31999L0027

KOMISIJAS DIREKTĪVA 1999/27/EK

(1999. gada 20. aprīlis)

par Kopienas metožu ieviešanu amprolija, diklazurila un karbadoksa noteikšanai barībā, ar ko groza Direktīvu 71/250/EEK, 73/46/EEK, un atceļ Direktīvu 74/203/EEK

(Dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu 70/373/EEK par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei [1], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Austrijas, Somijas un Zviedrijas Pievienošanās aktu, un jo īpaši tās 2. pantu,

(1) tā kā Direktīva 70/373/EEK paredz, ka lai pārbaudītu, vai barība atbilst prasībām, kas izriet no normatīviem un administratīviem aktiem, kas reglamentē tās kvalitāti un sastāvu, oficiālo kontroli jāveic, izmantojot Kopienas paraugu ņemšanas un analīžu metodes;

(2) tā kā Padomes 1970. gada 23. novembra Direktīvā 70/524/EEK par barības piedevām [2], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas Regulu 45/1999, noteikts, ka amprolija un diklazurila saturam jābūt norādītam attiecīgajā marķējumā gadījumos, kad šīs vielas pievieno premiksiem un barībai; tā kā karbadoksa lietošana barības piedevām aizliegta ar Komisijas 1998. gada 22. decembra Regulu 2788/98, ar ko groza Padomes Direktīvu 70/524/EEK par dažu barībai pievienojamo augšanas stimulatoru izmantošanas aizliegumu [3], un ir jāveic aizliegto vielu iespējamās izmantošanas oficiāla kontrole;

(3) tā kā jānosaka Kopienas analīžu metodes šo vielu noteikšanai;

(4) tā kā pirmajā Komisijas 1971. gada 15. jūnija Direktīvā 71/250/EEK, ar ko ievieš Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei [4], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 98/54/EEK [5], noteiktas attiecīgās analīžu metodes, tostarp sinepju eļļas un teobromīna noteikšanas metode; tā kā, ņemot vērā zinātnes un tehnikas attīstību, minētās metodes ir novecojušas un šim nolūkam kļuvušas nepiemērotas; tā kā tādēļ šīs metodes būtu jāatceļ;

(5) tā kā ceturtajā Komisijas 1972. gada 5. decembra Direktīvā 73/46/EEK par Kopienas analīžu metodēm barības oficiālajai kontrolei [6], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 98/54/EK [7], noteiktas attiecīgās analīžu metodes, tostarp sinepju eļļas un retinola (A vitamīna) noteikšanas metode; tā kā, ņemot vērā zinātnes un tehnikas attīstību, minētā metode ir novecojusi un šim nolūkam kļuvusi nepiemērota; tā kā tādēļ attiecībā uz retinolu šī noteikšanas metode būtu jāatceļ;

(6) tā kā piektajā Komisijas 1974. gada 25. marta Direktīvā 74/203/EEK par Kopienas analīžu metodēm barības oficiālajai kontrolei [8], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 81/680/EEK [9], noteiktas analīžu metodes cietes un tādu cietes lielmolekulāro noārdīšanās produktu analīzēm, ko satur barība, kuras sastāvā ir biešu atgriezumi, biešu mīkstums, kaltētas biešu galviņas un lapas, kartupeļu mīkstums, sausais raugs, produkti, kuri ir bagāti ar inulīnu vai dradžiem, amproliju, etopabātu, dinitolamīdu, nikarbazīnu un menadionu (K3 vitamīna); tā kā, ņemot vērā zinātnes un tehnikas attīstību, visas minētajā direktīvā aprakstītās metodes ir novecojušas un tāpēc šim nolūkam kļuvušas nepiemērotas; tā kā tādēļ šī direktīva būtu jāatceļ;

(7) tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi saskan ar Barības pastāvīgās komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstis nosaka, ka amprolija, diklazurila un karbadoksa satura analīzes barības un premiksu oficiālajai kontrolei veic saskaņā ar šīs direktīvas pielikumā aprakstītajām metodēm.

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

2. pants

Direktīvu 71/250/EEK groza šādi:

1. Direktīvas 1. pantā svītro vārdus "sinepju eļļa" un "teobromīns".
2. Direktīvas pielikumā svītro 8. un 13. punktu.

3. pants

Direktīvu 73/46/EEK groza šādi:

1. Direktīvā svītro 2. pantu.
2. Svītro direktīvas II pielikumu.

4. pants

Tiek atcelta Direktīva 74/203/EEK.

5. pants

Dalībvalstīs, vēlākais, līdz 1999. gada 31. oktobrim stājas spēkā normatīvi un administratīvi akti, kas vajadzīgi, lai izpildītu šīs direktīvas prasības. Par to dalībvalstis tūlīt informē Komisiju.

Dalībvalstis piemēro šos pasākumus no 1999. gada 1. novembra.

Kad dalībvalstis pieņem minētos pasākumus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu, vai arī šādu atsauci pievieno minēto pasākumu oficiālai publikācijai. Šādas atsauces pievienošanas kārtību paredz dalībvalstis.

6. pants

Šī direktīva stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī*.

7. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1999. gada 20. aprīlī

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Franz FISCHLER

PIELIKUMS

A DAĻA

AMPROLIJA NOTEIKŠANA

1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)-metil]-2-pikolīna hlorīda hidrogēnhlorīds

1. **Mērķis un izmantošanas joma**

Šo metodi izmanto amprolija satura noteikšanai barībā un premiksos. Metodes kvalitatīvās noteikšanas robeža ir 1 mg/kg, kvantitatīvās noteikšanas robeža – 25 mg/kg.

2. **Princips**

Paraugu ekstrahē ar metanola un ūdens maisījumu. Pēc atšķaidīšanas ar kustīgo fāzi un membrānfiltrācijas, amprolija saturu nosaka ar katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfijas metodi (*HPLC*), izmantojot UV detektoru.

3. **Reaģenti**

3.1. Metanols.

3.2. Acetonitrils, *HPLC* kvalitātes ūdens.

3.3. *HPLC* kvalitātes ūdens.

3.4. Nātrija dihidrogēnfosfāta šķīdums, c = 0,1 mol/l.

1000 ml tilpuma mērkolbā ūdenī (3.3.) izšķīdina 13,80 g nātrija dihidrogenfosfāta monohidrāta, uzpilda līdz zīmei ar ūdeni (3.3) un sajauc.

3.5. Nātrija perhlorāta šķīdums, c = 1,6 mol/l:

1000 ml tilpuma mērkolbā ūdenī (3.3.) izšķīdina 224,74 g nātrija perhlorāta monohidrāta, uzpilda līdz zīmei ar ūdeni (3.3) un sajauc.

3.6. *HPLC* kustīgā fāze (sk. 9.1 piezīmi).

Acetonitrila (3.2), nātrija dihidrogenfosfāta šķīduma (3.4) un nātrija perhlorāta šķīduma (3.5) maisījums 450 + 450 + 100 (v + v + v). Pirms lietošanas filtrē caur 0,22 µm membrānfiltru (4.3) un šķīdumu degazē (piemēram, ultraskaņas vannā (4.4) vismaz 15 minūtes).

3.7. Standartviela: tīrs amprolijs, 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)-metil]-2-pikolīna hlorīda hidrogēnhlorīds, E 750 (sk. 9.2).

3.7.1. Amprolija rezerves standartšķīdums, 500 µg/ml

Ar precizitāti līdz 0,1 mg iesver 50 mg amprolija (3.7) 100 ml tilpuma mērkolbā, izšķīdina 80 ml metanola (3.1) un kolbu uz 10 minūtēm ievieto ultraskaņas vannā (4.4). Pēc iedarbības ar ultraskaņu, šķīdumu atdzesē līdz istabas temperatūrai, kolbu uzpilda līdz zīmei ar ūdeni un sajauc. Šķīdums 4°C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.7.2. Amprolija darba standartšķīdums, 50 µg/ml

Ar pipeti 5 ml rezerves standartšķīduma (3.7.1.) pārnes 50 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar ekstrakcijas šķīdinātāju (3.8) un sajauc. Šķīdums 4 °C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.7.3. Kalibrēšanas šķīdumi

Attiecīgi 0,5 ml, 1 ml un 2 ml darba standartšķīduma (3.7.2) pārnes 50 ml tilpuma mērkolbās. Uzpilda līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.6) un sajauc. Šādi pagatavoti šķīdumi atbilst attiecīgi 0,5, 1 un 2?g amprolija uz ml. Šie šķīdumi jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

3.8. Ekstrakcijas šķīdinātājs

Metanola (3.1) maisījums ar ūdeni 2 + 1 (v + v).

4. **Aparatūra**

4.1. Katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfs ar ievadīšanas sistēmu, kas piemērota 100 µl tilpuma ievadīšanai.

4.1.1. Katjonu apmaiņas šķidruma hromatogrāfijas kolonna, 125 mm x 4 mm, ar 10 µm Nukleozila 10 SA pildījumu, vai tai līdzvērtīga.

4.1.2. UV detektors ar maināmu viļņa garumu vai ar diodu matricas detektoru.

4.2. Membrānfiltrs, *PTFE* materiāla, 0,45?m.

4.3. Membrānfiltrs, 0,22 µm.

4.4. Ultraskaņas vanna.

4.5. Mehāniskais kratītājs vai magnētiskais maisītājs.

5. **Procedūra**

5.1. *Vispārīgi noteikumi*

5.1.1. Tukšā parauga analīze

Veicot atgūstamības pārbaudi (5.1.2), analizē barības tukšo paraugu, lai pārbaudītu, vai paraugā nav amprolija vai traucējošu vielu. Tukšajam paraugam būtu jābūt līdzīgam analizējamajam paraugam pēc veida, un tam nevajadzētu saturēt amproliju vai traucējošas vielas.

5.1.2. Atgūstamības pārbaude

Atgūstamības pārbaudi veic, izmantojot barības tukšo kontrolparaugu, kas pastiprināts ar amproliju, kura daudzums ir līdzīgs analizējamajā paraugā esošajam amprolija daudzumam. Lai paraugu pastiprinātu līdz 100 mg/kg, koniskā 250 ml tilpuma kolbā pārnes 10 ml rezerves standartšķīduma (3.7.1), un to ietvaicē līdz apmēram 0,5 ml. Pievieno 50 g barības tukšā parauga, rūpīgi sajauc un pirms ekstrakcijas posma (5.2) atstāj uz 10 minūtēm, vairākas reizes sajaucot.

Ja nav pieejams analizējamajam paraugam līdzīgs tukšais paraugs (sk. 5.1.1), atgūstamību nosaka pēc standartpiedevu metodes. Šādā gadījumā analizējamo paraugu pastiprina ar amprolija daudzumu, kas ir līdzīgs analizējamajā paraugā jau esošajam daudzumam. Šo paraugu analizē kopā ar nepastiprinātu paraugu, un atgūstamību aprēķina pēc starpības.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. Premiksi (ar amprolija saturu < 1 %) un barība

Atkarībā no amprolija satura, ar precizitāti līdz 0,01 g nosver 5 līdz 40 g parauga, ko pārnes 500 ml tilpuma koniskā kolbā, un pievieno 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.8). Kolbu uz 15 minūtēm ievieto ultraskaņas vannā (4.4). Kolbu izņem no ultraskaņas vannas un 1 stundu krata, izmantojot kratītāju vai magnētisko maisītāju (4.5). Ekstrakta alikvotu atšķaida ar kustīgo fāzi (3.6) līdz amprolija koncentrācijai 0,5-2 µg/ml un sajauc (sk. 9.3 piezīmi). Šā atšķaidītā šķīduma 5 līdz 10 ml filtrē ar membrānas filtru (4.2). Veic katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfiju (5.3).

5.2.2. Premiksi (ar amprolija saturu ≥ 1 %)

Atkarībā no amprolija satura, ar precizitāti līdz 0,001 g nosver 1 līdz 4 g premiksa, pārnes 500 ml tilpuma koniskā kolbā un pievieno 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.8). Kolbu uz 15 minūtēm ievieto ultraskaņas vannā (4.4). Kolbu izņem no ultraskaņas vannas un 1 stundu krata, izmantojot kratītāju vai magnētisko maisītāju (4.5). Ekstrakta alikvotu atšķaida ar kustīgo fāzi (3.6) līdz amprolija koncentrācijai 0,5-2 µg/ml un sajauc. Šā atšķaidītā šķīduma 5 līdz 10 ml filtrē ar membrānas filtru (4.2). Veic katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfiju (5.3).

5.3. *Katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfija*

5.3.1. Parametri

Ieteicams ievērot šādus nosacījumus, citos apstākļos var strādāt, ja tie dod līdzvērtīgus rezultātus:

Šķidruma hromatogrāfijas kolonna (4.1.1):	Katjonu apmaiņas šķidruma hromatogrāfijas kolonna, 125 mm x 4 mm, ar 10 μm Nukleozila 10 SA pildījumu vai līdzvērtīgu.
Kustīgā fāze (3.6):	Acetonitrila (3.2), nātrija dihidrogenfosfāta šķīduma (3.4) un nātrija perhlorāta šķīduma (3.5) maisījums 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Plūsmas ātrums:	0,7 līdz 1 ml/min.
Noteikšanas viļņa garums:	264 nm.
Ievadītais tilpums:	100 μl.

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes ievadot kalibrēšanas šķīdumu (3.7.3), kas satur 1,0 μg/ml, līdz iegūst vienādus pīķu augstumus un vienādu izdalīšanas laiku.

5.3.2. Kalibrēšanas grafiks

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.7.3.) ievada vairākas reizes un nosaka katrai koncentrācijai atbilstošo vidējo pīķa augstumu (vai laukumu). Konstruē kalibrēšanas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu pīķu vidējos augstumus (vai laukumus), un uz abscisu ass attiecīgās koncentrācijas mg/ml.

5.3.3. Parauga šķīdums

Vairākas reizes ievada parauga ekstraktu (5.2.), ņemot tādu pašu tilpumu kā kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka amprolija pīķu vidējo augstumu (laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Izmantojot kalibrēšanas līkni (5.3.2), parauga ekstraktā pēc amprolija pīķa vidējā augstuma (vai laukuma) nosaka amprolija koncentrāciju parauga šķīdumā lg/ml.

Amprolija saturu (w) analizējamajā paraugā aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

V = ekstrakcijas šķīdinātāja (3.8) tilpums ml saskaņā 5.2 punktu (t.i., 200 ml)

δ = amprolija koncentrācija parauga ekstraktā (5.2) μg/ml

f = atšķaidījuma pakāpe atbilstīgi 5.2

m = analizējamā parauga masa gramos

7. **Rezultātu izvērtējums**

7.1. *Identifikācija*

Analīta identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analīzē vai, lietojot diodu matricas detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta (5.2) spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.7.3) spektru, kas satur 2,0?g/ml amprolija.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā analīze

Parauga ekstraktu (5.2) pastiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.7.3). Pievienotā amprolija daudzumam jābūt aptuveni vienādam ar parauga ekstraktā noteikto amprolija daudzumu.

Ņemot vērā pievienoto daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu, būtu jāpalielinās tikai amprolija pīķa augstumam. Pīķa pusaugstuma platumam jābūt ± 10 % no sākotnēji nepastiprināta parauga ekstrakta amprolija pīķa pusaugstuma platuma.

7.1.2. Noteikšana ar diodu matricas detektoru

Rezultātus izvērtē pēc šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas un standartspektra viļņa garumam, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, detektora sistēmas izšķirtspējas robežās jābūt vienādam. Diodu matricas detektoram šīs robežas parasti ir ± 2 nm;

b) no 210 līdz 320 nm, paraugs un standartspektri, kas reģistrēti hromatogrammas pīķa virsotnē, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir 10 līdz -100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Šis kritērijs ir ievērots, ja maksimumi sakrīt, un nevienā novērojamā punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta absorbcijas;

c) no 210 līdz 320 nm parauga ekstrakta radītā pīķa kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Šis kritērijs ir ievērots, ja maksimumi sakrīt, un ja nevienā novērojamā punktā novirze starp spektriem nepārsniedz 15 % no pīķa smailes spektra absorbcijas.

Ja kāds no šiem kritērijiem nav ievērots, nosakāmās vielas klātbūtne nav apstiprinājusies.

7.2. Atkārtojamība

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu atšķirības nedrīkst pārsniegt:

— 15 % no lielākās noteiktās vērtības, ja amprolija saturs ir no 25 mg/kg līdz 500 mg/kg

— 75 mg/kg, ja amprolija saturs ir no 500 mg/kg līdz 1000 mg/kg

— 7,5 % no lielākās noteiktās vērtības, ja amprolija saturs pārsniedz 1000 mg/kg

7.3. Atgūstamība

Pastiprināta kontrolparauga (tukšā parauga) atgūstamība ir vismaz 90 %.

8. **Salīdzinoša pētījuma rezultāti**

Tika sarīkota starplaboratoriju salīdzinošā testēšana, izmantojot trīs putnu barības paraugus (1. līdz 3. paraugs), viens minerālbarības paraugs (4. paraugs) un viens premiksa paraugs (5. paraugs). Salīdzinošās testēšanas rezultāti apkopoti tabulā:

	1. paraugs (barības tukšais paraugs)	2. paraugs	3. paraugs	4. paraugs	5. paraugs
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
vidējā vērtība [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
Nominālais saturs [mg/kg]	-	50	200	5 000	25 000

L: laboratoriju skaits
n: atsevišķu vērtību skaits
s_r: atkārtojamības standartnovirze
CV_r: atkārtojamības variācijas koeficients
S_R: reproducējamības standartnovirze
CV_R: reproducējamības variācijas koeficients

9. **Piezīmes**

9.1. Ja analizējamais paraugs satur tiamīnu, tiamīna pīķis hromatogrammā parādās īsi pirms amprolija pīķa. Analīzi veicot pēc šīs metodes, amprolijs un tiamīns ir jānodala. Ja amproliju un tiamīnu nenodala kolonnā (4.1.1), ko izmanto šajā metodē, kustīgajā fāzē (3.6) līdz 50 % acetonitrila aizstāj ar metanolu.

9.2. Saskaņā ar britu farmakopeju, amprolija (0,02 mol/l) spektrs sālsskābes šķīduma sasniedz maksimumu pie 246 nm un 262 nm. Absorbcija pie 246 nm ir 0,84, bet pie 262 nm attiecīgi 0,80.

9.3. Parauga ekstrakts noteikti jāatšķaida tikai ar kustīgo fāzi, citādi amprolija pīķa aiztures laiks var ievērojami mainīties jonu spēka izmaiņu dēļ.

B DAĻA

DIKLAZURILA NOTEIKŠANA

2,6-dihlor-α-(4-hlorfenil)-4-(4,5-dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-(3H)il)fenilacetonitrils

1. **Mērķis un izmantošanas joma**

Metode paredzēta diklazurila noteikšanai barībā un premiksos. Metodes kvalitatīvās noteikšanas robeža ir 0,1 mg/kg, kvantitatīvās noteikšanas robeža – 0,5 mg/kg.

2. **Princips**

Pēc iekšējā standarta pievienošanas paraugu ekstrahē ar paskābinātu metanolu. Barības ekstrakta alikvotu attīra, izmantojot C18 cietās fāzes ekstrakcijas kolonnu. Diklazurilu no kolonnas eluē ar paskābināta metanola un ūdens maisījumu. Pēc eluāta ietvaicēšanas, atlikumu izšķīdina DMFA/ūdenī. Premiksu ekstraktu ietvaicē, atlikumu izšķīdina DMFA/ūdenī. Diklazurila saturu nosaka trīspakāpju gradienta apgrieztās fāzes augstas efektivitātes šķidruma hromatogrāfijā (*HPLC*), lietojot UV detektoru.

3. **Reaģenti**

3.1. *HPLC* kvalitātes ūdens.

3.2. Amonija acetāts.

3.3. Tetrabutilamonija hidrogēnsulfāts (*TBHS*).

3.4. *HPLC* kvalitātes acetonitrils.

3.5. *HPLC* kvalitātes metanols.

3.6. N,N-dimetilformamīds (*DMFA*).

3.7. Sālsskābe, ρ20 = 1,19 g/ml.

3.8. Standartviela: diklazurils II - 24: 2,6-dihlor-α-(4-hlorfenil)-4-(4,5-dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazīn-2-(3H)il)fenilacetonitrils ar garantētu tīrību, E771.

3.8.1. Diklazurila rezerves standartšķīdums, 500 µg/ml

Ar precizitāti līdz 0,1 mg 50 ml tilpuma mērkolbā iesver 25 mg diklazurila standartvielas (3.8). Šķīdina DMFA (3.6), uzpilda līdz zīmei ar DMFA (3.6) un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā vai izmanto kolbu no tumša stikla un glabā ledusskapī. Šķīdums 4 °C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.8.2. Diklazurila standartšķīdums, 50 µg/ml

5,00 ml rezerves standartšķīduma (3.8.1) iepilda 50 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar DMFA (3.6) un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā vai izmanto kolbu no tumša stikla un glabā ledusskapī. Šķīdums 4 °C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.9. Iekšējais standarts: 4-dihlor-α-(4-hlorfenil)2,6-(4,5-dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-(3H)il) α-metilfenilacetonitrils.

3.9.1. Iekšējais rezerves standarta šķīdums, 500 µg/ml.

Ar precizitāti līdz 0,1 mg 50 ml tilpuma mērkolbā iesver 25 mg iekšējā standarta vielas (3.9). Šķīdina DMFA (3.6), uzpilda līdz zīmei ar DMFA (3.6), un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā vai izmanto kolbu no tumša stikla, to glabā ledusskapī. Šķīdums 4 °C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.9.2. Iekšējais standarta šķīdums, 50 µg/ml.

5,00 ml iekšējā standarta šķīduma (3.9.1.) pārnes 50 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar DMFA (3.6) un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā vai izmanto kolbu no tumša stikla, to glabā ledusskapī. Šķīdums 4°C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.9.3. Iekšējā standarta šķīdums premiksu analīzēm, p/1000 mg/ml (p = diklazurila nominālais saturs premiksā, mg/kg).

Ar precizitāti līdz 0,1 mg iesver p/10 mg iekšējās standarta vielas 100 ml tilpuma mērkolbā, šķīdina DMFA (3.6) ultraskaņas vannā (4.6), uzpilda līdz zīmei ar DMFA un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā vai izmanto kolbu no tumša stikla, to glabā ledusskapī. Šķīdums 4 °C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.10. Kalibrēšanas šķīdums, 2 µg/ml.

Ar pipeti 50 ml tilpuma mērkolbā pārnes 2,00 ml diklazurila standarta šķīduma (3.8.2) un 2,00 ml iekšējā standarta šķīduma (3.9.2). Pievieno 16 ml DMFA (3.6), uzpilda līdz zīmei ar ūdeni un sajauc. Šis šķīdums jāgatavo tieši pirms lietošanas.

3.11. C18 cietās fāzes ekstrakcijas kolonna, piemēram, *Bond Elut*, izmērs: 1 cm^3, sorbenta masa: 100 mg.

3.12. Ekstrakcijas šķīdinātājs: paskābināts metanols.

Ar pipeti 5,0 ml sālsskābes (3.7) pievieno 1000 ml metanola (3.5) un sajauc.

3.13. *HPLC* Kustīgā fāze:

Eluents A: amonija acetāta un tetrabutilamonija hidrogēnsulfāta šķīdums.

3.13.1. Izšķīdina 5 g amonija acetāta (3.2) un 3,4 g TBHS (3.3) 1000 ml ūdens (3.1) un sajauc.

3.13.2. Eluents B: acetonitrils (3.4).

3.13.3. Eluents C: metanols (3.5).

4. **Aparatūra**

4.1. Mehāniskais kratītājs.

4.2. Iekārta trijpakāpju gradienta *HPLC*.

4.2.1. Šķidruma hromatogrāfijas kolonna 100 mm x 4,6 mm, ar 3 µm *Hypersil ODS* vai līdzvērtīgu pildījumu.

4.2.2. UV detektors ar maināmu viļņa garumu vai ar diodes matricas detektoru.

4.3. Rotācijas vakuumietvaicētājs.

4.4. Membrānas filtrs, 0,45?m.

4.5. Vakuumkolektors.

4.6. Ultraskaņas vanna.

5. **Procedūra**

5.1. *Vispārīgi noteikumi*

5.1.1. Barības tukšais paraugs

Analizē tukšo paraugu, lai pārliecinātos, ka tajā nav ne diklazurila, ne noteikšanu traucējošu vielu. Tukšais paraugs pēc veida ir līdzīgs analizējamajam paraugam un, pārbaudot to, nebūtu jāatklājas diklazurilam vai noteikšanu traucējošām vielām.

5.1.2. Atgūstamības pārbaude

Atgūstamību pārbauda, izmantojot barības tukšo kontrolparaugu, kas pastiprināts, pievienojot tādu daudzumu diklazurila, kas ir līdzīgs paraugā esošajam daudzumam. Lai paraugu pastiprinātu līdz 1 mg/kg, 50 g barības tukšajam paraugam pievieno 0,1 ml rezerves standartšķīduma (3.8.1), rūpīgi sajauc un atstāj uz 10 minūtēm, pirms ekstrakcijas (5.2) vairākas reizes rūpīgi sajaucot.

Ja nav analizējamajam paraugam līdzīga tukšā parauga (sk. 5.1.1), atgūstamību nosaka pēc standarta piedevu metodes. Šādā gadījumā analizējamo paraugu pastiprina ar diklazurila daudzumu, kas ir līdzīgs analizējamajā paraugā jau esošajam daudzumam. Šo paraugu analizē kopā ar nepastiprinātu paraugu, un atgūstamību aprēķina pēc starpības.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. Barība

Ar precizitāti līdz 0,01 g nosver apmēram 50 g lielu paraugu. Pārnes to 500 ml tilpuma koniskā kolbā, pievieno 1,00 ml iekšējā standarta šķīduma (3.9.2), 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12), kolbu noslēdz ar aizbāzni. Maisījumu krata kratītājā visu nakti (4.1). Nostādina 10 minūtes. Pārnes dzidrā šķīduma 20 ml alikvotu piemērotā stikla traukā un atšķaida ar 20 ml ūdens. Šo šķīdumu pārnes uz ekstrakcijas kolonnu (3.11) un izlaiž cauri, izmantojot vakuumu (4.5). Kolonnu skalo ar 25 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12) un ūdens maisījumu tilpuma attiecībās 65 + 35 (v + v). Savāktās frakcijas izlej, un savienojumus eluē ar 25 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12) un ūdens maisījumu tilpuma attiecībā 80 + 20 (v + v). Šo frakciju ietvaicē sausu ar rotora ietveicētāja (4.3) palīdzību pie 60 °C temperatūras. Atlikumu šķīdina 1,0 ml DMFA (3.6), pievieno 1,5 ml ūdens (3.1) un sajauc. Filtrē caur membrānas filtru (4.4). Veic katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidruma hromatogrāfiju (5.3).

5.2.2. Premiksi

Ar precizitāti līdz 0,001 g nosver apmēram 1 g lielu paraugu. To pārnes 500 ml tilpuma koniskā kolbā, pievieno 1,00 ml iekšējā standarta šķīduma (3.9.3), 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12) un kolbu noslēdz ar aizbāzni. Maisījumu visu nakti krata kratītājā (4.1). Nostādina 10 minūtes. Dzidrā šķīduma alikvotu 10 000/p ml (p = diklazurila nominālais saturs premiksā, mg/kg) pārnes piemērota izmēra apaļkolbā. Ietvaicē to sausu, izmantojot rotora ietveicētāju (4.3), pie 60 °C temperatūras. Atlikumu šķīdina 10,0 ml DMFA (3.6), pievieno 15,0 ml ūdens (3.1) un sajauc. Veic katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfiju (5.3).

5.3. *HPLC noteikšana*

5.3.1. Kritēriji

Ieteicams ievērot šādus nosacījumus, citos apstākļos var strādāt, ja tajos iegūst līdzvērtīgus rezultātus:

— Šķidruma hromatogrāfijas kolonna (4.2.1):	100 mm x 4,6 mm, ar 3 μm *Hypersil ODS*, vai tam līdzvērtīgu pildījumu	
— Kustīgā fāze:	Eluents A (3.13.1):	Amonija acetāta un tetrabutilamonija hidrogēnsulfāta ūdens šķīdums
	Eluents B (3.13.2):	acetonitrils
	Eluents B (3.13.3):	metanols

— Eluēšanas režīms:	— lineārs gradients
	— sākumā: A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v)
	— pēc 10 minūtēm gradienta eluēšanas 30 minūtes: A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v)
	Skalo ar B 10 minūtes
— Plūsmas ātrums:	1,5 – 2 ml/min
— Ievadītais tilpums:	20 µl
— Detektora viļņa garums:	280 nm

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes ievadot kalibrēšanas šķīdumu (3.10), kas satur 2 µg/ml, līdz iegūst vienāda augstuma pīķus un vienādu izdalīšanas laiku.

5.3.2. Kalibrēšanas šķīdums

Vairākas reizes ievada pa 20 µl kalibrēšanas šķīduma un nosaka diklazurila un iekšējā standarta pīķu vidējo augstumu (laukumu).

5.3.3. Parauga šķīdums

Vairākas reizes ievada pa 20 µl parauga šķīduma (5.2.1. vai 5.2.2.) un nosaka diklazurila un iekšējā standarta pīķa vidējo augstumu (laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana**

6.1. Barība

Diklazurila saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina pēc formulas:

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

kur

$h_{d,s}$ = parauga šķīduma (5.2.1) diklazurila pīķa augstums (laukums)

$h_{i,s}$ = parauga šķīduma (5.2.1) iekšējā standarta pīķa augstums (laukums)

$h_{d,c}$ = kalibrēšanas šķīduma (3.10) diklazurila pīķa augstums (laukums)

$h_{i,c}$ = kalibrēšanas šķīduma (3.10) iekšējā standarta pīķa augstums (laukums)

$\delta_{d,c}$ = diklazurila koncentrācija µg/ml kalibrēšanas šķīdumā (3.10)

m = analizējamā parauga masa gramos.

V = saskaņā ar 5.2.1 iegūtā parauga ekstrakta tilpums (t.i., 2,5 ml)

6.2. Premiksi

Diklazurila saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina pēc formulas:

$$w = \frac{h_{d,c} h_{i,c}}{h_{i,s} h_{d,c}} x \frac{\beta_{d,c} 0{,}002Vp}{m} [mg/kg]$$

kur

$h_{d,c}$ = kalibrēšanas šķīduma (3.10) diklazurila pīķa augstums (laukums)

$h_{i,c}$ = kalibrēšanas šķīduma (3.10) iekšējā standarta pīķa augstums (laukums)

$h_{d,s}$ = parauga šķīduma (5.2.1) diklazurila pīķa augstums (laukums)

$h_{i,s}$ = parauga šķīduma (5.2.1) iekšējā standarta pīķa augstums (laukums)

$\delta_{d,c}$ = diklazurila koncentrācija kalibrēšanas šķīdumā (3.10)

m = analizējamā parauga masa gramos.

V = saskaņā ar 5.20.2 iegūtā parauga ekstrakta tilpums (t.i., 2,5 ml)

p = diklazurila nominālais saturs mg/kg premiksā

7. **Rezultātu izvērtējums**

7.1. *Identifikācija*

Nosakāmās vielas identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analīzē vai, lietojot diodu matricas detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta (5.2.1 vai 5.2.2) spektru ar kalibrēšanas šķīduma (3.10) spektru.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā analīze

Parauga ekstraktu (5.2.1 vai 5.2.2) pastiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.10). Pievienotā diklazurila daudzumam jābūt aptuveni vienādam ar parauga ekstraktā noteikto diklazurila daudzumu.

Ņemot vērā pievienoto daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu, būtu jāpalielinās tikai diklazurila un iekšējā standarta pīķa augstumam. Pīķa pusaugstuma platumam jābūt ± 10 % no sākotnējā parauga ekstrakta diklazurila vai iekšējā standarta pīķa pusaugstuma platuma.

7.1.2. Atklāšana ar diodu matricas detektoru

Rezultātus vērtē pēc šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas un standartspektra viļņa garumam, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, atklāšanas sistēmas izšķirtspējas noteiktās robežās jābūt vienādam. Diodu matricas detektoram šīs robežas parasti ir ± 2 nm;

b) starp 230 un 320 nm paraugs un standartspektri, kas reģistrēti hromatogrammas pīķa virsotnē, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir panākta, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojamā punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta absorbcijas;

c) no 230 līdz 320 nm parauga ekstrakta kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir no 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir panākta, ja maksimumi sakrīt, un ja nevienā novērojamā punktā novirze starp spektriem nepārsniedz 15 % no pīķa smailes spektra absorbcijas.

Ja nav atbilstības kādam no šiem kritērijiem, nosakāmās vielas klātbūtne nav apstiprinājusies.

7.2. Atkārtojamība

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu atšķirība nedrīkst pārsniegt:

— 30 % no lielākās noteiktās vērtības, ja diklazurila saturs ir no 0,5 mg/kg līdz 2,5 mg/kg,

— 0,75 mg/kg, ja diklazurila saturs barībā ir no 2,5 mg/kg līdz 5 mg/kg,

— 15 % no lielākās noteiktās vērtības, ja diklazurila saturs pārsniedz 5 mg/kg.

7.3. Atgūstamība

Pastiprināta tukšā parauga atgūstamībai vajadzētu būt vismaz 80 %.

8. **Salīdzinoša pētījuma rezultāti**

Tika organizēta starplaboratoriju salīdzinošā testēšana, kurā 11 laboratorijās analizēja 5 paraugus. Divi analizējamie paraugi bija premiksi, viens ar organisku matricu (O 100), otrs ar neorganisku matricu (A 100). Abu paraugu teorētiskais diklazurila saturs ir 100 mg/kg. Trīs mājputniem domātas kombinētās barības paraugus ir ražojuši atšķirīgi ražotāji (NL) (L1/Z1/K1). Tajos teorētiskais diklazurila saturs ir 1 mg/kg. Laboratorijām tika dots norādījums visus paraugus analizēt vienu vai divas reizes. (Sīkāku informāciju par šīs starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultātiem sk. *Journal of AOAC International, Volume 77, Nr. 6, 1994, p.1359[hyphen]1361*). Rezultāti apkopoti tabulā:

	1. paraugs A 100	2. paraugs O 100	3. paraugs L 1	4. paraugs Z 1	5. paraugs K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
vidējā vērtība	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
Nominālais saturs [mg/kg]	100	100	1	1	1

L: laboratoriju skaits
n: atsevišķu vērtību skaits
s_r: atkārtojamības standartnovirze
CV_r: atkārtojamības variācijas koeficients
S_R: reproducējamības standartnovirze
CV_R: reproducējamības variācijas koeficients

9. **Piezīmes**

Vispirms jāparāda, ka diklazurila signāla izmaiņas mērāmo koncentrāciju diapazonā ir lineāras.

C DAĻA

KARBADOKSA NOTEIKŠANA

Metil-3-(2-hinoksanililmetilēn)karbazāta N1,N4-dioksīds

1. **Mērķis un izmantošanas joma**

Šo metodi izmanto karbadoksa satura noteikšanai dzīvnieku barībā, premiksos un preparātos. Metodes kvalitatīvās noteikšanas robeža ir 1 mg/kg, bet kvantitatīvās noteikšanas robeža – 10 mg/kg.

2. **Princips**

Paraugu līdzsvaro ar ūdeni un ekstrahē ar metanola un acetonitrila maisījumu. Analizējot barību, filtrēta ekstrakta alikvotu attīra alumīnija oksīda kolonnā. Analizējot premiksus un preparātus, filtrēta ekstrakta alikvotu līdz vajadzīgajai koncentrācijai atšķaida ar ūdeni, metanolu un acetonitrilu. Karbadoksa saturu nosaka apgrieztās fāzes augstas efektivitātes šķidruma hromatogrāfijā (*HPLC*), lietojot UV detektoru.

3. **Reaģenti**

3.1. Metanols.

3.2. Acetonitrils ar *HPLC* tīrības pakāpi.

3.3. Etiķskābe, w = 100 %.

3.4. Alumīnija oksīds: neitrāls, I aktivitātes klases.

3.5. Metanola un acetonitrila maisījums 1 + 1 (v + v).

Sajauc 500 ml metanola (3.1) ar 500 ml acetonitrila (3.2).

3.6. Etiķskābe, σ = 10 %.

Atšķaida 10 ml etiķskābes (3.3) līdz 100 ml tilpumam ar ūdeni.

3.7. Nātrija acetāts, CH_3COONa.

3.8. *HPLC* kvalitātes ūdens

3.9. Acetāta buferšķīdums, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.

Izšķīdina 0,82 g nātrija acetāta (3.7) 700 ml ūdens (3.8), un ar etiķskābi (3.6) noregulē tā reakciju līdz pH 6,0. Pārnes 1000 ml tilpuma mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar ūdeni (3.8) un sajauc.

3.10. Kustīgā fāze *HPLC*

Sajauc 825 ml acetāta buferšķīduma (3.9) ar 175 ml acetonitrila (3.2). Šķīdumu filtrē caur 0,22 μm filtru (4.5) un degazē (piemēram, 10 minūtes apstrādājot ar ultraskaņu).

3.11. Standartviela

Tīrs karbadokss: Metil-3-(2-hinoksanililmetilēn)karbazāta N1,N4-dioksīds, E 850.

3.11.1. Karbadoksa rezerves standartšķīdums 100 μg/ml (sk. procedūras 5. punktā):

Ar precizitāti līdz 0,1 mg 250 ml tilpuma mērkolbā iesver 25 mg karbadoksa standartvielas (3.11). Apstrādājot ar ultraskaņu (4.7), izšķīdina metanola un acetonitrila maisījumā (3.5). Pēc iedarbības ar ultraskaņu, šķīdumu atdzesē līdz istabas temperatūrai, uzpilda līdz zīmei ar metanola un acetonitrila maisījumu (3.5) un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā vai izmanto kolbu no tumša stikla, to glabā ledusskapī. Šķīdums 4 °C temperatūrā ir stabils vienu mēnesi.

3.11.2. Kalibrēšanas šķīdumi

Attiecīgi 2,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml un 20,0 ml rezerves standartšķīduma (3.11.1) pārnes 100 ml tilpuma mērkolbās. Pievieno 30 ml ūdens, uzpilda līdz zīmei ar metanola un acetonitrila maisījumu (3.5) un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā. Šādi pagatavoto šķīdumu karbadoksa koncentrācija attiecīgi ir 2,0, 5,0, 10 un 20,0 μg/ml. Kalibrēšanas šķīdumi jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

Piezīme: Ja barībā karbadoksa saturs nepārsniedz 10 mg/kg, jāpagatavo kalibrēšanas šķīdumi ar koncentrāciju zem 2 μg/ml.

3.12. Ūdens - [metanola – acetonitrila] (3.5) maisījums, 300 + 700 (v + v).

300 ml ūdens sajauc ar 700 ml metanola un acetonitrila maisījuma (3.5).

4. **Aparatūra**

4.1. Laboratorijas kratītājs vai magnētiskais maisītājs.

4.2. Stiklašķiedras filtrpapīrs (GF/A Vatmans vai līdzvērtīgs).

4.3. Stikla kolonna (garums 300 līdz 400 mm, iekšējais diametrs aptuveni 10 mm) ar keramikas-stikla starpsienu un noteces krānu.

Piezīme: var izmantot arī stikla kolonnu ar krānu vai sašaurinātu apakšdaļu; tādā gadījumā kolonnas apakšējā daļā ievieto nelielu stiklašķiedras aizbāzni, ko sablīvē ar stikla spieķīti.

4.4. Katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfs ar ievadīšanas sistēmu, kas piemērota 20 μl tilpuma ievadīšanai.

4.4.1. 4.4.1. Šķidrumu hromatogrāfijas kolonna: 300 mm x 4 mm, C18, 10 μm pakojums vai līdzvērtīgs.

4.4.2. 4.4.2. UV detektors ar maināmu viļņa garumu, vai diodu matricas detektors, kas darbojas viļņu garuma diapazonā no 225 līdz 400 nm.

4.5. Membrānas filtrs, 0,22 μm.

4.6. Membrānas filtrs, 0,45 μm.

4.7. Ultraskaņas vanna

5. **Procedūra**

Piezīme:
Karbadokss ir gaismasjutīgs. Visas procedūras veic samazinātā apgaismojumā, lieto tumša stikla traukus vai arī tos ietin alumīnija folijā.

5.1. *Vispārīgi noteikumi*

5.1.1. Barības tukšais paraugs.

Veicot atgūstamības pārbaudi (5.1.2), analizē tukšo paraugu, lai pārbaudītu, vai paraugā nav karbadoksa vai traucējošu vielu. Tukšajā paraugā, kas ir līdzīgs analizējamajam paraugam, nebūtu jākonstatē karbadokss vai noteikšanu traucējošas vielas.

5.1.2. Atgūstamības pārbaude

Atgūstamības pārbaudi veic, analizējot barības tukšo paraugu (5.1.1.), kas pastiprināts, pievienojot tādu daudzumu karbadoksa, kas ir līdzīgs paraugā esošajam. Tukšā parauga pastiprināšanai līdz 50 mg/kg, ņem 5,0 ml rezerves standartšķīduma (3.11.1.), ko pārnes 200 ml tilpuma koniskā kolbā. Slāpekļa atmosfērā šķīdumu ietvaicē līdz aptuveni 0,5 ml tilpumam. Pirms ekstrakcijas (5.2) pievieno 10 g tukšā barības parauga, samaisa un atstāj uz 10 minūtēm.

Ja nav analizējamajam paraugam līdzīga tukšā parauga (sk. 5.1.1), atgūstamību var noteikt pēc standarta piedevu metodes. Šādā gadījumā analizējamo paraugu pastiprina ar karbadoksa daudzumu, kas ir līdzīgs analizējamajā paraugā jau esošajam daudzumam. Šo paraugu analizē kopā ar nepastiprinātu paraugu, un atgūstamību aprēķina pēc starpības.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. Barība

Ar precizitāti līdz 0,01 g iesver apmēram 10 g parauga, ko pārnes 200 ml tilpuma koniskā kolbā. Pievieno 15,0 ml ūdens, sajauc un atstāj uz 5 minūtēm. Pievieno 35,0 ml metanola un acetonitrila maisījuma (3.5), kolbu noslēdz ar aizbāzni un uz 30 minūtēm ievieto kratītājā vai maisa ar magnētisko maisītāju (4.1). Šķīdumu filtrē caur stiklašķiedras filtrpapīru (4.2). Šo šķīdumu glabā attīrīšanai (5.3.).

5.2.2. Premiksi (0,1 līdz 2,0 %).

Ar precizitāti līdz 0,01 g nosver apmēram 1 g parauga, ko pārnes 200 ml tilpuma koniskā kolbā. Pievieno 15,0 ml ūdens, samaisa un atstāj uz 5 minūtēm. Pievieno 35,0 ml metanola un acetonitrila maisījuma (3.5), kolbu noslēdz ar aizbāzni un uz 30 minūtēm ievieto kratītājā vai maisa ar magnētisko maisītāju (4.1). Šķīdumu filtrē caur stiklašķiedras filtrpapīru (4.2). Ar pipeti filtrāta alikvotu pārnes 50 ml tilpuma mērkolbā. Pievieno 15,0 ml ūdens, uzpilda līdz zīmei ar metanola un acetonitrila maisījumu (3.5) un sajauc. Karbadoksa koncentrācija pagatavotajā šķīdumā ir apmēram 10 µg/ml. Alikvotu filtrē caur 0,45 µm filtru (4.6). Veic *HPLC* hromatogrāfiju (5.4).

5.2.3. Preparāti (> 2 %)

Ar precizitāti līdz 0,001 g nosver apmēram 0,2 g nemalta parauga, ko pārnes 250 ml tilpuma koniskā kolbā. Pievieno 45,0 ml ūdens, sajauc un atstāj uz 5 minūtēm. Pievieno 105,0 ml metanola un acetonitrila maisījuma (3.5), kolbu noslēdz ar aizbāzni un tās saturu homogenizē. Paraugu 15 minūtes apstrādā ar ultraskaņu ultraskaņas vannā (4.7), pēc tam 15 minūtes krata vai maisa (4.1). Šķīdumu filtrē caur stiklašķiedras filtrpapīru (4.2). Filtrāta alikvotu atšķaida ar ūdens, metanola un acetonitrila maisījumu (3.12) līdz karbadoksa koncentrācijai 10-15 µg/ml (10 % preparātiem filtrātu atšķaida 10 reizes). Alikvotu filtrē caur 0,45 µm filtru (4.6). Veic *HPLC* hromatogrāfiju (5.4).

5.3. *Attīrīšana*

5.3.1. Alumīnija oksīda kolonnas sagatavošana.

Nosver 4 g alumīnija oksīda (3.4) un pārnes stikla kolonnā (4.3).

5.3.2. Parauga attīrīšana.

15 ml filtrētā ekstrakta (5.2.1) pārnes alumīnija oksīda kolonnā un pirmos 2 ml eluāta izlej. Nākamos 5 ml eluāta savāc un tā alikvotu filtrē caur 0,45 µm filtru (4.6). Veic *HPLC* hromatogrāfiju (5.4).

5.4. *HPLC noteikšana*

5.4.1. Kritēriji

Ieteicams ievērot šādus nosacījumus, lai gan var izmantot arī citus, ja tie dod līdzvērtīgus rezultātus.

Šķidruma hromatogrāfijas kolonna (4.1.1):	300 mm x 4 mm, C18, 10 µm pakojums vai līdzvērtīgs
Kustīgā fāze (3.10):	Acetāta buferšķīduma (3.9) un acetonitrila (3.2) maisījums 825 + 175 (v + v).
Plūsmas ātrums:	1,5-2 ml/min.
Viļņa garums noteikšanai:	365 nm.
Ievadītais tilpums:	20 µl.

Pārbauda hromatogrāfijas sistēmas stabilitāti, vairākas reizes ievadot kalibrēšanas šķīdumu (3.11.2.) ar koncentrāciju 5,0 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgus pīķa augstums (vai laukumu) un izdalīšanas laiku.

5.4.2. Kalibrēšanas grafiks

Visus kalibrēšanas šķīdumus (3.11.2.) ievada vairākas reizes un izmēra katrai koncentrācijai atbilstošo pīķa augstumu (laukumu). Konstruē kalibrēšanas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu pīķu vidējo augstumu (vai laukumu) un uz abscisu ass attiecīgo koncentrāciju µg/ml.

5.4.3. Parauga šķīdums

Vairākas reizes ievada parauga ekstraktu [(5.3.2) barība, (5.2.2) premiksi un (5.2.3) preparāti] un nosaka karbadoksa pīķu vidējo augstumu (vai laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Izmantojot kalibrēšanas grafiku (5.4.2), pēc karbadoksa pīķu vidējā augstuma (vai laukuma) nosaka parauga šķīduma koncentrāciju µg/ml.

6.1. Barība:

Karbadoksa saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

δ = karbadoksa koncentrācija µg/ml parauga ekstraktā (5.3.2).

V_1 = ekstrakta tilpums ml (, t.i., 50).

M = parauga masa g.

6.2. Premiksi un preparāti.

Karbadoksa saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina pēc formulas:

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

kur:

δ = karbadoksa koncentrācija µg/ml parauga ekstraktā (5.2.2 vai 5.2.3).

V_2 = ekstrakta tilpums ml (, t.i., 50, analizējot premiksus, un 150, analizējot preparātus).

F = atšķaidījuma pakāpe saskaņā ar 5.2.2 (premiksi) vai 5.2.3 (preparāti).

M = analizējamā parauga masa g.

7. **Rezultātu izvērtējums**

7.1. Identifikācija

Nosakāmās vielas identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analīzē vai, lietojot diodu matricas detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.11.2.) spektru, kas satur 10,0 µg/ml.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā analīze

Parauga ekstraktu pastiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.11.2). Pievienotā karbadoksa daudzumam būtu jābūt aptuveni vienādam ar parauga ekstraktā noteikto karbadoksa daudzumu.

Ņemot vērā pievienoto daudzumu un atšķaidījumu, būtu jāpalielinās tikai karbadoksa pīķa augstumam. Pīķa pusaugstuma platums nedrīkst mainīties vairāk par 10 % salīdzinot ar sākotnējo platumu.

7.1.2. Atklāšana ar diodu matricas detektoru

Rezultātus vērtē pēc šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas viļņa garumam un standarta spektram, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, atklāšanas sistēmas izšķirtspējas noteiktajās robežās ir jābūt vienādiem. Diodu matricas detektoram šīs robežas parasti ir ± 2 nm;

b) no 225 līdz 400 nm parauga un standarta spektri, kas reģistrēti hromatogrammas pīķa virsotnē, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kurās relatīvā absorbcija ir 10 līdz 100 %. Atbilstība šim kritērijam ir ievērota, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta absorbcijas;

c) no 225 līdz 400 nm parauga ekstrakta kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kurās relatīvā absorbcija ir no 10 līdz 100 %. Atbilstība šim kritērijam ir ievērota, ja maksimumi sakrīt un ja nevienā novērojumu punktā spektru atšķirības nepārsniedz 15 % no absorbcijas vērtības maksimuma smailē.

Ja nav atbilstības kādam no šiem kritērijiem, nosakāmās vielas klātbūtne nav apstiprinājusies.

7.2. Atkārtojamība.

Ja karbadoksa saturs analizējamajā paraugā ir 10 mg/kg vai augstāks, divu paralēlu analīžu rezultāti nedrīkst atšķirties vairāk par 15 % no lielākā rezultāta vērtības.

7.3. Atgūstamība

Pastiprināta tukšā parauga atgūstamībai vajadzētu būt vismaz 90 %.

8. **Salīdzinoša pētījuma rezultāti**

Tika organizēta starplaboratoriju salīdzinošā testēšana, kurā astoņās laboratorijās analizēja sešus barības paraugus, četrus premiksus un trīs preparātus. Visus paraugus analizēja divas reizes. (Sīkāku informāciju par šīs starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultātiem sk. *Journal of AOAC, Volume 71, Nr. 1988, 484. — 490. lpp.*). Analīžu rezultāti (izņemot izkritušos) apkopoti tabulā:

1. tabula. Baribas analiu starplaboratoriju salidzinošas testešanas rezultati

	1. paraugs	2. paraugs	3. paraugs	4. paraugs	5. paraugs	6. paraugs
L	8	8	8	8	8	8
n	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
vidējā vērtība (mg/kg)	15	14	15	15	15	15
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
Nominālais saturs (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

2. tabula. Premiksu un preparatu analiu starplaboratoriju salidzinošas testešanas rezultati

	Premiksi				Preparāti.		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Vidējā vērtība (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
Nominālais saturs (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: laboratoriju skaits
n: atsevišķo vērtību skaits
s_r: atkārtojamības standartnovirze
CV_r: atkārtojamības variācijas koeficients
S_R: reproducējamības standartnovirze
CV_R: reproducējamības variācijas koeficients