KOMISSION DIREKTIIVI 1999/27/EY,

annettu 20 päivänä huhtikuuta 1999,

yhteisön menetelmien vahvistamisesta amproliumin, diklatsuriilin ja karbadoksin määrittämiseksi rehuista ja direktiivien 71/250/ETY ja 73/46/ETY muuttamisesta sekä direktiivin 74/203/ETY kumoamisesta

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin 70/373/ETY ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna Itävallan, Suomen ja Ruotsin liittymisasiakirjalla, ja erityisesti sen 2 artiklan,

sekä katsoo, että

(1) direktiivissä 70/373/ETY säädetään, että rehujen laadusta ja koostumuksesta annettujen lakien, asetusten ja hallinnollisten säännösten noudattamisen valvomiseksi tehtävissä virallisissa tarkastuksissa on käytettävä yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmiä,

(2) rehujen lisäaineista 23 päivänä marraskuuta 1970 annetussa neuvoston direktiivissä 70/524/ETY ([2]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission asetuksella (EY) N:o 45/1999 ([3]), säädetään, että amprolium- ja diklatsuriilipitoisuus on merkittävä pakkauksiin, kun näitä aineita lisätään esiseoksiin ja rehuihin; hyväksyntä käyttää karbadoksia rehujen lisäaineena on peruutettu rehujen lisäaineista annetun neuvoston direktiivin 70/524/ETY muuttamisesta siltä osin kuin se koskee tiettyjen kasvunedistäjien hyväksymisen peruuttamisesta 22 päivänä joulukuuta 1998 annetulla komission asetuksella (EY) N:o 2788/98 ([4]), ja kiellettyjen aineiden mahdollisen laittoman käytön virallinen valvonta on tarpeen,

(3) kyseisten aineiden valvomiseksi tarkoitetut määritysmenetelmät on vahvistettava,

(4) yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 15 päivänä kesäkuuta 1971 annetussa ensimmäisessä komission direktiivissä 71/250/ETY ([5]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 98/54/ETY ([6]), vahvistetaan muun muassa sinappiöljyn ja teobromiinin määritysmenetelmät; mainitut menetelmät on poistettava,

(5) yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 5 päivänä joulukuuta 1972 annetussa neljännessä komission direktiivissä 73/46/ETY ([7]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 98/54/ETY, vahvistetaan muun muassa retinolin (A-vitamiinin) määritysmenetelmät; tieteellisen ja teknisen tietämyksen lisääntymisestä johtuen kuvattu menetelmä ei enää sovellu tarkoitukseensa; retinolin määritystä koskeva menetelmä on sen vuoksi poistettava,

(6) yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 25 päivänä maaliskuuta 1974 annetussa viidennessä komission direktiivissä 74/203/ETY ([8]), sellaisena kuin se on muutettuna direktiivillä 81/680/ETY ([9]), vahvistetaan määritysmenetelmät tärkkelyksen ja suurimolekyylisten tärkkelyksen pilkkoutumistuotteiden pitoisuuksien määrittämiseksi rehuista, jotka sisältävät juurikasleikettä, juurikaspulppaa, kuivattuja juurikkaan varsia tai lehtiä, perunapulppaa, kuivahiivaa, runsaasti inuliinia tai tali- ja rasvajätteitä sisältäviä tuotteita, amproliumia, etopabaattia, dinitolmidia, nikarbatsiinia ja menadionia (K3-vitamiinia); kaikki mainitussa direktiivissä kuvatut menetelmät eivät tieteellisen ja teknisen tietämyksen lisääntymisestä johtuen enää sovellu tarkoitukseensa; mainittu direktiivi on sen vuoksi kumottava,

(7) tämän direktiivin säännökset ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on säädettävä, että määritettäessä amproliumin, diklatsuriilin ja karbadoksin pitoisuuksia rehuissa ja esiseoksissa virallisia tarkastuksia varten on käytettävä tämän direktiivin liitteessä esitettyjä menetelmiä.

([1]) EYVL L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) EYVL L 270, 14.12.1970, s. 1.
([3]) EYVL L 6, 12.1.1999, s. 3.
([4]) EYVL L 347, 23.12.1998, s. 31.
([5]) EYVL L 155, 12.7.1971, s. 13.
([6]) EYVL L 208, 24.7.1998, s. 49.
([7]) EYVL L 83, 30.3.1973, s. 21.
([8]) EYVL L 108, 22.4.1974, s. 7.
([9]) EYVL L 246, 29.8.1981, s. 32.

2 artikla

Muutetaan direktiivi 71/250/ETY seuraavasti:

1) Poistetaan 1 artiklasta sanat ”sinappiöljy” ja ”teobromiini”.

2) Poistetaan liitteessä oleva 8 ja 13 kohta.

3 artikla

Muutetaan direktiivi 73/46/ETY seuraavasti:

1) Poistetaan 2 artikla.

2) Poistetaan liite II.

4 artikla

Kumotaan viides direktiivi 74/203/ETY.

5 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 31 päivänä lokakuuta 1999. Niiden on ilmoitettava tästä viipymättä komissiolle.

