31998L0064

L 257/14 *EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS* 19.9.1998.

KOMISIJAS DIREKTĪVA 98/64/EK

(1998. gada 3. septembris)

par Kopienas analīžu metodēm aminoskābju, kopeļļu, koptauku un olahindoksa noteikšanai dzīvnieku barībā, un par Direktīvas 71/393/EEK grozījumiem

(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,

tā kā Direktīvā 70/373/EEK noteikts, ka dzīvnieku barības oficiālās pārbaudes, kas paredzētas tam, lai noteiktu, vai ir ievērotas prasības, kas izriet no normatīvajiem un administratīvajiem aktiem, kas reglamentē tās kvalitāti un sastāvu, veic, izmantojot Kopienas paraugu ņemšanas un analīžu metodes;

tā kā Padomes 1979. gada 2. aprīļa Direktīvā 79/373/EEK par barības maisījumu tirdzniecību ([2]), kurā jaunākie grozījumi veikti ar Komisijas Direktīvu 97/47/EK ([3]), un Padomes 1993. gada 13. septembra Direktīvā 93/74/EEK par īpašām uztura vajadzībām domātas barības tirdzniecību ([4]), kurā jaunākie grozījumi veikti ar Direktīvu 96/25/EK ([5]), paredzēts, ka aminoskābju, kopeļļu un koptauku saturs ir jānorāda dzīvnieku barības etiķetēs;

tā kā Padomes 1970. gada 23. novembra Direktīvā 70/524/EEK par barības piedevām ([6]), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas Regulu 98/19/EK ([7]), noteikts, ka olahindoksa saturs jānorāda etiķetē gadījumos, kad šo vielu pievieno kombinētajai dzīvnieku barībai;

tā kā otrajā Komisijas 1971. gada 18. novembra Direktīvā 71/393/EEK, ar ko ievieš Kopienas analīžu metodes dzīvnieku barības oficiālajai kontrolei ([8]), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 84/4/EEK ([9]), noteiktas analīžu metodes, *inter alia*, kopeļļu un koptauku satura noteikšanai; tā kā aprakstītā metode būtu jāpārveido;

tā kā jānosaka Kopienas analīžu metodes šo vielu kontrolei;

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

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstis nosaka, ka aminoskābju, kopeļļu, koptauku un olahindoksa satura analīzes dzīvnieku barības oficiālajai kontrolei veic saskaņā ar šīs direktīvas pielikumā aprakstītajām metodēm.

2. pants

Direktīvas 71/393/EEK pielikuma 4. punktu "Kopeļļu un koptauku noteikšana" aizstāj ar šīs direktīvas pielikuma B daļu.

3. pants

1. Dalībvalstīs stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai izpildītu šīs direktīvas prasības līdz 1998. gada 31. decembrim. Dalībvalstis par to nekavējoties informē Komisiju.

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

Kad dalībvalstis pieņem minētos pasākumus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu, vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālai publikācijai. Dalībvalstis nosaka procedūru, kas jāievēro, izdarot šādas atsauces.

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

2. Dalībvalstis dara zināmus Komisijai tos savu tiesību aktu svarīgākos noteikumus, ko tās pieņēmušas jomā, kuru reglamentē šī direktīva.

4. pants

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

5. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1998. gada 3. septembrī

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Franz FISCHLER

PIELIKUMS

A DAĻA

AMINOSKĀBJU NOTEIKŠANA

1. **Mērķis un piemērošanas joma**

Pēc šīs metodes ar aminoskābju analizatoru nosaka brīvo (sintētisko un dabīgo) un kopējo (ar peptīdsaiti saistīto un brīvo) aminoskābju saturu dzīvnieku barībā. Tā ir izmantojama šādu aminoskābju noteikšanai: cist(e)īns, metionīns, lizīns, treonīns, alanīns, arginīns, asparagīnskābe, glutamīnskābe, glicīns, histidīns, izoleicīns, leicīns, fenilalanīns, prolīns, serīns, tirozīns un valīns.

Pēc šīs metodes neatšķir aminoskābju sāļus un nediferencē aminoskābju D un L izomērus. Tā nav izmantojama triptofāna un aminoskābju hidroksilanalogu noteikšanai.

2. **Princips**

2.1. *Brīvās aminoskābes*

Brīvās aminoskābes ekstrahē ar atšķaidītu hlorūdeņražskābi. Tām līdzekstrahētos lielmolekulāros slāpekli saturošos savienojumus izgulsnē ar sulfosalicilskābi un atdala filtrējot. Filtrētā šķīduma vides reakciju koriģē līdz pH 2,20. Aminoskābes sadala ar jonu apmaiņas hromatogrāfiju un pēc reakcijas ar ninhidrīnu nosaka fotometriski pie 570 nm.

2.2. *Kopējās aminoskābes*

Procedūru izvēlas atkarībā no nosakāmajām aminoskābēm. Pirms hidrolīzes cist(e)īns un metionīns jāoksidē attiecīgi līdz cisteīnskābei un metionīna sulfonam. Tirozīns jānosaka neoksidētu paraugu hidrolizātos. Visas pārējās 1. punktā uzskaitītās aminoskābes var noteikt gan oksidētos, gan neoksidētos paraugos.

Oksidēšanu veic ar peroksiskudrskābes un fenola maisījumu 0 °C temperatūrā. Oksidēšanas reaģenta pārākumu sadala ar nātrija disulfītu. Oksidētos vai neoksidētos paraugus 23 stundas hidrolizē ar hlorūdeņražskābi (c = 6 mol/l). Hidrolizāta vides reakciju koriģē līdz pH 2,20. Aminoskābes sadala ar jonu apmaiņas hromatogrāfiju un pēc reakcijas ar ninhidrīnu nosaka fotometriski pie 570 nm (prolīnu – pie 440 nm).

3. **Reaģenti**

Bidestilēts ūdens vai tam līdzvērtīgas kvalitātes ūdens (vadītspēja < 10 µS).

3.1. Ūdeņraža peroksīds, w = 30 %.

3.2. Skudrskābe, w = 98 – 100 %.

3.3. Fenols.

3.4. Nātrija disulfīts.

3.5. Nātrija hidroksīds.

3.6. 5-sulfosalicilskābes dihidrāts.

3.7. Hlorūdeņražskābe, blīvums apm. 1,18 g/ml

3.8. Trinātrija citrāta dihidrāts.

3.9. 2, 2-tiodietanols (tiodiglikols).

3.10. Nātrija hlorīds.

3.11. Ninhidrīns.

3.12. Petrolēteris, viršanas temperatūra 40 – 60 °C.

3.13. Norleicīns vai cits izmantošanai par iekšējo standartu piemērots savienojums.

3.14. Gāzveida slāpeklis (< 10 ppm skābekļa).

3.15. 1-oktanols.

3.16. Aminoskābes.

3.16.1. Standartvielas 1. punktā uzskaitītajiem savienojumiem. Tīras vielas bez kristalizācijas ūdens. Pirms lietošanas 1 nedēļu žāvē vakuumā virs P_2O_5 vai H_2SO_4.

3.16.2. Cisteīnskābe.

3.16.3. Metionīna sulfons.

3.17. Nātrija hidroksīda šķīdums, c = 7,5 mol/l:

300 g NaOH (3.5.) izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.

3.18. Nātrija hidroksīda šķīdums, c = 1 mol/l:

40 g NaOH (3.5.) izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.

3.19. Skudrskābes un fenola šķīdums:

889 g skudrskābes (3.2.) sajauc ar 111 g ūdens un pievieno 4,73 g fenola (3.3.).

3.20. Maisījums hidrolīzei, c = 6 mol HCl/l, kas satur 1 g fenola/l:

492 ml HCl (3.7.) pievieno 1 g fenola (3.3.) un papildina ar ūdeni līdz 1 litram.

3.21. Ekstrakcijas maisījums, c = 0,1 mol HCl/l, kas satur 2 % tiodiglikola:

8,2 ml HCl (3.7.) izšķīdina apmēram 900 ml ūdens, pievieno 20 ml tiodiglikola (3.9.) un papildina ar ūdeni līdz 1 litram (3.7. nedrīkst tieši sajaukt ar 3.9).

3.22. 5-sulfosalicilskābe, ß = 6 %:

60 g 5-sulfosalicilskābes (3.6.) izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.

3.23. Oksidēšanas maisījums (peroksiskudrskābes-fenola maisījums):

0,5 ml ūdeņraža peroksīda (3.1.) nelielā vārglāzē sajauc ar 4,5 ml skudrskābes-fenola šķīduma (3.19.). Peroksiskudrskābe veidojas, maisījumu izturot 1 stundu 20 – 30 °C temperatūrā, ko pirms pievienošanas paraugam 15 minūtes atdzesē ledusvannā.

Uzmanību:
novērst iespējas maisījumam tieši saskarties ar ādu un valkāt aizsargapģērbu!

3.24. Citrāta buferšķīdums, c = 0,2 mol Na^+/l, pH = 2,20:

apmēram 800 ml ūdens izšķīdina 19,61 g nātrija citrāta (3.8.), 5 ml tiodiglikola (3.9.), 1 g fenola (3.3.) un 16,50 ml HCl (3.7.). Noregulē pH līdz 2,20. Atšķaida ar ūdeni līdz 1 litram.

3.25. Eluācijas buferšķīdumi, pagatavoti atkarībā no izmantojamā analizatora ekspluatācijas noteikumiem (4.9.).

3.26. Ninhidrīna reaģents, pagatavots atkarībā no izmantojamā analizatora ekspluatācijas noteikumiem (4.9.).

3.27. Aminoskābju standartšķīdumi. Šie šķīdumi jāglabā temperatūrā zem 5 °C.

3.27.1. Aminoskābju (3.16.1.) rezerves standartšķīdums hlorūdeņražskābē, c = 2,5 µmol/ml katras aminoskābes. Var lietot gatavus nopērkamus šķīdumus.

3.27.2. Cisteīnskābes un metionīna sulfona rezerves standartšķīdums, c = 1,25 µmol/ml.

1 litra tilpuma mērkolbā citrāta buferšķīdumā (3.24.) izšķīdina 0,2115 g cisteīnskābes (3.16.2.) un 0,2265 g metionīna sulfona (3.16.3.) un atšķaida līdz zīmei ar citrāta buferšķīdumu. Glabā ne ilgāk par 12 mēnešiem temperatūrā zem 5 °C. Šo šķīdumu nelieto, ja cisteīnskābi un metionīna sulfonu satur rezerves standartšķīdums (3.27.1.).

3.27.3. Iekšējā standarta, piemēram, norleicīna rezerves standartšķīdums, c = 20 µmol/ml.

Mērkolbā citrāta buferšķīdumā (3.24.) izšķīdina 0,6560 g norleicīna (3.13.) un līdz 250 ml tilpumam atšķaida ar citrāta buferšķīdumu. Glabā ne ilgāk par 6 mēnešiem temperatūrā zem 5 °C.

3.27.4. Lietošanai kopā ar hidrolizātiem izmantojamais kalibrēšanas šķīdums, kas satur c = 5 nmol/50 µl cisteīnskābes un metionīna sulfona, un 10 nmol/50 µl visu pārējo aminoskābju.

100 ml tilpuma vārglāzē 30 ml citrāta buferšķīduma (3.24.) izšķīdina 2,2 g nātrija hlorīda (3.10). Pievieno 4,00 ml aminoskābju rezerves standartšķīduma (3.27.1.), 4,00 ml cisteīnskābes un metionīna sulfona (3.27.2.), un 0,50 ml iekšējā standarta standartšķīduma (3.27.3.) gadījumos, kad to izmanto. Noregulē pH līdz 2,20 ar nātrija hidroksīdu (3.18.).

Kvantitatīvi pārnes 50 ml tilpuma mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar citrāta buferšķīdumu (3.24.) un sajauc.

Glabā ne ilgāk par 3 mēnešiem temperatūrā zem 5 °C.

Sk. arī 9.1. piezīmi.

3.27.5. Standarta aminoskābju kalibrēšanas šķīdums lietošanai kopā ar hidrolizātiem, kas sagatavots saskaņā ar 5.3.3.1. punktu, un lietošanai kopā ar ekstraktiem (5.2.). Kalibrēšanas šķīdumu pagatavo saskaņā ar 3.27.4 punktu, nepievienojot nātrija hlorīdu.

Glabā ne ilgāk par 3 mēnešiem temperatūrā zem 5 °C.

4. **Iekārta**

4.1. 100 ml vai 250 ml tilpuma apaļkolba ar atteces dzesinātāju.

4.2. 100 ml borsilikāta stikla pudele ar aizskrūvējamu aizbāzni, kuram ir kaučuka/teflona oderējums (piemēram, Durana, Šota), lietošanai termostatā.

4.3. Termostats ar pastiprinātu ventilāciju un regulējamu temperatūru ar precizitāti, kas ir augstāka par ± 2 °C.

4.4. pH-metrs (ar mērīšanas precizitāti trīs cipari aiz komata).

4.5. Membrānas filtrs (0,2 μm).

4.6. Centrifūga.

4.7. Rotācijas vakuumietvaicētājs.

4.8. Mehāniskais kratītājs vai magnētiskais maisītājs.

4.9. Aminoskābju analizators vai augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfs (*HPLC*) ar jonu apmaiņas kolonnu, ierīci ninhidrīnam, pēckolonnas derivatizāciju un fotometrisko detektoru.

Kolonnas pildījumam izmanto sulfonētus polistirola sveķus, uz kuriem var sadalīt aminsoskābes un atdalīt vielas, kas reaģē ar ninhidrīnu. Šķidrumu pārvietošanos buferšķīduma un ninhidrīna līnijās nodrošina ar sūkņiem, kas nodrošina plūsmas stabilitāti ± 0,5 % visā standarta kalibrēšanas un parauga analīzes laikā.

Dažos aminoskābju analizatoros var tikt izmantotas hidrolīzes procedūras, kurās nātrija koncentrācija hidrolizātā ir c = 0,8 mol/l, un hidrolizātā pēc oksidēšanas ir palikusi skudrskābe. Daļā analizatoru nenotiek pietiekama aminoskābju atdalīšanās, ja hidrolizātā ir skudrskābes pārākums un/vai nātrija joni paaugstinātās koncentrācijās. Šādos gadījumos samazina skābes daudzumu, pēc hidrolīzes un pirms pH korekcijas ietvaicējot līdz apm. 5 ml tilpumam. Ietvaicēšana jāveic vakuumā temperatūrā, kas nepārsniedz 40 °C.

5. **Procedūra**

5.1. *Parauga sagatavošana*

Paraugu samaļ, lai tas izietu caur 0,5 mm sietu. Paraugus ar augstu mitruma saturu pirms malšanas žāvē gaisā temperatūrā, kas nepārsniedz 50 °C, vai liofilizē. Paraugus ar augstu tauku saturu pirms malšanas ekstrahē ar petrolēteri (3.12.).

5.2. Brīvo aminoskābju satura noteikšana lopbarībā un premiksos

Koniskā kolbā ar precizitāti līdz 0,2 mg ņem sagatavotā parauga (5.1.) piemērota lieluma iesvaru (1– 5 g) un pievieno 100,0 ml ekstrakcijas maisījuma (3.21.). Maisījumu 60 minūtes krata vai maisa, izmantojot mehānisko kratītāju vai magnētisko maisītāju (4.8.). Maisījumu nostādina un 10,0 ml dzidrā šķīduma ar pipeti pārnes 100 ml tilpuma vārglāzē.

Maisot pievieno 5,0 ml sulfosalicilskābes šķīduma (3.22.), un ar magnētisko maisītāju maisa vēl 5 minūtes. Nogulšņu pilnīgai atdalīšanai maisījuma virsējo slāni filtrē vai centrifugē. Iegūtā šķīduma 10,0 ml pārnes 100 ml tilpuma vārglāzē un ar nātrija hidroksīda šķīdumu (3.18.) koriģē pH līdz 2,20, pēc tam ar citrāta buferšķīdumu (3.24.) pārnes piemērota tilpuma mērkolbā, un uzpilda līdz zīmei ar buferšķīdumu (3.24.).

Gadījumos, kad izmanto iekšējo standartu, uz katriem 100 ml galīgā šķīduma pievieno pa 1,00 ml iekšējā standarta (3.27.3.) un uzpilda līdz zīmei ar buferšķīdumu (3.24.).

Turpina hromatogrāfiju saskaņā ar 5.4. punktu.

Ja ekstraktus neanalizē pagatavošanas dienā, tie jāglabā temperatūrā zem 5 °C.

5.3. *Kopējā aminoskābju satura noteikšana*

5.3.1. Oksidēšana

Ar precizitāti līdz 0,2 mg iesver 0,1 līdz 1 g sagatavotā parauga (5.1.):

— 100 ml tilpuma apaļkolbā (4.1.), ja veic hidrolīzi vaļējā traukā (5.3.2.3.),

— 250 ml tilpuma apaļkolbā (4.1.), ja vajadzīga pazemināta nātrija koncentrācija (5.3.3.1.), vai

— 100 ml tilpuma pudelē ar uzskrūvējamu aizbāzni (4.2.), ja veic hidrolīzi slēgtā traukā (5.3.2.4.).

Parauga iesvarā jābūt apmēram 10 mg slāpekļa, bet mitruma daudzums nedrīkst pārsniegt 100 mg.

Kolbu (vai pudeli) ievieto ledusvannā, kur to atdzesē līdz 0 °C, pievieno 5 ml oksidēšanas maisījuma (3.23.) samaisa, lietojot stikla lāpstiņu ar liektu galu. Kolbu (vai pudeli), kurā ir lāpstiņa, hermētiski noslēdz ar necaurlaidīgu plēvi, ledusvannu ar noslēgto trauku uz 16 stundām ievieto ledusskapī 0 °C temperatūrā. Pēc 16 stundām izņem no ledusskapja, un oksidēšanas reaģenta pārākumu sadala, pievienojot 0,84 g nātrija disulfīta (3.4.).

Turpina saskaņā ar 5.3.2.1. punktu.

5.3.2. Hidrolīze

5.3.2.1. Oksidēto paraugu hidrolīze

Oksidētajam paraugam, kas sagatavots saskaņā ar 5.3.1. punktu, pievieno 25 ml hidrolīzes maisījuma (3.20.) raugoties, lai šķīdumā tiktu ieskalotas parauga daļas, kas pielipušas trauka sienām un lāpstiņai. Atkarībā no izmantotās hidrolīzes procedūras, analīzi turpina saskaņā ar 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktu.

5.3.2.2. Neoksidētu paraugu hidrolīze

Ar precizitāti līdz 0,2 mg ņem 0,1 līdz 1 g sagatavotā parauga (5.1.) iesvara 100 ml vai 250 ml tilpuma apaļkolbā (4.1.) vai 100 ml pudelē ar aizskrūvējamu aizbāzni (4.2.). Iesvarā ir jābūt apmēram 10 mg slāpekļa. Uzmanīgi pievieno 25 ml hidrolīzes maisījuma (3.20.) un sajauc ar paraugu. Analīzi turpina saskaņā ar 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktu.

5.3.2.3. Hidrolīze vaļējā traukā

Maisījumam kolbā (kas sagatavots saskaņā ar 5.3.2.1. vai 5.3.2.2. punktu) pievieno 3 stikla lodītes un 23 stundas vienmērīgi vāra ar atteces dzesinātāju. Hidrolīzes beigās dzesinātāju izskalo ar 5 ml citrāta buferšķīduma (3.24.). Kolbai noņem dzesinātāju un to atdzesē ledusvannā. Analīzi turpina saskaņā ar 5.3.3. punktu.

5.3.2.4. Hidrolīze slēgtā traukā

Pudeli ar maisījumu, kas sagatavots saskaņā ar 5.3.2.1. vai 5.3.2.2. punktu, ievieto termostatā (4.3.) 110 °C temperatūrā. Pirmās stundas laikā, lai neveidotos paaugstināts spiediens (veidojoties gāzveida vielām) un novērstu eksploziju, aizbāzni uzliek traukam. Trauku ar aizbāzni nenoslēdz. Pēc vienas stundas aizbāzni aizskrūvē un tur termostatā (4.3.) 23 stundas. Hidrolīzi beidzot, pudeli no termostata izņem, uzmanīgi atskrūvē aizbāzni un pudeli ievieto ledusvannā. Atdzesē.

Atkarībā no izmantojamās pH korekcijas procedūras (5.3.3.) ar citrāta buferšķīdumu (3.24.) kvantitatīvi pārnes pudeles saturu 250 ml vārglāzē vai 250 ml apaļkolbā.

Analīzi turpina saskaņā ar 5.3.3. punktu.

5.3.3. pH korekcija

Atkarībā no aminoskābju analizatoram (4.9.) pieļaujamā nātrija satura pH koriģē saskaņā ar 5.3.3.1. vai 5.3.3.2. punktu.

5.3.3.1. Hromatogrāfijas sistēmām, kurām nepieciešama nātrija zema koncentrācija

Ieteicams izmantot iekšējo rezerves standartšķīdumu (3.27.3.) gadījumos, kad izmanto aminoskābju analizatorus, kuriem vajadzīga nātrija zema koncentrācija (kad jāsamazina skābes tilpums).

Šādā gadījumā pirms ietvaicēšanas hidrolizātam pievieno 2,00 ml iekšējā rezerves standartšķīduma (3.27.3.).

Hidrolizātam, kas iegūts saskaņā ar 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktu, pievieno 2 pilienus 1-oktanola (3.15.).

Ar rotācijas ietvaicētāju (4.7.) vakuumā 40 °C temperatūrā tilpumu samazina līdz 5 – 10 ml. Ja tilpums pēc ietvaicēšanas ir mazāks par 5 ml, hidrolizāts jāizlej un analīze jāatkārto.

Ar nātrija hidroksīda šķīdumu (3.18.) koriģē pH līdz 2,20 un analīzi turpina saskaņā ar 5.3.4. punktu.

5.3.3.2. Visiem pārējiem aminoskābju analizatoriem (4.9.)

Saskaņā ar 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktu iegūtos hidrolizātus daļēji neitralizē, maisot pievienojot 17 ml nātrija hidroksīda šķīduma (3.17.), raugoties, lai temperatūra nepārsniegtu 40 °C.

Istabas temperatūrā vispirms ar nātrija hidroksīda šķīdumu (3.17.), bet pēc tam ar nātrija hidroksīda šķīdumu (3.18.) koriģē pH līdz 2,20. Turpina saskaņā ar 5.3.4. punktu.

5.3.4. Parauga šķīdums hromatogrāfijai

Ar citrāta buferšķīdumu (3.24.) hidrolizātu, kuram koriģēts pH (5.3.3.1. vai 5.3.3.2.), kvantitatīvi pārnes 200 ml tilpuma mērkolbā, un ar citrāta buferšķīdumu uzpilda līdz zīmei.

Gadījumos, kad nav izmantots iekšējais standarts, pievieno 2,00 ml iekšējā standarta (3.27.3.) un uzpilda līdz zīmei ar citrāta buferšķīdumu (3.24.). Rūpīgi sajauc.

Veic *HPLC* hromatogrāfiju (5.4.).

Ja ekstraktus neanalizē pagatavošanas dienā, tie jāglabā temperatūrā zem 5 °C.

5.4. *Hromatogrāfija*

Pirms hromatografēšanas ekstraktu (5.2.) vai hidrolizātu (5.3.4.) sasilda līdz istabas temperatūrai. Maisījumu sakrata un pietiekamu daudzumu filtrē caur 0,2 µm membrānas filtru (4.5.). Iegūtajam dzidrajam šķīdumam izdara jonu apmaiņas hromatogrāfiju, izmantojot aminoskābju analizatoru (4.9.).

Injekciju var veikt rokas režīmā vai automātiski. Svarīgi, lai kolonnā tiktu ievadīts vienāds analizējamā šķīduma un standartšķīdumu daudzums ± 0,5 %, izņemot gadījumus, kad izmanto iekšējo standartu, un lai nātrija/aminoskābju attiecība standaršķīdumos un paraugu šķīdumos būtu iespējami līdzīgas.

Parasti kalibrēšanas biežums ir atkarīgs no ninhidrīna reaģenta un analītiskās sistēmas stabilitātes. Standartšķīdumu vai parauga šķīdumu atšķaida ar citrāta buferšķīdumu (3.24.) tā, lai standarta signāla laukums būtu 30 – 200 % no parauga aminoskābes signāla laukuma.

Aminoskābju hromatogrāfija atkarībā no izmantojamā analizatora tipa un sveķu veida var būt nedaudz atšķirīga. Ar izvēlēto sistēmu jābūt iespējām sadalīt aminsoskābes un atdalīt vielas, kas reaģē ar ninhidrīnu. Darbības laikā hromatogrāfiskai sistēmai būtu jādod lineārs atbildes signāls atkarībā no izmaiņām kolonnā ievadītajos aminoskābju daudzumos.

Hromatogrāfijas laikā, analizējot (nosakāmo aminoskābju) ekvimolāru šķīdumu, jāievēro turpmāk norādītās signāla minimuma/maksimuma augstuma attiecības. Šim ekvimolārajam šķīdumam jāsatur vismaz 30 % no katras aminoskābes maksimālā daudzuma, kuru var precīzi noteikt ar aminoskābju analizatora sistēmu (4.9).

Treonīna-serīna atdalīšanai signāla minimuma/maksimuma augstuma attiecība zemākajai no divām aminoskābēm, kuras hromatogrammā pārklājas, nevar būt lielāka par 2:10; (ja nosaka tikai cist(e)īnu, metionīnu, treonīnu un lizīnu, nepietiekama blakusesošo signālu atdalīšanās negatīvi ietekmē noteikšanas rezultātus). Visām pārējām aminoskābēm atdalīšanai jābūt labākai par 1:10.

Sistēmai jānodrošina, lai lizīns tiktu atdalīts no "lizīna artefaktiem" un ornitīna.

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Mēra katras aminoskābes signāla laukumu analizējamā parauga un standarta hromatogrammās, un aprēķina attiecīgās aminoskābes saturu g, kas ir parauga vienā kilogramā.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{g aminoskābes uz kg parauga}$$

Ja lieto iekšējo standartu, reizina ar: $\frac{D}{C}$

A = signāla laukums hidrolizāta vai ekstrakta hromatogrammā;

B = maksimuma laukums kalibrēšanas standartšķīduma hromatogrammā;

C = signāla laukums, iekšējais standarts hidrolizātā vai ekstraktā;

D = signāla laukums, iekšējais standarts, kalibrēšanas standartšķīdums;

MW = nosakāmās aminoskābes molekulmasa;

E = standarta koncentrācija µmol/ml;

W = parauga masa g (koriģēta atbilstoši sākotnējai masai, ja paraugs ir žāvēts vai attaukots);

F = ml kopējā hidrolizāta (5.3.4.) vai ml atšķaidītā ekstrakta kopējā tilpuma (6.1.).

Cistīnu un cisteīnu nosaka kā cisteīnskābi, kas rodas oksidētu paraugu hidrolizātos, bet aprēķina kā cistīnu ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MW 240,30), izmantojot MW 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Metionīnu nosaka kā metionīna sulfonu oksidētu paraugu hidrolizātos, bet aprēķina kā metionīnu, izmantojot metionīna molekulmasu MW: 149,21.

Pievienoto brīvo metionīnu nosaka pēc ekstrakcijas kā metionīnu, aprēķiniem izmantojot to pašu molekulmasu.

6.1. Ekstraktu kopējo atšķaidījuma tilpumu (F) brīvo aminoskābju satura (5.2) noteikšanai aprēķina šādi:

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

V = galīgā ekstrakta tilpums

7. **Metodes novērtējums**

Metode pārbaudīta 1990. gadā laboratoriju starptautiskajā salīdzinošajā testēšanā, izmantojot četrus dažādus dzīvnieku barības veidus (jauktu cūku barību, kombinēto barību broileriem, proteīna koncentrātu un premiksu). Rezultāti pēc izkritušo rezultātu izslēgšanas, to vidējās vērtības un standartnovirzes norādītas tabulā:

Vidējās vērtības, g/kg

Standartparaugs	Aminoskābes			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Jaukta cūku barība	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Kombinētā barība broileriem	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteīnu koncentrāts	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premikss	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = laboratoriju skaits

7.1. *Atkārtojamība*

Atkārtojamība, kas izteikta kā "vienas laboratorijas rezultātu standartnovirze" no iepriekšminētajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā iegūtajiem datiem parādīta turpmāk tabulās.

Vienas laboratorijas rezultātu standartnovirze (S_r), g/kg

Standartparaugs	Aminoskābes			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Jaukta cūku barība	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Kombinētā barība broileriem	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Proteīnu koncentrāts	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premikss	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = laboratoriju skaits

Vienas laboratorijas rezultātu standartnovirzes (S_r), variācijas koeficients (%)

Standartparaugs	Aminoskābes			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Jaukta cūku barība	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Kombinētā barība broileriem	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteīnu koncentrāts	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premikss	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = laboratoriju skaits

7.2. *Sakritība*

Dažādu laboratoriju rezultātu standartnovirze no iepriekšminētajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā iegūtajiem datiem parādīta turpmāk tabulās.

Dažādu laboratoriju rezultātu standartnovirze (S_R), g/kg

Standartparaugs	Aminoskābes			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Jaukta cūku barība	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Kombinētā barība broileriem	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Proteīnu koncentrāts	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premikss	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = laboratoriju skaits

Dažādu laboratoriju rezultātu standartnovirzes (S_R), variācijas koeficients (%)

Standartparaugs	Aminoskābes			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Jaukta cūku barība	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Kombinētā barība broileriem	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteīnu koncentrāts	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premikss	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = laboratoriju skaits

8. **Standartvielu un standartmateriālu lietošana**

Metodes izmantošanas pareizību pārbauda, ja iespējams, vairākos atkārtojumos, analizējot sertificētus standartmateriālus. Kalibrēšanai ieteicams izmantot sertificētus aminoskābju kalibrēšanas šķīdumus.

9. **Piezīmes**

9.1. Aminoskābju analizatoru atšķirību dēļ galīgās koncentrācijas standarta aminoskābju kalibrēšanas šķīdumiem (sk. 3.27.4. un 3.27.5.) un hidrolizātam (sk. 5.3.4.) ir tikai orientējošas.

Visām nosakāmajām aminoskābēm jāpārbauda arī aparatūras signāla linearitātes intervāls.

Standartšķīdumu ar citrāta buferšķīdumu atšķaida tā, lai iegūtu signālu maksimumu laukumus linearitātes intervāla vidusdaļā.

9.2. Ja hidrolizātu analīzei izmanto augstas efektivitātes šķidruma hromatogrāfus, noteikšanas apstākļus optimizē, ievērojot ražotāju rekomendācijas.

9.3. Pēc šīs metodes analizējot dzīvnieku barību, kas satur vairāk par 1 % hlorīdu (barības koncentrātus, minerālbarību, papildbarību), var iegūt pazeminātus rezultātus attiecībā uz metionīnu, un tāpēc tā jāanalizē īpaši.

B DAĻA

KOPEĻĻU UN KOPTAUKU NOTEIKŠANA

1. **Mērķis un piemērošanas joma**

Šī metode ir paredzēta kopeļļu un koptauku noteikšanai dzīvnieku barībā. Tā neattiecas uz Padomes 1966. gada 22. septembra Regulā 136/66/EEK minēto eļļasaugu sēklu un eļļu saturošu augļu analīzēm.

Kādu no turpmāk aprakstītajām divām procedūrām izvēlas atkarībā no barības īpašībām un sastāva, kā arī nolūka, kādam veic analīzi.

1.1. *A procedūra – tieši ekstrahējamas kopeļļas un koptauki*

Šī metode izmantojama augu valsts izcelsmes barības analīzēm, izņemot tos barības veidus, kas iekļauti B procedūras izmantošanas jomā.

1.2. *B procedūra – kopējais kopeļļu un koptauku saturs*

Šī metode izmantojama dzīvnieku valsts izcelsmes barības vielu analīzēm un visu veidu kombinētās barības analīzēm. Tā jāizmanto visiem materiāliem, no kuriem eļļas un taukus bez iepriekšējas hidrolīzes pilnīgi ekstrahēt nevar (piemēram, glutēniem, rauga, kartupeļu proteīniem un produktiem, kas pārstrādāti ar ekstrūzijas paņēmienu, pārslojot vai karsējot).

1.3. *Rezultātu interpretācija*

Visos gadījumos, kad pēc B procedūras iegūst augstāku rezultātu nekā pēc A procedūras, par patieso vērtību uzskata pēc B procedūras iegūto rezultātu.

2. **Princips**

2.1. *A procedūra*

Paraugu ekstrahē ar petrolēteri. Pēc šķīdinātāja atdestilēšanas atlikumu izžāvē un nosver.

2.2. *B procedūra*

Paraugu, apstrādā ar siltu hlorūdeņražskābi. Maisījumu atdzesē un filtrē. Atlikumu skalo, žāvē un veic noteikšanu pēc A procedūras.

3. **Reaģenti**

3.1. Petrolēteris, viršanas temperatūra: 40 līdz 60 °C. Tā broma skaitlim jābūt mazākam par 1 un negaistošajam atlikumam mazākam par 2 mg/100 ml.

3.2. Bezūdens nātrija sulfāts.

3.3. Sālsskābe, c = 3 mol/l

3.4. Filtrēšanas materiāls, piemēram, kīzelgūrs vai *Hyflo-supercel*.

4. **Iekārta**

4.1. Ekstrakcijas aparāti. Ekstraktoros ar sifonu (Soksleta aparāts) atteces ātrumam būtu jānodrošina aptuveni 10 ekstrakcijas cikli stundā; ekstraktoros bez sifona vēlamais atteces ātrums ir apmēram 10 ml minūtē.

4.2. Ekstrakcijas kapsulas, kas attīrītas no petrolēterī šķīstošām vielām un kuru porozitāte atbilst 4.1. punktā noteiktajām prasībām.

4.3. Uz darba temperatūru 75 °C ± 3 °C ieregulēts vakuumžāvēšanas skapis vai uz 100 °C ± 3 °C ieregulēts parastais žāvēšanas skapis.

5. **Procedūra**

5.1. *A procedūra (sk. 8.1. punktu)*

Ar precizitāti līdz 1 mg iesver 5 g parauga, ko pārnes ekstrakcijas kapsulā (4.2.) un pārklāj ar attaukotas kokvilnas vates tamponu.

Kapsulu ievieto ekstraktorā (4.1.) un sešas stundas veic ekstrakciju ar petrolēteri (3.1.). Petrolētera ekstraktu savāc sausā, nosvērtā kolbā, kurā ievietoti pumeka gabaliņi ([1]).

Atdestilē šķīdinātāju. Neiztvaikojušo atlikumu izžāvē, kolbu uz pusotru stundu ievietojot žāvēšanas skapī (4.3.). Kolbu atdzesē eksikatorā un nosver. Atkārtoti žāvē 30 minūtes, līdz eļļu un tauku masa nemainās (divos secīgi veiktos svērumos masas zudumam jābūt mazākam par 1 mg.).

5.2. *B procedūra*

Ar precizitāti līdz 1 mg (sk. 8.2. punktu) iesver 2,5 g parauga, ko ievieto 400 ml tilpuma vārglāzē vai 300 ml tilpuma koniskajā kolbā, pievieno 100 mililitrus sālsskābes (3.3.) un pumeka gabaliņus. Vārglāzi nosedz ar pulksteņstiklu vai koniskajai kolbai pievieno atteces dzesinātāju. Maisījumu uzkarsē līdz viršanas temperatūrai un vienu stundu lēni vāra uz nelielas gāzes degļa liesmas vai elektriskās plītiņas. Neļauj produktam pielipt pie trauka sienām.

Atdzesē un pievieno tādu daudzumu filtrēšanas materiāla (3.4.), kas ir pietiekams, lai novērstu eļļu un tauku zudumus filtrēšanas laikā. Filtrē caur samitrinātu, attaukotu, dubultu filtrpapīru. Atlikumu mazgā aukstā ūdenī līdz filtrāta neitrālai reakcijai. Pārbauda, vai filtrātā nav eļļu vai tauku. Ja filtrātā ir taukvielas, paraugs pirms hidrolīzes jāekstrаģē ar petrolēteri pēc A procedūras.

Dubulto filtrpapīru ar atlikumu pēc filtrēšanas novieto uz pulksteņstikla un pusotru stundu žāvē 100 °C ± 3 °C temperatūrā žāvēšanas skapī (4.3.).

Divkārtīgo filtrpapīru ar izžāvēto atlikumu pēc filtrēšanas ievieto ekstrakcijas kapsulā (4.2.) un pārklāj ar attaukotas vates tamponu. Kapsulu ievieto ekstraktorā (4.1.) un rīkojas, kā noteikts 5.1. punkta otrajā un trešajā daļā.

([1]) Ja eļļai vai taukiem jāizdara turpmākas kvalitātes pārbaudes, pumeka gabaliņu vietā lieto stikla lodītes.

6. **Rezultātu izteikšana**

Atlikuma masu izsaka procentos no parauga masas.

7. **Atkārtojamība**

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

— 0,2 % pēc absolūtā lieluma, ja taukvielu saturs ir mazāks par 5 %,

— 4 % no lielākā rezultāta skaitliskās vērtības, ja taukvielu saturs ir no 5 līdz 10 %,

— 0,4 % pēc absolūtā lieluma, ja taukvielu saturs ir lielāks par 10 %.

8. **Piezīmes**

8.1. Produktiem ar augstu eļļas un tauku saturu, kas ir grūti sasmalcināmi vai no kā nevar sagatavot viendabīgu samazinātu testa paraugu, to nosaka šādi.

Ar precizitāti līdz 1 mg iesver 20 g parauga un to sajauc ar 10 g vai vairāk bezūdens nātrija sulfāta (3.2.). Ekstraģē ar petrolēteri (3.1.), kā noteikts 5.1. punktā. Iegūto ekstraktu atšķaida līdz 500 ml tilpumam ar petrolēteri (3.1.) un homogenizē. Ņem 50 ml šķīduma, ko pārnes nelielā, sausā, nosvērtā kolbā, kurā ir pumeka gabaliņi ([1]). Atdestilē šķīdinātāju, izžāvē un rīkojas, kā noteikts 5.1. punkta pēdējā daļā.

Izdala šķīdinātāju no kapsulā palikušajiem ekstrakcijas atlikumiem, ko sasmalcina līdz 1 mm un pēc tam ievieto atpakaļ ekstrakcijas uzgalī (nepievieno nātrija sulfātu), un rīkojas, kā noteikts 5.1. punkta otrajā un trešajā daļā.

Eļļu un tauku saturu procentos no parauga masas aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur

a = ekstrakcijas atlikuma masa gramos pēc pirmās ekstrakcijas (ekstrakta alikvota daļa),

b = atlikuma masa gramos pēc otrās ekstrakcijas.

8.2. Produktiem ar zemu eļļu un tauku saturu analizējamo paraugu var palielināt līdz 5 g.

8.3. Barība lolojumdzīvniekiem ar paaugstinātu ūdens saturu, tāpat kā pēc B procedūras, pirms hidrolīzes un ekstrakcijas var būt jāsajauc ar bezūdens nātrija sulfātu.

8.4. Efektīvāk 5.2. punktā atlikumu pēc filtrēšanas var būt mazgāt nevis ar aukstu, bet karstu ūdeni.

8.5. Dažiem barības veidiem var būt vajadzīgs 1,5 stundu ilgs žāvēšanas laiks. Nedrīkst pārkaltēt, jo tādējādi var iegūt pazeminātus rezultātus. Žāvēšanai var izmantot arī mikroviļņu krāsni.

8.6. Iepriekšēju ekstrakciju pirms hidrolīzes pēc A procedūras un atkārtotu ekstrakciju pēc B procedūras ieteicams veikt gadījumos, kad kopeļļu vai koptauku saturs ir lielāks par 15 %. Daļēji tas atkarīgs arī no barības īpašībām, kā arī barības sastāvā esošo taukvielu īpašībām.

C DAĻA

OLAHINDOKSA KVANTITATĪVA NOTEIKŠANA

(2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilhinoksalīn-N^1, N^4-dioksīds)

1. **Mērķis un piemērošanas joma**

Šī metode ir paredzēta olahindoksa noteikšanai dzīvnieku barībā. Zemākā noteikšanas robeža ir 5 mg/kg.

2. **Princips**

Paraugu ekstrahē ar metanola un ūdens maisījumu. Olahindoksa saturu nosaka apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrumu hromatogrāfijā (*HPLC*), lietojot UV detektoru.

([1]) Ja eļļai vai taukiem jāizdara turpmākas kvalitātes pārbaudes, pumeka gabaliņu vietā lieto stikla lodītes.

3. **Reaģenti**

3.1. Metanols.

3.2. *HPLC* kvalitātes metanols.

3.3. *HPLC* kvalitātes ūdens

3.4. Kustīgā fāze *HPLC*

Ūdens (3.3.) un metanola (3.2.) maisījums, piemēram, 900 + 100 (V + V).

3.5. Standartviela: tīrs olahindokss 2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilhinoksalīn-N^1, N^4-dioksīds, E 851.

3.5.1. Olahindoksa rezerves standartšķīdums, 250 µg/ml

Ar precizitāti līdz 0,1 mg 200 ml tilpuma mērkolbā iesver 50 mg olahindoksa (3.5.) un pievieno apm. 190 ml ūdens. Pēc tam kolbu uz 20 minūtēm ievieto ultraskaņas vannā (4.1.). Pēc iedarbības ar ultraskaņu šķīdumu atdzesē līdz istabas temperatūrai, kolbu uzpilda līdz zīmei ar ūdeni un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā un glabā ledusskapī. Šis šķīdums jāgatavo no jauna katru mēnesi.

3.5.2. Olahindoksa standartšķīdums, 25 µg/ml

10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.5.1.) iepilda 100 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.4.) un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā un glabā ledusskapī. Šis šķīdums jāgatavo no jauna katru dienu.

3.5.3. Kalibrēšanas šķīdumi

50 ml tilpuma mērkolbās iepilda attiecīgi 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 un 20,0 ml standartšķīduma (3.5.2.). Uzpilda līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.4) un sajauc. Kolbu ietin alumīnija folijā. Šādi pagatavoti šķīdumi atbilst attiecīgi 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 un 10,0 µg olahindoksa uz ml.

Šis šķīdums jāgatavo no jauna katru dienu.

4. **Iekārta**

4.1. Ultraskaņas vanna.

4.2. Mehāniskais kratītājs.

4.3. *HPLC* iekārta, kurai ir ultravioletais detektors ar maināmu viļņu garumu, vai diodu matricas detektors.

4.3.1. Šķidruma hromatogrāfijas kolonna, 250 mm × 4 mm, C18, 10 µm pakojums vai līdzvērtīgs.

4.4. Membrānfiltri, 0,45 µm.

5. **Procedūra**

Piezīme: olahindokss ir gaismasjutīgs. Visas operācijas jāveic izkliedētā gaismā vai jālieto dzeltena stikla trauki.

5.1. *Vispārēji norādījumi*

5.1.1. Lai konstatētu, ka nav olahindoksa vai noteikšanu traucējošo vielu, jāveic barības tukšā parauga analīze.

5.1.2. Izmantojot barības tukšo kontrolparaugu, jāpārbauda atgūstamība, to pastiprinot ar tādu olahindoksa daudzumu, kas ir līdzīgs paraugā esošajam daudzumam. Lai paraugu pastiprinātu līdz 50 mg/kg, koniskā 250 ml koniskajā kolbā pārnes 10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.5.1.), un to ietvaicē līdz apmēram 0,5 ml tilpumam. Pievieno 50 g barības tukšā parauga, rūpīgi sajauc un pirms ekstrakcijas posma (5.2.) atstāj uz 10 minūtēm, vairākas reizes sajaucot.

Piezīme: lietojot šo metodi, barības tukšajam paraugam pēc veida vajadzētu būt līdzīgam analizējamajam paraugam, un tukšā parauga analīzē nekonstatē olahindoksu.

5.2. *Ekstrakcija*

Ar precizitāti līdz 0,01 g nosver apmēram 50 g lielu paraugu. Pārnes 1 000 ml tilpuma koniskajā kolbā, pievieno 100 ml metanola (3.1.) un kolbu uz 5 minūtēm ievieto ultraskaņas vannā (4.1.). Pievieno 410 ml ūdens un vēl uz 15 minūtēm ievieto ultraskaņas vannā. Kolbu izņem no ultraskaņas vannas un 30 minūtes krata, izmantojot kratītāju (4.2.), un filtrē caur kroku filtru. Pārnes 10,0 ml filtrāta 20 ml tilpuma mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar ūdeni un samaisa. Alikvotu daļu filtrē caur membrānfiltru (4.4.). (sk. 9. piezīmi). Veic *HPLC* šķidrumu hromatogrāfiju (5.3.).

5.3. *HPLC noteikšana*

5.3.1. Parametri

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

Analītiskā kolonna (4.3.1.)

Kustīgā fāze (3.4.):	ūdens (3.3.) un metanola (3.2.) maisījums, 900 + 100 (V + V)
Plūsmas ātrums:	1,5 – 2 ml/min.
Viļņa garums noteikšanai:	380 nm
Ievadītais tilpums:	20 µl – 100 µl

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes ievadot kalibrēšanas šķīdumu (3.5.3.), kas satur 2,5 µg/ml, līdz iegūst nemainīgu signālu maksimumu augstumu un izdalīšanas laiku.

5.3.2. Kalibrēšanas līkne

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.5.3.) ievada vairākas reizes un nosaka katrai koncentrācijai atbilstošo vidējo signāla maksimuma augstumu (vai laukumu). Konstruē kalibrēšanas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu signālu maksimumu vidējos augstumus (vai laukumus), un uz abscisu ass attiecīgās koncentrācijas µg/ml.

5.3.3. Parauga šķīdums

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

6. **Rezultātu aprēķināšana**

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

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

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

kur

c = olahindoksa koncentrācija µg/ml parauga ekstraktā (5.2.),

m = analizējamā parauga masa gramos (5.2.).

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 (3.5.3.) spektru, kas satur 5,0 µg/ml olahindoksa.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā analīze

Parauga ekstraktu (5.2.) pastiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.5.3.). Pievienotā olahindoksa daudzumam jābūt aptuveni vienādam ar parauga ekstraktā noteikto olahindoksa saturu.

Ņemot vērā pievienoto daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu, var palielināties tikai olahindoksa signāla maksimuma augstums. Signāla maksimuma pusaugstuma platumam jābūt ± 10 % no sākotnēji nepastiprināta parauga ekstrakta olahindoksa signāla maksimuma pusaugstuma platuma.

7.1.2. Noteikšana ar diodu matricas detektoru

Rezultātus vērtē pēc šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas un standartspektra viļņa garums, ko reģistrē signāla maksimuma smailē hromatogrammā, nevar pārsniegt detektora sistēmas izšķirtspējas noteikto robežu. Diodu matricas detektoram šī robeža parasti ir ± 2 nm;

b) starp 220 un 400 nm parauga un standarta spektri, kas reģistrēti hromatogrammas signāla maksimuma smailē, 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 220 līdz 400 nm parauga ekstrakta signāla maksimuma 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 signāla maksimuma smailes spektra absorbcijas.

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

7.2. *Atkārtojamība*

Ja olahindoksa saturs paraugā ir no 10 līdz 200 mg/kg, divu atkārtojumu rezultātu atšķirības nedrīkst pārsniegt 15 % no lielākā rezultāta vērtības.

7.3. *Atgūstamība*

Pastiprināta kontrolparauga atgūstamībai jābūt vismaz 90 %.

8. **Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti**

EK rīkotajā starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas programmā 13 laboratorijas analizēja četrus sivēnu barības paraugus, no kuriem viens bija barības tukšais paraugs. Analīžu rezultāti ir šādi:

	1. paraugs	2. paraugs	3. paraugs	4. paraugs
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
vidējā vērtība (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
Nominālais saturs (mg/kg)	—	15	50	100
Atgūstamība (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : laboratoriju skaits

n: : atsevišķu vērtību skaits

S_r : atkārtojamības standartnovirze

S_R : sakritības standartnovirze

CV_r : atkārtojamības variāciju koeficients

CV_R : sakritības variāciju koeficients

9. **Piezīmes**

Lai gan metode nav validēta tādas dzīvnieku barības analīzēm, kas satur vairāk par 100 mg/kg olahindoksa, apmierinošus analīzes rezultātus iespējams iegūt, ņemot mazāku parauga iesvaru un/vai atšķaidot ekstraktu (5.2.) tā, lai tā koncentrācija būtu kvantitatīvās noteikšanas intervālā, kuram konstruēta kalibrēšanas līkne (5.3.2.).