# KOMISSION DIREKTIIVI 98/64/EY,

**annettu 3 päivänä syyskuuta 1998,**

**yhteisön määritysmenetelmistä rehujen aminohappojen, raakarasvan ja olakvindoksin määritystä varten ja direktiivin 71/393/ETY muuttamisesta**

**(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

direktiivissä 70/373/ETY säädetään, että rehujen virallisessa tarkastuksessa on käytettävä yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmiä rehujen laatua ja koostumusta koskevissa laeissa, asetuksissa ja hallinnollisissa määräyksissä olevien edellytysten noudattamisen toteamiseksi,

rehuseosten pitämisestä kaupan 2 päivänä huhtikuuta 1979 annetussa neuvoston direktiivissä 79/373/ETY ([2]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 97/47/EY ([3]) ja erityisravinnoksi tarkoitetuista rehuista 13 päivänä syyskuuta 1993 annetussa neuvoston direktiivissä 93/74/ETY ([4]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna direktiivillä 96/25/EY ([5]), säädetään aminohappojen ja raakarasvan ilmoittamisesta rehujen päällysmerkinnöissä,

rehujen lisäaineista 23 päivänä marraskuuta 1970 annetussa neuvoston direktiivissä 70/524/ETY ([6]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 98/19/EY ([7]), säädetään, että olakvindoksipitoisuus on ilmoitettava päällysmerkinnässä, jos tätä ainetta lisätään rehuseoksiin,

yhteisön määritysmenetelmästä rehujen virallista tarkastusta varten 18 päivänä marraskuuta 1971 annetussa toisessa komission direktiivissä 71/393/ETY ([8]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna direktiivillä 84/4/ETY ([9]), vahvistetaan muun muassa raakarasvojen määritysmenetelmät; on aiheellista muuttaa kuvailtua menetelmää,

olisi laadittava yhteisön määritysmenetelmä näiden aineiden tarkastamiseksi, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

*1 artikla*

Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, että rehujen virallisessa tarkastuksessa käytettävät aminohappojen, raakarasvan ja olakvindoksin pitoisuudet määritetään tämän direktiivin liitteessä vahvistettujen menetelmien mukaisesti.

*2 artikla*

Korvataan komission direktiivin 71/393/ETY liitteessä oleva 4 osa ”Raakarasvan ja -öljyn määritys” tämän direktiivin liitteessä olevalla B osalla.

*3 artikla*

1. Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin edellyttämät lait, asetukset tai hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 31 päivänä joulukuuta 1998. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Niiden on sovellettava kyseisiä toimenpiteitä 1 päivästä tammikuuta 1999.

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

([1]) EYVL L 170, 3.8.1970, s. 2
([2]) EYVL L 86, 6.4.1979, s. 30
([3]) EYVL L 211, 5.8.1997, s. 45
([4]) EYVL L 237, 22.9.1993, s. 23
([5]) EYVL L 125, 23.5.1996, s. 35
([6]) EYVL L 270, 14.12.1970, s. 1
([7]) EYVL L 96, 28.3.1998, s. 39
([8]) EYVL L 279, 20.12.1971, s. 7
([9]) EYVL L 15, 18.1.1984, s. 28

2. Jäsenvaltioiden on toimitettava tässä direktiivissä tarkoitetuista kysymyksistä antamansa keskeiset kansalliset säännökset komissiolle.

*4 artikla*

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

*5 artikla*

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 3 päivänä syyskuuta 1998.

*Komission puolesta*
Franz FISCHLER
*Komission jäsen*

*LIITE*

A OSA

## AMINOHAPPOJEN MÄÄRITYS

### 1 Tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmällä voidaan määrittää rehujen vapaat aminohapot (synteettiset ja luonnon aminohapot) ja kokonaisaminohapot (peptideihin kiinnittyneet ja vapaat) aminohappoanalysaattorilla. Sitä sovelletaan seuraaviin aminohappoihin: kyst(e)iini, metioniini, lysiini, treoniini, alaniini, asparagiinihappo, glutamiinihappo, glysiini, histidiini, isoleusiini, leusiini, fenyylialaniini, proliini, seriini, tyrosiini ja valiini.

Menetelmä ei erota toisistaan aminohappojen suoloja eikä aminohappojen D- ja L-muotoja. Se ei sovellu tryptofaanin eikä aminohappojen hydroksianalogien määritykseen.

### 2 Periaate

2.1 *Vapaat aminohapot*

Lisätyt vapaat aminohapot uutetaan laimealla suolahapolla. Mukana uuttuneet typpipitoiset makromolekyylit saostetaan sulfosalisyylihapolla ja poistetaan suodattamalla. Suodatetun liuoksen pH säädetään arvoon 2,20. Aminohapot erotetaan ioninvaihtokromatografialla ja määritetään fotometrillä ninhydriiniderivaattina 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 kohdassa 1 mainitut aminohapot voidaan määrittää joko hapetetusta tai hapettamattomasta näytteestä.

Hapettaminen tapahtuu 0 °C:ssa permuurahaishapon ja fenolin seoksella. Hapetusreagenssin ylimäärä hajotetaan natriumdisulfiitin avulla. Hapetettu tai hapettamaton näyte hydrolysoidaan suolahapon ($c = 6$ mol/l) avulla 23 tunnin ajan. Hydrolyysituotteen pH säädetään arvoon 2,20. Aminohapot erotetaan ioninvaihtokromatografialla ja määritetään fotometrillä ninhydriiniderivaattina aallonpituudella 570 nm (proliini 440 nm).

### 3 Reagenssit

Veden tulee olla kaksoistislattua tai vastaavan laatuista (johtokyky $< 10$ µS).

3.1 Vetyperoksidi, $w = 30$ %.

3.2 Muurahaishappo, $w = 98 - 100$ %.

3.3 Fenoli.

3.4 Natriumdisulfiitti.

3.5 Natriumhydroksidi.

3.6 5-sulfosalisyylihappo-dihydraatti.

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

3.8 Trinatriumsitraatti-dihydraatti.

3.9 2,2′-tiodietanoli (tiodiglykoli).

3.10 Natriumkloridi.

3.11 Ninhydriini.

3.12 Petrolieetteri, kiehumisväli 40 – 60 °C.

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

3.14 Typpikaasu ($< 10$ ppm happea).

3.15 1-oktanoli.

3.16 Aminohapot.

3.16.1 Edellä kohdassa 1 luetellut standardiyhdisteet, jotka eivät sisällä kidevettä. Kuivataan tyhjiössä $P_2O_5$:lla tai $H_2SO_4$:lla viikon ajan ennen käyttöä.

3.16.2 Kysteiinihappo.

3.16.3 Metioniinisulfoni.

3.17 Natriumhydroksidiliuos c = 7,5 mol/l:

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

3.18 Natriumhydroksidiliuos c = 1 mol/l:

liuotetaan 40 g NaOH (3.5) veteen ja laimennetaan 1 litraksi.

3.19 Muurahaishappo-fenoliliuos:

sekoitetaan 889 g muurahaishappoa (3.2) ja 111 g vettä ja lisätään 4,73 g fenolia (3.3).

3.20 Hydrolyysiseos, c = 6 mol HCl ja 1 g fenolia litrassa:

lisätään 1 g fenolia (3.3) 492 ml:aan HCl (3.7) ja laimennetaan vedellä 1 litraksi.

3.21 Uuttoliuos, c = 0,1 mol HCl ja 2 % tiodiglykolia litrassa:

laimennetaan 8,2 ml HCl (3.7) noin 900 ml:aan vettä, lisätään 20 ml tiodiglykolia (3.9) ja laimennetaan vedellä yhdeksi litraksi (ei sekoiteta suoraan 3.7 ja 3.9).

3.22 5-sulfosalisyylihappo, ß = 6 %:

liuotetaan 60 g 5-sulfosalisyylihappoa (3.6) veteen ja laimennetaan vedellä litraksi.

3.23 Hapetusseos (perurahaishappo-fenoli):

sekoitetaan 0,5 ml vetyperoksidia (3.1) 4,5 ml:aan fenoli-muurahaishappoliousta (3.19) pienessä dekantterilasissa. Inkuboidaan 20 – 30 °C:ssa tunnin ajan, jotta saadaan permuurahaishappoa, annetaan sitten jäähtyä jäävesihauteessa (15 min) ennen näytteeseen lisäämistä.

*Varoitus:* vältettävä ihokosketusta ja käytettävä suojavaatteita.

3.24 Sitraattipuskuriliuos, c = 0,2 mol $Na^+$/l, pH 2,20:

liuotetaan 19,61 g natriumsitraattia (3.8), 5 ml tiodiglykolia (3.9), 1 g fenolia (3.3) ja 16,50 ml HCl (3.7) noin 800 ml:aan vettä. Säädetään pH arvoon 2,20. Laimennetaan vedellä yhdeksi litraksi.

3.25 Eluointipuskurit, valmistetaan analysaattorin vaatimusten mukaisesti (4.9).

3.26 Ninhydriinireagenssi, valmistetaan analysaattorin vaatimusten mukaisesti (4.9).

3.27 Aminohappojen standardiliuokset. Nämä liuokset säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa.

3.27.1 Aminohappojen perusstandardiliuos (3.16.1), c = 2,5 µmol/ml kutakin aminohappoa suolahapossa. Saatavana kaupallisesti.