Jäsenvaltioiden on sovellettava näitä säännöksiä 1 päivästä marraskuuta 1999.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

6 artikla

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

7 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 20 päivänä huhtikuuta 1999.

Komission puolesta

Franz FISCHLER

Komission jäsen

LIITE

A OSA

AMPROLIUMIN MÄÄRITYS

1 [(4-amino-2-propyylipyrimidin-5-yyli)metyyli]-2-metyylipyridiniumkloridihydrokloridi

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Määritysmenetelmä on tarkoitettu amproliumin määrittämiseen rehuseoksista ja esiseoksista. Toteamisraja on 1 mg/kg ja määritysraja 25 mg/kg.

2. **Periaate**

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

3. **Reagenssit**

3.1 Metanoli

3.2 Asetonitriili, HPLC-laatu

3.3 Vesi, HPLC-laatu

3.4 Natriumdivetyfosfaattiliuos, 0,1 mol/l

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

3.5 Natriumperkloraattiliuos 1,6 mol/l

Liuotetaan 224,74 g natriumperkloraattimonohydraattia veteen (3.3) 1000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin vedellä (3.3) ja sekoitetaan.

3.6 HPLC:ssä käytettävä ajoliuos (katso huomautus 9.1)

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

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

3.7.1 Amproliumstandardin kantaliuos, 500 µg/ml

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

3.7.2 Amproliumstandardin väliliuos, 50 µg/ml

Pipetoidaan 5,0 ml kantastandardiliuosta (3.7.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin uuttoliuoksella (3.8) ja sekoitetaan. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.7.3 Kalibrointiliuokset

Siirretään 0,5, 1,0 ja 2,0 ml välistandardiliuosta (3.7.2) 50 ml:n mittapulloihin. Täytetään merkkiin ajoliuoksella (3.6) ja sekoitetaan. Nämä liuokset vastaavat 0,5, 1,0 ja 2,0 µg/ml amproliumia. Nämä liuokset on valmistettava aina juuri ennen käyttöä.

3.8 Uuttoliuos

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

4. **Laitteet**

4.1 HPLC-laitteisto, jonka injektorilla voidaan injektoida 100 ul:n näytetilavuuksia

4.1.1 Nestekromatografiakolonni, 125 mm x 4 mm, kationinvaihto Nucleosil 10 SA, 10 µm:n tai vastaava

4.1.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetektori

4.2 Kalvosuodatin, PTFE:tä, 0,45 µm

4.3 Kalvosuodatin, 0,22 µm

4.4 Ultraäänihaude

4.5 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoittaja

5. **Suoritus**

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 Saannon määritys

Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on tehty näytteen amproliumpitoisuutta vastaava lisäys. Jotta saadaan 100 mg/kg amproliumia vastaava lisäys, 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, annetaan tasoittua 10 minuuttia sekoittaen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (katso 5.1.1), voidaan saanto määrittää vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään 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 15 minuutiksi. Kolvi otetaan pois ultraäänihauteesta ja ravistellaan 1 tunti ravistelijalla tai sekoitetaan magneettisekoittajalla (4.5). Uutteesta otettu erä laimennetaan ajoliuoksella (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 1 5 minuutiksi. Kolvi otetaan pois ultraäänihauteesta ja ravistellaan 1 tunti ravistelijalla tai sekoitetaan magneettisekoittajalla (4.5). Uutteesta otettu erä laimennetaan ajoliuoksella (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 Ajo-olosuhteet:

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia ja niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaisia tuloksia.

Nestekromatografiakolonni (4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationinvaihtaja Nucleosil 10 SA, 10 µm:n vastaava
Ajoliuos (3.6):	Asetonitriilin (3.2), natriumdivetyfosfaattiliuoksen (3.4) ja natriumperkloraattiliuoksen (3.5) seos, 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Virtausnopeus:	0,7 – 1 ml/min
Aallonpituus:	264 mm
Injektiotilavuus:	100 µl

Kromatografiajärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektoimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.7.3), jonka konsentraatio on 1,0 µl/ml, kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat ovat vakiot.

5.3.2 Kalibrointikäyrä

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

5.3.3 Näyteliuos

Injektoidaan näyteuutetta (5.2) useita kertoja käyttäen samaa injektiotilavuutta kuin kalibrointiliuoksille ja määritetään amproliumpiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen amproliumkonsentraatio (µg/ml) lasketaan piikin korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.3.2) avulla.

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

$$w = \frac{V \cdot \beta \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

jossa

V = uuttoliuoksen (3.8) tilavuus ml kohdan 5.2 mukaisesti (ts. 200 ml)

β = näyteuutteen (5.2) amproliumkonsentraatio (µg/ml)

f = kohdan 5.2 mukainen laimennustekijä

m = testattavan näytemäärän massa (g)

7. Tulosten validointi

7.1 *Tunnistus*

Analyytin tunnistus voidaan varmentaa rinnakkaiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla verrataan näyteuutteen (5.2) ja 2,0 µg/ml sisältävän kalibrointiliuoksen (7.3.3) spektrejä.

