100, A 100) ja kolme siipikarjan täydennysrehunäytettä (L1, Z1, K1). Toiseen esiseosnäytteeseen sekoitettiin orgaanista materiaalia (O 100) ja toiseen epäorgaanista materiaalia (A 100). Teoreettinen pitoisuus on 100 mg diklatsuriilia kilogrammassa. Laboratorioita pyydettiin analysoimaan kukin näyte kerran tai kaksoismäärityksinä. (Tarkempia tietoja ensimmäisestä laboratorioiden välisestä tutkimuksesta saa julkaisusta Journal of AOAC International, Volume 77, n:o 6, 1994, s. 1359–1361.)

Toisessa laboratorioiden välisessä vertailussa analysoitiin kolme siipikarjan täydennysrehua, joiden diklatsuriilipitoisuudet olivat 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) ja nollanäyte (MAT 3). Tarkempia tietoja toisesta laboratorioiden välisestä tutkimuksesta saa Yhteisen tutkimuskeskuksen (JRC) teknisestä raportista (2016) ja julkaisusta Journal of AOAC International, Volume 102, n:o 2, 2019, s. 646–652. Näiden kahden laboratorioiden välisen tutkimuksen tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

	Näyte 1A 100	Näyte 2O 100	Näyte 3 L1	Näyte 4 Z1	Näyte 5 K1	Näyte 6 MAT 1	Näyte 7 MAT 2	Näyte 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Keskiarvo (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Nimellispitoisuus (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Viite (*)	Ensimmäinen tutkimus, vuodelta 1994	Ensimmäinen tutkimus, vuodelta 1994	Ensimmäinen tutkimus, vuodelta 1994	Ensimmäinen tutkimus, vuodelta 1994	Ensimmäinen tutkimus, vuodelta 1994	Toinen tutkimus, vuodelta 2015	Toinen tutkimus, vuodelta 2015	Toinen tutkimus, vuodelta 2015

L = laboratorioiden lukumäärä

n = yksittäisten arvojen lukumäärä

S_r = toistettavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin

S_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin

LOQ = määrittäysraja.

(*) Ensimmäinen tutkimus, vuodelta 1994: Journal of AOAC International, Volume 77, n:o 6, 1994, s. 1359–1361; Toinen tutkimus, vuodelta 2015: JRC:n tekninen raportti ”Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study” (2016).

▼ **M9****9. Yleiset huomautukset**

Diklatsuriilivasteen lineaarisuus on osoitettava etukäteen ao. konsentraatioalueilla.

Ainakin paljon rasvaa sisältävien rehuseosten (tässä yhteydessä yli 12 % rasvaa) diklatsuriilin määrittämisessä määritysmenetelmä voidaan korvata muilla HPLC-menetelmillä, esimerkiksi menetelmällä, joka perustuu korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan yhdessä massaspektrometriadietektion kanssa (HPLC-MS), edellyttäen, että vaihtoehtoisella menetelmällä on vastaavat suorituskäytännölliset ominaisuudet (saantoaste, toistettavuuden ja uusittavuuden tarkkuus).

G. LASALOSID-NATRIUMIN MÄÄRITTÄMINEN

Streptomyces lasaliensis -bakteerin tuottaman polyeetterimonokarbonsyilihapon natriumsuola

Lasalosid-natriumpitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografia – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määritysmenetelmällä, tai
- korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) spektrofotometridetektoria (fluoresenssidetektoria) käyttäen, kuten jäljempänä 1–8 kohdassa on kuvattu.

1. Tarkoitus ja soveltamisala

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

2. Periaate

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

3. Reagenssit

3.1 Kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4).

3.2 Ortofosforihappo, w (w/w) = 85 %.

3.3 Ortofosforihappoliuos, c = 20 %.

Laimennetaan 23,5 ml ortofosforihappoa (3.2) vedellä 100 ml:aan.

3.4 6-metyyli-2-heptyyliamiini (1,5-dimetyyliheksyyliamiini), w (w/w) = 99 %.

3.5 Metanoli, HPLC-laatu vastava.

3.6 Kloorivetyhappo, tiheys = 1,19 g/ml.

3.7 Fosfaattipuskuriliuos, c = 0,01 mol/l

Liutetaan 1,36 g kaliumdivetyfosfaattia (KH_2PO_4) (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 (3.3) avulla arvoon 4,0 ja laimennetaan vedellä (3.11) 1 000 ml:aan.

▼ M9**3.8 Happamoitu metanoli**

Pipetoidaan 5,0 ml kloorivetyhappoa (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, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (*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, liuotetaan 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. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.11 Vesi, HPLC-laatua vastaava.**4. Välineistö****4.1 Ultraäänihaude (tai ravisteleva vesihaude), jossa on lämpötilansäätö.****4.2 Kalvosuodattimia, 0,45 µm.****4.3 HPLC-laitteisto, jossa voidaan injektoida 20 µl:n näytteitä.****4.3.1 Nestekromatografiakolonni, 125 mm × 4 mm, käänteisfaasi C_{18} , hiukaskaskoko 5 µm, tai vastaava.****4.3.2 Spektrofluorimetri, jossa voidaan säätää eksitaatio- ja emissioaallonpituuudet.****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.

▼ **M9****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 (5.2) siirtymistä.

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 Utto**5.2.1 Rehut**

Punnitaan 5–10 g näytettä 0,01 gramman tarkkuudella 250 ml:n tulpalliseen erlenmeyerkolviin. Lisätään pipetillä 100,0 ml happamoitua metanolia (3.8). Suljetaan löyhästi tulpalla ja sekoitetaan kunnes näyte on liennut. Asetetaan pullo noin 40-asteiseen ultraäänihäuteeseen (4.1) 20 minuutiksi, otetaan pois ja jäädytetään huoneenlämpöiseksi. Annetaan laskeutua noin tunnin ajan ja suodatetaan määräosa 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 metanolia (3.8) ja sekoitetaan kunnes esiseos on liennut. Laitetaan pullo sisältöineen noin 40-asteiseen ultraäänihäuteeseen (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 määräosa 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.2) läpi sopivaan astiaan. Laimennetaan sopiva määrä kirkasta suodosta happamoidulla metanolilla (3.8) siten, että lopullisessa koeliuoksessa on 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 C₁₈, hiukkaskoko 5 µm, tai vastaava

Liikkuva faasi (3.9): Fosfaattipuskuriliuoksen (3.7) ja metanolin (3.5) seos, 5 + 95 (V + V)

Virtausnopeus: 1,2 ml/min

Mittausaallonpituudet: Eksitaatio: 310 nm

Emissio: 419 nm

Injektiotilavuus: 20 µl

▼ **M9**

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 kalibrointiliuksille 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 = näyteliuksen (5.2.1) lasalosid-natriumkonsentraatio (µg/ml),

V_1 = 5.2.1 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus millilitroina (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 = näyteliuksen (5.2.2) lasalosid-natriumkonsentraatio (µg/ml),

V_2 = 5.2.2 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus millilitroina (ts. 250 ml),

f = 5.2.2 kohdan mukainen laimennuskerroin,

m = näyte-erän paino (g).

▼ **M9****7. Tulosten validointi****7.1 Tutkittavan aineen tunnistaminen**

Spektrofotometriasta perustuviin menetelmiin 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 lasalosid-natriummäärän on oltava suunnilleen sama kuin näyteliuksesta määritetty lasalosid-natriummäärä. Ainoastaan lasalosid-natriumpiikin korkeus saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä lasalosid-natriumia että näyteliuksen laimeneminen. Piikin leveys puolivälissä korkeutta on oltava ± 10 prosenttia sellaisen näyteliuksen piikin leveydestä, johon ei ole tehty lisäystä.

7.2 Toistettavuus

Kahden rinnakkaismäärityksen välinen ero samasta näytteestä ei saa olla suurempi kuin

— 15 % suuremmasta tuloksesta, kun lasalosid-natriumpitoisuus on 30–100 mg/kg,

— 15 mg/kg, kun lasalosid-natriumpitoisuus on 100–200 mg/kg,

— 7,5 % suuremmasta tuloksesta, kun lasalosid-natriumpitoisuus on yli 200 mg/kg.

7.3 Saanto

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 80 prosenttia. Sellaisen esiseosnäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, saannon on oltava vähintään 90 prosenttia.

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 esitetään seuraavassa taulukossa.

	Näyte 1 Kananrehun esiseos	Näyte 2 Kalkkunanrehun esiseos	Näyte 3 Kalkkunanrehupelletit	Näyte 4 Kananrehurakeet	Näyte 5 Kalkkunanrehu	Näyte 6 Siipikarjanrehu A	Näyte 7 Siipikarjanrehu B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Keskiarvo [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s _r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV _r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s _R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV _R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70

▼ **M9**

	Näyte 1 Kananrehun esiseos	Näyte 2 Kalkkunanrehun esiseos	Näyte 3 Kalkkunanrehupelletit	Näyte 4 Kananrehura- keet	Näyte 5 Kalkkunanre- hu	Näyte 6 Siipikarjan- rehu A	Näyte 7 Siipikarjan- rehu B
Nimellispitoisuus [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L = laboratorioiden lukumäärä

n = yksittäisten tulosten lukumäärä

s_r = toistettavuuden keskihajonta

s_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.

(*) Analyst, 1995, 120, s. 2175–2180

(**) Valmistajan ilmoittama pitoisuus

(+) Laboratoriossa valmistettu rehu.

H. AMPROLIUMHYDROKLORIDIN MÄÄRITYS

1 [(4-amino-2-propyyli-5-pyrimidinyyli)metyyli]-2-metyylipyridiniumkloridihydrokloridi

1. Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää amproliumin pitoisuus rehuissa. Toteamisraja on 1 mg/kg ja määrittäysraja 5 mg/kg.

2. Periaate

Näyte uutetaan metanoli-vesiseoksella. Uute laimennetaan liikkuvalla faasilla, suodatetaan kalvosuodattimella, ja amprolium määritetään korkean erotuskyvyn kationinvaihtonestekromatografialla (HPLC) ja UV-detektorilla.

3. Reagenssit

3.1 Metanoli.

3.2 Asetonitriili, HPLC-laatua vastaava.

3.3 Vesi, HPLC-laatua vastaava.

3.4 Natriumdivetyfosfaattiliuos, c = 0,1 mol/l.

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

3.5 Natriumperkloraaattiliuos, c = 1,6 mol/l.

Liutetaan 224,74 g natriumperkloraaattimonohydraattia 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).

Asetonitriiliin (3.2), natriumdivetyfosfaattiliuoksen (3.4) ja natriumperkloraaattiliuoksen (3.5) seos, 450 + 450 + 100 (v + v + v). Suodatetaan ennen käyttöä 0,22 µm:n kalvosuodattimella (4.3) ja poistetaan kaasut (esim. ultraäänihäuteessa (4.4) vähintään 15 min).

3.7 Standardiyhdiste: puhdas amprolium, 1-[(4-amino-2-propyyli-5-pyrimidinyyli)metyyli]-2-metyylipyridiniumkloridihydrokloridi, E 750 (katso 9.2 kohta).

▼ M9**3.7.1 Amproliumstandardin kantaliuos, 500 µg/ml**

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

3.7.2 Amproliumstandardin välimuotoliuos, 50 µg/ml

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

3.7.3 Kalibrointiliuokset

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

3.8 Uuttoliuos

Metanoli (3.1) -vesiseos 2 + 1 (v + v).

4. Välineistö**4.1 HPLC-laitteisto, jossa voidaan injektoida 100 µl:n näytteitä.****4.1.1 Nestekromatografiakolonne, 125 mm × 4 mm, kationinvaihtaja Nucleosil 10 SA, hiukkaskoko 5 µm tai 10 µm, tai vastaava.****4.1.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektor tai diodirividetektor.****4.2 Kalvosuodatin, PTFE:tä, 0,45 µm.****4.3 Kalvosuodatin, 0,22 µm.****4.4 Ultraäänihaude.****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 (5.2) siirtymistä.

▼ **M9**

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 tunnin 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-määritys (5.3).

5.2.2 *Esiseokset (amproliumpitoisuus ≥ 1 %)*

Punnitaan 0,001 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-määritys (5.3).

5.3 *HPLC-määritys*5.3.1 *Muuttujat:*

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

Nestekromatografia-kolonne (4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationinvaihtaja Nucleosil 10 SA, hiukaskoko 5 tai 10 µm, tai vastaava
-------------------------------------	---

Liikkuva faasi (3.6):	Asetonitriliin (3.2), natrium-divetyfosfaattiliuoksen (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 stabiilisuus tarkistetaan injektioimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.7.3), jonka konsentraatio on 1,0 µg/ml, kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.3.2 *Kalibrointikäyrä*

Injektoidaan kutakin kalibrointiliuosta (3.7.3) useita kertoja ja lasketaan kutakin konsentraatiota vastaavat piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrointikäyrä siten, että y-akselilla ovat kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot (µg/ml).

▼ **M9**

5.3.3 Näyteliuos

Injektoidaan näyteliuosta (5.2) useita kertoja käyttäen samaa injektioilavuutta kuin kalibrointiliuksille ja määritetään amproliumpiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen amproliumkonsentraatio (µg/ml) lasketaan piikkien korkeuksien (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (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 Tutkittavan aineen tunnistaminen

Tutkittavan aineen tunnistaminen voidaan varmentaa yhteiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla verrataan näyteuutteen (5.2) ja 2,0 µg/ml sisältävän kalibrointiliuoksen (3.7.3) spektrejä.

7.1.1 Yhteiskromatografia

Näyteuutteeeseen (5.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.7.3). Lisätyn amproliumin määrän on oltava samaa suuruusluokkaa kuin näyteuutteessa todettu amproliumin määrä.

Ainoastaan amproliumin piikki saa kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimennus. Piikin leveys puolivälissä piikin korkeutta on oltava ± 10 prosenttia sellaisen näyteuutteen alkuperäisen amproliumpiikin leveydestä, johon ei ole tehty lisäystä.

7.1.2 Diodirividetektorimäärittäminen

Tulokset arvioidaan seuraavien arviointiperusteiden mukaisesti:

a) Kromatogrammin piikkien huipusta mitattujen näyte- ja standardispektrien maksimiabsorption aallonpituuksien on oltava samat ilmaisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorilla tämä on tyypillisesti ± 2 nm.

b) 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 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 prosenttia standardianalyysin absorbanssista.

▼ **M9**

- c) Välillä 210–320 nm näyteuutteesta saadut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10–100 prosenttia. Tämä edellytys täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 prosenttia 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 tuloksesta, kun amproliumpitoisuus on 25–500 mg/kg,
- 75 mg/kg, kun amproliumpitoisuus on 500–1 000 mg/kg,
- 7,5 % suuremmasta tuloksesta, kun amproliumpitoisuus on yli 1 000 mg/kg.

7.3 *Saanto*

Sellaisen nollanäytteen saannon, johon on lisätty määritettävää ainetta, on oltava vähintään 90 prosenttia.

8. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset**

Eri laboratorioissa analysoitiin kolme siipikarjan rehua (näytteet 1–3), yksi kivennäisrehu (näyte 4) ja yksi esiseos (näyte 5). Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

	näyte 1(nollarehu)	näyte 2	näyte 3	näyte 4	näyte 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
keskiarvo [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
nimellispitoisuus [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: laboratorioiden lukumäärä

n: yksittäisten arvojen lukumäärä

s_r: toistettavuuden keskihajonta

CV_r: toistettavuuden variaatiokerroin

s_R: uusittavuuden keskihajonta

CV_R: uusittavuuden variaatiokerroin.

▼ M9**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 prosenttia liikkuvan faasin (3.6) asetoni-triiliosuudesta metanolilla.
- 9.2 British Pharmacopoeian mukaan kloorivetyhappoon ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) tehdyn amproliumliuoksen ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) spektrissä on maksimit aallonpituuksilla 246 nm ja 262 nm. Absorbanssin on saavutettava arvo 0,84 aallonpituudella 246 nm ja 0,80 aallonpituudella 262 nm.
- 9.3 Uute on aina laimennettava liikkuvalla faasilla, koska muuten amproliumpiikin retentioaika voi muuttua merkittävästi ionivahvuuden muutumisen johdosta.

I. NARASIININ MÄÄRITYS

Narasiinipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografialla – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN ISO 14183 -standardin (Rehut. Monensiinin, narasiinin ja salinomysiinin pitoisuuksien määrittäminen. Nestekromatografinen menetelmä käyttäen kolonnin jälkeistä derivointia) mukaisella menetelmällä.

J. NIKARBATSIININ MÄÄRITYS

Nikarbatsiinipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografialla – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN 15782 -standardin (Rehut. Nikarbatsiinin määrittäminen. Nestekaasukromatografimenetelmä) mukaisella menetelmällä.

K. DEKOKINAATIN MÄÄRITYS

Dekokinaattipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografialla – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN 16162 -standardin (Rehut. Dekokinaatin määrittäminen nestekromatografisesti fluoresenssilla toteamalla) mukaisella menetelmällä.

▼ **M9****L. MONENSIININ MÄÄRITYS**

Monensiinipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografia – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN ISO 14183 -standardin (Rehut. Monensiinin, narasiinin ja salinomysiinin pitoisuuksien määrittäminen. Nestekromatografinen menetelmä käyttäen kolonnin jälkeistä derivointia) mukaisella menetelmällä.

M. SALINOMYSIININ MÄÄRITYS

Salinomysiinipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografia – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN ISO 14183 -standardin (Rehut. Monensiinin, narasiinin ja salinomysiinin pitoisuuksien määrittäminen. Nestekromatografinen menetelmä käyttäen kolonnin jälkeistä derivointia) mukaisella menetelmällä.

N. SEMDURAMISIININ MÄÄRITYS

Semduramisiinipitoisuuden määrittäminen tehdään

- EN 17299 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Lisäainepitoisuustasolla sekä 1 %:n ja 3 %:n ristikontaminaatiotasolla olevien sallittujen kokkidiostaattien ja alle lisäainepitoisuustasolla olevien ei-rekisteröityjen kokkidiostaattien ja yksittäisen antibiootin seulonta ja määrittäminen rehuseoksesta suuren erotuskyvyn nestekromatografia – tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS)) mukaisella määrittämenetelmällä, tai
- EN 16158 -standardin (Rehut. Semduramisiinipitoisuuden määrittäminen. Nestekromatografinen menetelmä käyttäen puuanalyysiä) mukaisella menetelmällä.

O. EN-STANDARDIT

Seuraavat EN-standardit ovat merkityksellisiä sovellettaessa asetuksen (EU) 2017/625 34 artiklan 2 kohdan a alakohtaa:

EN ISO 30024 Rehut. Fytaasiaktiivisuuden määrittäminen

EN 17050 (Animal feeding stuffs – methods of sampling and analysis – Determination of iodine in animal feed by ICP-MS), joka koskee jodin määrittäystä rehusta ICP-MS:llä

EN 17550 (Animal feeding stuffs: Determination of carotenoids in animal compound feed and premixtures by high performance liquid chromatography – UV detection (HPLC-UV)), joka koskee karotenoidien määrittäystä rehuseoksista ja esiseoksista käyttäen korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa ja UV-detektiota (HPLC-UV)

EN 15784 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Detection and enumeration of *Bacillus* spp), joka koskee *Bacillus* spp -bakteerin havaitsemista ja määrittäystä rehusta

▼ **M9**

EN 15785 Rehut. *Bifidobacterium* -suvun bakteerien eristäminen ja määrittäminen

EN 15786 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Detection and enumeration of *Pediococcus* spp), joka koskee *Pediococcus* spp -bakteerin havaitsemista ja määrittäystä rehusta

EN 15787 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Detection and enumeration of *Lactobacillus* spp. used as feed additive), joka koskee rehun lisäaineena käytettävän *Lactobacillus* spp -bakteerin havaitsemista ja määrittäystä

EN 15788 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Detection and enumeration of *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. used as feed additive), joka koskee rehun lisäaineena käytettävän *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. -bakteerin havaitsemista ja määrittäystä

EN 15789 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* used as feed additive), joka koskee rehun lisäaineena käytettävän *Saccharomyces cerevisiae* -mikro-organismien havaitsemista ja määrittäystä

EN 15510 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, and lead by ICP-AES), joka koskee kalsiumin, natriumin, fosforin, magnesiumin, kaliumin, raudan, sinkin, kuparin, mangaanin, koboltin, molybdeenin ja lyijyn määrittäystä rehusta ICP-AES:llä, (rehun lisäaineiden koboltti ja molybdeeni määrittäystä varten)

EN 15621 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES), joka koskee kalsiumin, natriumin, fosforin, magnesiumin, kaliumin, rikin, raudan, sinkin, kuparin, mangaanin ja koboltin määrittäystä rehusta ICP-AES:llä painehajoituksen jälkeen, (rehun lisäaineiden koboltti määrittäystä varten)

EN 16159 Rehut. Seleenin määrittäminen mikroaaltolahotuksen (hajottaminen 65-prosenttisella typpihapolla ja 30-prosenttisellä vetyperoksidilla) jälkeen atomiabsorptiospektrometri-vety menetelmällä (HGAAS), (rehun lisäaineiden seleeni määrittäystä varten)

EN 17053: Rehut: Näytteenotto ja analysointi. Hivenaineiden, raskasmetallien ja muiden vastaavien alkuaineiden määrittäminen rehusta ICP-MS:llä (multimenetelmä) (rehun lisäaineiden koboltti, molybdeeni ja seleeni määrittäystä varten)

▼ M9

LIITE V

**REHUIEN SISÄLTÄMIEN HAITALLISTEN AINEIDEN
VALVONNASSA KÄYTETTÄVÄT MÄÄRITYSMENETELMÄT**

**A. DIOKSIINIEN (PCDD/PCDF) JA PCB-YHDISTEIDEN PITOISUUKSIEN
MÄÄRITTÄMINEN**

I LUKU

**NÄYTTEENOTTOMENETELMÄT JA MÄÄRITYSTULOSTEN
TULKINTA**

1. Soveltamisala ja määritelmät

Rehussa olevien polykloorattujen dibentso-para-dioksiinien (PCDD-yhdisteiden), polykloorattujen dibentsofuraanien (PCDF-yhdisteiden), dioksiinien kaltaisten polykloorattujen bifenyyliden (PCB-yhdisteiden) ⁽¹⁾ ja muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien viralliseen tarkastukseen tarkoitetut näytteet on otettava liitteessä I vahvistettujen säännösten mukaisesti. Rehuun tasaisesti jakautuneiden aineiden tai tuotteiden valvontaan on sovellettava liitteessä I olevassa 5.1 kohdassa vahvistettuja määriä koskevia vaatimuksia. Tällä tavoin saatujen kokoomanäytteiden katsotaan edustavan eriä tai osaa, joista ne on otettu. Laboratorionäytteistä määritettyjen pitoisuuksien perusteella arvioidaan, noudattavatko tutkittavat erät niitä enimmäismääriä, jotka on vahvistettu direktiivissä 2002/32/EY.

⁽¹⁾ PCDD-yhdisteiden, PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden toksisuusekvivalenssikertoimia (Toxic Equivalency Factor, TEF) koskeva taulukko: Ihmisille aiheutuvan riskin arvioinnissa käytettävät WHO:n toksisuusekvivalenssikertoimet (TEF) perustuvat Genevessä kesäkuussa 2005 pidetyn Maailman terveysjärjestön (WHO) asiantuntijakokouksen päätelmiin (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Kongeneeri	TEF-arvo	Kongeneeri	TEF-arvo
Dibentso-p-dioksiinit (PCDD:t) ja dibentso-p-furaanit (PCDF:t)		Dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteetEi-orto-PCB-yhdisteet + mono-orto-PCB-yhdisteet	
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	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto-PCB-yhdisteet	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Käytetyt lyhenteet: T = tetra; Pe = penta; Hx = heksa; Hp = hepta; O = okta; CDD = klooridibentsodiksiini; CDF = klooridibentsofuraani; CB = klooribifenyli.

▼ M9

Tässä osassa sovelletaan komission täytäntöönpanoasetuksen (EU) 2021/808 ⁽²⁾ liitteessä I vahvistettuja määritelmiä.

Kyseisten määritelmien lisäksi tässä osassa sovelletaan seuraavia määritelmiä:

”Seulontamenetelmillä” tarkoitetaan niiden näytteiden valitsemista, joissa PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet ylittävät enimmäismäärät tai toimintarajat. Seulontamenetelmien on mahdollistettava suuri näytteenkäsittelykapasiteetti, joka on kustannustehokas ja parantaa mahdollisuutta havaita uusia tapauksia, joihin liittyy merkittäviä altistumis- ja terveysriskejä kuluttajien kannalta. Seulontamenetelmien on perustuttava bioanalyttisiin tai GC-MS-menetelmiin. Enimmäismäärän noudattamisen tarkastamiseksi otetuista cut-off-arvon ylittävistä näytteistä saadut tulokset on tarkistettava tekemällä alkuperäisestä näytteestä täydellinen uusi analyysi varmistusmenetelmää käyttämällä.

”Varmistusmenetelmillä” tarkoitetaan menetelmiä, joilla saadaan täydelliset tiedot tai lisätietoja, joiden avulla PCDD/PCDF-yhdisteet ja dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet voidaan tunnistaa ja määrittää yksiselitteisesti enimmäistasolla tai tarvittaessa toimintarajalla. Tällaisia varmistusmenetelmiä ovat korkean erotuskyvyn kaasukromatografia/korkean erotuskyvyn massaspektrometria (GC-HRMS) tai kaasukromatografia/tandem-massaspektrometria (GC-MS/MS).

2. Erän tai osanerän enimmäismäärää koskevien vaatimusten mukaisuus

2.1 Muut kuin dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet

Erä tai osanerä on enimmäismäärän mukainen, jos PCB 28:n, PCB 52:n, PCB 101:n, PCB 138:n, PCB 153:n ja PCB 180:n, jäljempänä ”muut kuin dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet”, summaa koskeva määrittäytulos ei ylitä direktiivissä 2002/32/EY vahvistettua enimmäismäärää, kun otetaan huomioon laajennettu mittausepävarmuus ⁽³⁾. Erä tai osanerä ei ole direktiivissä 2002/32/EY vahvistetun enimmäismäärän mukainen, jos rinnakkaismäärittäytksellä ⁽⁴⁾ saatujen kahden suurimman määrittäytuloskeskiarvo ⁽⁵⁾ ylittää enimmäismäärän selvästi, kun otetaan huomioon laajennettu mittausepävarmuus, toisin sanoen vaatimustenmukaisuuden arvioinnissa käytetään määritettyä pitoisuutta, josta on vähennetty laajennettu mittausepävarmuus.

⁽²⁾ Komission täytäntöönpanoasetus (EU) 2021/808, annettu 22 päivänä maaliskuuta 2021, elintarviketuotantoläimissä käytettyjen farmakologisesti vaikuttavien aineiden jäämien määrittäytmenetelmien suorituskyvystä ja tulosten tulkinnasta sekä näytteenottomenetelmistä ja päätösten 2002/657/EY ja 98/179/EY kumoamisesta (EUVL L 180, 21.5.2021, s. 84).

⁽³⁾ Tarvittaessa on noudatettava asiakirjassa ”Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) kuvattuja periaatteita.

⁽⁴⁾ Rinnakkaismäärittäyt: tarkasteltavien analyttien erillinen määrittäytminen käyttäen toista osaa samasta homogenoidusta näytteestä. Yleisesti sovelletaan liitteessä II olevan C luvun 3 kohdassa vahvistettuja rinnakkaismäärittäytstä koskevia vaatimuksia. Kuitenkin menetelmissä, joissa käytetään ¹³C-leimattua sisäistä standardia asianomaisten analyttien osalta, rinnakkaismäärittäyt on tarpeen ainoastaan, jos ensimmäisen määrittäytksen tulos ei ole vaatimustenmukainen. Rinnakkaismäärittäyt on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikontaminaatio tai näytteiden sekoittuminen vahingossa. Jos määrittäyt suoritetaan kontaminaatiotapauksen yhteydessä, varmistus rinnakkaismäärittäytksellä voidaan jättää tekemättä, mikäli määrittäytseen valitut näytteet liittyvät jäljitettävyyden perusteella kontaminaatiotapaukseen ja havaittu määrä ylittää huomattavasti enimmäismäärän.

⁽⁵⁾ Suurimmat arvot: kunkin määrittäytmättä jääneen kongeneerin arvon oletetaan olevan määrittäytserajaa vastaava arvo. Pienimmät arvot: kunkin määrittäytmättä jääneen kongeneerin arvon oletetaan olevan nolla. Väliarvot: kunkin määrittäytmättä jääneen kongeneerin arvon oletetaan olevan puolet määrittäytserajaa vastaavasta arvosta.

▼ **M9**

Laajennettu mittausepävarmuus lasketaan käyttäen kattavuuskerrointa 2, jolloin luottamustaso on noin 95 prosenttia. Erä tai osaerä ei ole vaatimustenmukainen, jos mitattujen arvojen keskiarvo, josta on vähennetty keskiarvon laajennettu mittausepävarmuus, ylittää enimmäismäärän.

Edellä tässä kohdassa mainittuja sääntöjä sovelletaan virallista valvontaa varten otettujen näytteiden määrittystuloksiin. Toista asiantuntijalausuntoa tai vertaamista varten suoritettaviin määrittäksiin sovelletaan kansallisia sääntöjä.

2.2 *PCDD/PCDF-yhdisteet ja dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet*

Erä tai osaerä on enimmäismäärän mukainen, jos tulos yhdestä analyysistä,

- joka on suoritettu seulontamenetelmällä, jossa väärien vaatimustenmukaisten tulosten osuus on alle 5 prosenttia, osoittaa, ettei pitoisuus ylitä enimmäismäärää, joka on vahvistettu direktiivissä 2002/32/EY PCDD/PCDF-yhdisteille sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle,
- joka on suoritettu varmistusmenetelmällä, ei ylitä enimmäismäärää, joka on vahvistettu direktiivissä 2002/32/EY PCDD/PCDF-yhdisteille sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle, kun otetaan huomioon laajennettu mittausepävarmuus.

Seulontamäärittysten osalta on vahvistettava cut-off-arvo sen määrittämiseksi, noudattaako näyte niitä enimmäismääriä, jotka on vahvistettu joko PCDD/PCDF-yhdisteille tai PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle.

Erä tai osaerä ei ole direktiivissä 2002/32/EY vahvistetun enimmäismäärän mukainen, jos varmistusmenetelmää käyttäen rinnakkaismäärittelyksellä ⁽⁶⁾ saatujen kahden suurimman määrittystuloksen keskiarvo ⁽⁷⁾ ylittää enimmäismäärän selvästi, kun otetaan huomioon laajennettu mittausepävarmuus, toisin sanoen vaatimustenmukaisuuden arvioinnissa käytetään määritettyä pitoisuutta, josta on vähennetty laajennettu mittausepävarmuus.

Laajennettu mittausepävarmuus lasketaan käyttäen kattavuuskerrointa 2, jolloin luottamustaso on noin 95 prosenttia. Erä tai osaerä ei ole vaatimustenmukainen, jos mitattujen arvojen keskiarvo, josta on vähennetty keskiarvon laajennettu mittausepävarmuus, ylittää enimmäismäärän.

⁽⁶⁾ Yleisesti sovelletaan liitteessä II olevan C luvun 3 kohdassa vahvistettuja rinnakkaismäärittästä koskevia vaatimuksia. Kuitenkin varmistusmenetelmissä, joissa käytetään ¹³C-leimattua sisäistä standardia asianomaisten analyttien osalta, rinnakkaismäärittäminen on tarpeen ainoastaan, jos ensimmäisen määrittelyn tulos ei ole vaatimustenmukainen. Rinnakkaismäärittäminen on tarpeen, jotta voidaan sulkea pois mahdollinen sisäinen ristikon-taminaatio tai näytteiden sekoittuminen vahingossa. Jos määrittäminen suoritetaan kontami-naatiotapauksen yhteydessä, varmistus rinnakkaismäärittelyksellä voidaan jättää tekemättä, mikäli määrittäminen valitut näytteet liittyvät jäljitettävyyden perusteella kontaminaatiota-paukseen ja havaittu määrä ylittää huomattavasti enimmäismäärän.

⁽⁷⁾ Suurimmat arvot: toksisuusekvivalenttia TEQ laskettaessa oletetaan kunkin määrittämättä jääneen kongeneerin arvoksi määrittämissä vastaava arvo. Pienimmät arvot: TEQ:ta laskettaessa oletetaan kunkin määrittämissä jääneen kongeneerin arvoksi nolla. Väliarvot: TEQ:ta laskettaessa oletetaan kunkin määrittämissä jääneen kongeneerin arvoksi puolet määrittämissä vastaavasta arvosta.

▼ M9

PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden erillisten määrittystulosten yhteenlaskettua arvioitua laajennettua epävarmuutta on käytettävä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien summana.

Edellä tässä kohdassa mainittuja sääntöjä sovelletaan virallista valvontaa varten otettujen näytteiden määrittystuloksiin. Oikeussuojaa ja vertaamista varten suoritettaviin määrittäisiin sovelletaan kansallisia sääntöjä.

3. **Tulokset, jotka ylittävät direktiivin 2002/32/EY liitteessä II vahvistetut toimintarajat**

Toimintarajojen avulla voidaan valita näytteet niissä tapauksissa, joissa on tarpeen tunnistaa saastumisen lähde ja toteuttaa toimia sen vähentämiseksi tai poistamiseksi. Seulontamenetelmillä määritetään tarkoituksenmukaiset cut-off-arvot näiden näytteiden valitsemiseksi. Jos lähteen tunnistamiseksi ja saastumisen vähentämiseksi tai poistamiseksi tarvitaan huomattavia ponnistuksia, toimintarajan ylittyminen on aiheellista vahvistaa rinnakkaismäärittämisellä käyttäen varmistusmenetelmää ja ottaen huomioon laajennettu mittausepävarmuus ⁽⁸⁾.

II LUKU

NÄYTTEIDEN VALMISTUS JA VAATIMUKSET, JOTKA REHUSSA OLEVIENT DIOKSIINIEN (PCDD/PCDF) JA DIOKSIINIEN KALTAISTEN PCB-YHDISTEIDEN PITOISUUKSIEN VIRALLISESSA VALVONNASSA KÄYTETTYJEN MÄÄRITYSMENETELMIEN ON TÄYTETTÄVÄ

1. **Soveltamisala**

Tässä luvussa vahvistettuja vaatimuksia on sovellettava analysoitaessa rehua 2,3,7,8-substituoitujen polykloorattujen dibentso-para-dioksiinien (PCDD:t) ja polykloorattujen dibentsofuraanien (PCDF:t) ja dioksiinien kaltaisten polykloorattujen bifenyyliden (dioksiinien kaltaiset PCB:t) pitoisuuksien virallista valvontaa varten ja kun on kyse näytteiden valmistuksesta ja määrittämisvaatimuksista muita sääntelytarkeitua varten, mihin kuuluu myös rehualan toimijan suorittama valvonta Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 183/2005 ⁽⁹⁾ säännösten mukaisuuden varmistamiseksi.

PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden esiintymistä rehussa voidaan valvoa kahdella erityyppisellä määrittämismenetelmällä:

a) *Seulontamenetelmät*

Seulontamenetelmillä pyritään valitsemaan ne näytteet, joissa PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet ylittävät enimmäismäärät tai toimintarajat. Seulontamenetelmien on varmistettava suuri näytteenkäsittelykapasiteetti, joka on kustannustehokas ja parantaa mahdollisuutta havaita uusia tapauksia, joihin liittyy merkittäviä altistumis- ja terveysriskejä kuluttajien kannalta. Niiden soveltamisen tavoitteena on oltava väärin vaatimustenmukaisten tulosten välttäminen. Niihin voi kuulua bioanalyttisiä menetelmiä ja GC-MS-menetelmiä.

Seulontamenetelmät perustuvat määrittäystuloksen ja cut-off-arvon keskinäiseen vertailuun ja antavat myönteisen tai kielteisen viitteen siitä, ylittyykö enimmäismäärä tai toimintaraja. PCDD/PCDF-pitoisuus sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summa näytteissä, joiden epäillään olevan enimmäismäärää koskevien vaatimusten vastaisia, on määritettävä tai vahvistettava varmistusmenetelmän avulla.

Lisäksi seulontamenetelmät voivat antaa viitteen PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksista näytteessä. Sovellettaessa bioanalyttisiä seulontamenetelmiä tulos ilmaistaan bioanalyttisinä ekvivalentteina (BEQ), kun taas sovellettaessa fysikaalis-kemiallisia GC-MS-menetelmiä se ilmaistaan

⁽⁸⁾ Toimintarajojen tarkistukseen liittyvään rinnakkaismäärittäykseen sovelletaan samoja kriteerejä ja vaatimuksia kuin enimmäismääriin, ks. alaviite 5.

⁽⁹⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 183/2005, annettu 12 päivänä tammikuuta 2005, rehuhygieniaa koskevista vaatimuksista (EUVL L 35, 8.2.2005, s. 1).

▼ **M9**

toksisuusekvivalentteina (TEQ). Seulontamenetelmien numeerisesti ilmoitetut tulokset soveltuvat vaatimustenmukaisuuden, epäillyn vaatimustenvastaisuuden tai toimintarajojen ylittymisen osoittamiseen, ja ne antavat viitteen pitoisuuksien vaihteluvälistä, kun suoritetaan jatko-toimia varmistusmenetelmin. Ne eivät sovellu esimerkiksi taustapitoisuustasojen arvioimiseen, saannin arvioimiseen, pitoisuuksien kehityssuuntausten seuraamiseen tai toimintarajojen ja enimmäismäärien uudelleenarviointiin.

b) *Varmistusmenetelmät*

Varmistusmenetelmät mahdollistavat näytteessä esiintyvien PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden yksiselitteisen tunnistamisen ja määrittämisen ja antavat täydelliset tiedot yksittäisten kongeneerien tasolla. Sen vuoksi kyseisten menetelmien avulla voidaan valvoa enimmäismääriä ja toimintarajoja sekä vahvistaa seulontamenetelmillä saadut tulokset. Lisäksi tuloksia voidaan käyttää muihin tarkoituksiin, kuten matalien taustapitoisuustasojen määrittämiseen rehuvalvonnassa, kehityssuuntausten seuraamiseen, väestön altistumisen arvioimiseen ja tietokannan luomiseen enimmäismäärien ja toimintarajojen mahdollista uudelleenarviointia varten. Ne ovat merkittäviä myös kongeneerijakauman määrittämisessä, jotta mahdolliset saastumislähteet voidaan kartoittaa. Tällaiset menetelmät ovat GC-HRMS-menetelmiä. Sen vahvistamiseksi, noudattaako näyte enimmäismäärää koskevia vaatimuksia, voidaan käyttää myös GC-MS/MS-menetelmää.

2. **Tausta**

TEQ-pitoisuudet lasketaan siten, että tietyssä näytteessä olevien yksittäisten aineiden pitoisuudet kerrotaan kunkin aineen toksisuusekvivalenssikertoimella (TEF) (ks. I luvussa oleva alaviite 1) ja saadut määrät lasketaan yhteen, jolloin tulokseksi saadaan dioksiinien kaltaisten yhdisteiden kokonaispitoisuus toksisuusekvivalentteina ilmaistuna.

Tässä A osassa yksittäisen kongeneerin hyväksytyllä määritysrajalla tarkoitetaan matalinta analyytin pitoisuutta, joka voidaan mitata koh-tuullisella tilastollisella varmuudella ja joka täyttää tunnistamista koskevat kriteerit, jotka on kuvattu kansainvälisesti tunnustetuissa standardeissa, esimerkiksi standardissa EN 16215:2012 (Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS), joka koskee dioksiinien ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden määrittämistä rehuissa käyttäen GC-HRMS:ää ja indikaattori-PCB-yhdisteiden määrittämistä käyttäen GC-HRMS:ää, ja/tai tarkistetuissa EPA-menetelmissä 1613 ja 1668.

Yksittäisen kongeneerin hyväksytty määritysraja voi olla

- a) se näytenäytteessä olevan analyytin pitoisuus, joka tuottaa kahdelle mitattavalle ionille mittalaitteessa vasteen, jossa vähemmän herkän raakadatasignaalin signaali-kohinasuhde on 3:1; tai
- b) jos signaali-kohinasuhteen laskelma ei teknisistä syistä tuota luotettavia tuloksia, kalibrointikäyrällä oleva alin pitoisuus, joka antaa hyväksyttävän ($\leq 30\%$) ja johdonmukaisen (mitattuna vähintään näytesarjan alusta ja lopusta) poikkeaman keskimääräisestä suhteellisesta vastekertoimesta, joka on laskettu kalibrointikäyrän kaikille pisteille kussakin näytesarjassa. Määritysraja (LOQ) lasketaan alimmasta pitoisuudesta ottaen huomioon sisäisten standardien saannot ja näytteen määrä.

▼ **M9**

Bioanalyttisillä seulontamenetelmillä ei saada tuloksia kongeneeritasolla, vaan ainoastaan viite ⁽¹⁰⁾ TEQ-tasosta BEQ-arvona ilmaistuna sen vuoksi, että kaikki testivasteen tuottavassa näyteuutteessa olevat yhdisteet eivät täytä kaikkia TEQ-periaatteen vaatimuksia.

Seulonta- ja varmistusmenetelmiä voidaan käyttää tietyn matriisin tarkastuksessa ainoastaan, jos menetelmät ovat riittävät herkkiä ja kykenevät luotettavasti havaitsemaan määrät toimintarajalla tai enimmäismäärällä.

3. **Laadunvarmistusta koskevat vaatimukset**

- 3.1 On toimittava ristikontaminaation välttämiseksi kussakin näytteenoton ja analyysin vaiheessa.
- 3.2 Näytteet on varastoitava ja kuljetettava varastointiin soveltuvissa lasista, alumiinista, polypropyleenistä tai polyetyleenistä valmistetuissa säiliöissä, jotka eivät vaikuta PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksiin näytteissä. Paperipölyjäämät on poistettava näytesäiliöstä.
- 3.3 Näytteiden varastointi ja kuljetus on järjestettävä niin, että rehunäyte pysyy koskemattomana.
- 3.4 Jokainen laboratorionäyte jauhetaan tarvittaessa hienoksi ja sekoitetaan huolellisesti käyttäen menetelmää, jonka on osoitettu homogenoivan näytteen täydellisesti (esim. hienonnus 1 mm:n siivilän läpäiseviksi hiukkasiksi). Liian kosteat näytteet on kuivattava ennen hienontamista.
- 3.5 Reagenssit, lasitavarat ja laitteet on tarkistettava sen varalta, että ne voivat osaltaan vaikuttaa TEQ- ja BEQ-arvoihin perustuviin tuloksiin.
- 3.6 On suoritettava ilman näytettä tehtävä nolla-analyysi, jossa käydään läpi kaikki analyysin vaiheet.
- 3.7 Bioanalyttisten menetelmien osalta määrityksessä käytettävät lasitavarat ja liuottimet on testattava sen toteamiseksi, ettei niissä ole yhdisteitä, jotka voivat häiritä kohdeyhdisteiden havaitsemista mittausalueella. Lasitavarat on huuhdeltava liuottimilla tai kuumennettava lämpötiloihin, jotka soveltuvat PCDD/PCDF-yhdisteiden, dioksiinien kaltaisten yhdisteiden ja lasitavaroiden pinnalta peräisin olevien häiriöitä aiheuttavien yhdisteiden poistamiseen.
- 3.8 Uttamisessa käytettävän näytteen määrän on oltava riittävä, jotta täytetään vaatimukset, jotka koskevat riittävän matalaa mittausaluetta, joka käsittää enimmäismäärien tai toimintarajojen suuruiset pitoisuudet.
- 3.9 Tarkasteltavien tuotteiden yhteydessä käytettäviin näytteiden valmistusmenettelyihin on sovellettava kansainvälisesti hyväksyttyjä suuntaviivoja (ts. EN ISO 6498).

⁽¹⁰⁾ Bioanalyttiset menetelmät eivät kohdistu suoraan TEF-järjestelmään sisältyviin kongeneereihin. Näyteuutteessa voi olla muita rakenteellisesti samankaltaisia AhR-aktiivisia yhdisteitä, jotka vaikuttavat kokonaisvasteeseen. Sen vuoksi bioanalyttisillä menetelmillä saadut tulokset eivät ole arvio näytteen TEQ-arvosta vaan viite siitä.

▼ **M9****4. Laboratorioita koskevat vaatimukset**

4.1 Asetuksen (EU) 2017/625 säännösten mukaisesti laboratorioden on oltava ISO/IEC-opiaan 58 mukaisesti toimivan tunnustetun laitoksen hyväksymiä, millä varmistetaan, että laboratoriot soveltavat analyttistä laadunvarmistusta. Laboratorioden hyväksyntä on tehtävä EN ISO/IEC 17025 -standardin mukaisesti. PCDD/PCDF- ja PCB-yhdisteiden analyysin mittausepävarmuuden ja määritysrajojen arviointia koskevissa teknisissä ohjeissa ⁽¹¹⁾ kuvattuja periaatteita on noudatettava.

4.2 Laboratorion pätevyys osoitetaan sen osallistumisella jatkuvasti hyvin tuloksin laboratorioden välisiin tutkimuksiin, jotka koskevat PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden määrittämistä asianmukaisissa rehumatriiseissa ja pitoisuusalueilla.

4.3 Seulontamenetelmiä näytteiden rutiinitarkastuksissa käyttävien laboratorioden on tehtävä tiivistä yhteistyötä varmistusmenetelmää käyttävien laboratorioden kanssa laadunvalvonnan ja vaatimustenvastaisiksi epäilyjen näytteiden määrittäytuloksen varmistuksen osalta.

5. Perusvaatimukset dioksiinien (PCDD/PCDF) ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden määrittämenettelylle**5.1 Matala mittausalue ja määritysrajat**

Koska osa PCDD/PCDF-yhdisteistä on erittäin toksisia, ne on pystyttävä havaitsemaan jo femtogrammoina (10^{-15} g) ilmaistavan alueen ylemmillä arvoilla. Useimpien PCB-kongeneerien osalta määritysrajaksi riittää nanogrammoina (10^{-9} g) ilmaistava alue. Toksisempien dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden (erityisesti non-orto-substituoitujen yhdisteiden) mittauksessa mittausalueen ala-arvojen on oltava pikogrammoina (10^{-12} g) ilmaistavan alueen alimpia arvoja. Kaikkien muiden PCB-yhdisteiden osalta määritysrajaksi riittää nanogrammoina (10^{-9} g) ilmaistava alue.

5.2 Hyvä selektiivisyys (spesifisyys)

5.2.1 PCDD/PCDF-yhdisteet sekä dioksiinien kaltaiset PCB-yhdisteet on voitava erottaa lukuisista muista uuttamisessa mukana tulevista ja mahdollisesti häiriöitä aiheuttavista yhdisteistä, joiden pitoisuudet voivat olla moninkertaisia verrattuna tarkasteltavien analyttien pitoisuuksiin. GC-MS-menetelmissä on pystyttävä erottelemaan eri kongeneerit, kuten toksiset kongeneerit (esim. seitsemäntoista 2,3,7,8-substituoitua PCDD/PCDF-yhdistettä ja kaksitoista dioksiinien kaltaista PCB-yhdistettä) muista kongeneereista.

5.2.2 Bioanalyttisten menetelmien on kyettävä havaitsemaan kohdeyhdisteet PCDD/PCDF-yhdisteiden ja/tai dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summana. Näytteen puhdistamisella pyritään poistamaan yhdisteet, jotka voivat aiheuttaa vääriä vaatimustenvastaisia tuloksia, tai yhdisteet, jotka voivat heikentää vastetta ja johtaa vääriin vaatimustenmukaisiin tuloksiin.

⁽¹¹⁾ "Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry" [https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf], "Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

▼ M9

5.3 *Hyvä tarkkuus (oikeellisuus ja täsmällisyys, biotestin korjattu saanto)*

5.3.1 GC-MS-menetelmien osalta määrittämisessä on pystyttävä antamaan pätevä arvio aineen todellisesta pitoisuudesta näytteessä. Hyvä tarkkuus on välttämätön, jotta voidaan välttää näytteen määrittystuloksen hylkääminen sen perusteella, että määritetyn TEQ-arvon luotettavuus on heikko. 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).

5.3.2 Bioanalyttisten menetelmien osalta on määritettävä biotestin korjattu saanto. Biotestin korjatulla saannolla tarkoitetaan BEQ-arvoa, joka on laskettu TCDD:n tai PCB 126:n kalibrintikäyrästä korjattuna nollanäytteen suhteen ja sen jälkeen jaettu varmistusmenetelmällä määritetyllä TEQ-arvolla. Sillä pyritään korjaamaan sellaisia tekijöitä kuin PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten yhdisteiden hävikkä uuttamis- ja puhdistusvaiheissa, sellaisten mukana uuttuneiden yhdisteiden vaikutusta, jotka voivat voimistaa tai heikentää vastetta (agonistiset ja antagonistiset vaikutukset), käyrän sovituksen laatua tai TEF-arvojen ja suhteellisen voimakkuuden (REP) arvojen välisiä eroja. Biotestin korjattu saanto lasketaan soveltuvista vertailunäytteistä, joissa on edustava kongeneerijakauma lähellä merkittävänä pidettyä tasoa olevissa pitoisuuksissa.

5.4 *Validointi enimmäispitoisuusalueella ja yleiset laadunvalvontatoimet*

5.4.1 Laboratorioiden on osoitettava menetelmän suorituskyky enimmäispitoisuuksilla, esimerkiksi $0,5 \times$, $1 \times$ ja $2 \times$ enimmäismäärä, ja rinnakkaismittausten hajonnan on oltava hyväksyttävä validointimenettelyn ja rutiinianalyysin aikana.

5.4.2 Sisäistä laadunvalvontaa varten on analysoitava säännöllisesti nollanäytteitä ja näytteitä, joihin on lisätty analyttia, tai kontrollinäytteitä (mieluiten sertifioiduilla vertailuaineilla, jos niitä on saatavilla). Nollanäytteiden, näytteiden, joihin on lisätty analyttia, tai kontrollinäytteiden tulokset on kirjattava laadunvalvontakortteihin. Tulosten avulla on varmistettava, että määrittämenetelmien suorituskyky täyttää vaatimukset.

5.5 *Määrittäysraja*

5.5.1 Määrittäysrajan (LOQ) vahvistaminen ei ole bioanalyttisessä seulontamenetelmässä välttämätöntä, mutta menetelmällä on pystyttävä erottamaan toisistaan nolla- ja cut-off-arvo. BEQ-arvon ilmoittamista varten on vahvistettava raportointipitoisuus, jotta voidaan käsitellä näytteitä, joiden vaste alittaa tätä pitoisuutta vastaavan vasteen. On osoitettava, että raportointipitoisuus eroaa vähintään kertoimella kolme sellaisen nollanäytteen pitoisuudesta, jonka vaste on mittausalueen alarajan alapuolella. Siksi se lasketaan näytteistä, jotka sisältävät kohdeyhdisteitä noin vaaditun vähimmäispitoisuuden verran, eikä signaali-kohinasuhteesta tai nollamäärittämisestä.

5.5.2 Varmistusmenetelmän määrittäysrajan (LOQ) on oltava noin yksi viidesosa enimmäismäärästä.

5.6 *Analyttiset vaatimukset*

Varmistus- tai seulontamenetelmistä saatujen luotettavien tulosten osalta TEQ- tai BEQ-arvon on täytettävä seuraavat vaatimukset enimmäismäärillä, määritettiin ne sitten TEQ-kokonaisarvoina tai BEQ-kokonaisarvoina (eli PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summana) tai erikseen PCDD/PCDF-yhdisteille ja dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille:

▼ **M9**

	Seulonta bioanalyyttisin tai fysikaalis-kemiallisin menetelmin	Varmistusmenetelmät
Väärin vaatimustenmukaisien tulosten osuus (*)	< 5 %	
Oikeellisuus		–20 % – +20 %
Toistettavuus (RSD _r)	< 20 %	
Kohtalainen tarkkuus (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) enimmäismäärien osalta.

5.7 Seulontamenetelmiä koskevat erityisvaatimukset

5.7.1 Seulontaan voidaan käyttää sekä GC-MS-menetelmiä että bioanalyyttisiä menetelmiä. GC-MS-menetelmien on täytettävä 6 kohdassa esitetyt vaatimukset. Solupohjaisten bioanalyyttisten menetelmien erityisvaatimukset esitetään 7 kohdassa.

5.7.2 Seulontamenetelmiä näytteiden rutiinitarkastuksissa käyttävien laboratorioiden on tehtävä tiivistä yhteistyötä varmistusmenetelmää käyttävien laboratorioiden kanssa.

5.7.3 Seulontamenetelmän suorituskyky on tarkistettava rutiinianalyysin aikana analyyttisellä laadunvalvonnalla ja menetelmän jatkuvalla validoinnilla. Vaatimustenmukaisia tuloksia on valvottava jatkuvalla ohjelmalla.

5.7.4 Soluvasteen mahdollinen vaimentuminen ja sytotoksisuus on tarkistettava:

Rutiiniseurannassa 20 prosenttia näyteuutteista mitataan sekä siten, että niihin on lisätty enimmäismäärää tai toimintarajaa vastaava pitoisuus 2,3,7,8-TCDD-yhdistettä, että lisäämättä kyseistä yhdistettä, millä tarkistetaan, vaimentavatko näyteuutteessa olevat häiritsevät yhdisteet mahdollisesti määritysmenetelmän vastetta. Mitattua lisäysnäytteen pitoisuutta verrataan sellaisen näytteen pitoisuuden, johon ei ole lisätty analyyttiä, ja lisätyn pitoisuuden summaan. Jos tämä mitattu pitoisuus on enemmän kuin 25 prosenttia matalampi kuin laskettu pitoisuuksien summa, se on indikaatio mahdollisesta signaalin vaimentumisesta, jolloin kyseiselle näytteelle on tehtävä GC-HRMS-varmistusanalyysi. Tuloksia seurataan laadunvalvontakorteilla.

5.7.5 Vaatimustenmukaisten näytteiden laadunvalvonta:

Noin 2–10 prosenttia vaatimustenmukaisista näytteistä on varmistettava GC-HRMS-analyysillä näytematriisista ja laboratoriosta saadun kokeuksen mukaan.

5.7.6 Väärin vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden määrittäminen laadunvalvontatiedoista:

Enimmäismäärän tai toimintarajan ylittävien ja alittavien väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuus näytteiden seulonnassa on määritettävä. Todellisten väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuuden on oltava alle 5 prosenttia. Kun vaatimustenmukaisten näytteiden laadunvalvonnasta on saatavissa vähintään 20 vahvistettua tulosta matriisia tai matriisiryhmää kohti, väärin vaatimustenmukaisten näytteiden osuutta koskevat johtopäätökset on tehtävä kyseisestä tietokannasta. Väärin

▼ **M9**

vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden arviointia varten tarvittavaan 20 tuloksen vähimmäismäärään voidaan sisällyttää myös vertailutes-teissä tai kontaminaatiotapausten yhteydessä analysoitujen näytteiden ne tulokset, joissa pitoisuudet ovat enimmillään esim. $2 \times$ enimmäis-määrä. Näytteiden on katettava eri näytelähteitä edustavat yleisimmät kongeneerijakaumat.

Vaikka seulontamäärittelyissä on mieluiten pyrittävä havaitsemaan toi-mintarajan ylittävät näytteet, väärin vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden määrittämisen kriteerinä on enimmäistaso, kun otetaan huomi-oon laajennettu mittausepävarmuus varmistusmenetelmässä.

- 5.7.7 Seulonnan mahdollisesti vaatimustenvastaiset tulokset on aina tarkistet-tava tekemällä alkuperäisestä näytteestä täydellinen uusi analyysi var-mistusmenetelmällä. Näitä näytteitä voidaan myös käyttää väärin vaa-timustenvastaisten tulosten osuuden arvioimiseen. Seulontamenetelmien osalta väärin vaatimustenvastaisten tulosten osuuden muodostavat ne tulokset, joiden on varmistusmenetelmällä vahvistettu olevan vaatimus-tenmukaisia, vaikka edeltävän seulonnan perusteella näytteen on ilmoi-tettu olevan mahdollisesti vaatimustenvastainen. Seulontamenetelmän hyötyjen arvioinnin on perustuttava siihen, että väärin vaatimustenvas-taisten näytteiden määrää verrataan tarkistettujen näytteiden kokonais-määrään. Tämän osuuden pitää olla niin pieni, että seulontavälineen käytöstä on hyötyä.

- 5.7.8 Bioanalyttisten menetelmien on validointiolosuhteissa tuotettava pä-tevä indikaatio TEQ-tasosta, laskettuna ja ilmaistuna BEQ-arvona.

Bioanalyttisten menetelmien laboratorionsisäisen RSD_r :n tulisi toiste-uisissa olosuhteissa tyypillisesti olla pienempi kuin uusittavuus (RSD_R).

6. Seulonnassa tai varmistuksessa käytettäviä GC-MS-menetelmiä koskevat erityisvaatimukset

- 6.1 *WHO-TEQ-tulosten suurimman ja pienimmän arvon hyväksyttävät erot*

Enimmäismäärän tai tarvittaessa toimintarajojen ylityksen varmistuk-essa suurimman ja pienimmän arvon ero saa olla enintään 20 prosent-tia.

- 6.2 *Saantojen valvonta*

- 6.2.1 Määrittämenetelmän validoimiseksi on aiivan menetelmän alussa eli esimerkiksi ennen uuttamista lisättävä ^{13}C -leimattuja 2,3,7,8-kloo-risubstituoituja sisäisiä PCDD/PCDF-standardeja ja ^{13}C -leimattuja di-oksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden sisäisiä standardeja. On lisättävä vähintään yhtä kongeneeria kutakin tetra-oktakloorattua PCDD/PCDF-homologiryhmää kohden ja vähintään yhtä kongeneeria kutakin dioksi-iinien kaltaisten PCB-yhdisteiden homologiryhmää kohden (tai vaihtoeh-toisesti vähintään yhtä kongeneeria kutakin PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden valvonnassa käytettyä massas-pektrometrillä määritettyä ionia kohden). Varmistusmenetelmien yhtey-dessä on käytettävä kaikkia 17:ää ^{13}C -leimattua 2,3,7,8-kloorisubstitu-oitua sisäistä PCDD/PCDF-standardia ja kaikkia 12:ta ^{13}C -leimattua dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden sisäistä standardia.

▼ **M9**

6.2.2 Suhteelliset vastekertoimet on asianmukaista kalibrointiliuosta käyttäen määritettävä myös niille kongeneereille, joiden osalta ei lisätä ¹³C-leimattua analogia.

6.2.3 Kasvipärisistä rehuista ja alle 10 prosenttia rasvaa sisältävistä eläinperäisistä rehuista otettuihin näytteisiin on lisättävä sisäiset standardit ennen uuttamista. Yli 10 prosenttia rasvaa sisältävistä eläinperäisistä rehuista otettuihin näytteisiin ne on lisättävä joko ennen uuttamista tai rasvojen uuttamisen jälkeen. Uuttamisen tehokkuus on validoitava asianmukaisesti sen mukaan, missä vaiheessa sisäiset standardit lisätään.

6.2.4 Ennen GC-MS-analyysia on lisättävä 1 tai 2 saantostandardia.

6.2.5 Saantojen valvonta on välttämätöntä. Varmistusmenetelmissä yksittäisten sisäisten standardien saantojen on oltava 60–120 prosenttia. Yksittäisten kongeneerien pienemmät tai suuremmat saantoarvot voidaan hyväksyä erityisesti joidenkin hepta- ja oktakloorattujen dibentso-paara-dioksiinien ja dibentsofuraanien osalta edellyttäen, että niiden vaikutus TEQ-arvoon on enintään 10 prosenttia TEQ-arvon kokonaismäärästä (perustana PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summa). GC-MS-seulontamenetelmissä saantojen on oltava 30–140 prosenttia.

6.3 Häiritsevien aineiden poistaminen

— PCDD/PCDF-yhdisteet on erotettava häiriöitä aiheuttavista klooratuista yhdisteistä – esimerkiksi muista kuin dioksiinien kaltaisista PCB-yhdisteistä ja klooratuista bifenyylieettereistä – soveltuvilla kromatografiatekniikoilla (mieluiten florisil-, alumiinioksidi- ja/tai hiilikolonneilla).

— Isomeerien erotuksen kaasukromatografian avulla on oltava < 25 prosentin laakso 1,2,3,4,7,8-HxCDF:n ja 1,2,3,6,7,8-HxCDF:n välillä.

6.4 Kalibrointi standardikäyrän avulla

Kalibrointikäyrän vaihteluvälin laajuuden on oltava riittävä kattaakseen enimmäismäärien tai toimintarajojen relevantin vaihteluvälin.

6.5 Varmistusmenetelmiä koskevat erityisvaatimukset

— GC-HRMS:

HRMS-menetelmässä erotuskyvyn on yleensä oltava koko massa-alueella suurempi kuin 10 000 käyttäen 10 prosentin laakson määritelmää.

Tunnistamista ja varmistamista koskevien lisäkritereiden, jotka on kuvattu kansainvälisesti tunnistetussa standardissa, esim. standardissa EN 16215:2012 (Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS) ja/tai tarkistetuissa EPA-menetelmissä 1613 ja 1668, täyttyminen.

— GC-MS/MS:

▼ M9

Vähintään kahden spesifisen prekursori-ionin valvonta, joista kummallakin on spesifinen vastaava siirtymätuoteioni kaikilla leimailla ja leimaamattomilla analyyteillä tutkittavalla alueella.

Suhteellisten ioni-intensiteettien suurin sallittu toleranssi ± 15 prosenttia valituilla siirtymätuoteioneilla verrattuna laskettuihin tai mitattuihin arvoihin (kalibrointistandardien keskiarvo) identtissä MS/MS-olosuhteissa, etenkin törmäysenergian ja törmäyskaasupaineen suhteen, kullakin analyytin siirtymällä.

Kunkin kvadrupolin erotuskyky asetetaan vähintään yhtä suureksi tai paremmaksi kuin yksikkömassaresoluutio (yksikkömassaresoluutio: riittävä resoluutio kahden vierekkäisillä kokonaisilla massaluvuilla olevan piikin erottumiseksi) tarkasteltavana oleviin analyytteihin mahdollisesti kohdistuvien häiriöiden minimoimiseksi.

Lisäkritereiden, jotka on kuvattu kansainvälisesti tunnistetussa standardissa, esim. standardissa EN 16215:2012 (Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS) ja/tai tarkistetuissa EPA-menetelmissä 1613 ja 1668, täytyminen, lukuun ottamatta velvoitetta käyttää GC-HRMS-menetelmää.

7. Bioanalyttisiä menetelmiä koskevat erityisvaatimukset

Bioanalyttiset menetelmät ovat menetelmiä, jotka perustuvat biologisiin periaatteisiin, esimerkiksi solupohjaiset määritykset, reseptorimääritykset tai immunomääritykset. Tässä kohdassa vahvistetaan bioanalyttisiä menetelmiä koskevat yleiset vaatimukset.

Seulontamenetelmän perusteella periaatteessa luokitellaan, onko näyte vaatimusten mukainen vai epäilläänkö, ettei se täytä vaatimuksia. Laskettua BEQ-arvoa verrataan tätä varten cut-off-arvoon (ks. 7.3 kohta). Jos näytteen arvo on alle cut-off-arvon, sitä pidetään vaatimustenmukaisena. Jos näytteen arvo on yhtä suuri tai suurempi kuin raja-arvo, näytteen epäillään olevan vaatimusten vastainen, ja sille on tehtävä analyysi varmistusmenetelmällä. Käytännössä cut-off-arvona voidaan pitää BEQ-arvoa, joka on kaksi kolmasosaa enimmäismäärästä, edellyttäen, että väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuus jää alle 5 prosentin ja että väärin vaatimustenvastaisten tulosten osuus on hyväksyttävä. Koska PCDD/PCDF-yhdisteillä sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalla on erilliset enimmäismäärät, näytteiden vaatimustenmukaisuuden tarkistaminen ilman fraktiointislausta edellyttää, että PCDD/PCDF-yhdisteillä on tarkoituksenmukaiset cut-off-arvot biotestejä varten. Toimintarajat ylittävien näytteiden tarkastuksen yhteydessä cut-off-arvoksi soveltuu tarkoituksenmukainen prosenttiosuus kustakin toimintarajasta.

Jos indikatiivinen määrä on ilmaistu BEQ-arvona, näytteiden on sisällyttävä mittausalueelle ja ylitettävä raportointiraja (ks. 7.1.1 ja 7.1.6 kohta).

7.1 Testivasteen arviointi

7.1.1 Yleiset vaatimukset

— Laskettaessa pitoisuuksia TCDD-kalibrointikäyrän avulla käyrän yläpäässä olevissa arvoissa on suurta vaihtelua (korkea variaatio-kerroin, jäljempänä ”CV”). Mittausalue on alue, jossa tämä CV on alle 15 prosenttia. Mittausalueen ala-arvo (raportointiraja) on asetettava nollanäytettä korkeammaksi soveltamalla vähintään kerronta kolme. Mittausalueen yläarvo esitetään yleensä EC₇₀-arvona

▼ **M9**

(70 % vaikuttavan pitoisuuden enimmäismäärästä), mutta se on matalampi, jos CV on suurempi kuin 15 prosenttia tällä vaihteluvälillä. Mittausalue on määritettävä validoinnin aikana. Cut-off-arvojen (ks. 7.3 kohta) on oltava selvästi mittausalueen sisällä.

- Standardiliuokset ja näyteuutteet on testattava kolmena tai vähintään kahtena rinnakkaismäärityksenä. Rinnakkaismäärityksiä käytettäessä mikrotitrauslevyn eri osista valituissa 4–6 kuopassa testatun standardiliuoksen tai varmistusuutteen on tuotettava vaste tai pitoisuus (mahdollinen vain mittausalueella), jossa $CV < 15$ prosenttia.

7.1.2 Kalibrointi

7.1.2.1 Kalibrointi standardikäyrän avulla

- Näytteissä olevat pitoisuudet on arvioitava vertaamalla testivasetta TCDD:n (tai PCB 126:n tai PCDD:n/PCDF:n/dioksiinien kaltaisen PCB:n standardiseoksen) kalibrointikäyrään ja laskemalla sen perusteella BEQ-arvo uutteesta ja sitä kautta näytteessä.

- Kalibrointikäyriin on sisällyttävä 8–12 pitoisuutta (ainakin rinnakkaismäärityksinä) siten, että käyrän alapäässä on riittävästi pitoisuuksia (mittausalue). Erityistä huomiota on kiinnitettävä käyrän sovituksen mittausalueella. R^2 -arvolla sellaisenaan on vain vähäinen tai olematon arvo arvioitaessa epälineaarisen regression sovituksista. Parempi sovitus saadaan aikaan minimoimalla laskettujen ja havaittujen määrien välinen ero mittausalueella, esimerkiksi minimoimalla neliön korotettujen jäämien summa.

- Seuraavaksi näyteuutteen arvioitu pitoisuus on korjattava matriisi- tai liuotin-nollanäytteelle lasketun BEQ-arvon (jotta otetaan huomioon epäpuhtaudet käytetyistä liuottimista ja kemikaaleista) ja korjatun saannon perusteella (lasketaan sellaisten soveltuvien vertailunäytteiden BEQ-arvosta, joissa on edustava kongeneerijakauma lähellä enimmäismäärää tai toimintarajaa olevilla pitoisuuksilla). Jotta saanto voidaan korjata, korjatun saannon on oltava vaadittavan vaihteluvälin sisällä (ks. 7.1.4 kohta). Saannon korjaamisessa käytettävien vertailunäytteiden on täytettävä 7.2 kohdassa esitetyt vaatimukset.

7.1.2.2 Kalibrointi vertailunäytteiden avulla

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kalibrointikäyrää, joka on tuotettu vähintään neljän vertailunäytteen avulla (ks. 7.2.4 kohta): yksi matriisinolla ja kolme vertailunäytettä, joiden pitoisuudet ovat $0,5 \times$, $1 \times$ ja $2 \times$ enimmäismäärä tai toimintaraja, jolloin nollanäytettä ja saantoa ei tarvitse korjata, jos vertailunäytteiden matriisin ominaisuudet ovat samat kuin tuntemattomien näytteiden. Tällöin testivaste, joka vastaa kaksi kolmasosaa enimmäismäärästä (ks. 7.3 kohta), voidaan laskea suoraan näistä näytteistä ja sitä voidaan käyttää cut-off-arvona. Toimintaratajat ylittävien näytteiden tarkastuksen yhteydessä cut-off-arvoksi soveltuu tarkoituksenmukainen prosenttiosuus kustakin toimintarajasta.

▼ M9

7.1.3 PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden erillinen määrittäminen

Uutteet voidaan jakaa PCDD/PCDF-yhdisteitä ja dioksiinien kaltaisia PCB-yhdisteitä sisältäviin fraktioihin, jotta PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden TEQ-arvot (BEQ:ina) voidaan ilmoittaa erillisinä. Dioksiinien kaltaisia PCB-yhdisteitä sisältävän fraktion tulosten arvioinnissa olisi käytettävä PCB 126:n standardilla tuotettua kalibrointikäyrää.

7.1.4 Biotestien korjatut saannot

”Biotestin korjattu saanto” on laskettava soveltuvista vertailunäytteistä, joissa kongeneerijakauma on lähellä enimmäismäärää tai toimintarajaa, ja se ilmaistaan prosenttiosuutena BEQ-arvosta verrattuna TEQ-arvoon. Sen mukaan, minkä tyyppistä testiä ja TEF-arvoa ⁽¹²⁾ käytetään, dioksiinien kaltaisiin PCB-yhdisteisiin sovellettavien TEF- ja REP-kertoimien väliset erot voivat johtaa siihen, että dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden korjatut saannot ovat matalia PCDD/PCDF-yhdisteisiin verrattuna. Jos PCDD/PCDF-yhdisteille ja dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille tehdään erillinen määrittäminen, biotestien korjatut saannot ovat sen vuoksi seuraavat: dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille 20–60 prosenttia ja PCDD/PCDF-yhdisteille 50–130 prosenttia (vaihteluvälejä sovelletaan TCDD:n kalibrointikäyrään). Koska dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden vaikutus PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summaan voi vaihdella eri matriisien ja näytteiden välillä, biotestin korjatut saannot PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summan osalta heijastavat näitä vaihteluvälejä ja niiden on oltava 30–130 prosenttia. Jos unionin lainsäädännössä ilmenee merkittävästi muutettuja PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden TEF-arvoja, kyseiset vaihteluvälit on tarkistettava.

7.1.5 Saantojen valvonta puhdistusta varten

Yhdisteiden hävikki puhdistuksen aikana on tarkistettava validoinnin yhteydessä. Nollanäyte, johon on lisätty eri kongeneerien seosta, on puhdistettava (vähintään $n = 3$), ja saanto ja vaihtelevuus on tarkistettava varmistusmenetelmällä. Saannon on oltava 60–120 prosenttia etenkin niiden yhdisteiden osalta, joiden vaikutus eri seosten TEQ-arvoon on enemmän kuin 10 prosenttia.

7.1.6 Raportointiraja

BEQ-arvoista raportoimista varten on määritettävä raportointiraja relevanttien matriisinäytteiden perusteella, joilla on tyypillinen kongeneerijakauma, mutta ei standardien kalibrointikäyrän perusteella, koska käyrän ala-arvojen tarkkuus ei ole riittävä. Uuttamisen ja puhdistuksen vaikutukset on otettava huomioon. Raportointiraja on asetettava nollanäytettä korkeammaksi soveltamalla vähintään kerrointa kolme.

7.2 Vertailunäytteiden käyttö

7.2.1 Vertailunäytteiden on edustettava näytematriisia, kongeneerijakaumia ja pitoisuusalueita PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden osalta lähellä enimmäismäärää tai toimintarajaa olevilla pitoisuuksilla.

7.2.2 Kuhunkin testisarjaan on sisällytettävä matriisinolla tai, jos se ei ole mahdollista, nollanäyte sekä viitenäyte, jonka pitoisuus vastaa enimmäismäärää tai toimintarajaa. Nämä näytteet on uutettava ja testattava samanaikaisesti identtisissä oloissa. Vertailunäytteen vasteen on oltava selvästi kohonnut verrattuna nollanäytteeseen, jotta testin soveltuvuus olisi taattu. Tällaisia näytteitä voidaan käyttää nolla- ja saantokorjauksiin.

⁽¹²⁾ Nykyiset vaatimukset perustuvat seuraavassa asiakirjassa julkaistuihin TEF-arvoihin: M. Van den Berg et al., *Toxicol Sci* 93 (2), 223–241 (2006).

▼ M9

7.2.3 Saantokorjauksen suorittamiseen valittujen vertailunäytteiden on edustettava testinäytteitä, eli näytteiden kongeneerijakaumat eivät saa johtaa määrien aliarvioimiseen.

7.2.4 Lisäksi voidaan käyttää esimerkiksi 0,5- ja 2-kertaista enimmäismäärää tai toimintarajaa edustavia ylimääräisiä vertailunäytteitä, joilla osoitetaan testin toimivuus halutulla mittausalueella enimmäismäärän tai toimintarajan valvontaa varten. Yhdessä näitä näytteitä voidaan käyttää testinäytteiden BEQ-arvojen laskemiseen (ks. 7.1.2.2 kohta).

7.3 Cut-off-arvojen määrittäminen

BEQ-arvoina ilmaistujen bioanalyttisten tulosten ja TEQ-arvoina ilmaistujen varmistusmenetelmän tulosten välinen suhde on määritettävä esimerkiksi kalibroinnilla, jossa vertailunäytteisiin, joissa on samanlainen matriisi, on lisätty analyyttiä $0 \times$, $0,5 \times$, $1 \times$ ja $2 \times$ enimmäismäärä, ja jossa kukin näyte määritetään 6 kertaa ($n = 24$). Korjauskertoimet (nolla ja saanto) voidaan arvioida tämän suhteen perusteella, mutta ne on tarkistettava 7.2.2 kohdan mukaisesti.

Cut-off-arvot on määritettävä sen arvioimiseksi, vastaako näyte enimmäismääriä koskevia vaatimuksia, tai tarvittaessa toimintarajojen valvontaa varten, ja vastaavat enimmäismäärät tai toimintarajat on vahvistettava joko erikseen PCDD/PCDF-yhdisteille ja dioksiinien kaltaisille PCB-yhdisteille taikka PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summalle. Niitä edustaa bioanalyttisten tulosten jakauman *alempi* piste (korjattuna nollan ja saannon suhteen), joka vastaa varmistusmenetelmän päätösrajaa 95 prosentin luottamusrajalla, mikä tarkoittaa, että väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuus on < 5 prosenttia ja $RSD_R < 25$ prosenttia. Varmistusmenetelmän päätösraja on sama kuin enimmäismäärä, kun otetaan huomioon laajennettu mittausepävarmuus.

Cut-off-arvo (BEQ-arvona ilmaistuna) voidaan laskea 7.3.1, 7.3.2 tai 7.3.3 kohdassa esitetyn mallin avulla. (Katso kuva 1.)

7.3.1 Kun käytetään 95 prosentin ennustevälin *alempaa* kaistaa varmistusmenetelmän päätösrajalla

$$\text{Cut-off-arvo} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f = m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_l - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

jossa

BEQ_{DL} varmistusmenetelmän päätösrajaa vastaava BEQ, joka vastaa enimmäismäärää laajennettu mittausepävarmuus huomioon ottaen

$s_{y,x}$ jäännöksen keskihajonta

$t_{\alpha, f = m-2}$ Studentin kerroin ($\alpha = 5\%$, $f =$ vapausasteet, yksipuoliset)

m kalibrintipisteiden kokonaismäärä (indeksi j)

n toistojen lukumäärä kullakin tasolla

x_i näytteen pitoisuus (TEQ-arvona) kalibrintipisteessä i varmistusmenetelmällä määritettynä

$\bar{x}$ kaikkien kalibrintinäytteiden pitoisuuksien keskiarvo (TEQ-arvona)

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_l - \bar{x})^2$ neliösummamuuttuja, $i =$ kalibrintipisteen i indeksi.

▼ M9

- 7.3.2 Laskeminen (nollan ja saannon suhteen korjatuista) bioanalyttisistä tuloksista, kun on analysoitu useita näytteitä ($n \geq 6$), jotka on kontaminoitu varmistusmenetelmän päätösrajalla, joka on mittaustulosten jakauman *alempi* piste vastaavalla BEQ:n keskiarvolla:

$$\text{Cut-off-arvo} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

jossa

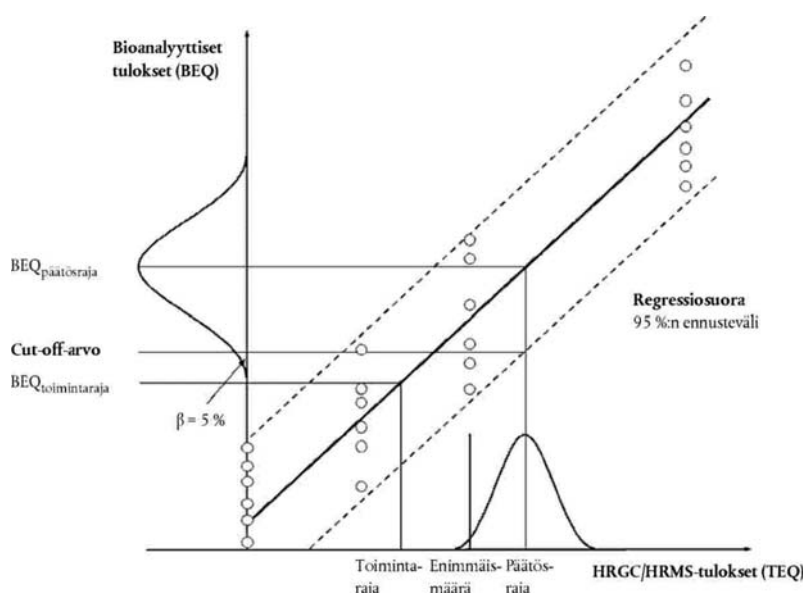
SD_R biologisten määrittystulosten keskihajonta kohdassa BEQ_{DL} , mitattuna laboratorionsisäisissä uusittavuusoloissa

- 7.3.3 Laskeminen bioanalyttisten tulosten keskiarvona (BEQ -arvona, korjattuna nollan ja saannon suhteen), kun on analysoitu useita näytteitä ($n \geq 6$), jotka on kontaminoitu tasolla kaksi kolmasosaa enimmäismäärästä tai toimintarajasta. Tämä perustuu havaintoon siitä, että kyseinen pitoisuus on 7.3.1 tai 7.3.2 kohdan mukaan määritetyn cut-off-arvon lähistöllä:

95 prosentin luottamustasoon perustuva cut-off-arvon laskenta, mikä tarkoittaa, että väärin vaatimustenmukaisten tulosten osuus on < 5 prosenttia ja $\text{RSD}_R < 25$ prosenttia:

1. kun käytetään 95 prosentin ennustevälin *alempaa* kaistaa varmistusmenetelmän päätösrajalla.
2. kun on analysoitu useita näytteitä ($n \geq 6$), jotka on kontaminoitu varmistusmenetelmän päätösrajalla, joka on mittaustulosten jakauman *alempi* piste (jota Kuvassa 1 esittää kellonmuotoinen käyrä) vastaavalla BEQ:n keskiarvolla.

Kuva 1



- 7.3.4 Cut-off-arvoja koskevat rajoitukset

BEQ -arvoihin perustuvat cut-off-arvot, jotka on laskettu validoinnin aikana saadusta RSD_R -arvosta käyttämällä rajallista määrää näytteitä, joiden matriisit ja/tai kongeneerijakaumat ovat erilaisia, saattavat olla korkeammat kuin TEQ -arvoihin perustuvat enimmäismäärät tai toimintarajat, koska tarkkuus on tällöin parempi kuin rutiinitesteissä, kun mahdollisten kongeneerijakaumien tuntematon spektri on tarkastettava. Tällöin cut-off-arvot on laskettava siten, että $\text{RSD}_R = 25$ prosenttia, tai mieluiten on käytettävä kaksi kolmasosaa enimmäismäärästä tai toimintarajasta.

▼ **M9**

- 7.4 *Suorituskykyä koskevat tiedot*
- 7.4.1 Koska bioanalyttisissä menetelmissä ei voida käyttää sisäisiä standardeja, bioanalyttisten menetelmien toistettavuus on testattava, jotta saadaa tietoa yksittäisen koesarjan sisäisestä ja koesarjojen välisestä keskihajonnasta. Toistettavuuden on oltava alle 20 prosenttia ja laboratorionsisäisen uusittavuuden on oltava alle 25 prosenttia. Tämän on perustuttava BEQ-arvona ilmaistuihin laskettuihin määriin nolla- ja saantokorjauksen jälkeen.
- 7.4.2 Validointiprosessin yhteydessä on osoitettava, että testillä pystytään erottamaan toisistaan nolla- ja cut-off-arvo, jolloin vastaavan cut-off-arvon ylittävät näytteet voidaan tunnistaa (ks. 7.1.2 kohta).
- 7.4.3 On määriteltävä kohdeyhdisteet, mahdolliset häiriöt sekä suurimmat hyväksyttävät nollatasot.
- 7.4.4 Vasteen tai vasteesta lasketun pitoisuuden (mahdollista ainoastaan mitausalueella) prosentuaalinen keskihajonta kunkin näyteuutteen kolminkertaisessa määrittäyksessä saa olla enintään 15 prosenttia.
- 7.4.5 BEQ-arvoina ilmaistuja vertailunäytte(id)en korjaamattomia tuloksia (nollanäyte ja enimmäistasolla tai toimintarajalla) käytetään bioanalyttisen menetelmän suorituskyvyn arviointiin vakiomittaisella ajanjaksolla.
- 7.4.6 Nollanäytteille ja kullekin vertailunäytetyypille on luotava laadunvalvontakortit, jotka on tarkastettava. Näin varmistetaan, että analyttinen suorituskyky vastaa vaatimuksia. Tämä koskee etenkin nollanäytteiden ja mittausalueen ala-arvojen välistä vähimmäiseroa ja vertailunäytteiden laboratorionsisäistä uusittavuutta. Nollanäytteet on tarkastettava huolellisesti, jotta vältetään väärät vaatimustenmukaiset tulokset vähentämisen yhteydessä.
- 7.4.7 Vaatimustenvastaisiksi epäilyille näytteille ja 2–10 prosentille vaatimustenmukaisista näytteistä (vähintään 20 näytettä matriisia kohden) tehtyjen varmistusmenetelmien tulokset on koottava, ja niitä on käytettävä seulontamenetelmän suorituskyvyn ja BEQ-arvon ja TEQ-arvon välisen suhteen arvioimisessa. Tätä tietokantaa voidaan hyödyntää rutiininäytteisiin sovellettavien cut-off-arvojen uudelleen arvioinnissa validoitujen matriisien osalta.
- 7.4.8 Menetelmän hyvä suorituskyky voidaan osoittaa myös osallistumalla vertailutesteihin. Jos laboratorio kykenee osoittamaan hyvän suorituskykynsä, vertailutesteissä analysoitujen näytteiden tulokset, joissa pitoisuudet ovat enimmillään esim. $2 \times$ enimmäismäärä, voidaan sisällyttää väärin vaatimustenmukaisten näytteiden osuuden arviointiin. Näytteiden on katettava eri näytelähteitä edustavat yleisimmät kongeneerijakaumat.
- 7.4.9 Kontaminaatiotapauksissa cut-off-arvot voidaan arvioida uudelleen ottaen huomioon näytematriisi ja tapauksessa esiintyneet kongeneerijakaumat.
8. **Tulosten raportointi**
- 8.1 *Varmistusmenetelmät*
- 8.1.1 Määrittäytuloksiin on sisällyttävä yksittäisten PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet ja TEQ-arvot on ilmoitettava pienimpinä, suurimpina ja väliarvoina, jotta tulosten raportointiin saadaan mukaan mahdollisimman paljon tietoa. Näin tuloksia pystytään tulkitsemaan kulloistenkin vaatimusten mukaisesti.

▼ **M9**

- 8.1.2 Raportissa on myös ilmoitettava PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden uuttamisessa käytetty menetelmä.
- 8.1.3 Yksittäisten sisäisten standardien saantotiedot on ilmoitettava, jos saantojen arvot ovat 6.2.5 kohdassa mainitun alueen ulkopuolella tai jos enimmäismäärä ylittyy (tällöin on ilmoitettava jommankumman rinnakkaismäärityksen saantotiedot). Muissa tapauksissa ne on toimitettava pyydettyinä.
- 8.1.4 Koska laajennettu mittausepävarmuus on otettava huomioon päätettäessä näytteen vaatimustenmukaisuudesta, tiedot tästä muuttujasta on ilmoitettava. Siksi määrittystulos on ilmoitettava muodossa $x \pm U$, jossa x on määrittystulos ja U on laajennettu mittausepävarmuus, jossa käytetään kattavuuskerrointa 2, jolloin luottamustaso on noin 95 prosenttia. Jos PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet määritetään erikseen, PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden erillisten määrittystulosten yhteenlaskettua arvioitua laajennettua epävarmuutta on käytettävä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien summana.
- 8.1.5 Tulokset on ilmaistava samoina yksikköinä ja vähintään yhtä monen merkitsevän numeron tarkkuudella kuin direktiivillä 2002/32/EY vahvistetut enimmäismäärät.
- 8.2 *Bioanalyttiset seulontamenetelmät*
- 8.2.1 Seulonnan tuloksen perusteella näytteen ilmoitetaan olevan ”vaatimustenmukainen” tai sen ”epäillä olevan vaatimustenvastainen”.
- 8.2.2 Lisäksi indikaatiivinen tulos voidaan ilmaista PCDD/PCDF-yhdisteiden ja/tai dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden osalta BEQ-arvona eikä TEQ-arvona.
- 8.2.3 Jos näytteen vaste on raportointirajan alapuolella, näytteellä ilmoitetaan olevan ”raportointirajaa matalampi arvo”. Jos näytteen vaste on mitta-alueen yläpuolella, näytteellä ilmoitetaan olevan ”mittausalueen ylittävä arvo” ja mitta-alueen yläarvoa vastaava pitoisuus ilmaistaan BEQ-arvona.
- 8.2.4 Kunkin näytematriisityypin osalta raportissa on mainittava enimmäismäärä tai toimintaraja, johon arviointi perustuu.
- 8.2.5 Raportissa on mainittava käytetyn testin tyyppi, testin perusperiaate ja kalibrointimenetelmä.
- 8.2.6 Raportissa on myös ilmoitettava PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden uuttamisessa käytetty menetelmä.
- 8.2.7 Jos näytteiden epäillä olevan vaatimusten vastaisia, raporttiin on liitettävä selvitys toteutettavista toimenpiteistä. Jos näytteissä on merkitäviä PCDD/PCDF-pitoisuuksia sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summan pitoisuuksia, kohonneet pitoisuudet on määritettävä tai vahvistettava varmistusmenetelmän avulla.
- 8.2.8 Vaatimustenvastaiset tulokset on ilmoitettava vain varmistusmäärityksestä.
- 8.3 *Fysikaaliskemialliset seulontamenetelmät*
- 8.3.1 Seulonnan tuloksen perusteella näytteen ilmoitetaan olevan ”vaatimustenmukainen” tai sen ”epäillä olevan vaatimustenvastainen”.
- 8.3.2 Kunkin näytematriisityypin osalta raportissa on mainittava enimmäismäärä tai toimintaraja, johon arviointi perustuu.

▼ M9

- 8.3.3 Lisäksi voidaan antaa yksittäisten PCDD/PCDF-kongeneerien ja /tai dioksiinien kaltaisten PCB-kongeneerien pitoisuudet ja TEQ-arvot ilmoitettuna pienimpinä, suurimpina ja väliarvoina. Tulokset on ilmoitettava samoina yksikköinä ja vähintään yhtä monen merkitsevän numeron tarkkuudella kuin direktiivillä 2002/32/EY vahvistetut enimmäismäärät.
- 8.3.4 Yksittäisten sisäisten standardien saantotiedot on ilmoitettava, jos saantojen arvot ovat 6.2.5 kohdassa mainitun alueen ulkopuolella tai jos enimmäismäärä ylittyy (tällöin on ilmoitettava jommankumman rinnakkaismäärittelyn saantotiedot). Muissa tapauksissa ne on toimitettava pyydettyinä.
- 8.3.5 Raportissa on mainittava sovellettu GC-MS-menetelmä.
- 8.3.6 Raportissa on myös ilmoitettava PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden uuttamisessa käytetty menetelmä.
- 8.3.7 Jos näytteiden epäillään olevan vaatimusten vastaisia, raporttiin on liitettävä selvitys toteutettavista toimenpiteistä. Jos näytteissä on merkittäviä PCDD/PCDF-pitoisuuksia sekä PCDD/PCDF-yhdisteiden ja dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summan pitoisuuksia, kohonneet pitoisuudet on määritettävä tai vahvistettava varmistusmenetelmän avulla.
- 8.3.8 Vaatimustenvastaisuus voidaan vahvistaa vasta varmistusmäärittelyn jälkeen.

III LUKU

NÄYTTEIDEN VALMISTUS JA VAATIMUKSET, JOTKA REHUSSA OLEVIA MUIDEN KUIN DIOKSIINIA KALTAISTEN PCB-YHDISTEIDEN VIRALLISESSA VALVONNASSA KÄYTETTYJEN MÄÄRITYSMENETELMIEN ON TÄYTETTÄVÄ

1. Soveltamisala

Tässä luvussa vahvistettuja vaatimuksia on sovellettava analysoitaessa rehua muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien virallista valvontaa varten ja kun on kyse näytteiden valmistuksesta ja määritysvaatimuksista muita sääntelytarkoituksia varten, mihin kuuluvat myös rehualan toimijan suorittamat tarkastukset asetuksen (EY) N:o 183/2005 säännösten mukaisuuden varmistamiseksi.

2. Soveltuvat osoitusmenetelmät

Kaasukromatografia-elektronisieppausdetektio (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS tai vastaavat menetelmät.

3. Tarkasteltavana olevien analyttien tunnistus ja varmistus

3.1 Suhteellinen retentioaika verrattuna sisäisiin standardeihin tai vertailustandardeihin (hyväksyttävä poikkeama +/- 0,25 %).

3.2 Muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden erottaminen mittauksista häiritsevästä aineista ja eritoten mukana eluoituvista PCB-yhdisteistä kaasukromatografian avulla, erityisesti jos näytteiden pitoisuudet ovat laillisissa rajoissa, ja vaatimustenvastaisuus on vahvistettava⁽¹³⁾.

3.3 GC-MS-tekniikkaa koskevat vaatimukset

Vähintään seuraavan molekyyli-ionien tai molekyyliklusterin tunnusomaisten ionien lukumäärän valvonta:

a) kaksi spesifistä ionia HRMS-menetelmässä,

b) kolme spesifistä ionia LRMS-menetelmässä,

⁽¹³⁾ Mukana eluoituvia samantyyppisiä kongeneereja ovat usein esimerkiksi PCB 28/31, PCB 52/69 ja PCB 138/163/164. GC-MS-menetelmien osalta on otettava huomioon myös mahdolliset useampia klooriatomeja sisältävien molekyylien osien aiheuttamat häiriöt.

▼ **M9**

- c) kaksi spesifistä prekursori-iona, joista kummallakin on yksi spesifinen vastaava siirtymätuoteioni, MS-MS-menetelmässä.

Suurimmat sallitut toleranssit valikoitujen massafragmenttien määrien suhteille:

Valikoitujen massafragmenttien määrasuhteen suhteellinen poikkeama teoreettisesta määrästä tai kohdeionin (runsaimmin esiintyvä mitattu ioni) ja sekundaaris(t)en ioni(e)n kalibroitistandardista: ± 15 prosenttia.

3.4 GC-ECD-tekniikoita koskevat vaatimukset

Enimmäismäärän ylittävät tulokset on varmistettava kahdella kaasukromatografikolonnilla, joiden stationäärifaasin polariteetti on erilainen.

4. Menetelmän suorituskyvyn osoittaminen

Menetelmän suorituskyky on validoitava enimmäismäärän vaihteluvälillä ($0,5-2 \times$ enimmäismäärä), ja toistettujen mittausten variaatiokertoimen on oltava hyväksyttävä (ks. 9 kohta, kohtalaista tarkkuutta koskevat vaatimukset).

5. Määrittäysraja

Muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden LOQ-arvojen summa ⁽¹⁴⁾ ei saa olla suurempi kuin kolmasosa enimmäismäärästä ⁽¹⁵⁾.

6. Laadunvalvonta

Nollanäytteiden säännöllinen mittaus; sellaisten näytteiden analyysi, joihin on lisätty analyttä; laadunvalvontanäytteet; osallistuminen asianomaisia matriiseja koskeviin laboratorioden välisiin tutkimuksiin.

7. Saantojen valvonta

- 7.1 On käytettävä sopivia sisäisiä standardeja, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ovat vastaavat kuin tarkasteltavana olevilla analyteillä.

- 7.2 Sisäisten standardien lisääminen:

Lisääminen tuotteisiin (ennen uuttoa ja puhdistusta).

- 7.3 Vaatimukset menetelmille, joissa käytetään kaikkia kuutta isotooppileimattua muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden kongeneeria:

- a) tulokset on oikaistava sisäisten standardien saantojen suhteen,
- b) isotooppileimattujen sisäisten standardien saantojen on oltava 60–120 prosenttia;
- c) pienemmät tai suuremmat saannot voidaan hyväksyä yksittäisille kongeneereille, jos niiden osuus muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden yhteismäärästä on alle 10 prosenttia.

- 7.4 Vaatimukset menetelmille, joissa ei käytetä kaikkia kuutta isotooppileimattua sisäistä standardia tai muuta sisäistä standardia:

- a) sisäisten standardien saannot on tarkastettava kaikista näytteistä,
- b) sisäisten standardien saantojen on oltava 60–120 prosenttia;
- c) tulokset on oikaistava sisäisten standardien saantojen suhteen.

⁽¹⁴⁾ Tarvittaessa on noudatettava asiakirjassa ”Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food” (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>) kuvattuja periaatteita.

⁽¹⁵⁾ On erittäin suositeltavaa, että reagenssinolla vaikuttaa vain vähän näytteessä olevan kontaminantin tasoon. Laboratorion on seurattava nollatasojen vaihtelua etenkin, jos nollatasot vähennetään mittausarvoista.

▼ M9

- 7.5 Leimaamattomien kongeneerien saannot tarkastetaan sellaisten näytteiden avulla, joihin on lisätty analyyttiä, tai laadunvalvontanäytteiden avulla, joiden pitoisuudet ovat enimmäismäärän vaihteluvälillä. Näiden yhdisteiden hyväksyttävät saannot ovat 60–120 prosenttia.

8. **Laboratorioita koskevat vaatimukset**

Asetuksen (EU) 2017/625 säännösten mukaisesti laboratorioiden on oltava ISO/IEC-oppaan 58 mukaisesti toimivan tunnustetun laitoksen hyväksymiä, millä varmistetaan, että laboratoriot soveltavat analyttistä laadunvarmistusta. Laboratorioiden hyväksyntä on tehtävä EN ISO/IEC 17025 -standardin mukaisesti. PCB-yhdisteiden analyysin mittausepävarmuuden ja määritysrajojen arviointia koskeissa teknisissä ohjeissa ⁽¹⁶⁾ kuvattuja periaatteita on noudatettava.

9. **Suorituskykyä koskevat tiedot: kriteerit, jotka koskevat muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden summaa enimmäismäärän tasolla**

	Isotooppilaimennusmassaspektrometria (*)	Muut menetelmät
Oikeellisuus	−20 % −+20 %	−30 % − +30 %
Kohtalainen tarkkuus (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Suurimman ja pienimmän arvon erotus	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Kaikkien kuuden ¹³C-leimatun analogin käyttöä sisäisinä standardeina edellytetään.

10. **Tulosten raportointi**

- 10.1 Määritystuloksiin on sisällyttävä yksittäisten muiden kuin dioksiinien kaltaisten PCB-yhdisteiden pitoisuudet ja kyseisten PCB-yhdisteiden pitoisuuksien summa on ilmoitettava pienimpinä, suurimpina ja väliarvoina, jotta tulosten raportointiin saadaan mukaan mahdollisimman paljon tietoja. Näin tuloksia pystytään tulkitsemaan kulloistenkin vaatimusten mukaisesti.
- 10.2 Raportissa on ilmoitettava PCB-yhdisteiden uuttamisessa käytetty menetelmä.
- 10.3 Yksittäisten sisäisten standardien saantotiedot on toimitettava, jos saantojen arvo on 7 kohdassa tarkoitetun alueen ulkopuolella tai jos enimmäismäärä ylittyy. Muissa tapauksissa ne on toimitettava pyydettyä.
- 10.4 Koska laajennettu mittausepävarmuus on otettava huomioon päätettäessä näytteen vaatimustenmukaisuudesta, tiedot kyseisestä muuttujasta on myös ilmoitettava. Siksi määritystulos on ilmoitettava muodossa $x \pm U$, jossa x on määritystulos ja U on laajennettu mittausepävarmuus, jossa käytetään kattavuuskerrointa 2, jolloin luottamustaso on noin 95 prosenttia.
- 10.5 Tulokset on ilmaistava samoina yksikköinä ja vähintään yhtä monen merkitsevän numeron tarkkuudella kuin direktiivillä 2002/32/EY vahvistetut enimmäismäärät.

B. EN-STANDARDIT

Seuraavat EN-standardit ovat merkityksellisiä sovellettaessa asetuksen (EU) 2017/625 34 artiklan 2 kohdan a alakohtaa:

⁽¹⁶⁾ Ks. alaviite 9.

▼ **M9**

EN 17194: Rehut. Näytteenotto- ja analysointimenetelmät. Deoksinivalenolin, aflatoksiini B1:n, fumonisiini B1:n ja B2:n, T-2- ja HT-2-toksiinien sekä zearaleonin ja okratoksiini A:n määrittäminen rehuaineissa ja rehuseoksissa nestekromatografi-massaspektrometrisesti (LC-MS/MS)

EN 17270: Rehut. Näytteenotto- ja analysointimenetelmät. Teobromiinin määrittäminen nestekromatografialla rehuaineissa ja rehuseoksissa kaakaopohjaiset ainesosat mukaan lukien.

EN 17504 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis. Determination of gossypol in cotton seed and feeding stuff by LC-MS/MS), joka koskee gossypolin määrittystä puuvillansiemenissä ja rehuissa LC-MS/MS:llä

EN 17362 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of pentachlorophenol (PCP) in feed materials and compound feed by LCMS/MS), joka koskee pentakloorifenolin (PCP) määrittystä rehuissa ja rehuseoksissa LCMS/MS:llä

EN 16279: Rehut. Fluoridipitoisuuden määrittäminen suolahappokäsittelyn jälkeen ionisensitiivisellä elektrodimenetelmällä (ISE) käyttäen

EN 17053: Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Hivenaineiden, raskasmetallien ja muiden vastaavien alkuaineiden määrittäminen rehusta ICP-MS:llä (multimenetelmä)

EN 15550 (Animal feeding stuffs – Methods of sampling and analysis – Determination of cadmium and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) after pressure digestion), joka koskee kadmiumin ja lyijyn määrittystä rehusta grafiittiuniatiomiabsorptiospektrometrialalla (GF-AAS) painehajoituksen jälkeen

EN 16206 Rehut. Arseenin määrittäminen mikroaaltohajotuksen (hajottaminen 65 % typpihapolla ja 30 % vetyperoksidilla) jälkeen atomiabsorptiospektrometri-vetymenetelmällä (HGAAS)

EN 16277 Rehut. Elohopean määrittäminen mikroaaltohajotuksen (uutto 65 % typpihapolla ja 30 % vetyperoksidilla) jälkeen kylmähöyryatomiabsorptiospektrometrimenetelmällä (CVAAS)

EN 16278 Rehut. Epäorgaanisen arseenin määrittäminen mikroaaltohajotuksen ja kiinteäfaasiuuton jälkeen atomiabsorptiospektrometri-vetymenetelmällä (HGAAS)

EN 17374 (Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of inorganic arsenic in animal feed by anion-exchange HPLC-ICP-MS), joka koskee epäorgaanisen arseenin määrittystä rehusta anioninvaihto-HPLC-ICP-MS:llä

▼ **M2**

LIITE VI

**REHUIEN SISÄLTÄMIEN ELÄINPERÄISTEN AINESOSIEN
MÄÄRITYSMENETELMÄT REHUIEN VIRALLISTA VALVONTAA
VARTEN**

▼ **M8**

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Rehujen eläinperäiset ainesosat olisi määritettävä valomikroskopialla tai polymeerasiketjureaktiolla (PCR) tässä liitteessä vahvistettujen säännösten mukaisesti.

Näillä kahdella menetelmällä on mahdollista havaita eläinperäisten ainesosien esiintyminen esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa. Niillä ei kuitenkaan ole mahdollista laskea kyseisten ainesosien määrää esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa. Kummankin menetelmän toteamisraja on alle 0,1 % (w/w).

PCR-menetelmän ansiosta esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa esiintyvien eläinperäisten ainesosien taksonominen ryhmä on mahdollista tunnistaa.

Näitä menetelmiä on käytettävä valvottaessa Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 999/2001 ⁽¹⁾ 7 artiklan 1 kohdassa ja liitteessä IV sekä asetuksen (EY) N:o 1069/2009 ⁽²⁾ 11 artiklan 1 kohdassa säädettyjen kieltojen täytäntöönpanoa.

Näitä menetelmiä voidaan käyttää joko yksin tai yhdessä testattavasta rehutyyppistä riippuen yhden operatiivisen protokollan puitteissa rehuissa esiintyvää eläinproteiinia käsittelevän EU:n vertailulaboratorion (EURL-AP) laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden ⁽³⁾ (Standard Operating Procedures, SOP) mukaisesti.

▼ **M2**

2. MENETELMÄT

▼ **M8**

2.1 Valomikroskopia

2.1.1 Periaate

Määritettäväksi lähetetyissä esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa mahdollisesti esiintyvät eläinperäiset ainesosat tunnistetaan tyypillisten mikroskooppisesti tunnistettavissa olevien ominaisuuksien, kuten lihassäikeiden ja muiden lihan palojen, ruston, luiden, sarvien, karvojen, harjasten, selkärangattomien kutikulan osasten, hyönteisten ilmaputkiston, verituotteiden, maidon rasvapallosten, laktoosikiteiden, höyhenten, munankuorten, kalanluiden ja suomujen, perusteella.

⁽¹⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 999/2001, annettu 22 päivänä tammikuuta 2001, tiettyjen tarttuvien spongiformisten enkefalopatioiden ehkäisyä, valvontaa ja hävittämistä koskevista säännöistä (EYVL L 147, 31.5.2001, s. 1).

⁽²⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1069/2009, annettu 21 päivänä lokakuuta 2009, muiden kuin ihmisravinnoksi tarkoitettujen eläimistä saatavien sivutuotteiden ja niistä johdettujen tuotteiden terveysäännöistä sekä asetuksen (EY) N:o 1774/2002 kumoamisesta (sivutuoteasetus) (EUVL L 300, 14.11.2009, s. 1).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

▼M8

Mikroskooppitutkimus suoritetaan sen jälkeen, kun näytteet on esikäsitelty sedimentaatiolla.

Näytteiden sedimentaatiovaihe toteutetaan seuraavasti:

- a) muiden eläinperäisten ainesosien kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi yksittäinen sedimentaatiovaihe tetrakloorietyleenillä (TCE) kohdassa 2.1.3.4.3 kuvatulla tavalla;
- b) maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi kaksinkertainen sedimentaatiovaihe petrolietterillä / tetrakloorietyleenillä (PE/TCE) kohdassa 2.1.3.4.4 kuvatulla tavalla.

2.1.2 *Reagenssit ja laitteet*

2.1.2.1 Reagenssit

2.1.2.1.1 Konsentrintireagenssi

- Tetrakloorietyleeni (suhteellinen tiheys 1,62).
- Petrolietteri (PE), kiehumispiste 40–60 °C (suhteellinen tiheys 0,65).

2.1.2.1.2 Värjäysreagenssi

- Alitsariinipunaliuos (laimennetaan 2,5 ml:aa 1 M:n kloorivetyhappoa 100 ml:aan vettä ja lisätään liuokseen 200 mg alitsariinipunaista).

2.1.2.1.3 Kiinnitysreagenssit

- Lipeä (NaOH 2,5 % w/v tai KOH 2,5 % w/v).
- Glyseroli (laimentamaton, viskositeetti: 1 490 cP) tai kiinnitysreagenssi, jolla on muun kuin kestopreparaatin valmisteluun soveltuvat ominaisuudet.
- Norland ® Optical Adhesive 65 (viskositeetti: 1 200 cP) tai hartsi, jolla on kestopreparaatin valmistukseen soveltuvat ominaisuudet.

2.1.2.1.4 Kiinnitysreagenssit, joilla on värjäysominaisuuksia

- Lugolin liuos (2 g kaliumjodidia liuotetaan 100 ml:aan vettä ja lisätään 1 g jodia ja sekoitetaan useita kertoja).
- Kystiiniireagenssi (2 g lyijyasetaattia, 10 g NaOH/100 ml vettä).
- Fehlingin liuos (valmistetaan ennen käyttöä kahdesta samansuuruisesta osasta (1/1) varastoliuosta A ja B. Liuos A: liuotetaan 6,9 g:aa kupari(II)sulfaattipentahydraattia 100 ml:aan vettä. Liuos B: liuotetaan 34,6 g:aa kaliumnatriumtartraattitetrakloorietyleenillä ja 12 g:aa NaOH:ta 100 ml:aan vettä).
- Tetrametyyli-bentsidiini/vetyperoksidi (liuotetaan 1 g 3,3',5,5'-tetrametyyli-bentsidiiniä (TMB) 100 ml:aan jääätikkää ja 150 ml:aan vettä. Ennen käyttöä 4 osaa TMB-liuosta sekoitetaan yhteen osaan 3-prosenttista vetyperoksidia).

2.1.2.1.5 Pesureagenssit

- Etanoli ≥ 96 % (tekninen laatu).
- Asetoni (tekninen laatu).

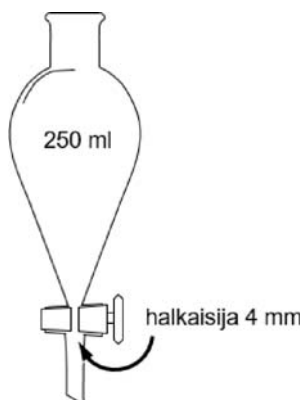
2.1.2.1.6 Värinpoistoreagenssi

- Kaupallinen natriumhypokloriittiliuos (9–14 % aktiivista klooria).

▼ **M8**

2.1.2.2. Laitteet

- Analyysivaaka, tarkkuus 0,001 g.
- Jauhamisvälineet: veitsimylly tai roottorimylly. Jos käytetään roottorimyllyä, kielletään seulat, jotka ovat $\leq 0,5$ mm.
- Seulat, joissa on neliönmuotoiset reiät, silmäkoko 0,25 mm ja 1 mm. Näytteen esiseulontaa lukuun ottamatta seulojen halkaisija ei saa olla suurempi kuin 10 cm, jotta aineksia ei katoa. Seuloja ei tarvitse kalibroida.
- Kartiomainen erotussuppilo, lasia, 250 ml, jonka pohjalla on teflon- tai lasihioshana sulkutulppana. Sulkutulpan halkaisijan on oltava avattuna ≥ 4 mm. Vaihtoehtoisesti, ainoastaan yksitistä sedimentaatiovaihetta tetrakloorietyleenillä varten, voidaan käyttää kartiopohjaista selkeytysastiaa, jos laboratorio on osoittanut, että toteamisrajat ovat vastaavia kuin lasista kartionmuotoista erotussuppiloa käytettäessä.

*Erotussuppilo*

- Stereomikroskooppi, jonka suurennusväli on ainakin $6,5\times$ – $40\times$.
- Lämpövalaisumikroskooppi, jonka suurennusväli on vähintään $100\times$ – $400\times$. Lisäksi voidaan käyttää polarisoitua valomikroskopiaa ja differentiaali-interferenssikontrastimikroskopiaa.
- Tavanomaiset laboratorion lasiastiat.
- Objektilasien valmisteluvälineet: tavalliset objektilasit, objektilasit, joissa on syvennys, peitelasit (20×20 mm), pinsetit, ohut spaatteli.
- Laboratoriouuni
- Sentrifugi.
- Suodatinpaperi: Kvalitatiivinen selluloosasuodatin (huokoskoko 4–11 μm)

2.1.3 *Näytteenotto ja näytteiden valmistus*2.1.3.1 *Näytteenotto*

Käytetään liitteen I mukaisesti otettua edustavaa näytettä.

▼ **M8**

- 2.1.3.1.1 Näytteen kuivaus:
- Näytteet, joiden kosteuspitoisuus on > 14 %, on kuivattava ennen liitteen III mukaista käsittelyä.
- 2.1.3.1.2 Näytteen esiseulonta:
- Jotta rehussa olevista mahdollisista ympäristön epäpuhtauksista saadaan tietoa, suositetaan, että pelletoitu rehu ja jyvät esiseulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 1 mm, ja saadut kaksi fraktiota, joita on pidettävä erillisinä näytteinä, valmistetaan ja määritetään erikseen ja niistä raportoidaan erikseen.
- 2.1.3.2 Varotoimenpiteet
- Ristikontaminaation välttämiseksi laboratoriossa kaikki uudelleen käytettävät välineet on puhdistettava huolellisesti ennen käyttöä. Erotussuppilon osat on irrotettava ennen puhdistusta. Erotussuppilon osat ja lasiastiat on esipestävä käsin ja sen jälkeen pestävä astianpesukoneessa. Seulat on puhdistettava jäykkäharjaksisella synteettisellä harjalla. Rasvaisten aineiden, kuten kalajauhon, seulonnan jälkeen suositetaan, että seulat puhdistetaan asetonilla ja paineilmalla.
- 2.1.3.3 Rasvasta tai öljystä koostuvien näytteiden esikäsittely
- Rasvasta koostuvien näytteiden esikäsittelyssä on noudatettava seuraavaa menettelyä:
- Jos rasva on kiinteää, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.
 - 40 ml rasvaa pipetoidaan näytteen pohjasta sentrifugiputkeen.
 - Näytettä sentrifugoidaan 10 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).
 - Jos rasva on jähmettynyt sentrifugoinnin aikana, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.
 - Sentrifugoidaan uudestaan 5 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).
 - Puolet dekantoiduista epäpuhtauksista siirretään pienellä lusikalla tai spaattelilla objektilasille mikroskooppista tutkimusta varten. Kiinnitysreagenssiksi suositetaan glyserolia.
 - Loput epäpuhtauksista käytetään sedimentin valmisteluun 2.1.3.4.3 kohdan ensimmäisessä luetelmakohdassa kuvatulla tavalla.
- Samaa menettelyä käytetään öljystä koostuvien näytteiden esikäsittelyyn lukuun ottamatta ensimmäistä ja neljättä luetelmakohtaa.
- 2.1.3.4 Muiden kuin rasva- tai öljynäytteiden esikäsittely
- 2.1.3.4.1 Osanäytteen otto ja jauhaminen: Osanäytteeksi otetaan vähintään 50 g näytteestä ja jauhetaan.
- 2.1.3.4.2 Raaka-aineen esikäsittely: Valmistetaan vähintään 5 g:n annos jauhettua osanäytettä. Se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm:n, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

▼ **M8**

- 2.1.3.4.3 Yksittäinen sedimentaatio tetrakloorietyleenillä muiden eläinperäisten ainesosien kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi.

— Sedimentin uutto ja valmistus:

10 g:n annos (0,01 g:n tarkkuudella) jauhettua osanäytettä siirretään erotussuppiloon tai kartiopohjaiseen selkeytysastiaan, minkä jälkeen siihen lisätään 50 ml tetrakloorietyleenä. Erotussuppiloon siirrettävä annos saa olla enintään 3 g, jos kyseessä on kalajauho tai muu puhtaasti eläintuote, kivennäisaineos tai esiseos, joka tuottaa yli 10 prosenttia sedimenttiä. Seosta ravistetaan voimakkaasti ainakin 30 sekuntia, minkä jälkeen siihen lisätään varovasti 50 ml tetrakloorietyleenä samalla kun suppilon sisäpinta pestään siihen mahdollisten tarttuneiden partikkelien poistamiseksi. Saadun seoksen annetaan laskeutua astian pohjalle vähintään viisi minuuttia, minkä jälkeen sedimentti erotetaan avaamalla sulikutulppa.

Jos käytetään kartiopohjasta selkeytysastiaa, seosta sekoitetaan voimakkaasti vähintään 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleenä. Seoksen annetaan laskeutua kolmen minuutin ajan, minkä jälkeen sitä sekoitetaan taas 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleenä. Saadun seoksen annetaan laskeutua vähintään 5 minuutin ajan, minkä jälkeen nestemäinen fraktio poistetaan ja poistetaan huolellisesti dekanttoimalla samalla kun huolehditaan siitä, ettei sedimenttiä menetetä.

Sedimentti kerätään suppiloon asetettuun suodatinpaperiin, jotta jäljelle jäävä tetrakloorietyleni voidaan erottaa ja samalla välttää rasvan laskeutuminen sedimenttiin. Sedimentti kuivataan. Sedimentaatiovaiheen tarkastamiseksi on sen jälkeen suositeltavaa punnita sedimentti (0,001 gramman tarkkuudella). Lopuksi sedimentti seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan, paitsi jos seulontaa ei pidetä tarpeellisena.

— Näytteen kelluvan osan, flotaatin, erottaminen ja esikäsittely:

Edellä kuvatulla menetelmällä tehdyn sedimentin talteenoton jälkeen erotussuppiloon pitäisi jäädä kaksi osaa: tetrakloorietyleenistä koostuva nestemäinen osa ja kelluvasta aineksesta muodostuva kiinteä osa. Tätä kiinteää osaa kutsutaan flotaatiksi, ja se otetaan talteen avaamalla suppilon tulppa ja kaatamalla tetrakloorietyleni pois. Erotussuppilo käännetään ylösalaisin ja flotaatti siirretään suureen petrimaljaan ja kuivataan ilmassa vetokaapissa. Se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm:n, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

— Värjäysreagenssien käyttö:

Eläinperäisten ainesosien oikean tunnistamisen helpottamiseksi laboratorio voi käyttää näytteen valmistelussa värjäysreagensseja EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien ohjeiden mukaisesti.

▼ M8

Jos sedimentin värjäämiseen käytetään alitsariinipunaliuosta, noudatetaan seuraavaa menettelyä:

- Kuivattu sedimentti siirretään lasiseen koeputkeen ja pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin yhden minuutin ja 30 sekunnin ajan ennen sen dekantointia).
- Sedimentti käsitellään värinpoistoreagenssilla lisäämällä sedimenttiin vähintään 1 ml natriumhypokloriittiliuosta. Reaktion annetaan jatkua 10 minuutin ajan. Putki täytetään vedellä, sedimentin annetaan laskeutua 2–3 minuutin ajan, ja sen jälkeen vesi ja suspendoituneet partikkelit dekantoidaan kevyesti.
- Sedimentti pestään vielä kahdesti noin 10 ml:lla vettä (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan, sedimentin annetaan laskeutua putken pohjaan ja vesi dekantoidaan).
- Lisätään alitsariinipunaliuosta 2–10 tippaa ja sekoitetaan seosta koeputkisekoittimella. Sedimentin annetaan reagoida liuoksen kanssa 30 sekunnin ajan, ja värjäytynyt sedimentti pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia ja sen jälkeen kerran asetonilla (joka kerta käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin minuutin ajan, minkä jälkeen liuos dekantoidaan).
- Värjäytynyt sedimentti kuivataan.

2.1.3.4.4 Kaksinkertainen sedimentaatio petrolietterillä / tetrakloorietyleenillä maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi.

Kaikissa vaiheissa on käytettävä 2.1.2.2 kohdan neljännessä luetelmakohdassa kuvattua lasista kartionmuotoista 250 ml:n erotussuppiloa.

- 10 g:n annos (0,01 g:n tarkkuudella) jauhettua osanäytettä siirretään erotussuppiloon ja sille tehdään yksittäinen sedimentaatio tetrakloorietyleenillä 2.1.3.4.3 kohdassa kuvatulla tavalla mukaan lukien sedimentin kerääminen suppiloon asetettuun suodatinpaperiin. Tätä sedimenttiä voidaan käyttää samoin kuin kohdan 2.1.3.4.3 mukaisesti kerättyä sedimenttiä.
- Sedimentin kanssa valutettu tetrakloorietyleeni siirretään asteikkoliseen mittalasiin. Avataan erotussuppilon sulkutulppa ja täytetään mittalasia, kunnes saadaan 30 ml tetrakloorietyleeniiä. Kun määrä on saavutettu, sulkutulppa suljetaan.
- Kerätty tetrakloorietyleenin määrä korvataan lisäämällä erotussuppiloon 30 ml petrolietteriä, jonka kiehumispiste on 40–60 °C. Erotussuppilon sisältö sekoitetaan huolellisesti, jotta saadaan seos, jossa on 30 prosenttia petrolietteriä ja 70 prosenttia tetrakloorietyleeniiä (tiheys noin 1,26 g.cm⁻³). Annetaan aineen laskeutua 10 minuuttia. Kaksi uutta fraktiota erottuu: toinen sedimentti ja lopullinen flotaatti (< 1,26 g.cm⁻³). Toinen sedimentti kerätään petrimaljaan (tai suppiloon asetettuun suodatinpaperiin) avaamalla sulkutulppa kunnes vain vähän liuosta ja lopullinen flotaatti jäävät erotussuppiloon. Jäljelle jäänyt neste ja lopullinen flotaatti on kerättävä erikseen suppiloon asetettuun suodatinpaperiin. Erotussuppilon seinämät on huuhdeltava petrolietterillä, jotta saadaan kerättyä kaikki lopullisen flotaatin materiaali. Lopullisen flotaatin annetaan kuivua. Lopullinen flotaatti seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi, paitsi jos seulontaa ei pidetä tarpeellisena.

▼ **M8**2.1.4 *Mikroskooppinen tutkimus*

2.1.4.1 Objektilasin valmistelu

Objektilasit valmistellaan sedimentistä ja laboratorion valinnan mukaan joko flotaatista tai raaka-aineesta. Silloin kuin se on aiheellista maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi, objektilaseja on valmistettava myös lopullisesta flotaatista, joka on kerätty 2.1.3.4.4 kohdassa kuvatulla tavalla. Tuloksena saadut kaksi fraktiota (hieno ja karkea) valmistellaan. Objektilasille levitettävien fraktion testinäytteiden on oltava koko fraktiota edustavia.

Objektilaseja on valmistettava riittävä määrä sen varmistamiseksi, että 2.1.4.2 kohdassa säädettyä tutkimusprotokollaa voidaan noudattaa kokonaisuudessaan.

Objektilaseilla on käytettävä riittävästi kiinnitysreagenssia EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti. Objektilaseilla käytetään peitinlaseja.

2.1.4.2 Vuokaaviot rehuseosten, rehuaineiden ja esiseosten sisältämien eläimestä peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi.

Valmisteltuja objektilaseja on tutkittava mikroskoopilla noudattaen kaavioissa 1 ja 2 esitettyjä vuokaavioita.

Mikroskooppitutkimus suoritetaan läpivalaisumikroskoopilla tutkimalla sedimenttiä ja laboratorion valinnan mukaan flotaattia tai raaka-ainetta. Lisäksi maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi tutkimuksia on suoritettava myös lopullisesta flotaatista, joka on kerätty 2.1.3.4.4 kohdassa kuvatulla tavalla ja noudattaen kaaviota 3. Karkeita fraktioita voidaan läpivalaisumikroskoopin lisäksi tutkia stereomikroskoopilla. Jokainen objektilasi tutkitaan läpikotaisin eri suurennuksilla. Tarkat selitykset vuokaavioiden käytöstä annetaan EURL-AP:n laati-
missa ja verkkosivuillaan julkaisemissa SOP-toimintaohjeissa (Standard Operating Procedures).

Vuokaavion kussakin vaiheessa havainnoitavien objektilasien vähimmäismäärää on noudatettava tarkasti, paitsi jos määrättyä objektilasimäärää ei ole mahdollista saavuttaa fraktioaineksen koon vuoksi, esimerkiksi jos sedimenttiä ei saada. Partikkelien määrän kirjaamiseen saa käyttää enintään kuusi objektilasia määritystä kohti.

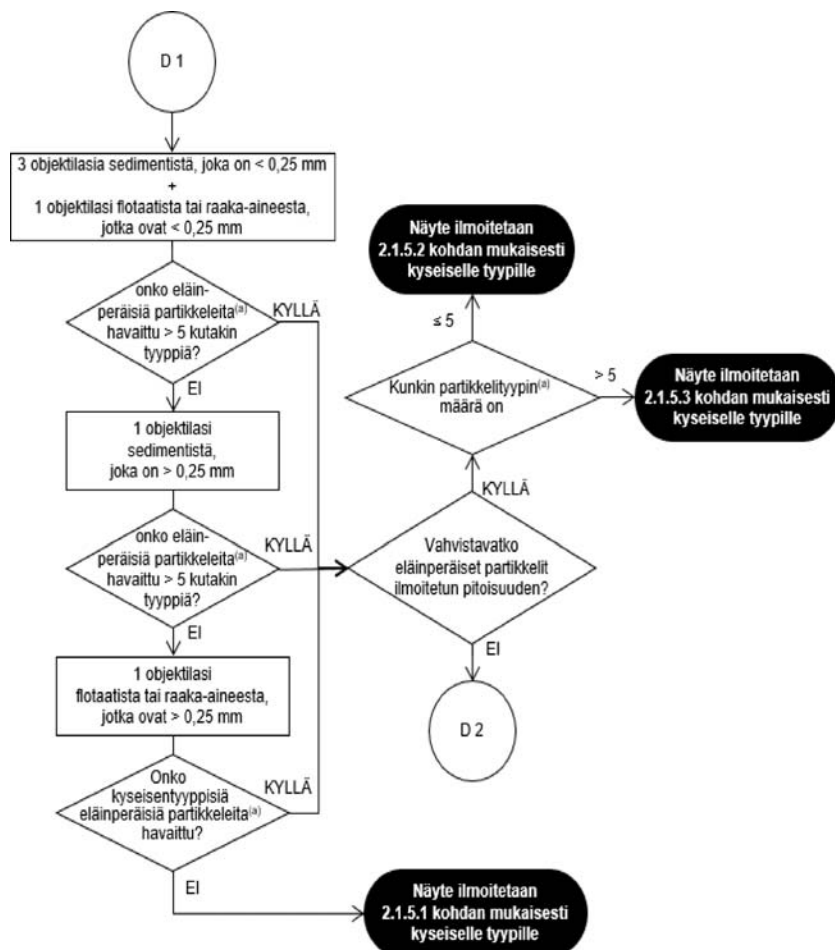
Valmisteltaessa lisäobjektilaseja joko flotaatista tai raaka-aineesta käyttäen 2.1.2.1.4 kohdassa tarkoitettuja erityisiä kiinnitysreagensseja, joilla on värjäysominaisuuksia, kun pyritään saamaan lisää tietoa sellaisista rakenteista (kuten sulat, karva, lihas tai veripartikkelit), jotka on havaittu 2.1.2.1.3 kohdassa tarkoitetuilla muilla kiinnitysreagensseilla valmistelluilla objektilaseilla, partikkelien määrä lasketaan määritystä kohti käytettävien objektilasien määrän perusteella, joka voi olla enintään kuusi, mukaan lukien lisäobjektilasit, joissa käytetään erityisiä kiinnitysreagenssia. Lisäobjektilaseja, jotka on valmistettu 2.1.3.4.4 kohdassa kuvatulla tavalla kerätystä lopullisesta flotaatista ja tarkoitettu maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi, ei tule käyttää muuntyyppisten (maalla elävät selkärangaiset ja kalat) ainesosien tunnistamiseen.

Jotta partikkelien tyyppi ja alkuperä olisi helpompi tunnistaa, laboratorio voi käyttää apuvälineitä, esimerkiksi päätöksentekoa tukevia järjestelmiä, kuvakirjastoja ja vertailunäytteitä.

▼ M8

Kaavio 1

Vuokaavio tetrakloorietyleenillä toteutetun yksittäisen sedimentaation jälkeen rehuseosten, rehuaineiden ja esiseoksien sisältämien muista kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi ensimmäisessä määrittäyksessä

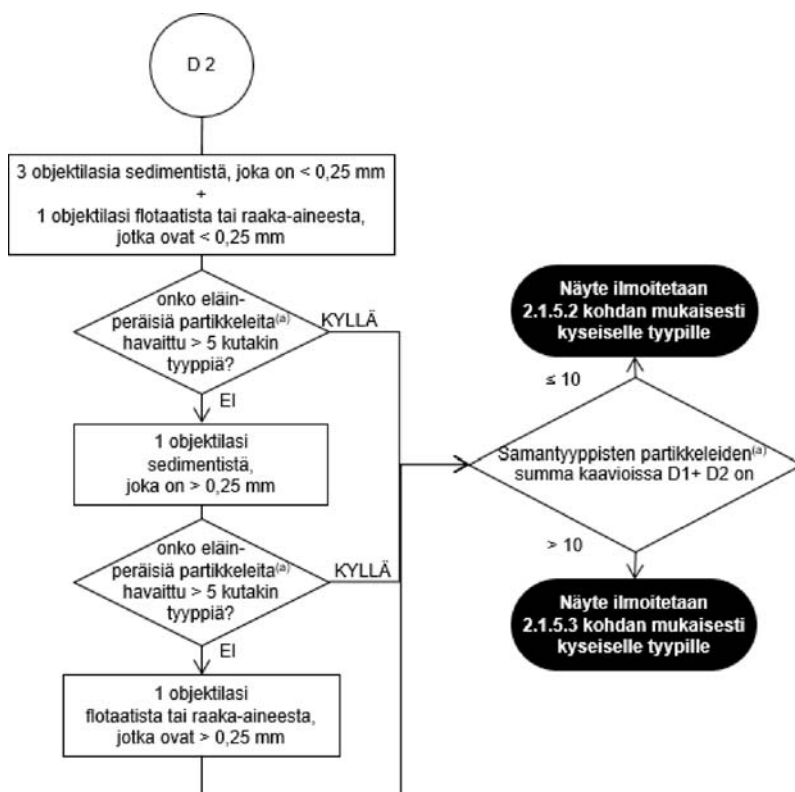


("D1" ja "D2" viittaavat ensimmäiseen ja toiseen määrittäykseen; ^(a): maalla elävät selkärangaiset, kalat)

▼ M8

Kaavio 2

Vuokaavio tetrakloorietyleenillä toteutetun yksittäisen sedimentaation jälkeen rehuseosten, rehuaineiden ja esiseoksien sisältämien muista kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi toisessa määrittelyssä

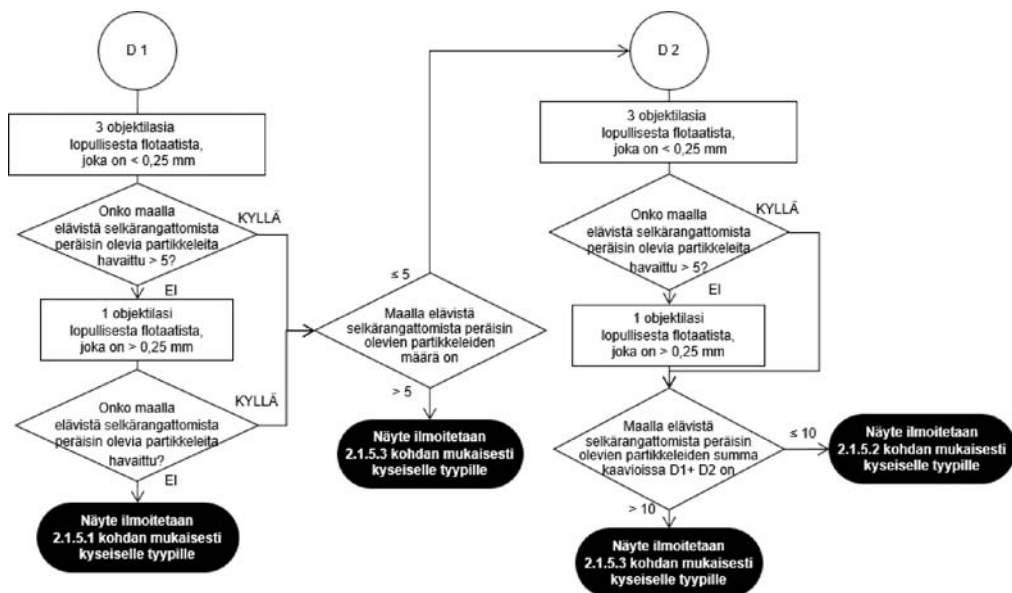


("D1" ja "D2" viittaavat ensimmäiseen ja toiseen määrittelykseen; ^(a): maalla elävät selkärangaiset, kalat)

▼M8

Kaavio 3

Vuokaavio petroolieetterillä / tetrakloorietyleenillä toteutetun kaksinkertaisen sedimentaation jälkeen rehuseosten, rehuaineiden ja esiseoksien sisältämien maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi



("D1" ja "D2" viittaavat ensimmäiseen ja toiseen määritykseen)

2.1.4.3 Määrittysten lukumäärä

Määrittykset on tehtävä erilaisista 50 gramman osanäytteistä.

Jos kaaviossa 1 tai tarvittaessa kaaviossa 3 vahvistetun vuokaavion mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrityksen jälkeen ei havaita eläinperäisiä partikkeleita, lisämääritys ei ole tarpeen, ja määrityksen tulos raportoidaan 2.1.5.1 kohdassa vahvistettua vakio- tai muotoilua käyttäen.

Jos kaaviossa 1 vahvistetun vuokaavion mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrityksen jälkeen kyseisentyypisiä eläinperäisiä partikkeleita (esim. maalla eläviä selkärangattomia tai kaloja) havaitaan yksi tai useampi ja havaitut partikkelit vahvistavat näytteen ilmoitetun pitoisuuden, toista määritystä ei tarvita. Jos tämän ensimmäisen määrityksen aikana havaittujen kyseisentyypisten eläinperäisten partikkelien määrä on suurempi kuin viisi, määrityksen tulos ilmoitetaan eläintyyppittäin 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua vakio- tai muotoilua käyttäen. Muussa tapauksessa määrityksen tulos ilmoitetaan eläintyyppittäin 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua vakio- tai muotoilua käyttäen.

Jos kaaviossa 3 vahvistetun vuokaavion mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrityksen jälkeen havaitaan enemmän kuin viisi maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa eläinperäistä partikkelia, toinen määritys ei ole tarpeen, ja määrityksen tulos raportoidaan 2.1.5.3 kohdassa tätä tarkoitusta varten vahvistettua vakio- tai muotoilua käyttäen.

▼M8

Kaikissa muissa tapauksissa, mukaan lukien tilanteet, joissa laboratorioille ei ole toimitettu pitoisuutta koskevaa ilmoitusta, tehdään toinen määrittäminen uudesta osanäytteestä. Jos kaaviossa 2 tai tarvittaessa kaaviossa 3 vahvistetun vuokaavion mukaisesti tehdyn toisen määrittämisen jälkeen näissä kahdessa määrittämisessä havaittujen kyseisentyypisten eläinperäisten partikkelien summa on yhteensä suurempi kuin kymmenen, määrittämisen tulos ilmoitetaan eläintyyppittäin 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen. Muussa tapauksessa määrittämisen tulos ilmoitetaan eläintyyppittäin 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen.

2.1.5 *Tulosten ilmoittaminen*

Laboratorion on tuloksista raportoidessaan ilmoitettava mistä aineksesta määrittäminen on tehty (sedimentti, flotaatti, lopullinen flotaatti tai raaka-aine). Raportoinnista on käytävä selvästi ilmi, kuinka monta määrittäystä on tehty ja onko fraktioita seulottu edellä olevan 2.1.3.4.3 kohdan ensimmäisen alakohdan kolmannen kappaleen mukaisesti tai 2.1.3.4.4 kolmannen alakohdan mukaisesti ennen objektilasien valmistusta.

Laboratorion raportin on sisällettävä ainakin tieto maalla elävistä selkärangkaisista ja kalasta peräisin olevien ainesosien esiintymisestä.

Eri tuloksista raportoidaan seuraavasti:

2.1.5.1 Kyseisentyypistä eläinperäistä partikkelia ei havaittu:

- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella todettu maalla elävistä selkärangkaisista peräisin olevia partikkeleita.”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella todettu kalasta peräisin olevia partikkeleita.”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella todettu maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevia partikkeleita.”

2.1.5.2 Kyseisentyypisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu 1–5, kun vain yksi määrittäminen on tehty, tai 1–10, kun kaksi määrittäystä on tehty (havaittujen partikkelien määrä on pienempi kuin rehuissa esiintyvää eläinproteiinia käsittelevän EU:n vertailulaboratorion (EURL-AP) laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien SOP-toimintaohjeiden mukainen päätösraja):

Kun vain yksi määrittäminen on tehty:

- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enintään viisi maalla elävistä selkärangkaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enintään viisi kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”

▼ M8

Kun on tehty kaksi määrittystä:

- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrittelyn yhteydessä enintään kymmenen maalla elävistä selkärangkaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrittelyn yhteydessä enintään kymmenen kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrittelyn yhteydessä enintään kymmenen maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kutikulan osat, suuosat, lihas, ilmaputkisto, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”

Lisäksi:

- Jos näyte esiseulotaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.
- Jos havaitaan ainoastaan sellaisia eläinperäisiä partikkeleita, joita ei voida luokitella maalla eläviksi selkärangkaisiksi eikä kaloiksi (esim. lihassäikeet), raportissa on mainittava, että ainoastaan tällaisia eläinperäisiä partikkeleita havaittiin ja ettei voida sulkea pois sitä, että ne ovat mahdollisesti peräisin maalla elävistä selkärangkaisista.

- 2.1.5.3 Kyseisentyypisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu enemmän kuin viisi, kun vain yksi määrittys on tehty, tai enemmän kuin kymmenen, kun kaksi määrittystä on tehty:

Kun vain yksi määrittys on tehty:

- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enemmän kuin viisi maalla elävistä selkärangkaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enemmän kuin viisi kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enemmän kuin viisi maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kutikulan osat, suuosat, lihas, ilmaputkisto, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

▼ **M8**

Kun on tehty kaksi määrittystä:

- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrittelyn yhteydessä enemmän kuin kymmenen maalla elävistä selkärangaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrittelyn yhteydessä enemmän kuin kymmenen kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”
- ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrittelyn yhteydessä enemmän kuin kymmenen maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kutikulan osat, suuosat, lihas, ilmaputkisto, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

Lisäksi:

- Jos näyte esiseulotaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.
- Jos havaitaan ainoastaan sellaisia eläinperäisiä partikkeleita, joita ei voida luokitella maalla eläviksi selkärangaisiksi eikä kaloiksi (esim. lihassäikeet), raportissa on mainittava, että ainoastaan tällaisia eläinperäisiä partikkeleita havaittiin ja ettei voida sulkea pois sitä, että ne ovat mahdollisesti peräisin maalla elävistä selkärangaisista.

▼ **M2**

2.2 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

2.2.1 Periaate

Eläinperäisiä deoksiribonukleiinihapon (DNA) fragmentteja, joita rehuaineissa ja rehuseoksissa saattaa esiintyä, havainnoidaan geneettisellä amplifikaatiotekniikalla (PCR-tekniikalla), joka kohdennetaan lajikohtaisiin DNA-sekvensseihin.

PCR-menetelmä edellyttää ensiksi DNA:n eristysvaihetta. Seuraavassa vaiheessa näin eristetty DNA amplifioidaan määrittelyn kohteena olevan eläinlajin havaitsemiseksi.

2.2.2 Reagenssit ja välineet

2.2.2.1 Reagenssit

2.2.2.1.1 Reagenssit DNA:n eristysvaihetta varten

Ainoastaan reagensseja, jotka EURL-AP on hyväksynyt ja verkkosivuillaan julkaissut, saa käyttää.

2.2.2.1.2 Reagenssit geneettistä amplifikaatiotekniikkaa varten

▼ **M2**

- 2.2.2.1.2.1 Alukkeet ja koettimet
- Ainoastaan alukkeita ja koettimia, joiden oligonukleotidisekvenssit EURL-AP on validoinut, saa käyttää ⁽¹⁾.
- 2.2.2.1.2.2 Master Mix
- Ainoastaan Master Mix -liuoksia, jotka eivät sisällä reagensseja, jotka saattavat johtaa eläin-DNA:n esiintymisen vuoksi väärin tuloksiin, saa käyttää ⁽²⁾.
- 2.2.2.1.2.3 Dekontaminaatioreagenssit.
- 2.2.2.1.2.3.1 Suolahappoliuos (0,1N).
- 2.2.2.1.2.3.2 Natriumhypokloriittiliuos (0,15 % aktiivista klooria).
- 2.2.2.1.2.3.3 Syövyttämättömät reagenssit kalliiden laitteiden, kuten analyysivaakojen (esim. MP Biomedicals -yrityksen tuote DNA EraseTM) dekontaminointiin.
- 2.2.2.2 Laitteet
- 2.2.2.2.1 Analyysivaaka, tarkkuus 0,001 g.
- 2.2.2.2.2 Jauhamisvälineet.
- 2.2.2.2.3 Lämpöblokki, joka mahdollistaa reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion (PCR)
- 2.2.2.2.4 Mikrosentrifugi mikrofugiputkia varten.
- 2.2.2.2.5 Mikropipettejä, joilla voidaan pipetoida tilavuudeltaan 1–1 000 µl:n näytteitä.
- 2.2.2.2.6 Molekyylibiologiassa käytettävät tavanomaiset muoviasiat: mikrofugiputket, suodattimelliset mikropipettien muovikärjet, lämpöblokkiin soveltuvat levyt.
- 2.2.2.2.7 Pakastimet näytteiden ja reagenssien säilytystä varten.
- 2.2.3 *Näytteenotto ja näytteiden valmistus*
- 2.2.3.1 Näytteenotto
- Käytetään liitteen I säännösten mukaisesti otettua edustavaa näytettä.
- 2.2.3.2 Näytteen valmistus
- Laboratorionäytteet on esikäsitteltävä DNA:n eristämistä varten liitteessä II vahvistettujen vaatimusten mukaisesti. Vähintään 50 grammaa näytettä on jauhettava määritystä varten.
- Näytteen valmistus on tehtävä eri huoneissa kuin DNA:n eristys ja geneettinen amplifikaatioreaktio ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla.
- Valmistetaan vähintään kaksi 100 mg:n suuruista testinäytettä.
- 2.2.4 *DNA:n eristäminen*
- DNA eristetään näytteistä, jotka on esikäsittely EURL-AP:n laitteiden ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti.
- Jokaista DNA:n eristyskertaa kohti tehdään kaksi eristyskontrollia ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla:
- negatiivinen DNA-eristyskontrolli,
 - positiivinen DNA-eristyskontrolli.

⁽¹⁾ Luettelo näistä määrityksen kohteena oleville kullekin eläinlajille vahvistetuista koettimista ja alukkeista on saatavana EURL-AP:n verkkosivustolla.

⁽²⁾ Esimerkkejä toimivista Master Mix -liuoksista on saatavana EURL-AP:n verkkosivustolla.

▼ **M2**2.2.5 *Geneettinen amplifikaatio*

Geneettinen amplifikaatio suoritetaan kullekin tunnistettavalle lajille validoitua menetelmää käyttäen. Nämä menetelmät on vahvistettu EURL-AP:n laatimissa ja verkkosivullaan julkaisemissa toimintaohjeissa. Kukin eristetty DNA on määritettävä vähintään kahtena eri laimennoksena, jotta inhibitio voidaan arvioida.

Jokaista kohdelajia kohti tehdään kaksi amplifikaatiokontrollia ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla:

- kohteen positiivinen DNA-kontrolli kullekin PCR-ajolle tai PCR-testisarjalle,
- amplifikaation reagenssikontrolli (ilman DNA-templaattia NTC) kullekin PCR-ajolle tai PCR-testisarjalle.

2.2.6 *Tulosten tulkinta ja esittäminen*

Laboratorion on tuloksista raportoidessaan ilmoitettava ainakin käytettyjen testinäytteiden paino, käytetty eristystekniikka, suoritettujen määritysten määrä ja menetelmän toteamisraja.

Tuloksia ei saa tulkita eikä raportoida, jos testin kohteesta ei positiivisessa DNA-eristyskontrollissa ja kohteen positiivisessa DNA-kontrollissa saada positiivisia tuloksia kun taas amplifikaation reagenssikontrolli on negatiivinen.

Jos kahdesta testinäytteestä saadut tulokset eivät ole yhdenmukaisia, ainakin geneettinen amplifikaatio on toistettava. Jos laboratorio epäilee, että epäyhdenmukaisuus voi johtua eristetystä DNA:sta, DNA:n eristys ja geneettinen amplifikaatio on tehtävä uudelleen ennen tulosten tulkitsemista.

Lopullisten raportoitavien tulosten on perustuttava kyseisestä kahdesta testinäytteestä saatujen tulosten yhdistämiseen ja tulkintaan EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti.

2.2.6.1 *Negatiivinen tulos*

Negatiivinen tulos on raportoitava seuraavasti:

Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu yhtään X:n DNA:ta (X on testin kohteena oleva eläinlaji tai eläinlajiryhmä).

2.2.6.2 *Positiivinen tulos*

Positiivinen tulos raportoidaan seuraavasti:

Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin X:n DNA:ta (X on testin kohteena oleva eläinlaji tai eläinlajiryhmä).

▼ **M9***LIITE VII***SIIPIKARJAN REHUIJEN ENERGIA-ARVON
LASKENTAMENETELMÄ****1. ENERGIA-ARVON LASKENTAMENETELMÄ JA ILMOITTAMINEN**

Siipikarjan rehuseosten energia-arvo on laskettava jäljempänä olevan kaavan mukaisesti tiettyjen rehun ravintoaineiden prosenttiosuuksien perusteella. Energia-arvo ilmoitetaan typen suhteen korjattuna muuntokelpoisena energiana (ME) käyttäen yksikköä megajoule (MJ) rehuseoskiloa kohti:

$\text{MJ/kg ME:tä} = 0,1551 \times \text{raakavalkuaisprosentti} + 0,3431 \times \text{raakarasvaprosentti} + 0,1669 \times \text{tärkkelysprosentti} + 0,1301 \times \text{kokonaissokeriprocentti}$ (sakaraoosina ilmaistuna).

2. SALLITUT POIKKEAMAT ILMOITETUISTA ENERGIA-ARVOISTA

Jos virallisessa tarkastuksessa käy ilmi, että tarkastuksen perusteella saatu ja ilmoitettu energia-arvo poikkeavat toisistaan (pienempi tai suurempi kuin ilmoitettu energia-arvo), sallitaan ME:ssä 0,4 MJ/kg:n suuruinen poikkeama.

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 unionin näytteenottomenetelmien ja virallisen rehuvalvonnan määritysmenetelmien mukaisesti.

Seuraavia menetelmiä on käytettävä:

— raakarasvapitoisuuden määrittäminen: raakarasvan ja -öljyn määrittämisessä käytettävä menettelytapa B sellaisena kuin se on vahvistettu liitteessä III olevassa G osassa,

— tärkkelyspitoisuuden määrittäminen: polarimetrisen menetelmä, joka on vahvistettu liitteessä III olevassa K osassa.

**KISSOILLE JA KOIRILLE TARKOITETTUIJEN REHUAINEIDEN JA
REHUSEOSTEN ENERGIA-ARVON LASKENTAMENETELMÄ**

Kissoille ja koirille tarkoitettujen rehuaineiden ja rehuseosten energia-arvo lasketaan EN 16967 -standardin (Rehut. Näytteenotto ja analysointi. Laskentakaavat kissan- ja koiranruuan ja niiden raaka-aineiden sisältämän metaboloituvan energian arvioimiseksi, mukaan lukien dieettiruuat) mukaisesti.

▼ M9

▼ B

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	—

▼B**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/ETY

Direktiivi 84/425/ETY	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

▼B**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