3.27.2 Kysteiinihapon ja metioniinisulfonin perusstandardiliuos. c = 1,25 µmol/ml.

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

3.27.3 Sisäisen standardin perusliuos, esimerkiksi norleusiini, c = 20 µmol/ml.

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

3.27.4 Kalibrointiliuos hydrolysaateille: Kysteiinihappo ja metioniinisulfoni, c = 5 nmol/50 µl, muut aminohapot c = 10 nmol/50 µl.

Liuotetaan 2,2 g natriumkloridia (3.10) 30 ml:aan sitraattipuskuria (3.24) 100 ml:n dekantterilasissa. Lisätään 4,00 ml aminohappojen perusstandardiliuosta (3.27.1), 4,00 ml kysteiinihapon ja metioniinisulfonin perusstandardiliuosta (3.27.2) ja tarvittaessa 0,50 ml sisäisen standardin perusliuosta (3.27.3). Säädetään pH arvoon 2,20 natriumhydroksidilla (3.18).

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

Säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa enintään 3 kuukautta.

Katso myös huomautukset kohdassa 9.1.

3.27.5 Hydrolysaateille ja ekstrakteille, jotka on valmistettu kohtien (5.3.3.1) ja (5.2) mukaan, valmistetaan aminohappojen standardiliuos kohdan (3.27.4) mukaisesti jättämällä natriumkloridi pois.

Säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa enintään 3 kuukautta.

## 4. **Laitteisto**

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

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

4.3 Koneellisella ilmanvaihdolla varustettu ja lämpötilaltaan säädettävä kuivausuuni, jonka tarkkuus on parempi kuin ± 2 °C.

4.4 pH-mittari (lukemat kolmen desimaalin tarkkuudella).

4.5 Kalvosuodatin (0,2 μm).

4.6 Sentrifugi.

4.7 Pyöröhaihdutin.

4.8 Mekaaninen ravistelija tai magneettisekoitin.

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

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

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

## 5 **Menetelmä**

5.1 *Näytteen valmistaminen*

Näyte jauhetaan niin hienoksi, että se menee 0,5 mm:n seulan läpi. Näytteet, joiden kosteuspitoisuus on suuri, on ilmakuivattava enintään 50 °C:ssa tai pakastekuivaamalla ennen jauhamista. Näytteet, joiden rasvapitoisuus on suuri, on uutettava petrolieetterillä (3.12) ennen jauhamista.

5.2 *Vapaiden aminohappojen määrittäminen rehuista ja esiseoksista*

Punnitaan 0,2 mg:n tarkkuudella sopiva määrä (1 – 5 g) jauhettua näytettä (5.1) erlenmeyerpulloon ja lisätään 100,0 ml uuttoliuosta (3.21). Ravistetaan seosta 60 minuuttia mekaanisella tai magneettisella sekoittimella (4.8). Annetaan sakan laskeutua ja pipetoidaan 10,0 ml liuosta 100 ml:n dekantterilasiin.

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

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

Kromatografoidaan kohdan 5.4 mukaisesti.

Jos uutteita ei kromatografoida samana päivänä, ne säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa.

5.3 *Kokonaisaminohappojen määritys*

5.3.1 Hapettaminen

Punnitaan 0,2 mg:n tarkkuudella 0,1 grammasta yhteen grammaan jauhettua näytettä (5.1), jonka typpipitoisuus on noin 10 mg ja kosteuspitoisuus enintään 100 mg:

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

— 250 ml:n pyörökolviin (4.1) avointa hydrolyysiä varten (5.3.3.1), jos tarvitaan alhaista natriumpitoisuutta, tai

— 100 ml:n kierrekorkilliseen pulloon (4.2) suljettua hydrolyysiä varten (5.3.2.4).

Asetetaan pyörökolvi tai pullo jäävesihauteeseen ja jäähdytetään 0 °C:seen; lisätään 5 ml hapetusseosta (3.23) ja sekoitetaan kaarevakärkisellä lasilastalla.

Suljetaan kolvi/pullo lastoineen ilmatiiviin kalvon avulla, asetetaan jäävesihaude näin suljettuine astioineen 0 °:iseen jääkaappiin ja jätetään sinne 16 tunniksi. Tämän jälkeen se otetaan jääkaapista ja hajoitetaan hapetusreagenssin ylimäärä lisäämällä 0,84 *g* natriumdisulfiittia (3.4).

Siirrytään kohtaan 5.3.2.1.

5.3.2 Hydrolyysi

5.3.2.1 Hapetettujen näytteiden hydrolyysi

Edellä 5.3.1. kohdan mukaisesti valmistettuun hapetettuun näytteeseen lisätään 25 ml hydrolyysiseosta (3.20) huolehtien siitä, että astian seinämiin ja lastaan jäänyt näyte huuhdellaan pois. Riippuen valitusta hydrolyysimenetelmästä jatketaan kohdasta 5.3.2.3 tai 5.3.2.4.

5.3.2.2 Hapettamattomien näytteiden hydrolyysi

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

5.3.2.3 Avoin hydrolyysi

Lisätään kolme lasikuulaa kolvissa olevaan seokseen (valmistettu 5.3.2.1 tai 5.3.2.2 kohdan mukaisesti) ja keitetään tasaisesti pystyjäähdyttäjän alla tasan 23 tuntia. Hydrolyysin jälkeen huuhdellaan jäähdytin 5 ml:lla sitraattipuskuria (3.24). Kolvi irrotetaan ja se jäähdytetään jäävesihauteessa. Jatketaan kohdasta 5.3.3.

5.3.2.4 Suljettu hydrolyysi

Asetetaan kohdan 5.3.2.1 tai 5.3.2.2 mukaisesti valmistettua näyteseosta sisältävä pullo uuniin (4.3) 110 °C:seen. Ensimmäisen tunnin aikana *pidetään kierrekorkki sulkematta pullon päällä*, jottei kaasun muodostuksen vuoksi syntyisi painetta ja jotta vältyttäisiin räjähdyksiltä. Tunnin kuluttua astia suljetaan kierrekorkilla ja sen annetaan olla uunissa (4.3) 23 tunnin ajan. Hydrolyysin jälkeen otetaan pullo uunista, avataan varovasti korkki ja asetetaan pullo jäävesihauteeseen. Annetaan jäähtyä.

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

Jatketaan kohdasta 5.3.3.

5.3.3 pH:n säätäminen

Aminohappoanalysaattorin (4.9) natriumin sietokyvyn mukaan käytetään menetelmää 5.3.3.1 tai 5.3.3.2 pH:n säätämiseen.

5.3.3.1 Kromatografit (4.9), jotka edellyttävät alhaista natriumpitoisuutta:

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

Tässä tapauksessa lisätään 2,00 ml sisäistä standardiliuosta (3.27.3) hydrolysaattiin ennen tai jälkeen haihdutuksen.

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

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

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

5.3.3.2 Muut aminohappoanalysaattorit (4.9):

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

Lopullinen pH:n säätäminen 2,20:een tapahtuu huoneen lämpötilassa natriumhydroksidiliuoksen (3.17 ja 3.18) avulla. Jatketaan kohdasta 5.3.4.

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.

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

Siirrytään kromatografiavaiheeseen (5.4).

Jos näyteliuoksia ei kromatografoida samana päivänä, ne säilytetään alle 5 °C:n lämpötilassa.

5.4 *Kromatografia*

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

Injektio voidaan suorittaa käsin tai automaattisesti. On tärkeää, että pylvääseen lisätään aina sama määrä (± 0,5 %) vertailu- tai näyteliuosta, paitsi silloin kun käytetään sisäistä standardia, ja että natriumin ja aminohapon 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 olisi 30 – 200 % näytteen aminohapon antaman piikin pinta-alasta.

Aminohappojen kromatografia vaihtelee jonkin verran käytetyn analysaattorin tyypin ja käytetyn hartsin mukaan. Valitun menetelmän on mahdollistettava aminohappojen erottaminen toisistaan ja muista ninhydriinin kanssa reagoivista aineista. Pylvääseen ruiskutettujen yhdisteiden pitoisuuden tulee olla alueella, jolla laite antaa lineaarisen vasteen.

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

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

Kromatografian osalta on varmistuttava siitä, että lysiini erottuu johdannaisistaan ja ornitiinistä.

## 6 **Tulosten laskeminen**

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

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = g \text{ aminohappoa/kg näytettä}$$

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

A = analysoitavan piikin pinta-ala, hydrolysaatti tai uutteessa

B = analysoitavan piikin pinta-ala, standardiliuos

C = sisäisen standardin piikin pinta-ala hydrolysaatissa tai uutteessa

D = sisäisen standardin piikin pinta-ala kalibrointiliuoksessa

MW = analysoitavan aminohapon molekyylipaino

E = standardin väkevyys µmol/ml

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

F = 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 ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MW 240,30) käyttäen MW-arvoa 120,15 (= 0,5 × 240,30).

Metioniini määritetään metioniinisulfonina hapetetun näytteen hydrolysaateista, mutta lasketaan metioniiniksi käyttäen metioniinin MW-arvoa 149,21.

Lisätty vapaa metioniini määritetään uuttamisen jälkeen metioniinina; laskennassa käytetään samaa MW-arvoa.

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

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

V = lopullisen uutteen määrä

## 7 **Menetelmän arviointi**

Menetelmä on testattu vuonna 1990 tehdyssä kansainvälisessä laboratorioiden välisessä vertailussa käyttäen neljää eri rehua (sikojen täysrehu, broilereiden täysrehu, valkuaistiiviste ja esiseos). Tulosten keskiarvo ja standardipoikkeama poikkeavuuksien poissulkemisen jälkeen on esitetty seuraavassa taulukossa.

Keskiarvot g/kg

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

n = osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä.

### 7.1 *Toistettavuus*

Toistettavuus testattujen aminohappojen osalta on ilmaistu muodossa ”laboratorion sisäinen standardipoikkeama” ja on esitetty alla olevassa taulukossa.

Laboratorion sisäinen standardipoikkeama ($S_r$) g/kg

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

n = osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä.

Variaatiokerroin (%) laskettuna laboratorion sisäisestä standardipoikkeamasta ($S_r$)

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

n = osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä.

7.2 *Uusittavuus*

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

Standardointipoikkeama laboratorioiden välillä ($S_r$) g/kg

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

n = osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä.

Laboratorioiden välisistä standardipoikkeamista ($S_r$) laskettu variaatiokerroin (%)

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

n = osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä.

8 **Vertailumateriaalin käyttö**

Menetelmän oikea soveltaminen varmistetaan tekemällä vertailuanalyysi sertifioidulla referenssimateriaalilla, jos sellainen on saatavilla. Kalibrointi sertifioidulla aminohappojen kalibrointiliuoksella on suotavaa.

9 **Huomautuksia**

9.1 Aminohappoanalysaattoreiden välisten erojen vuoksi annettuja aminohappojen kalibrointiliuosten (3.27.4 ja 3.27.5) ja hydrolysaattien (5.3.4) lopullisia väkevyyksiä 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 suuren erotuskyvyn nestekromatografialaitteistoa käytetään hydrolysaattien analysointiin, koeolosuhteet on optimoitava valmistajan suositusten mukaisesti.

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

## B OSA

## RAAKARASVAN JA -ÖLJYN MÄÄRITYS

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmällä määritetään rehuissa olevan raakarasvan ja -öljyn määrä. Siihen eivät kuulu määritykset öljysiemenistä ja -hedelmistä, jotka on määritelty 22 päivänä syyskuuta 1966 annetussa neuvoston asetuksessa N:o 136/66/ETY.

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

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

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

1.2 *Menettelytapa B — Raakarasvan ja -öljyn kokonaismäärä*

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

1.3 *Tulosten tulkinta*

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

2 **Periaate**

2.1 *Menettelytapa A*

Näyte uutetaan petrolieetterillä. Liuotin tislataan pois, jäännös kuivataan ja punnitaan.

2.2 *Menettelytapa B*

Näyte käsitellään keittämällä sitä suolahapon kanssa. Seos jäähdytetään ja suodatetaan. Jäännös pestään ja kuivataan ja määritystä jatketaan menettelytavan A mukaisesti.

3 **Reagenssit**

3.1 Petrolieetteri, kiehumisväli: 40 – 60 °C. Bromiluvun on oltava alle 1 ja haihdutusjäännöksen alle 2 mg/100 ml.

3.2 Natriumsulfaatti, vedetön.

3.3 Suolahappo, 3 M.

3.4 Suodatuksen apuaine, esim. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4 **Välineistö**

4.1 Uuttolaitteisto. Jos käytetään Soxhlet-laitteistoa, refluksointinopeuden on oltava sellainen, että Soxhlet-väliosan täyttyminen liuottimella ja tyhjeneminen siitä tapahtuvat noin 10 kertaa tunnissa. Jos laitteistoon kuuluu suoramallinen väliosa, refluksointinopeuden on oltava noin 10 ml minuutissa.

4.2 Uuttohylsyjä, joissa ei ole petrolieetteriin liukenevaa materiaalia ja joiden huokoisuus täyttää 4.1 kohdassa esitetyt vaatimukset.

4.3 Kuivauskaappi, joko vakuumikaappi, joka on säädetty 75 ± 3 °C:seen tai kiertoilmakaappi, joka on säädetty 100 ± 3 °C:seen.

5 **Suoritus**

5.1 *Menettelytapa A (katso kohta 8.1)*

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). Petrolieetteriliuos otetaan talteen kuivaan, punnittuun pulloon, joka sisältää hohkakivijyväsiä ([1]).

Liuotin tislataan pois. Pullon ja sen sisältämän jäännöksen annetaan kuivua puolentoista tunnin ajan (4.3). Pullon jäännöksineen annetaan jäähtyä eksikkaattorissa ja se punnitaan. Kuivausta jatketaan edelleen 30 minuutin ajan sen varmistamiseksi, että rasvan ja öljyn paino pysyy vakiona (kahden peräkkäisen punnituksen välisen painoeron on oltava alle 1 mg).

5.2 *Menettelytapa B*

Näytettä punnitaan 2,5 g 1 mg:n tarkkuudella (ks. 8.2 kohta) 400 ml:n dekantterilasiin tai 300 ml:n erlenmeyeriin ja astiaan lisätään 100 ml 3 M suolahappoa (3.3) ja hohkakivijyväsiä. Dekantterilasi peitetään kellolasilla tai erlenmeyer yhdistetään pystyjäähdyttimeen. Seos saatetaan varovasti kiehuvaksi käyttäen pientä liekkiä tai sähkölevyä ja seoksen annetaan kiehua hiljalleen tunnin ajan. Näytteen tarttumista astian seinämiin tulee välttää.

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

Jäännöksen sisältävä kaksinkertainen suodatinpaperi asetetaan kellolasille ja sen annetaan kuivua puolitoista tuntia kuivauskaapissa 100 ± 3 °C:ssa.

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.

([1]) Jos rasvalle tai öljylle tehdään vielä tämän jälkeen sen laatuun liittyviä määräyksiä, hohkakivijyväset korvataan lasihelmillä

6 **Tuloksen ilmoittaminen**

Jäännöksen paino ilmoitetaan prosentteina näytteen painosta.

7 **Toistettavuus**

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

— 0,2 %-yksikköä, kun raakarasva- ja öljypitoisuus on alle 5 %,

— 4,0 % suuremmasta tuloksesta, kun raakarasva- ja -öljypitoisuus on 5—10 %,

— 0,4 % -yksikköä, kun raakarasva- ja -öljypitoisuus on yli 10 %.

8 **Huomautuksia**

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

Näytettä punnitaan 20 g 1 mg:n tarkkuudella ja siihen sekoitetaan vähintään 10 g vedetöntä natriumsulfaattia (3.2). Sitä uutetaan petrolieetterillä (3.1) 5.1 kohdassa esitetyllä tavalla. Saadun uutoksen tilavuus täydennetään 500 ml:ksi petrolieetterillä (3.1) ja se sekoitetaan. Liuosta otetaan 50 ml ja kaadetaan pieneen, kuivaan, punnittuun pulloon, joka sisältää hoihkakivijyväsiä ([1]). 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:

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

jossa:

a = ensimmäisen uuton jälkeen saadun jäännöksen (määräosa uutoksesta) paino grammoina,

b = toisen uuton jälkeen saadun jäännöksen paino grammoina.

8.2 Pieniä rasva- ja öljymääriä sisätävien näytteiden punnitusmäärä voidaan nostaa 5 g:aan.

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 tulisi kuitenkin välttää, sillä se voi johtaa alhaisempiin tuloksiin. Myös mikroaaltouunia voidaan käyttää.

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

## C OSA

## OLAKVINDOKSIN MÄÄRITYS

(2-[N-2′-(hydroksietyyli)karbamoyyli]-3-metyylikinoksaliini-$N^1$,$N^4$-dioksidi

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Tämän menetelmän avulla voidaan määrittää olakvindoksi rehusta. Määrityksen alaraja on 5 mg/kg.

2 **Periaate**

Näyte uutetaan vesi-metanoliseoksen avulla. Olakvindoksipitoisuus määritetään käänteisfaasin suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

([1]) Jos rasvalle tai öljylle tehdään vielä tämän jälkeen sen laatuun liittyviä määräyksiä, hohkakivijyväset korvataan lasihelmillä

3 **Reagenssit**

3.1 Metanoli.

3.2 Metanoli, HPLC-laatua.

3.3 Vesi, HPLC-laatua.

3.4 Eluentti HPLC:aa varten:

Vesi (3.3)-metanoli (3.2)-seos, 900 + 100 (V + V).

3.5 Standardiaine: puhdas olakvindoksi, 2-[N-2′-(hydroksietyyli)karbamoyyli]-3-metyylikinoksaliini-$N^1$,$N^4$-dioksidi, E 851.

3.5.1 Olakvindoksistandardin kantaliuos, 250 µg/ml:

Punnitaan 50 mg olakvindoksia (3.5) 0,1 mg:n tarkkuudella 200 ml:n mittapulloon ja lisätään noin 190 ml vettä. Asetetaan pullo 20 minuutiksi ultraäänihauteeseen (4.1). Ultraänikäsittelyn jälkeen saatetaan liuos huoneen lämpötilaan, täytetään merkkiin vedellä ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään jääkaapissa. Kuukausittain valmistetaan uusi liuos.

3.5.2 Olakvindoksistandardin perusliuos, 25 µg/ml:

Pipetoidaan 10,0 ml kantaliuosta (3.5.1) 100 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin eluentilla (3.4) ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään jääkaapissa. Kuukausittain valmistetaan uusi liuos.

3.5.3 Kalibrointiliuokset:

Pipetoidaan sarjassa 50 ml:n mittapulloihin 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 ja 20,0 ml perusliuosta (3.5.2). Täytetään merkkiin eluentilla (3.4) ja sekoitetaan. Kääritään pullot alumiinifolioon. Nämä liuokset sisältävät vastaavasti 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 ja 10,0 µg/ml olakvindoksia. Liuokset on valmistettava päivittäin.

4 **Välineet**

4.1 Ultraäänihaude.

4.2 Mekaaninen ravistelija.

4.3 HPLC-laitteisto, jossa on vaihtuva-aallonpituinen ultraviolettidetektori tai diodirividetektori.

4.3.1 Nestekromatografiakolonni, 250 mm × 4 mm, C18, 10 µm täyte, tai vastaava.

4.4 Membraanisuodattimia, 0,45 µm.

5 **Menetelmä**

*Huom.* Olakvindoksi on valoherkkää. Kaikki toimenpiteet on tehtävä himmennetyssä valaistuksessa tai ruskeita lasiastioita käyttäen.

5.1 *Yleistä*

5.1.1 Sokeanäyte on analysoitava, jotta varmistetaan, ettei olakvindoksia tai muita häiritseviä aineita esiinny.

5.1.2 Saantokoe suoritetaan analysoimalla sokeanäyte, johon on lisätty näytteessä esiintyvää määrää vastaava määrä olakvindoksia. Lisäyksen saamiseksi tasolle 50 mg/kg pipetoidaan 10,0 ml standardin kantaliuosta (3.5.1) 250 ml:n erlenmeyerpulloon ja haihdutetaan liuos noin 0,5 ml:ksi. Lisätään 50 g sokeanäytettä, sekoitetaan huolellisesti ja annetaan tasoittua 10 min sekoittaen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen siirtymistä (5.2).

*Huom.* Sokeanäytteen olisi oltava tyypiltään samanlaista kuin näyte, eikä siinä saa esiintyä olakvindoksia.

5.2 *Uutto*

Punnitaan noin 50 g näytettä 0,01 g:n tarkkuudella. Siirretään 1 000 ml:n erlenmeyerpulloon, lisätään 100 ml metanolia (3.1) ja asetetaan pullo 5 minuutiksi ultraäänihauteeseen (4.1). Lisätään 410 ml vettä ja annetaan olla ultraäänihauteessa vielä 15 minuuttia. Otetaan pullo ultraäänihauteesta, ravistellaan 30 minuutin ajan ravistelijassa (4.2) ja suodatetaan taitellun suodatinpaperin läpi. Pipetoidaan 10,0 ml suodosta 20 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin vedellä ja sekoitetaan. Suodatetaan osa membraanisuodattimen (4.4) läpi (ks. kohta 9 Huomautus). Jatketaan HPLC-määrityksellä (5.3).

5.3 *HPLC-määritys*

5.3.1 Parametrit:

Seuraavat olosuhteet annetaan viitteellisinä, muitakin olosuhteita voidaan käyttää, jos niillä päästään vastaaviin tuloksiin.

Analyysikolonni (4.3.1)

| | |
|---|---|
| Eluentti (3.4): | vesi (3.3) – metanoli (3.2) seos, 900 + 100 (V + V) |
| Virtausnopeus: | 1,5 – 2 ml/min |
| Detektioaallonpituus: | 380 nm |
| Injektoitava tilavuus: | 20 µl – 100 µl |

Kromatografiajärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektoimalla useita kertoja 2,5 µg/ml olakvindoksia sisältävää kalibrointiliuosta (3.5.3), kunnes piikkien korkeudet ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.3.2 Kalibrointikäyrä

Jokaista kalibrointiliuosta (3.5.3) injektoidaan useita kertoja. Lasketaan kullekin pitoisuudelle piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo. Piirretään kalibrointikäyrä käyttäen kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvoja x-akselina ja vastaavia kalibrointiliuosten pitoisuuksia (µg/ml) y-akselina.

5.3.3 Näyteliuos

Injektoidaan useita kertoja näyteliuosta (5.2) sama määrä kuin kalibrointiliuoksia ja lasketaan olakvindoksipiikkien piikin korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

## 6 Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen olakvindoksipitoisuus (µg/ml) lasketaan olakvindoksin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.3.2) avulla.

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

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

jossa:

c = näyteliuoksen (5.2) olakvindoksipitoisuus (µg/ml)

m = punnittu näytemäärä (g).

## 7 Tulosten validointi

7.1 *Analyytin tunnistettavuuden varmentaminen*

Analyytin tunnistettavuus voidaan varmentaa rinnakkaiskromatografialla tai diodirividetektorilla vertaamalla näyteliuoksen (5.2) ja 5,0 µg/ml olakvindoksia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.5.3) spektrejä.

7.1.1 Rinnakkaiskromatografia

Näyteliuokseen (5.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.5.3). Lisätyn olakvindoksimäärän tulisi olla sama kuin näyteliuoksesta analysoitu olakvindoksin määrä.

Vain olakvindoksipiikin korkeus saa kasvaa huomioiden sekä lisätty määrä että olakvindoksin näyteliuoksen laimeneminen. Piikin leveyden tulisi olla puolikorkeuden ± 10 prosenttia alkuperäisen näyteliuoksen olakvindoksipiikin leveydestä.

7.1.2 Diodirividetektori

Tulokset arvioidaan seuraavien vaatimusten mukaisesti:

a) Näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorption aallonpituuden, mitattuna kromatogrammin piikin kärjestä, on oltava detektorin erotuskyvyn määräämissä rajoissa. Diodirividetektorille tämä on tyypillisesti ± 2 nm.

b) Välillä 220 – 400 nm, näytteen ja standardin spektrit, kromatogrammin piikin kärjestä mitattuna, eivät saa erota niiltä spektrin osilta, joiden suhteellinen absorbanssi on 10 – 100 %. Tämä vaatimus täyttyy, kun maksimit ovat samat eikä missään kohdassa spektrien välinen ero ole suurempi kuin 15 % standardianalyytin absorbanssista.

c) Välillä 220 – 400 nm, näyteliuoksen piikin noususta, kärjestä ja laskusta mitatut spektrit 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 poikkeama ei ole suurempi kuin 15 % piikin kärjen spektrin absorbanssista.

Jos toinen näistä vaatimuksista ei täyty, analyyttiä esiintymistä ei ole varmennettu.

7.2 *Toistettavuus*

Kun olakvindoksipitoisuus on 10 – 200 mg/kg, niin näytteen kahden rinnakkaisen määrityksen välinen ero ei saa olla suurempi kuin 15 % suuremmasta rinnakkaistuloksesta.

7.3 *Saanto*

Sokeanäytteen lisäyksen saannon on oltava vähintään 90 %.

## 8 Laboratorioiden välisen vertailun tulokset

EY:n sisäisessä laboratorioiden välisessä menetelmävertailussa 13 laboratoriossa analysoitiin neljä porsaan rehunäytettä, joista yksi oli sokeanäyte. Tulokset olivat seuraavat:

| | Näyte 1 | Näyte 2 | Näyte 3 | Näyte 4 |
|---|---|---|---|---|
| L | 13 | 10 | 11 | 11 |
| n | 40 | 40 | 44 | 44 |
| keskiarvo (mg/kg) | — | 14,6 | 48,0 | 95,4 |
| ($S_r$) (mg/kg) | — | 0,82 | 2,05 | 6,36 |
| ($S_R$) (mg/kg) | — | 1,62 | 4,28 | 8,42 |
| $CV_r$ (%) | — | 5,6 | 4,3 | 6,7 |
| $CV_R$ (%) | — | 11,1 | 8,9 | 8,8 |
| Nimellinen pitoisuus (mg/kg) | — | 15 | 50 | 100 |
| tak. saanto (%) | — | 97,3 | 96,0 | 95,4 |

L : laboratorioiden lukumäärä
n : yksittäisten arvojen lukumäärä
$S_r$ : toistettavuuden keskihajonta
$S_R$ : uusittavuuden keskihajonta
$CV_r$ : toistettavuuden variaatiokerroin
$CV_R$ : uusittavuuden variaatiokerroin.

## 9 Huomautus

Vaikka menetelmää ei ole validoitu rehuille, joissa on yli 100 mg/kg olakvindoksia, sillä on mahdollista saada tyydyttäviä tuloksia käyttämällä pienempää näytemäärää ja/tai laimentamalla näyteliuosta (5.2), jotta päästäisiin kalibrointikäyrän pitoisuusalueelle (5.3.2).