7.1.1 Rinnakkaiskromatografia

Näyteuutteeseen (5.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.7.3). Lisätyn amproliumin määrän tulisi olla samaa suuruusluokkaa kuin näytteessä todettu amproliumin määrä.

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

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tuloksia arvioidaan seuraavien vaatimusten mukaisesti:

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

b) Välillä 210 – 320 nm kromatogrammin piikkien huipun kohdalla ajetut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10 – 100 %. Tämä vaatimus täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % standardianalyytin absorbanssista.

c) Välillä 210 – 320 nm näyteuutteesta ajetut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10 – 100 %. Tämä vaatimus täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % piikin huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä vaatimuksista ei täyty, analyytin läsnäoloa ei voi pitää varmistettuna.

7.2 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaisen määrityksen tulosten ero ei saa olla suurempi kuin

— 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta, kun amproliumpitoisuus on välillä 25 mg/kg – 500 mg/kg,

— 75 mg/kg, kun amproliumpitoisuus on välillä 500 mg/kg – 1 000 mg/kg,

— 75 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta, kun amproliumpitoisuus on yli 1 000 mg/kg.

7.3 Saanto

Kun (nolla)näytteeseen on tehty amproliumlisäys, saannon on oltava vähintään 90 %.

8. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset**

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

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

L = laboratorioiden lukumäärä

n = yksittäisten arvojen lukumäärä

s_r = toistettavuuden keskihajonta

CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin

s_R = uusittavuuden keskihajonta

CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin

9. **Huomautuksia**

9.1 Jos näytteessä on tiamiinia, tiamiinipiikki näkyy kromatogrammissa hiukan ennen amproliumpiikkiä. Tässä menetelmässä amprolium ja tiamiini on erotettava. Jos ne eivät erotu käytetyllä kolonnilla (4.1.1), korvataan enintään 50 % ajoliuoksen (3.6) asetonitriiliosuudesta metanolilla.

9.2 British Pharmacopoeian mukaan suolahappoon (c = 0,1 mol/l) tehdyn amproliumliuoksen (c = 0,02 mol/l) spektrissä on maksimit aallonpituuksilla 246 nm ja 262 nm. Absorbanssin on saavutettava arvo 0,84 aallonpituudella 246 nm ja 0,80 aallonpituudella 262 nm.

9.3 Uute on aina laimennettava ajoliuoksella, koska muuten amproliumpiikin retentioaika voi muuttua merkittävästi ionivahvuuden muuttumisen johdosta. Kun määritetään alhaisia (esim. ≤ 10 mg/kg) amproliumpitoisuuksia, testattavan näytemäärän on oltava suurempi, jotta uutetta voidaan laimentaa.

B OSA

DIKLATSURIILIN MÄÄRITYS

(+)-4-kloorifenyyli-[2,6-dikloori-4-(2, 3, 4, 5-tetrahydro-3, 5-diokso-1, 2, 4-triatsin-2-yyli)-fenyyli]asetonitriili

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmä on tarkoitettu diklatsuriilin määrittämiseen rehuseoksista ja esiseoksista. Toteamisraja on 0,1 mg/kg ja määritysraja 0,5 mg/kg.

2. **Periaate**

Sisäisen standardin lisäyksen jälkeen näyte uutetaan happamalla metanolilla. Rehuseosnäytteistä saadut uutteet puhdistetaan C18-kiinteäfaasiuuttopatruunalla. Diklatsuriili eluoidaan patruunasta happaman metanolin ja veden seoksella. Haihdutuksen jälkeen jäännös liuotetaan DMF-vesiseokseen. Esiseoksista saadut uutteet haihdutetaan ja jäännös liuotetaan DMF-vesiseokseen. Diklatsuriilipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (RP-HPLC) käyttäen ternaarigradienttia ja UV-detektoria.

3. **Reagenssit**

3.1 Vesi, HPLC-laatu

3.2 Ammoniumasetaatti

3.3 Tetrabutyyliammoniumvetysulfaatti (TBHS)

3.4 Asetonitriili, HPLC-laatu

3.5 Metanoli, HPLC-laatu

3.6 N,N-dimetyyliformamidi (DMF)

3.7 Suolahappo, ρ_{20} = 1,19 g/ml

3.8 Standardiaine: diklatsuriili II-24: (+)-4-kloorifenyyli-[2,6-dikloori-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triatsin-2-yyli)-fenyyli]asetonitriili, jonka puhtaus on varmistettu, E 771.

