393L0117

N:o L 329/54 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* 30.12.93

KAHDESTOISTA KOMISSION DIREKTIIVI 93/117/EY,

annettu 17 päivänä joulukuuta 1993,

yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- jamääritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin 70/373/ETY(1), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 3768/85(2), ja erityisesti sen 2 artiklan,

sekä katsoo, että

direktiivissä 70/373/ETY säädetään, että rehujen virallisessa tarkastuksessa rehujen laatua ja koostumusta koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten nojalla säädettyjen edellytysten noudattamisen toteamiseksi on käytettävä yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmiä,

on suotavaa vahvistaa yhteisön määritysmenetelmä, jonka avulla voidaan valvoa, että robenidiinin ja metyylibentsokvaatin käyttöedellytyksiä rehuissa noudatetaan, 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 robenidiinin ja metyylibentsokvaatin pitoisuudet määritetään tämän direktiivin liitteessä esitettyjä menetelmiä vastaavien menetelmien mukaisesti.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 30 päivänä marraskuuta 1994. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niitä virallisesti julkaistaessa niihin on liitettävä viittaus tähän direktiiviin. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

3 artikla

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

Tehty Brysselissä 17 päivänä joulukuuta 1993.

Komission puolesta

René STEICHEN

Komission jäsen

(1) EYVL N:o L 170, 3.8.1970, s. 2
(2) EYVL N:o L 362, 31.12.1985, s. 8

LIITE

1 ROBENIDIININ MÄÄRITTÄMINEN

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

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Tällä menetelmällä on mahdollista määrittää robenidiinin pitoisuus rehuissa. Määrityksen alaraja on 5 mg/kg.

2 Periaate

Näyte uutetaan happamaksi tehdyllä metanolilla. Uute kuivataan ja määräosa puhdistetaan alumiinioksidikolonnissa. Robenidiini eluoidaan kolonnista metanolilla, väkevöidään ja saatetaan sopivaksi tilavuudeksi liikkuvalla faasilla. Robenidiinin pitoisuus määritetään käänteisfaasista suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) ultraviolettidetektorin avulla.

3 Reagenssit

3.1 *Metanoli*

3.2 *Happamaksi tehty metanoli*

Siirretään 4,0 ml vetykloridihappoa (ϱ_{20} n. 1,18 g/ml) 500 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin metanolilla (3.1) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.3 *Asetonitriili, HPLC-laatua*

3.4 *Molekyyliseula*

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

3.5 *Alumiinioksidi: hapan, aktiviteettiluokka I pylväskromatografiaa varten*

Siirretään 100 grammaa alumiinioksidia sopivaan astiaan ja lisätään 2,0 ml vettä. Suljetaan ja ravistellaan noin 20 minuutin ajan. Säilytetään hyvin suljetussa astiassa.

3.6 *Kaliumdivetyfosfaattiliuos, c = 0,025 mol/l*

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

3.7 *Dinatriumvetyfosfaattiliuos, c = 0,025 mol/l*

Liuotetaan 3,55 grammaa vedetöntä (tai 4,45 g dihydraattia tai 8,95 g dodekahydraattia) dinatriumvetyfosfaattia veteen (HPLC-laatua) 1 000 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin ja sekoitetaan.

3.8 *HPLC:n liikkuva faasi*

Sekoitetaan seuraavat reagenssit:

650 ml asetonitriiliä (3.3),

250 ml vettä (HPLC-laatua),

50 ml kaliumdivetyfosfaattiliuosta (3.6),

50 ml dinatriumvetyfosfaattiliuosta (3.7).

Suodatetaan 0,22 µm:n suodattimen (4.6) läpi ja poistetaan liuoksesta kaasut (esimerkiksi käsittelemällä ultraäänellä 10 minuuttia).

3.9 *Standardiyhdiste*

Puhdas robenidiini: 1,3-bis[(4-klooribentsylideeni)amino]guanidiini-hydrokloridi.

3.9.1 Standardirobenidiinin kantaliuos : 300 µg/ml

Punnitaan 30 mg 0,1 mg:n tarkkuudella robenidiinin standardiyhdistettä (3.9). Liuotetaan happamaksi tehtyyn metanoliin (3.2) 100 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin samalla liuottimella ja sekoitetaan. Kääritään pullo alumiinifolioon ja säilytetään valolta suojattuna.

3.9.2 Standardirobenidiinin välimuotoliuos : 12 µg/ml

Siirretään 10,0 ml standardikantaliuosta (3.9.1) 250 ml:n pulloon, täytetään merkkiin 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 liikkuvalla faasilla (3.8) ja sekoitetaan. Näiden liuosten robenidiinipitoisuudet ovat vastaavasti 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 ja 6,0 µg/ml. Ne on valmistettava juuri ennen käyttöä.

4 Välineistö

4.1 *Lasikolonni*

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

4.2 *Laboratorioravistelija*

4.3 *Pyöröhaihdutin*

4.4 *HPLC-laitteisto, jossa aallonpituudeltaan säädettävissä oleva ultraviolettidetektori tai diodirividetektori, joka toimii alueella 250–400 nm*

4.4.1 Nestekromatografiakolonni: 300 mm x 4 mm, täytettynä 10 µm:n C 18-tyypin partikkeleilla tai vastaava kolonni

4.5 *Lasikuitusuodattimia* (Whatman GF/A tai vastaavia suodattimia)

4.6 *Kalvosuodattimia, 0,22 µm*

4.7 *Kalvosuodattimia, 0,45 µm*

5 Menettely

Huom: Robenidiini on herkkä valolle. Kaikkiin toimintoihin suositellaan keltaisen lasin käyttöä.

5.1 *Yleistä*

5.1.1 Rikastamaton rehu suositellaan analysoitavaksi (sokeakoe) robenidiinin ja häiritsevien aineiden poissaolon varmistamiseksi.

5.1.2 Sokearehua (5.1.1) määritettäessä tulisi suorittaa takaisinsaantokoe sen jälkeen, kun rehua on rikastettu lisäämällä yhtä suuri määrä robenidiinia, kuin näytteessä esiintyy. Rikastamalla pitoisuuteen 60 mg/kg siirretään 3,0 ml standardikantaliuosta (3.9.1) 250 ml:n erlenmeyerpulloon. Haihdutetaan liuos noin 0,5 ml:ksi typpivirrassa. Lisätään 15 g rikastamatonta rehua, sekoitetaan ja odotetaan 10 minuuttia ennen siirtymistä uuttovaiheeseen (5.2).

Huom: Tämän menetelmän tarkoituksiin rikastamattoman rehun kemiallisen koostumuksen on oltava näytetyypin kaltainen ja määrityksen aikana robenidiinia ei saa havaita.

5.2 *Uutto*

Punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella noin 15 g valmistettua näytettä. Siirretään 250 ml:n erlenmeyerpulloon ja lisätään 100,0 ml happamaksi tehtyä 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

erlenmeyerpulloon. Lisätään 7,5 g molekyyliseulaa (3.4), suljetaan astia ja ravistellaan viisi minuuttia. Suodatetaan välittömästi lasikuitusuodatinpaperin läpi. Tämä liuos säilytetään puhdistusta (5.3) varten.

5.3 *Puhdistus*

5.3.1 Alumiinioksidikolonnin esikäsittely

Lasikolonnin (4.1) alapäähän laitetaan pieni tuppo lasivillaa ja tasoitetaan se lasisauvaa käyttäen. Punnitaan 11,0 g valmistettua alumiinioksidia (3.5) ja siirretään kolonniin. Tässä vaiheessa tulee huolehtia, että altistuminen ilmalle on vähäisin mahdollinen. Taputellaan kevyesti täytettyä kolonnia sen alapäästä alumiinioksidin asettumiseksi.

5.3.2 Näytteen puhdistus

Pipetoidaan kolonniin 5,0 ml valmistettua näyteuutetta (5.2). Annetaan pipetin kärjen levätä kolonnin seinää vasten ja liuoksen absorboitua alumiinioksidiin. Eluoidaan robenidiini kolonnista 100 ml:lla metanolia (3.1) virtausnopeudella 2–3 ml/min ja kerätään eluaatti 250 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon. Kuivataan metanoliliuos haihduttamalla alennetussa paineessa 40 °C:ssa pyöröhaihduttimessa (4.3). Liuotetaan jäännös uudelleen 3–4 ml:aan liikkuvaa faasia (3.8) ja siirretään kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon. Huuhdellaan pullo usealla 1–2 ml:n annoksella liikkuvaa faasia ja siirretään nämä huuhteluliuokset mittapulloon. Täytetään merkkiin samalla liuottimella ja sekoitetaan. Määräosa suodatetaan 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.7) läpi. Tämä liuos säilytetään HPLC-määritystä (5.4) varten.

5.4 *HPLC-määritys*

5.4.1 Parametrit

Seuraavat olosuhteet annetaan viitteeksi. Muita parametrejä voidaan käyttää, jos ne johtavat vastaaviin tuloksiin.

Nestekromatografiakolonni (4.4.1).

HPLC:n liikkuva faasi (3.8).

Virtausnopeus : 1,5–2 ml/minuutti.

Detektorin aallonpituus : 317 nm.

Injektoitu määrä : 20–50 µl.

Kromatografisen järjestelmän stabiilisuus tarkastetaan injektoimalla 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 useamman kerran kutakin kalibrointiliuosta (3.9.3) ja mitataan kunkin pitoisuuden piikkien korkeudet (pinta-alat). Piirretään kalibrointikäyrä käyttäen kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien tai pinta-alojen keskiarvoja ordinaattana ja vastaavia pitoisuuksia, µg/ml, abskissana.

5.4.3 Näyteliuos

Injektoidaan useamman kerran näyteuutetta (5.3.2) käyttäen samaa määrää kuin kalibrointiliuoksille, ja määritetään robenidiinipiikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6 Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen robenidiinipiikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta määritetään näyteliuoksen pitoisuus µg/ml:na käyttäen kalibrointikäyrää (5.4.2).

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

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

jossa :

c = näyteliuoksen robenidiinipitoisuus µg/ml:na

m = näytteen massa grammoina.

7 Tulosten validointi

7.1 *Tunnistaminen*

Tutkittavan aineen tunnistus voidaan varmistaa ko-kromatografialla tai diodirividetektorilla, mikä mahdollistaa näyteuutteen ja 6,0 µg/ml robenidiinia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.6.3) spektrien vertailun.

7.1.1 Ko-kromatografia

Näyteuute rikastetaan lisäämällä sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.9.3). Lisätyn robenidiinin määrän on vastattava näyteuutteesta löydetyn robenidiinin arvioitua määrää.

Ainoastaan robenidiinipiikin korkeuden tulisi kasvaa ottaen huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimeneminen. Piikin leveyden, sen puolikorkeudella, on oltava noin 10 % sen alkuperäisestä leveydestä.

7.1.2 Määritys diodirividetektorilla

Tulokset arvioidaan seuraavien edellytysten mukaisesti:

a) Näyte- ja kalibrointispektrien maksimiabsorption aallonpituuden, mitattuna kromatogrammin piikin huipusta, on oltava sama rajoissa, jonka määritysjärjestelmän erotuskyky määrää. Määritykselle diodirividetektorilla tämä on yleensä noin ± 2 nm:ä;

b) Välillä 250–400 nm näyte- ja kalibrointispektrit, mitattuna kromatogrammin piikkien huipusta, eivät saa poiketa toisistaan niiltä osin, jotka kuuluvat 10–100 % alueeseen suhteellista absorbanssia. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät eikä missään havaittavassa kohdassa kahden spektrin välinen poikkeama ylitä 15 %:a tutkittavan aineen standardiabsorbanssista;

c) Välillä 250–400 nm näyteuutteen antaman piikin nousevan käyrän, huipun ja laskevan käyrän spektrit eivät saa poiketa silmämääräisesti toisistaan niiltä osin, jotka kuuluvat 10–100 % alueeseen suhteellista absorbanssia. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa kohdissa spektrien välinen poikkeama ei ylitä 15 %:a huipun spektrin absorbanssista.

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

7.2 *Toistettavuus*

Kahden rinnakkaisen, samasta näytteestä tehdyn määrityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 10 %:a suuremmasta tuloksesta, kun robenidiinipitoisuudet ovat yli 15 mg/kg.

7.3 *Saanto*

Rikastetulle näytteelle saannon on oltava vähintään 85 %.

8 Laboratorioiden välisten tulosten tarkastelu

Euroopan yhteisön laboratorioiden välisessä tarkastelussa 12 laboratoriota on määrittänyt neljä jauhon tai rakeiden muodossa olevaa kani- ja siipikarjarehunäytettä. Kukin näyte määritettiin kaksi kertaa. Tulokset esitetään alla olevassa taulukossa:

	Siipikarja		Kani	
	Jauho	Rakeet	Jauho	Rakeet
Keskiarvo (mg/kg)	27,00	27,99	43,6	40,1
S_r (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Saanto (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r = toistettavuuden standardipoikkeama
Cv_r = toistettavuuden variaatiokerroin
S_R = uusittavuuden standardipoikkeama
CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin

2 METYYLIBENTSOKVAATTIPITOISUUDEN MÄÄRITYS

7-Bentsyloksi-6-butyyli-3-metoksikarbonyyli-4-kinoloni

1 Tarkoitus ja soveltamisala

Tällä menetelmällä on mahdollista määrittää metyylibentsokvaattipitoisuus rehuissa. Määrityksen alaraja on 1 mg/kg.

2 Periaate

Metyylibentsokvaatti uutetaan näytteestä metanolisella metaanisulfonihappoliuoksella. Uute puhdistetaan dikloorimetaanilla ioninvaihtokromatografialla ja sitten uudelleen dikloorimetaanilla. Metyylibentsokvaattipitoisuus määritetään käänteisfaasista suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) ja UV-detektorilla.

3 Reagenssit

3.1 *Dikloorimetaani*

3.2 *Metanoli, HPLC-laatua*

3.3 *HPLC:n liikkuva faasi:*

metanolin (3.2) ja veden (HPLC-laatua) seos 75 + 25 (v +v)

Suodatetaan 0,22 µm:n suodattimen (4.5) läpi ja liuoksesta poistetaan kaasut (esimerkiksi ultraäänikäsittelyllä 10 minuuttia).

3.4 *Metaanisulfonihappoliuos, σ = 2 %*

Laimennetaan 20,0 ml metaanisulfonihappoa 1 000 ml:ksi metanolilla (3.2).

3.5 *Vetykloridihappoliuos, σ = 10 %*

Laimennetaan 100 ml vetykloridihappoa (ϱ_{20} noin 1,18 g/ml) 1 000 ml:ksi vedellä.

3.6 *Kationinvaihtohartsi Amberlite CG-120 (Na), 100–200 mesh*

Hartsi esikäsitellään ennen käyttöä: sekoitetaan 100 g hartsia 500 ml:n kanssa vetykloridihappoa (3.5) ja saatetaan seos kiehuvaksi lämpölevyllä koko ajan sekoittaen. Annetaan jäähtyä ja dekantoidaan happo pois. Tyhjösuodatetaan suodatinpaperin läpi. Pestään hartsi kahdesti 500 ml:n annoksella vettä ja sitten 250 ml:lla metanolia (3.2). Huuhdellaan hartsi uudelleen 250 ml:lla metanolia (3.2) ja kuivataan johtamalla ilmavirta suodatuskakun läpi. Kuivattu hartsi säilytetään suljetussa pullossa.

3.7 *Standardiyhdiste: puhdas metyylibentsokvaatti (7-bentsyloksi-6-butyyli-3-metoksikarbonyyli-4-kinoloni)*

3.7.1 Standardimetyylibentsokvaatin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 50 mg (0,1 mg:n tarkkuudella) standardiyhdistettä (3.7), liuotetaan metaanisulfonihappoliuokseen (3.4) 100 ml:n mittapullossa, täytetään merkkiin ja sekoitetaan.

3.7.2 Standardimetyylibentsokvaatin välimuotoliuos, 50 µg/ml

Siirretään 5,0 ml standardikantaliuosta (3.7.1) 50 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin metanolilla (3.2) ja sekoitetaan.

3.7.3 Kalibrointiliuokset

Siirretään sarjassa 25 ml:n mittapulloihin 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 ml standardin välimuotoliuosta (3.7.2). Täytetään merkkiin liikkuvalla faasilla (3.3) ja sekoitetaan. Näiden liuosten metyylibentsokvaattipitoisuudet ovat vastaavasti 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ja 10,0 µg/ml. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

4 **Välineistö**

4.1 *Laboratoriosekoittaja*

4.2 *Pyöröhaihdutin*

4.3 *Lasikolonni (250 mm × 15 mm) varustettuna hanalla ja noin 200 ml:n säiliöllä*

4.4 *HPLC-laitteisto, jossa aallonpituudeltaan säädettävissä oleva ultraviolettidetektori tai diodirividetektori*

4.4.1 Nestekromatografiakolonni: 300 mm x 4 mm, täytettynä 10 µm:n C 18-tyypin partikkeleilla tai vastaava kolonni

4.5 *Kalvosuodattimia, 0,22 µm*

4.6 *Kalvosuodattimia, 0,45 µm*

5 **Menettely**

5.1 *Yleistä*

5.1.1 Rikastamaton rehu (sokeakoe) on analysoitava metyylibentsokvaatin tai häiritsevien aineiden poissaolon varmistamiseksi.

5.1.2 Määritettäessä sokearehua, jota on rikastettu lisäämällä yhtä suuri määrä metyylibentsokvaattia, kuin näytteessä esiintyy, on suoritettava takaisinsaantokoe. Rikastamalla pitoisuuteen 15 mg/kg lisätään 600 µl standardikantaliuosta (3.7.1) 20 g:aan sokearehua, sekoitetaan ja odotetaan 10 minuuttia ennen siirtymistä uuttovaiheeseen (5.2).

Huom: Tämän menetelmän tarkoituksiin rikastamattoman rehun koostumustyypin on oltava näytteen kaltainen ja määrityksen aikana metyylibentsokvaattia ei saa havaita.

5.2 *Uutto*

Punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella noin 20 g valmistettua näytettä ja siirretään 250 ml:n erlenmeyerpulloon. Lisätään 100,0 ml metaanisulfonihappoa (3.4) ja ravistellaan mekaanisesti (4.1) 30 minuutin ajan. Suodatetaan liuos suodatinpaperin läpi ja suodos säilytetään neste-neste erotusta (5.3) varten.

5.3 *Neste-neste erotus*

Siirretään 25 ml suodosta (5.2) 500 ml:n erotussuppiloon, joka sisältää 100 ml vetykloridihappoliuosta (3.5). Lisätään 100 ml diklоorimetaania (3.1) suppiloon ja ravistellaan yhden minuutin ajan. Faasien erottumisen jälkeen valutetaan alempi faasi (diklоorimetaani) pyöreäpohjaiseen 500 ml:n pulloon. Toistetaan vesifaasin uutto vielä kahdella 40 ml:n annoksella diklоorimetaania ja yhdistetään nämä ensimmäiseen uutteeseen pyöreäpohjaisessa pullossa. Diklоorimetaaniuute haihdutetaan täysin kuivaksi pyöröhaihduttimessa (4.2), jonka on toimittava 40 °C:n lämpötilassa ja alennetussa paineessa. Liuotetaan jäännös 20 - 25 ml:aan metanolia (3.2), suljetaan pullo ja säilytetään koko uute ioninvaihtokromatografiaa (5.4) varten.

5.4 *Ioninvaihtokromatografia*

5.4.1 Kationinvaihtokolonnin esivalmistelu

Laitetaan pieni tuppo lasivillaa lasikolonnin (4.3) alapäähän. Valmistetaan liete 5 g:sta käsiteltyä kationinvaihtohartsia (3.6) ja 50 ml:sta vetykloridihappoa (3.5), kaadetaan kolonniin ja annetaan asettua. Annetaan hapon valua siten, että sen pinta jää juuri ja juuri hartsipinnan yläpuolelle ja pestään kolonni vedellä, kunnes ulos virtaava liuos on lakmuspaperilla mitattuna neutraalia. Siirretään 50 ml metanolia (3.2) kolonniin ja annetaan valua, kunnes se saavuttaa hartsipinnan.

5.4.2 Pylväskromatografia

Pipetoidaan varovasti saatua uutetta (5.3) kolonniin. Huuhdellaan pyöreäpohjainen pullo kahdella 5 - 10 ml:n annoksella metanolia (3.2) ja siirretään nämä pesuliuokset kolonniin. Annetaan uutteen valua hartsipintaan ja pestään kolonni 50 ml:lla metanolia valvoen ettei virtausnopeus ylitä 5 ml:aa minuutissa. Heitetään ulos

valunut liuos pois. Metyylibentsokvaatti eluoidaan kolonnista käyttäen 150 ml:aa metaanisulfonihappoliuosta (3.4) ja kerätään eluaatti kolonnista 250 ml:n erlenmeyerpulloon.

5.5 *Neste-neste erotus*

Siirretään saatu eluaatti (5.4.2) 1 l:n erotussuppiloon. Huuhdellaan erlenmeyerpullo 5–10 ml:lla metanolia (3.2) ja yhdistetään pesuliuos erotussuppilon sisällön kanssa. Lisätään 300 ml vetykloridihappoliuosta (3.5) ja 130 ml dikloorimetaania (3.1). Ravistellaan yhden minuutin ajan ja annetaan faasien erottua. Valutetaan alempi faasi (dikloorimetaani) 500 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon. Toistetaan vesifaasin uutto kahdella uudella 70 ml:n annoksella dikloorimetaania ja yhdistetään nämä uutteet ensimmäisen, pyöreäpohjaisessa pullossa olevan uutteen kanssa.

Dikloorimetaaniuute haihdutetaan täysin kuivaksi pyöröhaihduttimessa (4.2), jonka on toimittava 40 °C:n lämpötilassa ja alennetussa paineessa. Liuotetaan pullon jäännös noin 50 ml:aan metanolia (3.2) ja siirretään tämä liuos kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon. Pyöreäpohjainen pullo huuhdellaan kahdella uudella 1–2 ml:n annoksella metanolia ja siirretään liuos mittapulloon. Täytetään merkkiin metanolilla ja sekoitetaan. Suodatetaan määräosa kalvosuodattimen (4.6) läpi. Tämä liuos säilytetään HPLC-määritystä (5.6) varten.

5.6 *HPLC-määritys*

5.6.1 Parametrit

Seuraavat olosuhteet annetaan viitteeksi. Muita parametrejä voidaan käyttää, jos ne johtavat vastaaviin tuloksiin.

Nestekromatografiakolonni (4.4.1).

HPLC:n liikkuva faasi (3.3).

Virtausnopeus: 1–1,5 ml/minuutti.

Detektorin aallonpituus: 265 nm.

Injektoitu määrä: 20–50 µl.

Kromatografisen järjestelmän stabiilisuus tarkastetaan injektoimalla useamman kerran kalibrointiliuosta (3.7.3), jonka pitoisuus on 4,0 µg/ml, kunnes saadaan piikkejä, joiden korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.6.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan useamman kerran kutakin kalibrointiliuosta (3.7.3) ja mitataan kunkin pitoisuuden piikkien korkeudet (pinta-alat). Piirretään kalibrointikäyrä käyttäen kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien tai pinta-alojen keskiarvoja ordinaattana ja vastaavia pitoisuuksia, µg/ml, abskissana.

5.6.3 Näyteliuos

Injektoidaan useamman kerran näyteuutetta (5.5) käyttäen samaa määrää kuin kalibrointiliuoksille, ja määritetään metyylibentsokvaattipiikin korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6 Tulosten laskeminen

Näyteliuoksen metyylibentsokvaattipiikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta määritetään näyteliuoksen pitoisuus µg/ml:na käyttäen kalibrointikäyrää (5.6.2).

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

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

jossa:

c = näyteliuoksen metyylibentsokvaattipitoisuus mikrogrammoina millilitrassa,

m = näytteen massa grammoina.

7 Tulosten validointi

7.1 *Tunnistaminen*

Tutkittavan aineen tunnistus voidaan varmistaa ko-kromatografialla tai diodirividetektorilla, mikä mahdollistaa näyteuutteen ja 10,0 µg/ml metyylibentsokvaattia sisältävän kalibrointiliuoksen (3.7.3) spektrien vertailun.

7.1.1 Ko-kromatografia

Näyteuute rikastetaan lisäämällä sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.7.2). Lisätyn metyylibentsokvaatin määrän on vastattava näyteuutteesta löydetyn metyylibentsokvaatin arvioitua määrää.

Ainoastaan metyylibentsokvaatin piikin korkeuden tulisi kasvaa ottaen huomioon sekä lisätty määrä että uutteen laimeneminen. Piikin leveyden, sen puolikorkeudella, on oltava noin 10 % sen alkuperäisestä leveydestä.

7.1.2 Määritys diodirividetektorilla

Tulokset arvioidaan seuraavien edellytysten mukaisesti:

a) Näyte- ja kalibrointispektrien maksimiabsorption aallonpituuden, mitattuna kromatogrammien piikin huipusta, on oltava sama rajoissa, jonka määritysjärjestelmän erotuskyky määrää. Määritykselle diodirividetektorilla tämä on yleensä noin ± 2 nm:ä;

b) Välillä 220–350 nm näyte- ja kalibrointispektrit, mitattuna kromatogrammin piikkien huipusta, eivät saa poiketa toisistaan niiltä osin, jotka kuuluvat 10–100 % alueeseen suhteellista absorbanssia. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät eikä missään havaittavassa kohdassa kahden spektrin välinen poikkeama ylitä 15 %:a tutkittavan aineen standardiabsorbanssista;

c) Välillä 220–350 nm näyteuutteen antaman piikin nousevan käyrän, huipun ja laskevan käyrän spektrit eivät saa poiketa silmämääräisesti toisistaan niiltä osin, jotka kuuluvat 10–100 % alueeseen suhteellista absorbanssia. Tämä edellytys täyttyy, kun samat maksimit esiintyvät ja kun kaikissa havaittavissa kohdissa spektrien välinen poikkeama ei ylitä 15 %:a huipun spektrin absorbanssista.

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

7.2 *Toistettavuus*

Kahden rinnakkaisen, samasta näytteestä tehdyn määrityksen tulosten välinen ero ei saa ylittää 10 %:a suuremmasta tuloksesta, kun metyylibentsokvaattipitoisuudet ovat välillä 4–20 mg/kg.

7.3 *Saanto*

Rikastetulle näytteelle saannon on oltava vähintään 90 %.

8 Laboratorioiden välisten tulosten tarkastelu

Laboratorioiden välisessä tarkastelussa 10 laboratoriota on määrittänyt viisi näytettä. Kukin näyte määritettiin kaksi kertaa.

Tulokset

	Sokeakoe	Jauho 1	Rae 1	Jauho 2	Rae 2
Keskiarvo (mg/kg)	ei hav.	4,50	4,50	8,90	8,70
S_r (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r (%)	—	6,70	4,40	6,70	5,70
S_R (mg/kg)	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Saanto (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ei hav = ei havaittu
S_r = toistettavuuden standardipoikkeama
CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin
S_R = uusittavuuden standardipoikkeama
CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin