31998L0064

L 257/14 *EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS* 1998 9 19

KOMISIJOS DIREKTYVA 98/64/EB

1998 m. rugsėjo 3 d.

nustatanti Bendrijos analizės metodus pašaruose esančioms aminorūgštims, žaliems aliejams ir riebalams bei olakvindoksui nustatyti ir iš dalies pakeičianti Direktyvą 71/393/EEB

(tekstas svarbus EEE)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 70/373/EEB dėl oficialios pašarų kontrolės mėginių ėmimo ir analizės metodų įvedimo Bendrijoje ([1]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Austrijos, Suomijos ir Švedijos Stojimo aktu, ypač į jos 2 straipsnį,

kadangi Direktyvoje 70/373/EEB reikalaujama, kad tikrinant, ar pašarai atitinka įstatymų ir kitų teisės aktų jiems keliamus kokybės ir sudėties reikalavimus, oficiali pašarų kontrolė būtų atliekama taikant Bendrijos mėginių ėmimo ir analizės metodus;

kadangi 1979 m balandžio 2 d. Tarybos direktyva 79/373/EEB dėl prekybos kombinuotaisiais pašarais ([2]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos direktyva 97/47/EB ([3]), ir 1993 m. rugsėjo 13 d. Tarybos direktyva 93/74/EEB dėl pašarų konkretiems mitybos tikslams ([4]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 96/25/EB ([5]), nustato, kad aminorūgštys bei žali aliejai ir riebalai turi būti nurodomi pašarų etiketėse;

kadangi 1970 m lapkričio 23 d. Tarybos direktyva 70/524/EEB dėl priedų pašaruose ([6]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos direktyva 98/19/EB ([7]), nustato, kad olakvindokso kiekis turi būti nurodytas etiketėje tada, kai šios medžiagos yra įdėta į kombinuotuosius pašarus;

kadangi 1971 m lapkričio 18 d. antroji Komisijos direktyva 71/393/EB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus analizės metodus ([8]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos direktyva 84/4/EEB ([9]), išdėsto analizės metodus, tarp jų žalių aliejų ir riebalų nustatymo; kadangi aprašytąjį metodą reikėtų pakeisti;

kadangi turi būti nustatyti šių medžiagų patikrinimo Bendrijos analizės metodai;

kadangi priemonės, numatytos šioje direktyvoje, sutampa su Pašarų nuolatinio komiteto nuomone,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės numato, kad oficialiai tikrinant aminorūgščių, žalių aliejų ir riebalų bei olakvindokso kiekį pašaruose, analizės būtų atliekamos priede nurodytais metodais.

2 straipsnis

Komisijos direktyvos 71/393/EEB priedo 4 punktas „Žalių aliejų ir riebalų nustatymas“ pakeistas šios direktyvos priedo B dalimi.

3 straipsnis

1. Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję iki 1998 m. gruodžio 31 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

Šias priemones jos taiko nuo 1999 sausio 1 dienos.

Valstybės narės, priimdamos šias priemones, daro jose nuorodą į šią direktyvą, arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

([1]) OL L 170, 1970 8 3, p. 2.
([2]) OL L 86, 1979 4 6, p. 30.
([3]) OL L 211, 1997 8 5, p. 45.
([4]) OL L 237, 1993 9 22, p. 23.
([5]) OL L 125, 1996 5 23, p. 35.
([6]) OL L 270, 1970 12 14, p. 1.
([7]) OL L 96, 1998 3 28, p. 39.
([8]) OL L 279, 1971 12 20, p. 7.
([9]) OL L 15, 1984 1 18, p. 28.

2. Valstybės narės pateikia Komisijai šios direktyvos taikymo srityje priimtų pagrindinių nacionalinių teisės aktų nuostatų tekstus.

4 straipsnis

Ši direktyva įsigalioja dvidešimtą dieną po jos paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

5 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1998 m. rugsėjo 3 d.

Komisijos vardu

Franz FISCHLER

Komisijos narys

PRIEDAS

A DALIS

Aminorūgščių nustatymas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu, naudojant aminorūgščių analizatorių, nustatomas laisvųjų (sintetinių ir natūralių) ir bendrųjų (sujungtų peptiduose ir laisvųjų) aminorūgščių kiekis pašaruose. Šis metodas tinkamas šioms aminorūgštims: cisteinui (cistinui), metioninui, lizinui, treoninui, alaninui, argininui, asparagino ir glutamino rūgštims, glicinui, histidinui, izoleucinui, leucinui, fenilalaninui, prolinui, serinui, tirozinui ir valinui.

Šis metodas neišskiria aminorūgščių druskų ir negali atskirti D-aminorūgšties formos nuo L-aminorūgšties formos. Metodas netinka triptofano ar aminorūgščių hidroksilo analogams nustatyti.

2. **Metodo esmė**

2.1. *Laisvosios aminorūgštys*

Laisvosios aminorūgštys ekstrahuojamos praskiesta druskos rūgštimi. Kartu ekstrahuojamos azoto makromolekulės nusodinamos sulfosalicilo rūgštimi ir atskiriamos filtruojant. Filtruoto tirpalo pH sureguliuojamas iki 2,20. Aminorūgštys atskiriamos jonų mainų chromatografija ir nustatomos fotometriškai vykdant reakciją su ninhidrinu, bangos ilgiui esant 570 nm.

2.2. *Bendros aminorūgštys*

Nustatymo metodas pasirenkamas, nelygu tiriamos aminorūgštys. Cisteinas (cistinas) ir metioninas prieš hidrolizę turi būti oksiduojami iki cistino rūgšties ir metionino sulfono. Tirozinas turi būti nustatomas neoksiduotų mėginių hidrolizatuose. Visos kitos aminorūgštys, paminėtos 1 dalyje, gali būti nustatomos arba oksiduotuose, arba neoksiduotuose mėginiuose.

Oksidacija atliekama peroksiskruzdžių rūgšties ir fenolio mišiniu, esant 0 °C temperatūrai. Oksidacijos reagento perteklius suskaidomas natrio disulfitu. Oksiduoti ar neoksiduoti mėginiai hidrolizuojami druskos rūgštimi (c = 6 mol/l) 23 valandas. Hidrolizatų pH sureguliuojamas iki 2,20. Aminorūgštys atskiriamos jonų mainų chromatografijos būdu fotometriškai, bangos ilgiui esant 570 nm (prolinui – 440 nm), vykdant reakciją su ninhidrinu.

3. **Reagentai**

Turi būti naudojamas du kartus distiliuotas arba atitinkamos kokybės (elektroninis laidumas < 10 μS) vanduo.

3.1. Vandenilio peroksidas, w = 30 %.

3.2. Skruzdžių rūgštis, w = 98 – 100 %.

3.3. Fenolis.

3.4. Natrio disulfitas.

3.5. Natrio hidroksidas.

3.6. 5-sulfosalicilo rūgšties dihidratas.

3.7. Druskos rūgštis, tankis apytikriai 1,18 g/ml.

3.8. Trinatrio citratas dihidratas.

3.9. 2,2'-tiodietanolis (tiodiglikolis).

3.10. Natrio chloridas.

3.11. Ninhidrinas.

3.12. Petroleteris, virimo temperatūros ribos 40–60 °C.

3.13. Norleucinas arba kitas junginys, kurį galima naudoti kaip vidinį standartą.

3.14. Azoto dujos (mažiau 10 milijonųjų dalių deguonies).

3.15. 1-oktanolis.

3.16. Aminorūgštys.

3.16.1. Medžiagų, paminėtų 1 dalyje, standartai. Grynieji junginiai, neturintys kristalizacinio vandens. Išdžiovinami vakuume virš P_2O_5 ar H_2SO_4 likus savaitei iki naudojimo.

3.16.2. Cistino rūgštis.

3.16.3. Metionino sulfonas.

3.17. Natrio hidroksido tirpalas, c = 7,5 mol/l:

300 g NaOH (3.5) ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1litro.

3.18. Natrio hidroksido tirpalas, c = 1 mol/l:

40 g NaOH (3.5) ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1litro.

3.19. Skruzdžių rūgšties ir fenolio tirpalas:

889 g skruzdžių rūgšties (3.2) sumaišoma su 111 g vandens ir pridedama 4,73 g fenolio (3.3).

3.20. Hidrolizuojantis mišinys, HCl c = 6 mol/l su 1 g/l fenolio:

įdedama 1 g fenolio (3.3) į 492 ml HCl (3.7) ir praskiedžiama vandeniu iki 1 litro.

3.21. Ekstrahavimo mišinys, HCl c = 0,1 mol/l su 2 % tiodiglikolio:

8,2 ml HCl (3.7) praskiedžiama su maždaug 900 ml vandens, įpilama 20 ml tiodiglikolio (3.9), praskiedžiama vandeniu iki 1 litro (3.7 ir 3.9 tiesiogiai nemaišoma).

3.22. 5-sulfosalicilo rūgštis, β = 6 %

60 g 5-sulfosalicilo rūgšties (3.6) ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama vandeniu iki 1 litro.

3.23. Oksiduojantis mišinys (peroksiskruzdžių rūgštis ir fenolis):

menzūrėlėje sumaišoma 0,5 ml vandenilio peroksido (3.1) ir 4,5 ml skruzdžių rūgšties bei fenolio tirpalo (3.19). Palaikoma valandą esant 20–300 °C temperatūrai, kad susidarytų peroksiskruzdžių rūgštis, po to, prieš supilant į mėginį, atšaldoma ledo vandens vonelėje (15 min).

Pastaba:
Kad neužtikštų ant odos ir drabužių, naudojami apsauginiai drabužiai.

3.24. Citratinis buferinis tirpalas, Na^+ c = 0,2 mol/l, pH 2,20:

Apie 800 ml vandens ištirpinama 19,61 g trinatrio citrato (3.8), 5 ml tiodiglikolio (3.9), 1g fenolio (3.3) ir 16,50 ml HCl (3.7). Praskiedžiama vandeniu iki 1 litro. pH sureguliuojamas iki 2,20.

3.25. Eliuentiniai buferiniai tirpalai ruošiami pagal analizatoriaus instrukcijas (4.9).

3.26. Ninhidrino reagentas ruošiamas pagal analizatoriaus instrukcijas (4.9).

3.27. Standartiniai aminorūgščių tirpalai. Šie tirpalai turi būti laikomi esant žemesnei kaip 50 °C temperatūrai.

3.27.1. Pradiniai standartiniai aminorūgščių tirpalai (3.16.1). c = 2,5 µmol/ml kiekvienos aminorūgšties druskos rūgštyje. Gali būti perkami.

3.27.2. Pradinis standartinis cistino rūgšties ir metionino sulfono tirpalas, c = 1,25 µmol/ml:

0,2115 g cistino rūgšties (3.16.2) ir 0,2265 g metionino sulfono (3.16.3) ištirpinama citratiniame buferiniame tirpale (3.24) 1 litro matavimo kolboje, iki žymės praskiedžiama citratiniu buferiniu tirpalu. Laikoma esant žemesnei kaip 5 °C temperatūrai ne ilgiau kaip 12 mėnesių. Šis tirpalas nenaudojamas, jei pradiniame standartiniame tirpale (3.27.1) yra cistino rūgšties ir metionino sulfono.

3.27.3. Pradinis vidinio standarto tirpalas, pvz.: norleucino, c = 20 µmol/ml:

0,6560 g norleucino (3.13) ištirpinama citratiniame buferiniame tirpale (3.24) 250 ml matavimo kolboje, iki žymės praskiedžiama citratiniu buferiniu tirpalu. Laikoma esant žemesnei kaip 5 °C temperatūrai ne ilgiau kaip 6 mėnesius.

3.27.4. Standartinių aminorūgščių, naudojamų hidrolizatų matavimui, kalibracinis tirpalas, c = 5 nmol/50µl cistino rūgščiai ir metionino sulfonui ir c = 10 nmol/50µl kitoms aminorūgštims:

30 ml citratinio buferinio tirpalo (3.24) ištirpinama 2,2 g natrio chlorido (3.10) 100 ml menzūrėlėje. Įpilama 4,00 ml pradinio standartinio aminorūgščių tirpalo (3.27.1), 4,00 ml pradinio standartinio cistino rūgšties bei metionino sulfono tirpalo (3.27.2) ir, jei reikia, 0,50 ml pradinio vidinio standarto tirpalo (3.27.3). Natrio hidroksidu (3.18) pH sureguliuojamas iki 2,20.

Šis kiekis perkeliamas į 50 ml matavimo kolbutę, praskiedžiama iki žymės citratiniu buferiniu tirpalu (3.24) ir sumaišoma.

Laikoma esant žemesnei kaip 5 °C temperatūrai ne ilgiau kaip 3 mėnesius.

Žiūrėkite pastabas 9.1.

3.27.5. Hidrolizatų, paruoštų pagal 5.3.3.1 punktą, ir ekstraktų (5.2) nustatymo kalibracinis tirpalas. Kalibracinis tirpalas ruošiamas pagal 3.27.4 nenaudojant natrio chlorido.

Laikoma esant žemesnei kaip 5 °C temperatūrai ne ilgiau kaip 3 mėnesius.

4. **Prietaisai**

4.1. 100 arba 250 ml apvaliadugnė kolba su grįžtamuoju kondensatoriumi.

4.2. 100 ml borosilikatinio stiklo butelis užsukamu kamšteliu su guminiu ar tefloniniu tarpikliu (pvz.: *Duran, Schott*), tinkantis naudoti krosnyje.

4.3. Krosnis, priverstinės ventiliacijos, su termoreguliatorium, kurio tikslumas didesnis kaip ± 2 °C.

4.4. pH-metras (trys skaičiai po kablelio).

4.5. Membraninis filtras (0,2 μm).

4.6. Centrifuga.

4.7. Sukamasis vakuuminis garintuvas.

4.8. Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.

4.9. Aminorūgščių analizatorius arba didelio slėgio skysčių chromatografijos įranga su jonų mainų kolonėle, įrengimas ninhidrinui, po kolonėle esančiu reaktoriumi ir fotometriniu detektoriumi.

Kolonėlė užpildyta sulfonuoto polistireno dervomis, galinčiomis atskirti aminorūgštis vieną nuo kitos ir nuo kitų ninhidrin-teigiamų junginių. Tekėjimą buferinio tirpalo ir ninhidrino sistemoje sąlygoja siurbliai, kurių pastovumas yra ± 0,5 % tiek kalibravimo, tiek ir mėginio matavimo metu.

Kai kuriais aminorūgščių analizatoriais galima matuoti hidrolizatus, kuriuose natrio jonų koncentracija c = 0,8 mol/l ir kuriuose po oksidacijos yra likęs skruzdžių rūgšties perteklius. Kitais analizatoriais nepatenkinamai atskiriamos tam tikros aminorūgštys, jei hidrolizatuose yra skruzdžių rūgšties likutis ir (arba) didelė natrio jonų koncentracija. Tokiu atveju po hidrolizės, prieš pH sureguliavimą, rūgšties tūris sumažinamas apytiksliai iki 5 ml nugarinant. Garinama turėtų būti vakuume, esant aukštesnei kaip 40 °C temperatūrai.

5. **Matavimas**

5.1. *Mėginio paruošimas*

Mėginys sumalamas, kad išbyrėtų per 0,5 mm sietelį. Labai drėgni mėginiai prieš sumalant turi būti arba išdžiovinami oru neviršijant 50 °C temperatūros, arba džiovinami šaldant. Daug riebalų turintys mėginiai prieš malimą turi būti ekstrahuojami petroleteriu (3.12).

5.2. Laisvųjų aminorūgščių nustatymas pašaruose ir premiksuose

Į kūginę kolbą 0,2 mg tikslumu pasveriamas atitinkamas paruošto mėginio (5.1) kiekis (1–5 g) ir įpilama 100,0 ml ekstrahavimo mišinio (3.21). Mišinys maišomas 60 min mechanine purtykle ar magnetine maišykle (4.8). Leidžiama nusistovėti nuosėdoms ir 10,0 ml supernatanto tirpalo perpilama pipete į 100 ml menzūrėlę.

Maišant įpilama 5,0 ml sulfosalicilo rūgšties tirpalo (3.22) ir maišoma magnetine maišykle 5 minutes. Supernatantas filtruojamas arba centrifuguojamas tam, kad būtų pašalintos bet kokios nuosėdos. 10,0 ml gauto tirpalo įpilama į 100 ml menzūrėlę ir, natrio hidroksido tirpalu (3.18) pH sureguliavus iki 2,20, citratiniu buferiniu tirpalu (3.24) perkeliamas į tinkamo tūrio matavimo kolbą ir iki žymės praskiedžiamas citratiniu buferiniu tirpalu (3.24).

Jei naudojamas vidinis standartas, pridedama 1,00 ml vidinio standarto (3.27.3) kiekvienam 100 ml gauto tirpalo ir praskiedžiama iki žymės buferiniu tirpalu (3.24).

Atliekama chromatografinė analizė pagal 5.4.

Jei ekstraktai nematuojami tą pačią dieną, jie turi būti laikomi esant žemesnei kaip 5 °C temperatūrai.

5.3. *Bendrų aminorūgščių nustatymas*

5.3.1. Oksidacija

0,2 mg tikslumu pasveriama 0,1–1 g paruošto mėginio (5.1):

— į 100 ml apvaliadugnę kolbą (4.1) „atvirajai“ hidrolizei (5.3.23),

— į 250 ml apvaliadugnę kolbą (4.1), jei reikalinga maža natrio koncentracija (5.3.3.1), arba

— į 100 ml butelį su užsukamu kamšteliu (4.2) „uždarajai“ hidrolizei (5.3.2.4).

Pasvertojoje mėginio dalyje azoto kiekis turi būti apie 10 mg, o drėgnis neviršyti 100 mg.

Kolba (butelis) patalpinama į ledo vandens vonelę ir atšaldoma iki 0 °C, įpilama 5 ml oksiduojančio tirpalo (3.23) ir pamaišoma stikline mentele lenktu galiuku. Kolba (butelis), kartu su joje (jame) esančia mentele uždengiama orui nepralaidžia plėvele, ledo vandens vonelė, kurioje yra uždaras indas, patalpinama į šaldytuvą esant 0 °C temperatūrai ir paliekama jame 16 valandų. Po 16 valandų išimama iš šaldytuvo, oksiduojančio reagento perteklius suskaidomas pridedant 0,84 g natrio disulfito (3.4).

Toliau vykdoma 5.3.2.1. procedūra.

5.3.2. Hidrolizė

5.3.2.1. Oksiduoto mėginio hidrolizė

Į oksiduotą mėginį, paruoštą pagal 5.3.1, įpilama 25 ml hidrolizuojančio mišinio, (3.20) stengiantis nuplauti prie indo sienelių ir mentelės prilipusius mėginio likučius. Nelygu naudojama hidrolizės eiga, tęsiama pagal 5.3.2.3 ar 5.3.2.4.

5.3.2.2. Neoksiduoto mėginio hidrolizė

Į 100 ml ar 250 ml apvaliadugnę kolbą (4.1) ar į 100 ml butelį su užsukamu kamšteliu (4.2) 0,2 mg tikslumu pasveriama 0,1–1 g paruošto mėginio (5.1). Pasvertojoje mėginio dalyje azoto turėtų būti apie 10 mg. Atsargiai įpilama hidrolizuojančio mišinio (3.20) ir sumaišoma su mėginiu. Tęsiama pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4.

5.3.2.3. „Atviroji“ hidrolizė

3 stikliniai rutuliukai įdedami į kolbą su mišiniu (paruoštu pagal 5.3.2.1 ar 5.3.2.2) ir virinami 23 valandas. Hidrolizei pasibaigus, kondesatorius išplaunamas 5 ml citratinio buferinio tirpalo (3.24). Kolba nuimama ir atšaldoma ledo vonelėje. Tęsiama pagal 5.3.3.

5.3.2.4. „Uždaroji“ hidrolizė

Butelis su mišiniu, paruoštu pagal 5.3.2.1 ar 5.3.2.2, patalpinamas į krosnį (4.3), įkaitintą iki 110 °C. Kad slėgis nedidėtų (dėl dujinių medžiagų susidarymo) ir būtų išvengta sprogimo, pirmąją hidrolizės valandą indas uždengiamas užsukamu kamšteliu. *Kamštelis neužsukamas*. Po valandos kamštelis užsukamas ir indas paliekamas krosnyje 23 valandoms. Hidrolizei pasibaigus, indas išimamas iš krosnies, atsargiai atsukamas kamštelis ir butelis įstatomas į ledo vandens vonelę. Paliekama, kad atšaltų.

Nelygu pH reguliavimo eiga (5.3.3), naudojant citratinį buferinį tirpalą (3.24) butelio turinio kiekis perpilamas į 250 ml menzūrėlę ar 250 ml apvaliadugnę kolbą.

Toliau vykdoma 5.3.3. procedūra

5.3.3. pH reguliavimas

Nelygu aminorūgščių analizatoriaus (4.9) tolerancija natriui, pH reguliavimas tęsiamas pagal 5.3.3.1 ar 5.3.3.2.

5.3.3.1. Chromatografinėms sistemoms (4.9), reikalaujančioms mažos natrio koncentracijos:

kai aminorūgščių analizatoriui reikalinga maža natrio koncentracija (kai rūgšties tūris turi būti sumažintas), pageidautina naudoti pradinį vidinio standarto tirpalą (3.27.3).

Šiuo atveju prieš garinimą į hidrolizatą įpilama 2,00 ml pradinio vidinio standarto tirpalo (3.27.3).

Į hidrolizatus, gautus pagal 5.3.2.3 ar 5.3.2.4, įlašinama 2 lašai 1-octanolio.

Sukamuoju garintuvu, vakuume esant 40 °C, tūris sumažinamas iki 5 ml–10 ml. Jei atsistiktinai tūris sumažinamas mažiau kaip iki 5 ml, hidrolizatas išpilamas, o matavimas atliekamas pakartotinai.

Natrio hidroksido tirpalu (3.18) pH sureguliuojamas iki 2,20 ir toliau vykdoma 5.3.4. procedūra.

5.3.3.2. Visiems kitiems aminorūgščių analizatoriams (4.9):

Hidrolizatai, gauti pagal 5.3.2.3 ar 5.3.2.4, iš dalies neutralizuojami atsargiai pilant ir tuo pat metu maišant 17 ml natrio hidroksido tirpalo (3.17), įsitikinama, ar temperatūra yra žemesnė kaip 40 °C.

Esant kambario temperatūrai pH sureguliuojamas iki 2,20 naudojant natrio hidroksido tirpalą (3.17), paskui – natrio hidroksido tirpalą (3.18). Toliau vykdoma 5.3.4. procedūra.

5.3.4. Mėginio tirpalas chromatografijai

Visas hidrolizato, kurio pH sureguliuotas (5.3.3.1 ar 5.3.3.2) citratiniu buferiniu tirpalu (3.24), kiekis perpilamas į 200 ml matavimo kolbą, iki žymės praskiedžiant buferiniu tirpalu (3.24).

Jei vidinis standartas dar nebuvo naudotas, įpilama 2,00 ml vidinio standarto (3.27.3) ir iki žymės praskiedžiama citratiniu buferiniu tirpalu (3.24). Gerai išmaišoma.

Atliekama chromatografinė analizė (5.4).

Jei mėginio tirpalai nebus matuojami tą pačią dieną, jie turi būti laikomi esant žemesnei nei 5 °C temperatūrai.

5.4. *Chromatografija*

Prieš chromatografiją ekstraktas (5.2) ar hidrolizatas (5.3.4) palaikomas kambario temperatūroje. Mišinys suplakamas ir filtruojamas 0,2 μm poringumo membraniniu filtru (4.5). Panaudojant aminorūgščių analizatorių (4.9) atliekama gauto skaidraus tirpalo chromatografija.

Injekcija gali būti atliekama rankiniu būdu arba automatiškai. Svarbu, kad matuojant ir standartus, ir mėginius į kolonėlę būtų įvedamas toks pat tirpalo kiekis ± 0,5 %, išskyrus tuos atvejus, kai naudojamas vidinis standartas, ir kad natrio ir aminorūgščių kiekių santykis standarte ir mėginio tirpale būtų kiek įmanoma vienodesnis.

Paprastai kalibravimo dažnis priklauso nuo ninhidrino reagento stabilumo ir analizinės sistemos. Standartas ar mėginys skiedžiamas citratiniu buferiniu tirpalu (3.24), kad standarto smailės plotas sudarytų 30–200 % mėginio aminorūgšties smailės ploto.

Nelygu naudojamo analizatoriaus tipas ir dervos, aminorūgščių chromatografija šiek tiek skiriasi. Pasirinkta sistema turi atskirti vieną aminorūgštį nuo kitos ir nuo kitų ninhidrin-teigiamų junginių. Atliekant chromatografiją turėtų būti gauti duomenys apie į aminorūgščių, pridedamų į kolonėlę, kiekio pasikeitimus.

Kai matuojami ekvimoliniai tirpalai (nustatomų aminorūgščių), vykstant chromatografijai naudojamasi toliau minimu smailės pagrindo pločio ir aukščio santykiu. Šį ekvimolinį tirpalą turi sudaryti mažiausiai 30 % kiekvienos su mėginiu pridedamos aminorūgšties maksimalus kiekis, kurį galima tiksliai išmatuoti aminorūgščių analizavimo sistema (4.9).

Atskiriant treoniną ir seriną, mažesnės iš persidengiančių aminorūgščių smailės pagrindo pločio ir aukščio santykis chromatogramoje neturi viršyti 2:10 (jei matuojamas tik cisteinas (cistinas), metioninas, treoninas ir lizinas, nepakankamas atskyrimas nuo besišliejančios smailės turi nepalankią įtaką nustatymui). Visoms kitoms aminorūgštims atskyrimo santykis turi būti didesnis kaip 1:10.

Sistema turi garantuoti, kad lizinas būtų atskirtas nuo „lizino artifaktų“ ir ornitino.

6. **Rezultatų skaičiavimas**

Matuojamas mėginio ir standarto kiekvienos aminorūgšties smailės plotas ir skaičiuojamas kiekis gramais kilograme mėginio.

$$\text{Aminorūgštis g/kg mėginio} = \frac{\text{A x E x MW x F}}{\text{B x W x 1 000}}$$

Jei buvo naudotas vidinis standartas, dauginama iš $\frac{D}{C}$

A = hidrolizato ar ekstrakto smailės plotas

B = kalibracinio standartinio tirpalo smailės plotas

C = vidinio standarto hidrolizate ar ekstrakte smailės plotas

D = vidinio standarto kalibraciniame standartiniame tirpale smailės plotas

MW = matuojamos aminorūgšties santykinė molekulinė masė

E = standarto koncentracija µmol/ml

W = mėginio svoris (g) (pakoreguotas iki pradinio svorio, jei mėginys buvo džiovintas ar iš jo pašalinti riebalai)

F = bendras hidrolizato tūris ml (5.3.4) ar apskaičiuotas bendras praskiesto ekstrakto tūris (6.1) ml.

Oksiduotų mėginių hidrolizatuose cistinas ir cisteinas nustatomi kaip cistino rūgštis, bet apskaičiuojami kaip cistinas ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$ MW 240,30 naudojant MW 120,15 (0,5 x 240,30).

Oksiduotų mėginių hidrolizatuose metioninas nustatomas kaip metionino sulfonas, bet apskaičiuojamas kaip metioninas naudojant metionino MW: 149,21.

Laisvasis metioninas, kurio buvo įdėta, po ekstrakcijos nustatomas kaip metioninas, apskaičiavimui naudojant metionino MW.

6.1. Bendras praskiesto ekstrakto tūris (F) nustatant laisvąsias aminorūgštis (5.2) apskaičiuojamas taip:

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

V = gauto ekstrakto tūris.

7. **Metodo įvertinimas**

Šis metodas buvo patikrintas ir palygintas tarptautiniu lygiu 1990 metais panaudojant keturis skirtingus pašarus (maišytuosius kiaulių pašarus, kombinuotuosius pašarus broileriams, baltyminį koncentratą, premiksus). Matematinio vidurkio ir standartinio nuokrypio rezultatai, atmetus išskirtis, pateikiami toliau esančioje lentelėje:

Vidurkiai g/kg

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštys			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Maišytieji kiaulių pašarai	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Kombinuotieji pašarai broileriams	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Baltyminis koncentratas	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiksas	58,42 n = 16	–	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = dalyvaujančių laboratorijų skaičius.

7.1. *Pakartojamumas*

Vienoje laboratorijoje gautų duomenų standartinio nuokrypio pakartojamumas pateikiamas toliau esančiose lentelėse.

Laboratorijoje gautų duomenų standartinis nuokrypis (S_r) g/kg

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštys			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Maišytieji kiaulių pašarai	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Kombinuotieji pašarai broileriams	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Baltyminis koncentratas	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premiksas	1,30 n = 16	–	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = dalyvaujančių laboratorijų skaičius.

Laboratorijoje gautų duomenų standartinio nuokrypio (S_r) variacijos koeficientas (%)

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštys			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Maišytieji kiaulių pašarai	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Kombinuotieji pašarai broileriams	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Baltyminis koncentratas	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiksas	2,2 n = 16	–	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = dalyvaujančių laboratorijų skaičius.

7.2. *Atkuriamumas*

Tarplaboratorinio standartinio nuokrypio, gauto lyginant pirmiau pateiktus tarplaboratorinius rezultatus, pateikiami toliau esančiose lentelėse.

Tarplaboratorinių duomenų standartinis nuokrypis (S_r) g/kg

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštys			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Maišytieji kiaulių pašarai	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Kombinuotieji pašarai broileriams	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Baltyminis koncentratas	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premiksas	2,49 n = 16	–	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = dalyvaujančių laboratorijų skaičius.

Tarplaboratorinio standartinio nuokrypio (S_r) variacijos koeficientas (%)

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštys			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Maišytieji kiaulių pašarai	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Kombinuotieji pašarai broileriams	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Baltyminis koncentratas	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiksas	4,3 n = 16	–	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = dalyvaujančių laboratorijų skaičius.

8. **Pamatinių medžiagų naudojimas**

Teisingas šio metodo pritaikymas yra patvirtinamas atliekant pakartotinus sertifikuotųjų pamatinių medžiagų matavimus, kai šios medžiagos yra turimos. Rekomenduojama kalibruoti sertifikuotaisiais aminorūgščių kalibraciniais tirpalais.

9. **Pastabos**

9.1. Dėl aminorūgščių analizatorių skirtingumų standartinių aminorūgščių kalibracinių tirpalų (žr. 5.27.4 ir 5.27.5) ir hidrolizatų (žr. 5.3.4) galutinės koncentracijos turėtų būti ruošiamos pagal instrukcijas.

Prietaiso parodymų diapazonas turi būti tikrinamas visoms aminorūgštims.

Tam, kad smailės plotas būtų diapazono viduryje, standartinis tirpalas skiedžiamas citratiniu buferiniu tirpalu.

9.2. Jei hidrolizatų matavimui buvo naudota didelio slėgio skysčių chromatografijos įranga, eksperimentui palankiausios sąlygos turi būti sudaromos pagal gamintojo rekomendacijas.

9.3. Šiuo metodu tiriant pašarus, kuriuose yra daugiau kaip 1 % chloridų (koncentratai, mineraliniai pašarai, papildai), yra galimas nepakankamas metionino įvertinimas, todėl turi būti atliktas specialus apdorojimas.

B DALIS

ŽALIŲ ALIEJŲ IR RIEBALŲ NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šis metodas taikomas žalių aliejų ir riebalų kiekio nustatymui pašaruose. Metodas netaikomas aliejingosioms sėkloms ir aliejiniams vaisiams, nurodytiems 1966 m. rugsėjo 22 d. Tarybos reglamente (EEB) Nr. 136/66.

Nelygu pašarų prigimtis ir sudėtis, gali būti naudojamas vienas iš dviejų metodų.

1.1. *A metodas – Tiesiogiai ekstrahuojami žali aliejai ir riebalai*

Šis metodas taikomas augalinės kilmės pašarams, išskyrus pašarus, kurie patenka į B metodo taikymo sritį.

1.2. *B metodas – bendri žali aliejai ir riebalai*

Šis metodas taikomas gyvūninės kilmės pašarams ir visiems kombinuotiesiems pašarams. Jis turi būti naudojamas tiriant visas medžiagas (grūdų glitimą, mieles, bulvių baltymus ir supleišėjusius, iškaitintus bei ekstruzijos paveiktus produktus), iš kurių žali aliejai ir riebalai negali būti iki galo pašalinti ekstrakcijos būdu prieš tai neatlikus hidrolizės.

1.3. *Rezultatų vertinimas*

Visais atvejais, kai rezultatas, gautas taikant B metodą, yra didesnis už rezultatą, gautą taikant A metodą, teisingu yra laikomas rezultatas, gautas taikant B metodą.

2. **Metodų esmė**

2.1. *A metodas*

Mėginys ekstrahuojamas petroleteriu. Tirpiklis išgarinamas, o likutis išdžiovinamas ir pasveriamas.

2.2. *B metodas*

Mėginys veikiamas druskos rūgštimi kaitinant. Mišinys atšaldomas ir filtruojamas. Likutis išplaunamas, išdžiovinamas ir ekstrahuojamas A metodu.

3. **Reagentai**

3.1. Petroleteris: virimo temperatūra 40–60 °C, bromo kiekio turi būti mažiau kaip 1 mg/100ml, o jo likučio po išgarinimo mažiau kaip 2 mg/100ml.

3.2. Natrio sulfatas, bevandenis.

3.3. Druskos rūgšties tirpalas, c = 3 mol HCl/l.

3.4. Filtravimo priemonė, pvz.: diatomitas, *Hyflo-supercel*.

4. **Prietaisai**

4.1. Ekstrahavimo prietaisas. Jei ekstrahavimo prietaisas sujungtas su sifonu (Soksleto aparatas), tirpiklio tekėjimo greitis turi būti toks, kad įvyktų 10 ciklų per valandą; jei prietaisas be sifono, tirpiklio tekėjimo greitis turi būti apie 10 ml per minutę.

4.2. Ekstrahavimo kapsulės, kuriose nėra tirpių petroleteryje medžiagų ir kurių poringumas atitinka 4.1 punkto reikalavimus.

4.3. Džiovinimo spinta – vakuuminė spinta su nustatyta 75 ± 3 °C temperatūra arba džiovinimo spinta su oro cirkuliacija bei nustatyta 100 °C ± 3 °C temperatūra.

5. **Matavimas**

5.1. *A metodas (žr. 8.1)*

5 g mėginio, kuris pasveriamas miligramo tikslumu, perkeliamas į ekstrahavimo kapsulę (4.2) ir uždengiamas vatos, iš kurios pašalinti riebalai, kamšteliu.

Kapsulė patalpinama į ekstrahavimo prietaisą (4.1) ir ekstrahuojama 6 valandas petroleteriu (3.1). Petroleterio ekstraktas surenkamas į sausą, prieš tai pasvertą kolbą su pemzos gabaliukais ([1]).

Tirpiklis distiliuojamas. Likutis džiovinamas 1,5 val., kolbą laikant džiovinimo spintoje (4.3). Kolba atvėsinama eksikatoriuje ir pasveriama. Džiovinama dar 30 min., kad būtų įsitikinta, ar riebalų ir aliejų svoris išlieka pastovus (svorio skirtumas tarp dviejų gretimų svėrimų turi būti mažesnis nei 1 mg).

5.2. *B metodas*

2,5 g mėginio, kuris pasveriamas miligramo tikslumu (žr. 8.2), suberiamas į 400 ml menzūrą arba 300 ml kūginę kolbą ir užpilamas 100 ml druskos rūgšties (3.3), įmetami keli pemzos gabaliukai. Menzūra uždengiama laikrodžio stikleliu. Naudojant kūginę kolbą, ji sujungiama su grįžtamuoju kondensatoriumi. Mišinys atsargiai virinamas valandą virš nedidelės ugnies arba ant kaitinimo plytelės. Produktas neturi prilipti prie indo sienelių.

Tirpalas atvėsinamas ir pridedama pakankamai filtravimo priemonės (3.4), kad būtų išvengta riebalų nuostolių filtruojant. Filtruojama per sudrėkintą dvigubą filtravimo popierių, iš kurio pašalinti riebalai. Likutis plaunamas šaltu vandeniu, kol filtratas tampa neutralus. Patikrinama, ar filtrate nėra riebalų. Jų buvimas filtrate rodo, kad mėginys prieš hidrolizę turi būti ekstrahuojamas petroleteriu pagal A metodą.

Dvigubas filtravimo popierius su likučiu padedamas ant laikrodžio stiklelio ir džiovinamas 1,5 val. džiovinimo spintoje su oro cirkuliacija(4.3), esant 100 °C ± 3 °C temperatūrai.

Dvigubas filtravimo popierius su sausu likučiu patalpinamas ekstrahavimo kapsulėje (4.2), kuri užkemšama vatos, iš kurios pašalinti riebalai, kamšteliu. Kapsulė įdedama į ekstrahavimo prietaisą (4.1) ir toliau dirbama, kaip nurodyta 5.1 punkto antroje ir trečioje pastraipose.

([1]) Jei po to atliekama riebalų kokybinė analizė, pemzos gabaliukai pakeičiami stikliniais rutuliukais.

6. **Rezultatų išraiška**

Likučio svoris išreiškiamas procentais mėginyje.

7. **Pakartojamumas**

Rezultatų skirtumas tarp dviejų lygiagrečiųjų vieno mėginio rezultatų, atliekamų to paties tyrėjo, neturėtų būtų didesnis negu:

— 0,2 % absoliučios reikšmės, kai aliejų ir riebalų kiekis mėginyje yra mažesnis kaip 5 %,

— 4,0 % didesnio rezultato atžvilgiu, kai riebalų kiekis mėginyje sudaro 5–10 %,

— 0,4 % absoliučios reikšmės, kai riebalų kiekis mėginyje sudaro daugiau nei 10 %.

8. **Pastabos**

8.1. Produktus, turinčius didelį riebalų ir aliejų kiekį, sunku susmulkinti ir paimti jų vidutinį homogeninį mėginį, todėl dirbama, kaip nurodyta toliau.

Miligramo tikslumu pasveriama 20 g mėginio ir sumaišoma su 10 g ar daugiau bevandenio natrio sulfato (3.2). Ekstrahuojama petroleteriu (3.1), kaip nurodyta 5.1. Ekstraktas praskiedžiamas iki 500 ml su petroleteriu (3.1) ir sumaišoma. 50 ml tirpalo supilama į nedidelę sausą, prieš tai pasvertą kolbutę su pemzos gabalėliais ([1]). Tirpiklis nugarinamas, išdžiovinamas ir atliekama 5.1 punkto paskutinėje pastraipoje aprašyta procedūra.

Tirpiklis pašalinamas iš ekstrahavimo kapsulės, likutis susmulkinamas ne didesnėmis kaip 1 mm dydžio dalelėmis, grąžinamas į ekstrahavimo kapsulę (natrio sulfato nedėti) ir atliekamos 5.1 punkto antroje ir trečioje pastraipose nurodytos procedūros.

Riebalų ir aliejų kiekis apskaičiuojamas procentais mėginyje pagal tokią formulę:

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

čia

a = riebalų likučio svoris gramais po pirmojo ekstrahavimo (alikvotinė ekstrakto dalis),

b = riebalų likučio svoris gramais po antrojo ekstrahavimo.

8.2. Jei produkte yra nedaug riebalų, mėginio masė gali būti padidinta iki 5 g.

8.3. Naminių gyvūnėlių ėdalas, turintis daug vandens, prieš hidrolizę ir ekstrahavimą prireikus gali būti sumaišomas su bevandeniu natrio sulfatu, kaip ir taikant B metodą.

8.4. Atliekant 5.2 punkte aprašytas procedūras, nufiltruotas likutis veiksmingiau gali būti išplautas ne šaltu, o karštu vandeniu.

8.5. Kai kurių pašarų atveju prireikus laikomasi 1,5 val. riebalų likučio džiovinimo trukmės. Per ilgo džiovinimo vengiama, nes dėl to gali būti gauti sumažinti matavimo rezultatai. Džiovinimui gali būti naudojama mikrobangų krosnelė.

8.6. Išankstinis ekstrahavimas prieš hidrolizę A metodu ir pakartotinis ekstrahavimas B metodu rekomenduojamas tuo atveju, jei žalių aliejų ir riebalų kiekis yra didesnis kaip 15 % Ekstrahavimo trukmė priklauso ir nuo pašarų, ir nuo riebalų ar aliejaus, esančių pašaruose, kilmės.

C DALIS

OLAKVINDOKSO NUSTATYMAS

[N-(2-hidroksietil)-3-metil-2-kvinoksalinkarboksiamido 1,4-dioksido]

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas olakvindokso kiekis pašaruose. Mažiausia nustatymo riba yra 5 mg/kg.

2. **Metodo esmė**

Mėginys ekstrahuojamas vandens ir etanolio mišiniu. Olakvindokso kiekis nustatomas atvirkštinių fazių didelio slėgio skysčių chromatografija (HPLC), naudojant UV detektorių.

([1]) Jei po to atliekama riebalų kokybinė analizė, pemzos gabaliukai pakeičiami stikliniais rutuliukais.

3. **Reagentai**

3.1. Metanolis.

3.2. Metanolis, HPLC grynumo kategorijos.

3.3. Vanduo, HPLC grynumo kategorijos.

3.4. HPLC judančioji fazė:

vandens (3.3) ir metanolio (3.2) mišinys, 900 + 100 (V + V).

3.5. Pamatinė medžiaga: grynasis olakvindoksas (N-(2-hidroksietil)-3-metil-2-kvinoksalinkarboksiamido 1,4-dioksidas), E 851.

3.5.1. Olakvindokso pradinis standartinis tirpalas, 250 µg/ml.

Į 200 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg olakvindokso (3.5) ir pripilama apie 190 ml vandens. Po to kolba 20 minučių patalpinama į ultragarsinę vonelę (4.1). Po apdorojimo ultragarsu tirpalas atvėsinamas iki kambario temperatūros, iki žymės praskiedžiama vandeniu ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma šaldytuve. Šis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo kiekvieną mėnesį.

3.5.2. Olakvindokso tarpinis standartinis tirpalas, 25 µg/ml.

10,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.5.1) supilama į 100 ml matavimo kolbą, praskiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.4) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma šaldytuve. Šis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo kiekvieną dieną.

3.5.3. Kalibraciniai tirpalai:

Į 50 ml matavimo kolbutes įpilama 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml, 15,0 ml ir 20,0 ml tarpinio standartinio tirpalo (3.5.2). Praskiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.4) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija. Šiuose tirpaluose yra atitinkamai 0,5 µg/ml, 1,0, µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 7,5 µg/ml ir 10,0 µg/ml olakvindokso.

Šie tirpalai turi būti ruošiami iš naujo kiekvieną dieną.

4. **Prietaisai**

4.1. Ultragarsinė vonelė.

4.2. Mechaninė purtyklė.

4.3. Didelio slėgio skysčių chromatografijos įranga su kintamo bangos ilgio UV detektorium arba diodine matrica.

4.3.1. Skysčių chromatografinė kolonėlė 250 mm x 4 mm, C18, 10 µm ar panašios įkrovos

4.4. Membraniniai filtrai, 0,45 µm.

5. **Matavimas**

Pastaba: Olakvindoksas jautrus šviesai. Visus matavimus atlikite esant susilpnintai šviesai arba rudo stiklo induose.

5.1. *Bendrosios nuostatos*

5.1.1. Reikėtų tirti pašarą be priedų, kad būtų patikrinta, ar jame nėra nei olakvindokso, nei trukdančių medžiagų.

5.1.2. Atliekant grįžtamumo testą, į tuščiąjį (blank) pašarą turėtų būti pridėta maždaug tiek olakvindokso, kiek jo yra mėginyje. Tam, kad koncentracija būtų papildyta iki 50 mg/kg, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 10,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.5.1) ir tirpalas nugarinamas iki maždaug 0,5 ml. Pridedama 50 g tuščiojo (blank) pašaro, gerai sumaišoma, paliekama 10 min. ir prieš ekstrahavimą (5.2) dar keletą kartų pamaišoma.

Pastaba: šiuo tikslu naudojamas tuščiasis (blank) pašaras turi būti be olakvindokso ir to paties kaip mėginys tipo.

5.2. *Ekstrahavimas*

0,01 g tikslumu pasveriama maždaug 50 g mėginio. Supilama į 1000 ml kūginę kolbą, įpilama 100 ml metanolio (3.1). Kolba 5 minutėms patalpinama į ultragarsinę vonelę (4.1). Įpilama 410 ml vandens ir kolba 15 min. paliekama ultragarsinėje vonelėje. Kolba išimama iš ultragarsinės vonelės, 30 min. purtoma purtykle (4.2) ir filtruojama per gofruotą filtrą. 10,0 ml filtrato nupilama į 20 ml matavimo kolbutę, iki žymės praskiedžiama vandeniu ir sumaišoma. Mėginys filtruojamas per membraninį filtrą (4.4). (žr. 9. Pastabos). Atliekami HPLC matavimai (5.3).

5.3. *HPLC matavimas*

5.3.1. Parametrai:

Siūloma vadovautis šiomis sąlygomis, tačiau gali būti naudojamos kitos sąlygos, jei joms esant gaunami panašūs rezultatai.

Analizinė kolonėlė (4.3.1)

Judančioji fazė (3.4):	vandens (3.3) ir metanolio (3.2) mišinys, 900 + 100 (V + V)
Tekėjimo greitis:	1,5 ml/min – 2 ml/min.
Matavimo bangos ilgis:	380 nm
Injekcinis tūris:	20–100 µl

Chromatografinės sistemos stabilumas tikrinamas įleidžiant keletą kartų 2,5 µg/ml kalibracinio tirpalo (3.5.3), kol smailės aukščiai ir sulaikymo trukmė bus pastovūs.

5.3.2. Kalibracinė kreivė

Kiekvienos koncentracijos kiekvienas kalibracinis tirpalas (3.5.3) įleidžiamas keletą kartų ir išmatuojamas kiekvienos koncentracijos smailės aukščių (plotų) vidurkis. Nubraižoma kalibracinė kreivė, ant ordinačių ašies atidedant kalibracinių tirpalų smailių aukščių (plotų) vidurkius, ant abscisių – atitinkamų koncentracijų dydžius µg/ml.

5.3.3. Mėginio tirpalas

Keletą kartų įleidžiamas mėginio ekstraktas (5.2), tokio pat kaip ir kalibracinių tirpalų atveju tūrio, ir išmatuojamas olakvindokso smailių aukščių (plotų) vidurkis.

6. **Rezultatų skaičiavimas**

Pagal mėginio tirpalo olakvindokso smailių aukščių (plotų) vidurkį, remiantis kalibracine kreive (5.3.2), nustatoma mėginio tirpalo koncentracija mikromoliais mililitre.

Olakvindokso kiekis w miligramais kilograme mėginio skaičiuojamas pagal tokią formulę:

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

čia:

c = olakvindokso koncentracija mėginio ekstrakte (5.2) mikromoliais mililitre,

m = matavimui paimto mėginio dalies svoris gramais (5.2).

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1. *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas kochromatografija ar diodinės matricos metodu, kuriuo palyginami mėginio ekstrakto (5.2) ir 5,0 µg/ml kalibracinio tirpalo (3.5.3) spektrai.

7.1.1. Kochromatografija

Mėginio ekstraktas (5.2) papildomas, pridedant į jį atitinkamą kalibracinio tirpalo (3.5.3) kiekį. Pridedamas olakvindokso kiekis turėtų būti panašus į išmatuotą olakvindokso kiekį mėginio ekstrakte.

Atsižvelgiant tiek į pridėtą kiekį, tiek į ekstrakto praskiedimą, padidėti turėtų tik olakvindokso smailės aukštis. Smailės plotis pusėje jos aukščio turėtų sudaryti ± 10 % nepapildyto mėginio ekstrakto olakvindokso smailės pločio.

7.1.2. Diodinė matrica

Rezultatai vertinami remiantis tokiais kriterijais:

a) mėginio ir standarto spektrų absorbcijos maksimumo bangos ilgis, užregistruotas chromatogramos smailės viršūnėje, turi atitikti detekcinės sistemos skiriamosios gebos nustatytas ribas. Detekcijai diodine matrica tai yra ± 2 nm;

b) tarp 220 nm ir 400 nm užregistruoti mėginio ir standarto chromatogramų smailių viršūnių spektrai neturi skirtis santykinės absorbcijos riboms esant nuo 10 % iki 100 % Šis kriterijus taikomas ir tais atvejais, kai maksimalūs absorbcijos dydžiai yra tokie patys ir kai nėra nei vieno taško, kuriame nuokrypis tarp dviejų spektrų būtų didesnis nei 15 % standarto analitės absorbcijos;

c) tarp 220 ir 400 nm mėginio ekstrakto smailės pakilimo, viršūnės ir nusileidimo spektrai neturi skirtis vienas nuo kito, santykinio absorbavimo riboms esant nuo 10 % iki 100 % Šis kriterijus taikomas ir tais atvejais, kai maksimalūs absorbcijos dydžiai visuose stebimuose taškuose yra tokie patys ir kai nuokrypis tarp spektrų nėra didesnis nei 15 % smailės viršūnės spektro absorbcijos.

Jei nesilaikoma nors vieno iš šių kriterijų, analitės buvimas nėra patvirtintas.

7.2. *Pakartojamumas*

Rezultatų skirtumas tarp dviejų lygiagrečiųjų vieno mėginio matavimų rezultatų neturi būti didesnis kaip 15 % didesnio rezultato atžvilgiu, kai olakvindokso kiekis yra tarp 10 mg/kg ir 200 mg/kg.

7.3. *Išgava*

Tuščiojo (blank) mėginio atveju išgava turi būti bent jau 90 %.

8. **Tarplaboratorinių tyrimų rezultatai**

EB organizavo tarplaboratorinius tyrimus, kurių metu 13-oje laboratorijų buvo tiriami keturi kiaulių pašarų mėginiai, tarp jų ir tuščiasis (blank) pašaras. Rezultatai pateikiami toliau:

	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Vidurkis (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
Nominalus kiekis (mg/kg)	–	15	50	100
Išgava (%)	–	97,3	96,0	95,4

L : laboratorijų skaičius

n : vienetinių verčių skaičius

S_r : pakartojamumo standartinis nuokrypis

S_R : atkuriamumo standartinis nuokrypis

CV_r : pakartojamumo variacijos koeficientas

CV_R : atkuriamumo variacijos koeficientas.

9. **Pastaba**

Nors metodas nebuvo patvirtintas pašarams, kuriuose olakvindokso yra daugiau kaip 100 mg/kg, patenkinamus rezultatus galima gauti naudojant mažesnio svorio mėginį ir (arba) praskiedžiant ekstraktą (5.2) tam, kad būtų gauta koncentracija, atitinkanti kalibracinės kreivės ribas (5.3.2).