3.8.1 Diklatsuriilistandardin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella noin 25 mg diklatsuriilistandardia (3.8) 50 ml:n mittapulloon, liuotetaan DMF:ään (3.6), täytetään merkkiin DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.8.2 Diklatsuriilin standardiliuos, 50 µg/ml

Pipetoidaan 5,00 ml standardin kantaliuosta (3.8.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.9 Sisäinen standardiaine: 2,6-dikloori-α-(4-kloorifenyyli)-4-(4,5-dihydro-3,5-diokso-1,2,4-triatsin-2-(3H)-yyli-α-metyylibentseeniasetonitriili

3.9.1 Sisäisen standardin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella noin 25 mg sisäistä standardiainetta (3.9) 50 ml:n mittapulloon, liuotetaan DMF:ään (3.6), täytetään merkkiin DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.9.2 Sisäinen standardiliuos, 50 µg/ml

Pipetoidaan 5,00 ml sisäisen standardin kantaliuosta (3.9.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin DMF:llä (3.6) ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.9.3 Sisäinen standardiliuos esiseoksille, p/1 000 mg/ml (p = diklatsuriilin nimellispitoisuus esiseoksessa mg/kg)

Punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella p/10 mg sisäistä standardiainetta 100 ml:n asteikolliseen pulloon, liuotetaan DMF:ään (3.6) ultraäänihauteessa (4.6), täytetään merkkiin DMF:llä ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa. pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.10 Kalibrointiliuos, 2 µg/ml

Pipetoidaan 2,00 ml diklatsuriilin standardiliuosta (3.8.2) ja 2,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2) 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 16 ml DMF:ää (3.6), täytetään merkkiin vedellä ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava aina uudestaan ennen käyttöä.

3.11 C18-kiinteäfaasiuuttopatruuna, esim. Bond Elut, 1 ml, sorbentin massa: 100 mg.

3.12 Uuttoliuos: hapan metanoli.

Pipetoidaan 5,0 ml suolahappoa (3.7) 1 000 ml:aan metanolia (3.5) ja sekoitetaan.

3.13 HPLC:ssä käytettävä ajoliuos

Eluentti A: ammoniumasetaatti-tetrabutyyliammoniumvetysulfaattiliuos.

3.13.1 Liuotetaan 5 g Rammoniumasetaattia (3.2) ja 3,4 g TBHS:a (3.3) 1 000 ml:aan vettä (3.1) ja sekoitetaan.

3.13.2 Eluentti B: asetonitriili (3.4)

3.13.3 Eluentti C: metanoli (3.5)

4. **Laitteet**

4.1 Mekaaninen ravistelija

4.2 Ternaarigradientti HPLC -laitteisto

4.2.1 Nestekromatografiakolonni, 100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm tai vastaava

4.2.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetektori

4.3 Vakuumipyöröhaihduttaja

4.4 Kalvosuodatin, 0,45 µm

4.5 Tyhjiösuodatuslaite

4.6 Ultraäänihaude

5. **Suoritus**

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 Saannon määritys

Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on tehty näytteen diklatsuriiliapitoisuutta vastaava lisäys Jotta saadaan 1 mg/kg diklatsuriilia vastaava lisäys, siirretään 0,1 ml standardin kantaliuosta (3.8.1) 50 g:aan nollanäytettä, sekoitetaan perusteellisesti, annetaan tasoittua 10 minuuttia sekoittaen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

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

5.2 *Uutto*

5.2.1 Rehut

Punnitaan noin 50 g näytettä 0,01 gramman tarkkuudella 500 ml:n erlenmeyerkolviin, lisätään 1,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.9.2), 200 ml uuttoliuosta (3.12) ja suljetaan kolvi tulpalla. Seosta ravistellaan ravistelijalla (4.1) yli yön. Annetaan laskeutua 10 minuuttia. Siirretään 20 ml supernatantista sopivaan lasiastiaan ja laimennetaan 20 ml:lla vettä. Siirretään liuos uuttopatruunaan (3.11) ja imetään liuos sen läpi vakuumilla (4.5). Pestään patruuna 25 ml:lla uuttoliuoksen (3.12) ja veden seosta, 65 + 35 (V + V). Kerätyt fraktiot heitetään pois ja määritettävät aineet eluoidaan 25 ml:lla uuttoliuoksen (3.12) ja veden seosta, 80 + 20 (V + V). Tämä fraktio haihdutetaan pyöröhaihduttimella (4.3) 60 °C:ssa melkein kuiviin. Jäännös liuotetaan 1,0 ml:aan DMF:ää (3.6), lisätään 1,5 ml vettä (3.1) ja sekoitetaan. Suodatetaan kalvosuodattimella (4.4). Tehdään HPLC- määritys (5.3).

5.2.2 Esiseokset

Punnitaan noin 1 g näytettä 0,001 g:n tarkkuudella 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 pyöröhaihduttajalla (4.3) 60 °C:ssa melkein kuiviin. 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 Ajo-olosuhteet

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia ja niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaisia tuloksia.

— Nestekromatografiakolonni (4.2.1):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, pakkausaine 3 µm:n, tai vastaava	
— Ajoliuos:	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 gradienttieluointi 30 minuutissa: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)
	Huuhdotaan B:llä 10 min.
— Virtausnopeus:	1,5 – 2 ml/min
— Injektiotilavuus:	20 µl
— Aallonpituus:	280 mm

Kromatografiajärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektoimalla useita kertoja kalibrointiliuosta (3.10), jonka konsentraatio on 2 µl/ml, kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat ovat vakiot.

5.3.2 Kalibrointiliuos

Injektoidaan 20 µl kalibrointiliuosta (3.10) useita kertoja ja määritetään diklatsuriilin ja sisäisen standardin piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot.

5.3.3 Näyteliuos

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

6. **Tulosten laskeminen**

6.1 Rehut

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

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

jossa

$h_{d,s}$ = näyteliuoksen (5.2.1) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala)

$h_{i,c}$ = näyteliuoksen (5.2.1) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala)

$h_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala)

$h_{i,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala)

$\beta_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilipitoisuus µg/ml

m = testattavan näytemäärän massa grammoina

V = näyteuutteen tilavuus kohdan 5.2.1 mukaan (ts. 2,5 ml).

6.2 Esiseokset

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

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

jossa

$h_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala)

$h_{ic,}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala)

$h_{d,s}$ = näyteliuoksen (5.2.2) diklatsuriilin piikin korkeus (pinta-ala)

$h_{i,s}$ = näyteliuoksen (5.2.2) sisäisen standardin piikin korkeus (pinta-ala)

$\beta_{d,c}$ = kalibrointiliuoksen (3.10) diklatsuriilipitoisuus µg/ml

m = testattavan näytemäärän massa grammoina

V = näyteuutteen tilavuus kohdan 5.2.2 mukaan (ts. 25 ml)

P = esiseoksen diklatsuriilin nimellispitoisuus mg/kg.

7. **Tulosten validointi**

7.1 *Tunnistus*

Analyytin tunnistus voidaan varmentaa rinnakkaiskromatografialla tai käyttämällä diodirividetektoria, jolla verrataan näyteuutteen (5.2.1 tai 5.2.2) ja kalibrointiliuoksen (3.10) spektrejä.

7.1.1 Rinnakkaiskromatografia

Näyteuutteeseen (5.2.1 tai 5.2.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.10). Lisätyn diklatsuriilin määrän tulisi olla samaa suuruusluokkaa kuin näytteessä todettu diklatsuriilin määrä.

Ainoastaan diklatsuriilin ja sisäisen standardin piikit saavat kasvaa, kun otetaan huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimennus. Piikin leveys puolivälissä piikin korkeutta on oltava 10 % sellaisen näyteuutteen alkuperäisen diklatsuriilipiikin tai sisäisen standardin piikin leveydeltä, johon ei ole tehty lisäystä.

7.1.2 Diodirividetektorimääritys

Tuloksia arvioidaan seuraavien vaatimusten 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 ajetut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10-100 %: Tämä vaatimus täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % standardianalyytin absorbanssista.

c) Välillä 230 – 320 nm näyteuutteesta ajetut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10 – 100 %. Tämä vaatimus täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % spiikin huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä vaatimuksista ei täyty, analyytin läsnäoloa ei voi pitää varmistettuna.

7.2 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaisen määrityksen tulosten ero ei saa olla suurempi kuin

— 30 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta, kun diklatsuriilipitoisuus on välillä 0,5 mg/kg – 2,5 mg/kg,

— 0,75 mg/kg, kun diklatsuriilipitoisuus on välillä 2,5 mg/kg – 5 mg/kg,

— 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta, kun diklatsuriilipitoisuus on yli 5 mg/kg.

7.3 Saanto

Kun näytteeseen on tehty diklatsuriililisäys, saannon on oltava vähintään 80 %.

8. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset**

Viisi näytettä analysoitiin 11 laboratoriossa. Näytteistä oli kaksi esiseosta. Toinen sekoitettiin orgaaniseen matriisiin (O 100) ja toinen epäorgaaniseen matriisiin (A 100). Teoreettinen pitoisuus on 100 mg diklatsuriilia kilogrammassa. Kolme eri valmistajaa (NL) valmisti kolme siipikarjan rehuseosta (L1/Z1/K1). Teoreettinen pitoisuus on 1 mg diklatsuriilia kilogrammassa. Laboratorioita pyydettiin analysoimaan kukin näyte kerran tai kaksoismäärityksinä. (Tarkempia tietoja tästä laboratorioiden välisestä tutkimuksesta löytyy aikakauslehdestä *Journal of AOAC International, Volume 77, n:o 6, 1994, s. 1359 – 1361.)* Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

	Näyte 1 A 100	Näyte 2 O 100	Näyte 3 L 1	Näyte 4 Z 1	Näyte 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Keskiarvo	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S_r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV_r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S_R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV_R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nimellispitoisuus (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = laboratorioiden lukumäärä
n = yksittäisten arvojen lukumäärä
s_r = toistettavuuden keskihajonta
CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin
S_R = uusittavuuden keskihajonta
CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.

9. Huomautuksia

Diklatsuriilivasteen lineaarisuus on osoitettava etukäteen ao. konsentraatioalueilla.

C OSA

KARBADOKSIN MÄÄRITYS

Metyyli-3-(2-kinoksalinyylimetyleeni)-karbatsaatti-N[1],N4-dioksidi

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Tämän menetelmän avulla voidaan määrittää karbadoksi rehuseoksista, esiseoksista ja rehun lisäainevalmisteista. Toteamisraja on 1 mg/kg. Määritysraja on 10 mg/kg.

2. **Periaate**

Näytteeseen lisätään vettä ja se uutetaan metanoli-asetonitriilillä. Rehuseosnäytteiden suodatetusta uutoksesta puhdistetaan tietty tilavuusosa alumiinioksidipylvään avulla. Esiseosnäytteiden ja rehun lisäainevalmistenäytteiden suodatetusta uutoksesta tietty tilavuusosa laimennetaan sopivalle pitoisuusalueelle vedellä, metanolilla ja asetonitriilillä. Karbadoksipitoisuus määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

3. **Reagenssit**

3.1 Metanoli

3.2 Asetonitriili, HPLC-laatu

3.3 Etikkahappo, w = 100 %

3.4 Alumiinioksidi: neutraali, aktiivisuusaste I

3.5 Metanoli-asetonitriili 1 + 1 (V + V)

Sekoitetaan 500 ml metanolia (3.1) ja 500 ml asetonitriiliä (3.2).

3.6 Etikkahappo, σ = 10 %

Laimennetaan 10 ml etikkahappoa (3.3) 100 ml:aan vedellä.

3.7 Natriumasetaatti, CH_3COONa

3.8 Vesi, HPLC-laatu

3.9 Asetaattipuskuriliuos, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0

Liuotetaan 0,82 g natriumasetaattia (3.7) 700 ml:aan vettä (3.8) ja pH säädetään arvoon 6,0 etikkahapolla (3.6). Siirretään 1 000 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin vedellä (3.8) ja sekoitetaan.

3.10. HPLC-ajoliuos

Sekoitetaan 825 ml asetaattipuskuriliuosta (3.9) ja 175 ml asetonitriiliä (3.2). Suodatetaan 0,22 µm:n kalvosuodattimen (4.5) läpi ja poistetaan kaasut liuoksesta (esiin. ultraäänihauteessa 10 min).

3.11 Standardiaine

Puhdas karbadoksi: Metyyli-3-(2-kinoksalinyylimetyleeni)-karbatsaatti-N[1],N4-dioksidi, E 850.

3.11.1 Karbadoksistandardin kantaliuos, 100 µg/ml (katso huomautus kohdasta 5: Analyysin suoritus)

Punnitaan 25 mg karbadoksia (3.11) 0,1 mg:n tarkkuudella 250 ml:n mittapulloon. Liuotetaan metanoli-asetonitriiliin (3.5) käsittelemällä ultraäänihauteessa (4.7). Ultraäänikäsittelyn jälkeen liuos jäähdytetään huoneen lämpötilaan, täytetään merkkiin metanoli-asetonitriilillä (3.5) ja sekoitetaan. Pullo kääritään alumiinifolioon tai käytetään tummaa pulloa ja säilytetään jääkaapissa. Liuos säilyy ≤ 4 °C:n lämpötilassa yhden kuukauden.

3.11.2 Kalibrointiliuokset

Pipetoidaan 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 ml karbadoksistandardin kantaliuosta (3.11.1) 100 ml:n kalibroituihin pulloihin. Lisätään 30 ml vettä, täytetään merkkiin metanoli-asetonitriilillä (3.5) ja sekoitetaan. Kääritään pullot alumiinifolioon. Nämä liuokset sisältävät vastaavasti 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 µg/ml karbadoksia. Kalibrointiliuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

Huom. Kun määritetään karbadoksia rehuista, jotka sisältävät vähemmän kuin 10 mg/kg karbadoksia, on valmistettava kalibrointiliuos, jonka konsentraatio on pienempi kuin 2,0 µg/ml.

3.12 Vesi-(metanoli-asetonitriili) (3.5) -seos, 300 + 700 (V + V)

Sekoitetaan 300 ml vettä ja 700 ml metanoli-asetonitriiliseosta (3.5).

4. **Laitteisto**

4.1 Laboratorioravistelija tai magneettisekoittaja

4.2 Lasikuitusuodatinpaperi (Whatman GF/A tai vastaava)

4.3 Lasikolonni (pituus 300 – 400 mm, sisähalkaisija noin 10 mm), jossa on lasisuodatin ja poistohana.

Huom. Voidaan käyttää myös tulpalla varustettua lasikolonnia tai lasikolonnia, jonka pää suippenee. Tällöin kolonnin alapäähän pannaan pieni lasivillatuppo, joka tiivistetään lasisauvalla.

4.4 HPLC-laitteisto, jossa injektori, jonka injektiotilavuus 20 µl

4.4.1 C18-nestekromatografiakolonni: 300 mm x 4 mm, hiukkaskoko 10 µm tai vastaava

4.4.2 Vaihtuva-aallonpituuksinen UV-detektori tai diodirividetektori, mittausaallonpituusalue 225 – 400 nm

4.5 Kalvosuodatin 0,22 µm

4.6 Kalvosuodatin 0,45 µm

4.7 Ultraäänihaude

5. **Analyysin suoritus**

Huom. Karbadoksi on valonarkaa. Kaikki toimenpiteet on suoritettava himmennetyssä valaistuksessa, tai on käytettävä ruskeita tai alumiinifolioon käärittyjä lasitavaroita.

5.1 *Yleistä*

5.1.1 Nollarehu

Saantokokeen (5.1.2) suorittamista varten analysoidaan nollarehu, jotta varmistetaan, ettei se sisällä karbadoksia tai häiritseviä aineita. Nollarehun on oltava näytteen kaltainen, eikä lisäksi sitä analysoitaessa havaita karbadoksia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe

Saantokoe suoritetaan analysoimalla nollarehu (5.1.1), johon on lisätty näytteessä esiintyvää määrää vastaava määrä karbadoksia. Lisäyksen saamiseksi tasolle 50 mg/kg karbadoksia, pipetoidaan 5,0 ml karbadoksistandardin kantaliuosta (3.11.1) 200 ml:n erlenmeyerpulloon. Liuos haihdutetaan noin 0,5 ml:ksi typpivirrassa. Lisätään 10 g nollarehua, sekoitetaan ja seisotetaan 10 minuuttia ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (katso 5.1.1), voidaan saantokoe suorittaa vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään näytteiden ennestään sisältämä määrä karbadoksia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea ko. näytteiden karbadoksimäärien erotuksesta.

5.2 *Uutto*

5.2.1 Rehuseokset

Punnitaan noin 10 g näytettä 0,01 gramman tarkkuudella ja siirretään 200 ml:n erlenmeyerpulloon. Lisätään 15,0 ml vettä, sekoitetaan ja annetaan seistä 5 minuuttia. Lisätään 35,0 ml metanoli-asetonitriiliseosta (3.5), suljetaan tulpalla ja ravistetaan 30 minuuttia ravistelijalla tai sekoitetaan magneettisekoittajalla (4.1). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatinpaperin läpi (4.2). Jatketaan puhdistusvaiheesta (5.3).

5.2.2 Esiseokset (karbadoksipitoisuus 0,1 – 2,0 %)

Punnitaan noin 1 g jauhamatonta näytettä 0,001 g:n tarkkuudella ja siirretään 200 ml:n erlenmeyerpulloon. Lisätään 15,0 ml vettä, sekoitetaan ja annetaan seistä 5 minuuttia. Lisätään 35,0 ml metanoli-asetonitriiliseosta (3.5), suljetaan tulpalla ja ravistellaan 30 minuuttia ravistelijalla tai sekoitetaan magneettisekoittajalla (4.1). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatinpaperin läpi (4.2). Pipetoidaan määräosa suodoksesta 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 15,0 ml vettä, täytetään merkkiin metanoli-asetonitriiliseoksella (3.5) ja sekoitetaan. Lopullisen liuoksen karbadoksipitoisuuden pitäisi olla noin 10 µg/ml. Suodatetaan osa 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.6). Jatketaan HPLC-määrityksellä (5.4).

5.2.3 Lisäainevalmisteet (karbadoksipitoisuus yli 2 %)

Punnitaan noin 0,2 g jauhamatonta näytettä 0,001 g:n tarkkuudella ja siirretään 250 ml:n erlenmeyerpulloon. Lisätään 45,0 ml vettä, sekoitetaan ja annetaan seistä 5 minuuttia. Lisätään 105,0 ml metanoli-asetonitriiliseosta (3.5), suljetaan tulpalla ja homogenisoidaan. Pidetään näytettä ultraäänihauteessa (4.7) 15 minuuttia, minkä jälkeen liuosta ravistellaan tai sekoitetaan 15 minuuttia (4.1). Suodatetaan liuos lasikuitusuodatinpaperin läpi (4.2). Laimennetaan määräosa suodosta vesi-metanoli-asetonitriiliseoksella (3.12) siten, että lopullisen liuoksen karbadoksipitoisuuden pitäisi olla 10 – 15 µg/ml (10 %:selle lisäainevalmisteelle laimennuskerroin on 10). Suodatetaan osa 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.6). Jatketaan HPLC-määrityksellä (5.4).

5.3 *Puhdistus*

5.3.1 Alumiinioksidipylvään valmistus

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

5.3.2 Näytteen puhdistus

Lisätään 15 ml suodatettua uutosta (5.2.1) alumiinioksidipylvääseen. Ensimmäiset 2 ml eluaattia heitetään pois. Seuraavat 5 ml otetaan talteen ja suodatetaan osa 0,45 µm:n kalvosuodattimen läpi (4.6). Jatketaan HPLC-määrityksellä (5.4).

5.4 *HPLC-määritys*

5.4.1 Ajo-olosuhteet

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia. Niitä voidaan muuttaa, mikäli ne antavat vastaavanlaisia tuloksia.

C18-nestekromatografiakolonni (4.1.1):	300 mm × 4 mm, hiukkaskoko 10 µm, tai vastaava
Ajoliuos (3.10):	Asetattipuskuriliuoksen (3.9) ja asetonitriilin (3.2) seos, 825+175 (V + V)
Virtausnopeus:	1,5−2 ml/min
Mittausaallonpituus:	365 mm
Injektiotilavuus:	20 µl

Kromatografiajärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektoimalla useita kertoja 5,0 µg/ml karbadoksia sisältävää kalibrointiliuosta (3.11.2), kunnes piikkien korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.4.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan jokaista kalibrointiliuosta (3.11.2) useita kertoja ja mitataan kutakin konsentraatiota vastaavat karbadoksipiikkien korkeudet (pinta-alat). Kalibrointikäyrä piirretään siten, että y-akselilla ovat kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta alojen) keskiarvot ja x-akselilla vastaavat konsentraatiot µg/ml.

5.4.3 Näyteliuos

Injektoidaan näyteuutosta (rehuseosten (5.3.2), esiseosten (5.2.2) ja lisäainevalmisteiden (5.2.3)) useita kertoja ja määritetään karbadoksipiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. **Tulosten laskeminen**

Näyteliuoksen karbadoksipitoisuus (µg/ml) lasketaan karbadoksin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.4.2) avulla.

6.1 Rehuseokset

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

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

jossa

β = näyteuutoksen (5.3.2) karbadoksipitoisuus (µg/ml)

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

m = punnittu näytemäärä (g)

6.2 Esiseokset ja lisäainevalmisteet

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

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

jossa

β = näyteuutoksen (5.2.2 tai 5.2.3) karbadoksipitoisuus (µg/ml)

V_2 = uuttoliuoksen tilavuus (ml) (ts. esiseoksille 50, lisäainevalmisteille 150)

f = laimennuskerroin kohdan 5.2.2 (esiseokset) tai 5.2.3 (lisäainevalmisteet) mukaisesti

m = punnittu näytemäärä (g).

7. **Tulosten validointi**

7.1 Analyytin tunnistettavuuden varmentaminen

Analyytin tunnistettavuus voidaan varmentaa rinnakkaiskromatografialla tai diodirividetektorilla vertaamalla näytteen uuttoliuoksen ja 10,0 µl/ml karbadoksia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.11.2) spektrejä.

7.1.1 Rinnakkaiskromatografia

Näytteen uuttoliuokseen lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.11.2). Lisätyn karbadoksimäärän tulisi olla sama kuin näyteliuoksesta analysoitu karbadoksin määrä.

Ainoastaan karbadoksipiikin korkeus saisi kasvaa huomioiden sekä lisätty määrä karbadoksia että näyteliuoksen laimeneminen. Karbadoksipiikin puolikorkeuden leveyden ero verrattuna alkuperäisen näyteliuoksen piikin leveyteen saa olla korkeintaan noin 10 %.

7.1.2 Diodirividetektorilla varmentaminen

Tuloksia arvioidaan seuraavien vaatimusten mukaisesti:

a) Kromatogrammin piikin huipun kohdalla näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorptioaallonpituuksien on oltava samat ilmaisinjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määräytyvissä rajoissa. Diodirividetektorille tämä on tyypillisesti ± 2 nm.

b) Välillä 225 – 400 nm kromatogrammin piikin huipun kohdalla ajetut näyte- ja standardispektrit eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10-100 %. Tämä vaatimus täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä spektrien välinen ero ole missään kohdassa suurempi kuin 15 % standardianalyytin absorbanssista.

c) Välillä 225 – 400 nm näyteliuoksesta ajetut spektrit piikin nousun, huipun ja laskun kohdalla eivät saa erota toisistaan niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10-100 %. Tämä vaatimus täyttyy, kun maksimit ovat samat ja kun kaikissa tarkastelluissa pisteissä spektrien välinen ero ei ole suurempi kuin 15 % piikin huipun spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä vaatimuksista ei täyty, analyytin esiintymistä ei ole varmennettu.

7.2 Toistettavuus

Kun karbadoksipitoisuus on 10 mg/kg tai suurempi, kahden rinnakkaisen samasta näytteestä tehdyn määrityksen tulosten ero ei saa olla suurempi kuin 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta.

7.3 Saanto

Kun (nolla)näytteeseen on lisätty karbadoksia, saannon on oltava vähintään 90 %.

8. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset**

Järjestettiin laboratorioiden välinen vertailu, jossa analysoitiin 6 rehuseosta, 4 esiseosta ja 3 lisäainevalmistetta kahdeksassa laboratoriossa. Kustakin näytteestä tehtiin rinnakkaismääritykset. (Tarkempia tietoja tästä laboratorioiden välisestä vertailusta löytyy aikakauslehdestä *Journal of AOAC, Volume 71, 1988, s. 484 – 490.)* Tulokset (lukuun ottamatta hylättyjä tuloksia) olivat seuraavanlaiset:

Taulukko 1. Rehuseosten laboratorioiden välisen vertailun tulokset

	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5	Näyte 6
L	8	8	8	8	8	8
N	15	14	15	15	15	15
Keskiarvo (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nimellinen pitoisuus (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Taulukko 2. Esiseosten ja lisäainevalmisteiden laboratorioiden välisen vertailun tulokset

	Esiseokset				Lisäainevalmisteet		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Keskiarvo (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nimellinen pitoisuus (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = laboratorioiden lukumäärä
n = yksittäisten arvojen lukumäärä
s_r = toistettavuuden keskihajonta
CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin
S_R = uusittavuuden keskihajonta
CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin.