Šis tekstas yra skirtas tik informacijai ir teisinės galios neturi. Europos Sąjungos institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį. Autentiškos atitinkamų teisės aktų, įskaitant jų preambules, versijos skelbiamos Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje ir pateikiamos svetainėje „EUR-Lex“. Oficialūs tekstai tiesiogiai prieinami naudojantis šiame dokumente pateikiamomis nuorodomis

►B

KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 152/2009

2009 m. sausio 27 d.

nustatantis oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos ėminių ėmimo ir analizės metodus

(Tekstas svarbus EEE)

(OL L 54, 2009 2 26, p. 1)

iš dalies keičiamas:

		Oficialusis leidinys		
		Nr.	puslapis	data
►M1	2012 m. kovo 28 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 278/2012	L 91	8	2012 3 29
►M2	2013 m. sausio 16 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 51/2013	L 20	33	2013 1 23
►M3	2013 m. liepos 19 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 691/2013	L 197	1	2013 7 20
►M4	2014 m. birželio 20 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 709/2014	L 188	1	2014 6 27
►M5	2017 m. balandžio 5 d. Komisijos reglamentas (ES) 2017/645	L 92	35	2017 4 6
►M6	2017 m. gegužės 3 d. Komisijos reglamentas (ES) 2017/771	L 115	22	2017 5 4

▼B

KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 152/2009

2009 m. sausio 27 d.

nustatantis oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos ėminių ėmimo ir analizės metodus

(Tekstas svarbus EEE)

▼M3

1 straipsnis

Ėminių ėmimas oficialiai pašarų kontrolei, visų pirma susijusiai su sudedamųjų dalių, įskaitant medžiagą, kurios sudėtyje yra genetiškai modifikuotų organizmų (toliau – GMO) arba kuri yra iš jų sudaryta arba iš jų pagaminta, pašarų priedų, kaip apibrėžta Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 1831/2003 ([1]), nepageidaujamų medžiagų, kaip apibrėžta Europos Parlamento ir Tarybos direktyvoje 2002/32/EB ([2]), nustatymu, atliekamas laikantis I priede nurodytų metodų.

I priede nurodytas ėminių ėmimo metodas taikomas pašarų kontrolei, susijusiai su pesticidų likučių nustatymu, kaip apibrėžta 2005 m. vasario 23 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 396/2005 ([3]), ir atitikties kontrolei pagal Reglamentą (ES) Nr. 619/2011.

▼B

2 straipsnis

Ėminiai analizei ruošiami ir rezultatų išraiška pateikiama pagal II priede aprašytus metodus.

3 straipsnis

Oficialiai pašarų kontrolei skirta analizė atliekama, taikant metodus, aprašytus III priede (Analizės metodai, taikomi pašarinių medžiagų ir kombinuotųjų pašarų sudėčiai kontroliuoti), IV priede (Analizės metodai leidžiamų pašarų priedų koncentracijai kontroliuoti), V priede (Analizės metodai nepageidaujamoms medžiagoms pašaruose kontroliuoti) ir VI priede (Analizės metodai gyvūninės kilmės sudedamosioms dalims nustatyti atliekant oficialiąją pašarų kontrolę).

4 straipsnis

Paukščių kombinuotųjų pašarų energinė vertė apskaičiuojama pagal VII priedą.

5 straipsnis

VIII priede aprašyti analizės metodai, skirti daugiau neleidžiamų naudoti pašarų priedų neteisėtam buvimui kontroliuoti, taikomi patvirtinimo tikslais.

([1]) OL L 268, 2003 10 18, p. 29.
([2]) OL L 140, 2002 5 30, p. 10.
([3]) OL L 70, 2005 3 16, p. 1.

▼B

6 straipsnis

Direktyvos 71/250/EEB, 71/393/EEB, 72/199/EEB, 73/46/EEB, 76/371/EEB, 76/372/EEB, 78/633/EEB, 81/715/EEB, 84/425/EEB, 86/174/EEB, 93/70/EEB, 93/117/EB, 98/64/EB, 1999/27/EB, 1999/76/EB, 2000/45/EB, 2002/70/EB ir 2003/126/EB panaikinamos.

Nuorodos į panaikintas direktyvas laikomos nuorodomis į šį reglamentą ir aiškinamos pagal IX priede pateiktas atitikčių lenteles.

7 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja dvidešimtą dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Jis taikomas nuo 2009 m. rugpjūčio 26 d.

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

▼M3

I PRIEDAS

ĖMINIŲ ĖMIMO METODAI

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Ėminiai, skirti oficialiai pašarų kontrolei, imami pagal toliau aprašytus metodus. Taip gauti ėminiai laikomi reprezentatyviosiomis atrinktosiomis dalimis.

Reprezentatyviojo ėminių ėmimo tikslas yra gauti mažą dalį iš partijos tokiu būdu, kad nustatytos šiai daliai būdingos savybės rodytų visos partijos vidutines savybes. Partijos ėminiai sudaromi pakartotinai imant atskiruosius ėminius skirtingose partijos vietose. Atskirieji ėminiai sudedami ir sumaišomi, kad sudarytų jungtinį ėminį, iš kurio dalijant į visumos savybes rodančias dalis paruošiami reprezentatyvieji galutiniai ėminiai.

Jei atliekant regimąjį patikrinimą nustatoma, kad pašarų partijų, iš kurių turi būti paimti mėginiai, kokybė skiriasi nuo kitų tos pačios partijos pašarų, tokios partijos atskiriamos nuo likusių pašarų ir traktuojamos kaip atskira partijos dalies dalis. Jei pašarų neįmanoma padalyti į atskiras partijos dalis, pašarai laikomi viena partija. Tokiais atvejais šis faktas paminimas ėminių ėmimo ataskaitoje.

Jei nustatoma, kad pašarai, iš kurių ėminiai paimti laikantis šio reglamento nuostatų, neatitinka ES reikalavimų, yra tos pačios klasės arba to paties aprašymo pašarų partijos dalis, daroma prielaida, kad tas pat būdinga visiems tos partijos pašarams, išskyrus atvejus, kai išsamiai įvertinus nerasta įrodymų, kad likusi partijos dalis neatitinka ES reikalavimų.

2. APIBRĖŽTYS

— Partija – nustatytas pašarų kiekis, kuriam būdingos vienodos savybės, pavyzdžiui, kilmė, rūšis, pakuotės tipas, pakuotojas, siuntėjas arba ženklinimas, o gamybos proceso atveju – vienos gamybos įmonės produkcijos vienetas, pagamintas naudojant vienodus gamybos parametrus, arba keletas tokių vienetų, pagamintų vienas po kito ir laikomų kartu.

— Atrinktoji dalis (Reglamente 152/2009 – partija) – partija arba nustatyta partijos dalis, arba partijos dalies dalis.

— Užplombuotas ėminys – ėminys, užplombuotas taip, kad prie jo nebūtų galima prieiti nepažeidus arba nenuėmus plombos.

— Atskirasis ėminys – kiekis, paimtas iš vienos atrinktosios dalies vietos.

— Jungtinis ėminys – atskirųjų ėminių, paimtų iš vienos atrinktosios dalies, visuma.

— Sumažintasis ėminys – jungtinio ėminio dalis, atspindinti jo visumą, gauta reprezentatyviosios redukcijos metodu.

— Galutinis ėminys – sumažintojo arba homogenizuoto jungtinio ėminio dalis.

— Laboratorinis ėminys – laboratorijai skirtas ėminys (kaip gauta laboratorijos), kuris gali būti galutinis, sumažintasis arba jungtinis ėminys.

▼M3

3. BENDROSIOS NUOSTATOS

— Ėminius imantys pareigūnai: ėminius ima pareigūnai, kuriuos tam įgalioja kompetentinga institucija.

— Ėminys turi būti užplombuotas taip, kad jo negalima būtų atidaryti nepažeidus arba nenuėmus plombos. Plombos žymuo turi būti aiškus ir gerai matomas. Ėminys taip pat gali būti dedamas į talpyklą ar konteinerį, kuris uždaromas taip, kad jo negalima atidaryti nepataisomai nepažeidus talpyklos arba konteinerio, taip išvengiant talpyklos ar konteinerio panaudojimo antrą kartą.

— Ėminio identifikavimas: ėminys turi būti pažymėtas nenuplaunamomis priemonėmis ir privalo būti identifikuojamas tokiu būdu, kad jį būtų galima vienareikšmiai susieti su ėminių ėmimo ataskaita.

— Iš kiekvieno jungtinio ėminio imama bent po du galutinius ėminius: bent vienas ėminys kontrolei atlikti (vykdymo užtikrinimo tikslais) ir bent vienas ėminys – pašarų ūkio subjektui (teisių gynimo tikslais). Galiausiai, vienas galutinis ėminys gali būti laikomas kontroliniu ėminiu. Jei visas jungtinis ėminys yra homogenizuotas, galutiniai ėminiai imami iš homogenizuoto jungtinio ėminio, išskyrus atvejus, kai tokia procedūra prieštarauja valstybių narių taisyklėms dėl pašarų ūkio subjekto teisių.

4. APARATAS

4.1. Ėminių ėmimo aparatas turi būti pagamintas iš medžiagų, negalinčių užteršti produktų, iš kurių imami ėminiai. Daugkartinio naudojimo aparatas turi būti lengvai valomas, kad būtų išvengiama bet kokio užteršimo.

4.2. **Aparatas, rekomenduojamas kietųjų pašarų ėminiams imti**

4.2.1. *Ėminių ėmimas rankiniu būdu*

4.2.1.1. Plokščiadugnė bertuvė vertikaliais kraštais.

4.2.1.2. Ėminių ėmimo zondas su ilgu plyšiu arba pertvaromis. Zondo matmenys turi atitikti atrinktosios dalies ypatybes (konteinerio gylį, maišo matmenis ir pan.) ir pašarų dalelių dydį.

Jei ėminių ėmimo zondas turi keletą angų, siekiant užtikrinti, kad ėminiai būtų imami iš skirtingų vietų išilgai zondo, tarpai tarp angų turėtų būti vienodi arba angos turėtų būti atskirtos pertvaromis.

4.2.2. *Ėminių ėmimas mechaniniu būdu*

Judančių pašarų ėminiams imti gali būti naudojamas tinkamas mechaninis aparatas. Tinkamas reiškia, kad ėminiai imami mažiausiai iš visos srauto sekcijos.

Judančių pašarų (greito srauto) ėminiams imti gali būti naudojami automatiniai ėmikliai.

4.2.3. *Dalytuvas*

Jei įmanoma ir taikoma, aparatas, skirtas padalyti ėminį į maždaug vienodo dydžio dalis, turėtų būti naudojamas sumažintiesiems ėminiams ruošti reprezentatyviuoju būdu.

▼M3

5. KIEKYBINIAI REIKALAVIMAI DĖL ATSKIRŲJŲ ĖMINIŲ SKAIČIAUS

— Kiekybiniai 5.1 ir 5.2 punktų reikalavimai dėl atskirųjų ėminių skaičiaus taikomi atrinktosioms dalims, kurios yra ne didesnės kaip 500 tonų ir iš kurių galima paimti ėminius, atspindinčius jų visumą. Aprašyta ėmimo procedūra taip pat taikoma kiekiams, didesniems nei nurodytas didžiausias atrinktosios dalies dydis, jei neatsižvelgiama į toliau pateiktose lentelėse nurodytą didžiausią atskirųjų ėminių skaičių, atskirųjų ėminių skaičius nustatomas pagal procedūros atitinkamoje dalyje (žr. 5.3 punktą) pateiktą kvadratinės šaknies formulę, o mažiausias jungtinio ėminio dydis proporcingai padidinamas. Tai nereiškia, kad didelės partijos dėl to negalima padalyti į mažesnes partijos dalis ir imti ėminių iš partijos kiekvienos dalies laikantis 5.1 ir 5.2 punktuose aprašytos procedūros.

— Atrinktoji dalis turi būti tokia, kad iš jos būtų galima paimti kiekvienos jos sudedamosios dalies ėminį.

— Jei partijos arba partijų dalys yra labai didelės (> 500 tonų) ir jei partijos gabenamos arba laikomos taip, kad ėminių negalima imti pagal šio skyriaus 5.1 ir 5.2 punktuose nurodytą ėmimo procedūrą, taikoma 5.3 punkte nurodyta ėmimo procedūra.

— Jei pašarų ūkio subjektui teisės aktais nustatytas reikalavimas šio reglamento laikytis pagal privalomos stebėsenos sistemą, pašarų ūkio subjektas, siekdamas atsižvelgti į eksploatavimo savybes, nuo šiame skyriuje nustatytų kiekybinių reikalavimų gali nukrypti tik kompetentingai institucijai įtikinamai įrodęs, kad ėminių ėmimo procedūra lygiavertė reprezentatyvumo atžvilgiu, ir tik gavęs kompetentingos institucijos leidimą.

— Išimtiniais atvejais, jeigu nustatyto ėminių ėmimo metodo neįmanoma taikyti kiekybinių reikalavimų atžvilgiu dėl nepriimtinos komercinės žalos partijai (dėl įpakavimo būdų, gabenimo priemonių, laikymo būdo ir t. t.), galima taikyti kitokį ėminių ėmimo metodą, jei jis yra kuo reprezentatyvesnis ir yra išsamiai aprašytas bei patvirtintas dokumentais.

5.1. **Kiekybiniai atskirųjų ėminių reikalavimai kontroliuojant pašaruose vienodai pasiskirsčiusias medžiagas arba produktus**

5.1.1. *Piltiniai kietieji pašarai*

Atrinktosios dalies dydis	Mažiausias atskirųjų ėminių skaičius
≤ 2,5 tonos	7
> 2,5 tonos	kvadratinė šaknis iš 20 kartų atrinktąją dalį sudarančių tonų skaičiaus (*), bet ne daugiau kaip 40 atskirųjų ėminių

(*) Jei gautas skaičius yra trupmena, ji turėtų būti suapvalinama iki didesnio sveiko skaičiaus.

▼M3

5.1.2. *Piltiniai skystieji pašarai*

Atrinktosios dalies dydis	Mažiausias atskirųjų ėminių skaičius
≤ 2,5 tonos arba ≤ 2 500 litrų	4 (*)
> 2,5 tonos arba > 2 500 litrų	7 (*)

(*) Jei neįmanoma padaryti, kad skystis būtų homogeninis, reikia padidinti atskirųjų ėminių skaičių.

5.1.3. *Supakuoti pašarai*

Pašarai (kietieji ir skystieji) gali būti supilti į maišelius, maišus, dėžes, statines ir kt., nurodytus lentelėje kaip pakavimo vienetai. Iš didelių vienetų (≥ 500 kg arba litrų) ėminiai turi būti imami laikantis piltiniams pašarams nustatytų nuostatų (žr. 5.1.1 ir 5.1.2 punktus).

Atrinktosios dalies dydis	Mažiausias skaičius vienetų, iš kurių reikia paimti (mažiausiai) vieną atskirąjį ėminį (*)
1–20 vienetų	1 vienetas (**)
21–150 vienetų	3 vienetai (**)
151–400 vienetų	5 vienetai (**)
> 400 vienetų	¼ atrinktąją dalį sudarančių vienetų skaičiaus kvadratinės šaknies (***), bet ne daugiau kaip 40 vienetų

(*) Jei atidarius vienetą galima padaryti poveikį analizei (pvz., greitai gendantys drėgni pašarai), atskirasis ėminys yra neatidarytas vienetas.
(**) Vienetų, kurių turinio masė yra ne didesnė kaip 1 kg arba vienas litras, atskirasis ėminys yra pradinio vieneto turinys.
(***) Jei gautas skaičius yra trupmena, ji turėtų būti suapvalinama iki didesnio sveiko skaičiaus.

5.1.4. *Pašarų briketai ir mineralų laižalai*

Mažiausiai vienas briketas arba laižalas, iš kurio imamas ėminys, 25 vienetų atrinktajai daliai, bet ne daugiau kaip keturi briketai arba laižalai.

Jei briketai arba laižalai sveria ne daugiau kaip po 1 kg, atskirasis ėminys yra vieno briketo arba vieno laižalo turinys.

5.1.5. *Stambieji pašarai/pašariniai augalai*

Atrinktosios dalies dydis	Mažiausias atskirųjų ėminių skaičius (*)
≤ 5 tonos	5
> 5 tonos	kvadratinė šaknis iš 5 kartus atrinktąją dalį sudarančių tonų skaičiaus (**), bet ne daugiau kaip 40 atskirųjų ėminių

(*) Pripažįstama, kad tam tikrais atvejais (pvz., jei tai yra silosas) neįmanoma paimti reikalingų atskirųjų ėminių nepadarant nepriimtinos žalos partijai. Tokiais atvejais galima taikyti alternatyvų ėminių ėmimo metodą, o ėminių iš tokių partijų ėmimo gairės bus parengtos iki pradedant taikyti šį reglamentą.
(**) Jei gautas skaičius yra trupmena, ji turėtų būti suapvalinama iki didesnio sveiko skaičiaus.

▼M3

5.2. **Kiekybiniai atskirųjų ėminių reikalavimai kontroliuojant pašaruose tikėtinai nevienodai pasiskirsčiusias sudedamąsias dalis ar medžiagas**

Šie kiekybiniai atskirųjų ėminių reikalavimai taikytini tokiomis aplinkybėmis:

— kontroliuojant aflatoksinus, rugių skalsę, kitus mikotoksinus ir kenksmingas botanines priemaišas pašarinėse žaliavose;

— kontroliuojant kryžminę taršą sudedamąja dalimi, įskaitant genetiškai modifikuotą medžiagą arba medžiagą, kuri, manoma, nevienodai pasiskirsčiusi pašarinėse žaliavose.

Jei kompetentinga kontrolės institucija pagrįstai įtaria, kad toks nevienodas pasiskirstymas taip pat galimas kryžminės taršos sudedamąja dalimi arba kombinuotųjų pašarų medžiaga atveju, gali būti taikomi lentelėje toliau nurodyti kiekybiniai reikalavimai.

Atrinktosios dalies dydis	Mažiausias atskirųjų ėminių skaičius
< 80 tonų	Žr. kiekybinius reikalavimus pagal 5.1 punktą. *Imtinų atskirųjų ėminių skaičių reikia padauginti iš 2,5.*
≥ 80 tonų	100

5.3. **Labai didelėms partijoms taikomi kiekybiniai atskirųjų ėminių reikalavimai**

Jei atrinktosios dalys yra didelės (> 500 tonų), imtinų atskirųjų ėminių skaičius = 40 atskirųjų ėminių + tonų skaičiaus kvadratinė šaknis, kai atliekama vienodai pašaruose pasiskirsčiusių medžiagų arba produktų kontrolė, arba 100 atskirųjų ėminių + tonų skaičiaus kvadratinė šaknis, kai atliekama greičiausiai nevienodai pasiskirsčiusių sudedamųjų dalių ar medžiagų kontrolė.

6. KIEKYBINIAI JUNGTINIO ĖMINIO REIKALAVIMAI

Reikia paruošti vieną jungtinį vienos atrinktosios dalies ėminį.

	Pašarų pobūdis	Mažiausias jungtinio ėminio kiekis (*) (**)
6.1.	Piltiniai pašarai	4 kg
6.2.	Supakuoti pašarai:	4 kg (***)

▼M3

Reikia paruošti vieną jungtinį vienos atrinktosios dalies ėminį.

	Pašarų pobūdis	Mažiausias jungtinio ėminio kiekis (*) (**)
6.3.	Skystieji arba pusiau skysti pašarai:	4 litrai
6.4.	Pašarų briketai arba laižalai:	
6.4.1.	kiekvieno masė didesnė kaip 1 kg	4 kg
6.4.2.	kiekvieno masė ne didesnė kaip 1 kg	keturių pirminių briketų arba laižalų masė
6.5.	Stambieji pašarai / pašariniai augalai	4 kg (****)

(*) Jei pašarų ėminio vertė yra didelė, galima imti mažesnį jungtinio ėminio kiekį, jei tai yra aprašyta ir pagrįsta dokumentais ėminių ėmimo ataskaitoje.

(**) Pagal 2011 m. birželio 24 d. Komisijos reglamento (ES) 619/2011, kuriuo nustatomi oficialios kontrolės, kuria siekiama nustatyti, ar pašaruose nėra genetiškai modifikuotų medžiagų, dėl kurių atliekama leidimo suteikimo procedūra arba kurių leidimas baigė galioti, ėminių ėmimo ir analizės metodai (OL L 166, 2011 6 25, p. 9) nuostatas, jungtinio ėminio, skirto patikrinti, ar pašaruose nėra genetiškai modifikuotų medžiagų, masė turi būti ne mažesnė nei 35 000 sėklų ir (arba) grūdų masė. Tai reiškia, kad jei tai yra kukurūzai – jungtinio ėminio masė privalo būti ne mažiau kaip 10,5 kg, o jei tai sojos pupelės – 7 kg. Jei tai kitos sėklos ir grūdai, pavyzdžiui, miežiai, sorgas, avižos, ryžiai, rugiai, kviečiai ir rapsai – jungtinis 4 kg ėminys atitinka daugiau nei 35 000 sėklų masę.

(***) Jei pašarai yra supakuoti, taip gali būti neįmanoma pasiekti 4 kg jungtinio ėminio dydį, nes jis priklauso nuo atskirų vienetų dydžio.

(****) Jei tai yra stambieji pašarai arba pašariniai augalai, kurių yra mažas savitasis svoris (pvz., šienas, šiaudai), jungtinio ėminio kiekis turėtų būti mažiausiai 1 kg.

7. KIEKYBINIAI GALUTINIŲ ĖMINIŲ REIKALAVIMAI

Galutiniai ėminiai

Reikia atlikti bent vieno galutinio ėminio analizę. Analizuojamo galutinio ėminio kiekis turi būti ne mažesnis kaip:

Kietieji pašarai	500 g (*) (**) (***)
Skystieji arba pusiau skysti pašarai	500 ml (*)

(*) Pagal reglamento (ES) 619/2011 nuostatas galutinio ėminio, skirto patikrinti, ar pašaruose nėra genetiškai modifikuotos medžiagos, masė privalo būti ne mažesnė nei 10 000 sėklų ir (arba) grūdų masė. Tai reiškia, kad jei tai yra kukurūzai – galutinio ėminio masė privalo būti ne mažiau kaip 3 000 g, o jei tai sojos pupelės – 2 000 g. Jei tai kitos sėklos ir grūdai, pavyzdžiui, miežiai, sorgas, avižos, ryžiai, rugiai, kviečiai ir rapsai – galutinis 500 g ėminys atitinka daugiau nei 10 000 sėklų masę.

(**) Jei jungtinis ėminys yra gerokai mažesnis nei 4 kg arba litrai (žr. 6 punkto išnašas), galima imti mažesnį kiekį galutinio ėminio, jei tai yra aprašyta patvirtinta dokumentais ėminių ėmimo ataskaitoje.

(***) Jei imami ankštinių augalų, javų grūdų ir medžių riešutų ėminiai pesticidų likučiams juose nustatyti, mažiausias galutinio ėminio dydis yra 1 kg, laikantis Komisijos direktyvos 2002/63/EB (OL L 187, 2002 7 16, p. 30) nuostatų.

▼M3

8. ĖMINIŲ ĖMIMO IŠ LABAI DIDELIŲ PARTIJŲ ARBA IŠ PARTIJŲ, KURIOS LAIKOMOS ARBA GABENAMOS TAIP, KAD ĖMINIŲ ĖMIMAS IŠ VISOS PARTIJOS NĖRA ĮMANOMAS, METODAS

8.1. **Bendrieji principai**

Jei dėl partijos gabenimo arba laikymo būdo neįmanoma paimti atskirųjų ėminių iš visos partijos, tokių partijų ėminius reikėtų imti tuomet, kai partija juda srautu.

Didelių sandėlių, skirtų laikyti pašarus, atveju, juos eksploatuojančius subjektus reikėtų paskatinti sandėlyje sumontuoti įrangą, kad būtų galima (automatiškai) imti ėminius iš visos sandėlyje laikomos partijos.

Taikant ėminių ėmimo procedūrą, kaip nurodyta 8 skyriuje, pašarų ūkio subjektui arba jo atstovui pranešama apie ėminių ėmimo procedūrą. Jei pašarų ūkio subjektui arba jo atstovui kyla abejonių dėl šios ėmimo procedūros, pašarų ūkio subjektas arba jo atstovas leidžia kompetentingai institucijai imti ėminius iš visos partijos ir padengia su tuo susijusias išlaidas.

8.2. **Laivu gabenamos didelės partijos**

8.2.1. *Dinaminis ėmimas iš didelių laivu gabenamų partijų*

Ėminius iš didelių partijų laivuose geriausia imti tuo metu, kai produktas juda srautu (dinaminis ėmimas).

Ėminiai imami talpų vienetais, kuriuos galima fiziškai atskirti. Vis dėlto talpos viena po kitos iš dalies ištuštinamos, kad po perkėlimo į saugyklas nebeliktų pradinio fizinio atskyrimo. Todėl ėminiai gali būti imami juos fiziškai atskiriant pačioje pradžioje arba jau perkėlus pašarus į saugyklą.

Partijai iškrauti iš laivo gali prireikti kelių dienų. Paprastai ėminiai turi būti imami reguliariu intervalu visą partijos iškrovimo laiką. Vis dėlto, tai ne visada įmanoma ar tinkama, nes valstybinis inspektorius negali būti toje vietoje visą partijos iškrovimo laiką. Todėl ėminius leidžiama imti iš partijos dalies (atrinktosios dalies). Atskirųjų ėminių skaičius nustatomas atsižvelgiant į atrinktosios dalies dydį.

Jei ėminiai imami iš tos pačios klasės arba to paties aprašymo pašarų partijos dalies ir jei nustatyta, kad partijos dalis neatitinka ES reikalavimų, daroma prielaida, kad tas pat būdinga visiems tos partijos pašarams, išskyrus atvejus, kai išsamiai įvertinus nerasta įrodymų, kad likusi partijos dalis neatitinka ES reikalavimų.

Net jei oficialus ėminys imamas automatiškai, inspektoriui dalyvauti būtina. Vis dėlto, jei automatinis ėmimas atliekamas vadovaujantis iš anksto nustatytais parametrais, kurių negalima keisti imant ėminius, o atskirieji ėminiai surenkami į talpyklą, kuri užplombuojama apsaugant nuo bet kokių pažeidimų, tuomet inspektoriui būtina dalyvauti tik ėminių ėmimo pradžioje, kiekvieną kartą, kai reikia pakeisti ėminių talpyklą, ir ėminių ėmimo pabaigoje.

▼M3

8.2.2. *Statinis ėmimas iš laivu gabenamų partijų*

Jei ėminiai imami statiniu būdu, turi būti taikoma tokia pati procedūra, kokia numatyta iš viršaus pasiekiamoms laikymo patalpoms (silosinėms) (žr. 8.4.1).

Ėmimas turi būti atliekamas (iš viršaus) pasiekiamoje partijos dalyje. Atskirųjų ėminių skaičius nustatomas atsižvelgiant į atrinktosios dalies dydį. Jei ėminiai imami iš tos pačios klasės arba to paties aprašymo pašarų partijos dalies ir jei nustatyta, kad partijos dalis neatitinka ES reikalavimų, daroma prielaida, kad tas pat būdinga visiems tos partijos pašarams, išskyrus atvejus, kai išsamiai įvertinus nerasta įrodymų, kad likusi partijos dalis neatitinka ES reikalavimų.

8.3. **Ėminių ėmimas iš didelių sandėliuose laikomų partijų**

Ėminiai turi būti imami pasiekiamoje partijos dalyje. Atskirųjų ėminių skaičius nustatomas atsižvelgiant į atrinktosios dalies dydį. Jei ėminiai imami iš tos pačios klasės arba to paties aprašymo pašarų partijos dalies ir jei nustatyta, kad partijos dalis neatitinka ES reikalavimų, daroma prielaida, kad tas pat būdinga visiems tos partijos pašarams, išskyrus atvejus, kai išsamiai įvertinus nerasta įrodymų, kad likusi partijos dalis neatitinka ES reikalavimų.

8.4. **Ėminių ėmimas iš laikymo patalpų (silosinių)**

8.4.1. *Ėminių ėmimas iš silosinių, (lengvai) pasiekiamų iš viršaus*

Ėminiai turi būti imami pasiekiamoje partijos dalyje. Atskirųjų ėminių skaičius nustatomas atsižvelgiant į atrinktosios dalies dydį. Jei ėminiai imami iš tos pačios klasės arba to paties aprašymo pašarų partijos dalies ir jei nustatyta, kad partijos dalis neatitinka ES reikalavimų, daroma prielaida, kad tas pat būdinga visiems tos partijos pašarams, išskyrus atvejus, kai išsamiai įvertinus nerasta įrodymų, kad likusi partijos dalis neatitinka ES reikalavimų.

8.4.2. *Ėminių ėmimas iš silosinių, nepasiekiamų iš viršaus (uždaros silosinės)*

8.4.2.1. Didesnės nei 100 tonų silosinės, kurios yra nepasiekiamos iš viršaus (uždaros silosinės)

Tokiose silosinėse laikomų pašarų ėminių negalima imti statiniu būdu. Jei reikia imti ėminį iš silosinėje laikomų pašarų ir nėra galimybės partijos pajudinti, su silosine eksploatuojančiu subjektu susitariama, kad jis inspektoriui praneš, kada silosinės turinys bus iškraunamas, kad būtų galima paimti ėminius pašarams judant srautu.

8.4.2.2. Mažesnės kaip 100 tonų silosinės, kurios yra nepasiekiamos iš viršaus (uždaros silosinės)

Ėmimo procedūros metu į talpyklą paimamas 50–100 kg pašarų kiekis ir iš jo imami ėminiai. Jungtinio ėminio dydis priklauso nuo visos partijos dydžio, o atskirųjų ėminių skaičius yra susijęs su siloso, paimto į talpyklą ėminiams, kiekiu. Jei ėminiai imami iš tos pačios klasės arba to paties aprašymo pašarų partijos dalies ir jei nustatyta, kad partijos dalis neatitinka ES reikalavimų, daroma prielaida, kad tas pat būdinga visiems tos partijos pašarams, išskyrus atvejus, kai išsamiai įvertinus nerasta įrodymų, kad likusi partijos dalis neatitinka ES reikalavimų.

▼M3

8.5. **Piltinių pašarų dideliuose uždaruose konteineriuose ėminių ėmimas**

Ėminius iš tokių partijų dažnai galima imti tik tuomet, kai partijos yra iškrautos. Tam tikrais atvejais konteinerių neįmanoma iškrauti importo ar kontrolės punkte, todėl ėminiai turėtų būti imami iškrovus konteinerius.

9. ĖMINIŲ ĖMIMO, RUOŠIMO IR PAKAVIMO INSTRUKCIJOS

9.1. **Bendrosios aplinkybės**

Ėminiai turi būti imami ir ruošiami nedelsiant, laikantis atsargumo priemonių, kurios yra būtinos siekiant užtikrinti, kad produktas nepakistų ir nebūtų užterštas. Įrankiai ėminiams imti ir konteinerių, kuriuose jie laikomi, paviršiai turi būti švarūs ir sausi.

9.2. **Atskirieji ėminiai**

Atskirieji ėminiai turi būti imami atsitiktinai iš visos atrinktosios dalies ir jie turi būti maždaug vienodo dydžio.

Atskirojo ėminio dydis yra ne mažiau nei 100 g arba 25 g, jei tai yra stambieji pašarai arba pašariniai augalai, kurių yra mažas savitasis svoris.

Jei laikantis 8 punkte nurodytų ėmimo procedūros taisyklių būtina imti mažiau nei 40 atskirųjų ėminių, atskirųjų ėminių dydis nustatomas atsižvelgiant į nustatytą jungtinio ėminio dydį (žr. 6 punktą).

Ėminių ėmimo iš supakuotų pašarų mažų partijų atveju, kai, laikantis kiekybinių reikalavimų, būtina imti ribotą atskirųjų ėminių skaičių, atskirasis ėminys yra vieno pradinio vieneto, kurio turinys yra ne didesnis kaip 1 kg ar 1 litras, turinys.

Jei imami į mažus vienetus (pvz., < 250 g) supakuotų pašarų ėminiai, atskirojo ėminio dydis priklauso nuo vieneto dydžio.

9.2.1. *Piltiniai pašarai*

Jei tinka, ėminius galima imti keičiant atrinktosios dalies vietą (kraunant arba iškraunant).

9.2.2. *Supakuoti pašarai*

Atrinkus reikiamą skaičių vienetų ėminiams imti, kaip nurodyta 5 skyriuje, kiekvieno vieneto dalis paimama bertuve arba zondu. Prireikus ėminiai imami atskirai ištuštinus vienetus.

9.2.3. *Homogeniniai arba homogenizuojami skystieji arba pusiau skysti pašarai*

Atrinkus reikiamą skaičių vienetų ėminiams imti, kaip nurodyta 5 skyriuje, jų turinys prireikus homogenizuojamas ir iš kiekvieno vieneto paimamas tam tikras kiekis.

Atskiruosius ėminius galima imti išpilant talpyklos turinį.

▼M3

9.2.4. *Nehomogenizuojami skystieji arba pusiau skysti pašarai*

Atrinkus reikiamą skaičių vienetų ėminiams imti, kaip nurodyta 5 skyriuje, ėminiai imami iš skirtingų lygių.

Be to, ėminius galima imti išpilant turinį, tačiau pirmosios dalys turėtų būti išpiltos kaip netinkamos.

Abiem atvejais visas paimto ėminio tūris neturi būti mažesnis kaip 10 litrų.

9.2.5. *Pašarų briketai ir mineralų laižalai*

Atrinkus ėminiams imti reikalingą skaičių pašarų briketų arba laižalų, kaip nurodyta 5 skyriuje, galima imti kiekvieno briketo arba laižalo dalį. Jei įtariama, kad briketas arba laižalas yra nehomogeninis, kaip ėminį galima imti visą briketą arba laižalą.

Jei briketai arba laižalai sveria ne daugiau kaip po 1 kg, atskirasis ėminys yra vieno briketo arba vieno laižalo turinys.

9.3. **Jungtinių ėminių ruošimas**

Atskirieji ėminiai sumaišomi, kad būtų gautas vienas jungtinis ėminys.

9.4. **Galutinių ėminių ruošimas**

Bendrojo ėminio medžiaga kruopščiai sumaišoma ([1]).

— Kiekvienas ėminys sudedamas į atitinkamą konteinerį / talpyklą. Imamasi visų reikalingų atsargumo priemonių, kad gabenant arba saugant negalėtų pasikeisti ėminio sudėtis, jis nebūtų užterštas arba sufalsifikuotas.

— Jei tikrinamos sudedamosios dalys arba vienodai pašaruose pasiskirsčiusios medžiagos, jungtinis ėminys gali būti reprezentatyviai sumažinamas bent iki 2,0 kg arba 2,0 litro (sumažintasis ėminys) ([2]), geriausia naudojant mechaninį arba automatinį dalytuvą. Jei atliekama pesticidų likučių ankštiniuose augaluose, javų grūduose ir medžių riešutuose kontrolė, mažiausias sumažintojo ėminio kiekis yra 3 kg. Jei dėl pašarų pobūdžio neįmanoma naudoti dalytuvo arba dalytuvo nėra, ėminį galima sumažinti taikant ketvirčiavimo metodą. Iš sumažintųjų ėminių paruošiamas maždaug toks pats kiekis galutinių ėminių (kontrolės, teisių gynimo tikslais ir kontroliniam ėminiui) laikantis 7 skyriuje nurodytų kiekybinių reikalavimų. Atliekant sudedamųjų dalių, įskaitant genetiškai modifikuotas medžiagas, arba medžiagų, kurios, tikėtina, yra nevienodai pasiskirsčiusios pašarinėse žaliavose, kontrolę, jungtinis ėminys yra:

  — visiškai homogenizuojamas ir po to paskirstomas į galutinius ėminius arba

  — sumažinamas iki mažiausiai 2 kg arba 2 litrų ([3]) naudojant mechaninį arba automatinį dalytuvą. Tik tuo atveju, jei dėl pašarų pobūdžio negalima naudoti dalytuvo, ėminį, jei reikia, galima sumažinti taikant ketvirčiavimo metodą. Siekiant nustatyti, ar pašaruose nėra genetiškai modifikuotų medžiagų, pagal Reglamentą (ES) Nr. 619/2011 sumažintasis ėminys turi būti sudarytas iš mažiausiai 35 000 sėklų ir (arba) grūdų masės, kad būtų galima gauti galutinius ėminius vykdymo užtikrinimo, teisių gynimo tikslais ir kontroliniam ėmimui, kurie būtų sudaryti iš mažiausiai 10 000 sėklų ir (arba) grūdų (žr. (**) išnašą 6 skyriuje ir (*) išnašą 7 skyriuje).

([1]) Visi ėminių gabalai sutrupinami (prireikus smulkinami atskirai ir grąžinami į ėminį).
([2]) Išskyrus, jei tai yra stambieji pašarai arba pašariniai augalai, kurių yra mažas savitasis svoris.
([3]) Išskyrus, jei tai yra stambieji pašarai arba pašariniai augalai, kurių yra mažas savitasis svoris.

▼M3

9.5. **Ėminių pakavimas**

Konteineriai arba pakuotės plombuojami ir ženklinami taip, kad jų nebūtų galima atidaryti, nepažeidus plombos. Visa etiketė turi būti po plomba.

9.6. **Ėminių siuntimas į laboratoriją**

Ėminys nedelsiant siunčiamas į paskirtąją kontrolės laboratoriją kartu su analizę atliekančiam asmeniui būtina informacija.

10. ĮRAŠAI APIE ĖMINIUS

Turi būti daromi įrašai apie visus ėminius, kad vienareikšmiškai būtų galima nustatyti kiekvieną atrinktąją dalį ir jos dydį.

Darant įrašą taip pat nurodomas bet koks nukrypimas nuo šiame reglamente nustatytos ėmimo procedūros.

Su padarytu įrašu gali susipažinti oficiali kontrolės laboratorija, įrašas taip pat pateikiamas pašarų ūkio subjektui ir (arba) pašarų ūkio subjektui paskirtai laboratorijai.

▼M3

II PRIEDAS

BENDROSIOS NUOSTATOS DĖL PAŠARŲ ANALIZĖS METODŲ

A. ĖMINIŲ RUOŠIMAS ANALIZEI

1. **Tikslas**

Toliau aprašytos procedūros taikomos analizei ruošiant į kontrolės laboratorijas atsiųstus ėminius, paimtus pagal I priede pateiktas nuostatas.

Šie laboratoriniai ėminiai turi būti ruošiami taip, kad pagal analizės metodą sverti numatyto kiekio ėminiai būtų homogeniniai ir atitiktų galutinius ėminius.

2. **Taikytinos atsargumo priemonės**

Ėminių ruošimo procedūra, kurios reikia laikytis, priklauso nuo taikomo analizės metodo ir nuo tikrintinų sudedamųjų dalių ir medžiagų. Todėl labai svarbu užtikrinti, kad ėminių ruošimo procedūra atitiktų taikomą analizės metodą ir tikrintinas sudedamąsias dalis ar medžiagas.

Visi būtini veiksmai turi būti atlikti taip, kad kiek įmanoma būtų išvengta ėminio užteršimo ir jo sudėties pokyčių.

Malama, maišoma ir sijojama nedelsiant, kad ėminį kuo mažiau veiktų oras ir šviesa. Nenaudojami malūnėliai ir smulkintuvai, kurie gali gerokai įkaitinti ėminį.

Šilumai ypač jautrių pašarų ėminius rekomenduojama malti rankiniu būdu. Be to, užtikrinama, kad pati aparatūra nebūtų užteršimo šaltiniu.

Jei ruošiant ėminį neįmanoma užtikrinti, kad gerokai nepakistų jo drėgmės kiekis, jis nustatomas prieš ėminio ruošimą ir jį paruošus pagal III priedo A dalyje nurodytą metodą.

3. **Procedūra**

3.1. *Bendroji procedūra*

Tiriamoji alikvotinė dalis paimama iš galutinio ėminio. Kūgio supylimo ir ketvirčiavimo metodas nerekomenduojamas, nes gali būti gautos alikvotinės dalys su didele dalijimo paklaida.

3.1.1. Pašarai, kuriuos galima malti be paruošimo

— Sijotas galutinis ėminys sumaišomas ir sudedamas į tinkamą švarų ir sausą, sandariai užkemšamą konteinerį. Prieš sveriant analizei reikiamas ėminio kiekis (tiriamoji alikvotinė dalis) dar kartą sumaišomas, siekiant užtikrinti visišką vientisumą.

3.1.2. Pašarai, kurie prieš malant džiovinami

— Jei analizės metoduose nenurodyta kitaip, galutinis ėminys džiovinamas drėgmės kiekiui sumažinti iki 8–12 % taikant pradinio džiovinimo procedūrą, aprašytą III priedo A dalyje pateikto drėgmės nustatymo metodo 4.3 punkte. Tada tęsiama, kaip nurodyta 3.1.1. skirsnyje.

▼M3

3.1.3. Skystieji arba pusiau skysti pašarai

— Galutinis ėminys supilamas į tinkamą švarų ir sausą, sandariai užkemšamą konteinerį. Prieš sveriant analizei reikiamas ėminio kiekis (tiriamoji alikvotinė dalis) dar kartą kruopščiai sumaišomas, siekiant užtikrinti visišką vientisumą.

3.1.4. Kiti pašarai

— Galutiniai ėminiai, kurių neįmanoma paruošti pagal kurią nors pirmiau pateiktą procedūrą, apdorojami taikant bet kurią kitą procedūrą, kuria būtų užtikrinta, kad analizei pasverti ėminiai (tiriamoji alikvotinė dalis) būtų homogeniniai ir reprezentuotų galutinius ėminius.

3.2. *Speciali procedūra atliekant regimąjį patikrinimą, tiriant mikroskopu arba tais atvejais, kai visas jungtinis ėminys yra homogenizuotas*

— Atliekant regimąjį patikrinimą (nenaudojant mikroskopo), patikrinimui naudojamas visas laboratorinis ėminys.

— Jei tikrinimas atliekant naudojant mikroskopą, laboratorija gali sumažinti jungtinį ėminį arba dar labiau sumažinti sumažintąjį ėminį. Galutiniai ėminiai teisių gynimo tikslais ir tam tikrais atvejais kontroliniam ėminiui imami laikantis tokios pačios procedūros kaip galutinio ėminio reikalavimų vykdymo procedūra.

— Jei homogenizuotas visas jungtinis ėminys, galutiniai ėminiai imami iš homogenizuoto jungtinio ėminio.

4. **Ėminių laikymas**

Ėminiai turi būti laikomi temperatūroje, kurioje nekistų jų sudėtis. Vitaminų analizei skirti ėminiai arba šviesai ypač jautrūs ėminiai laikomi tokiomis sąlygomis, kad ėminio neigiamai nepaveiktų šviesa.

B. NUOSTATOS DĖL ANALIZĖS METODAMS NAUDOJAMŲ REAGENTŲ IR APARATŪROS

1. Jei analizės metoduose nenurodyta kitaip, visi analiziniai reagentai turi būti analitiškai gryni (a. g.). Atliekant pėdsakų analizę, reagentų grynumas turi būti patikrintas atliekant tuščiąjį bandymą. Atsižvelgiant į gautą rezultatą, gali tekti papildomai gryninti reagentus.

2. Visoms tirpalų ruošimo, skiedimo, skalavimo arba plovimo operacijoms, minimoms analizės metoduose, nenurodant naudojamo tirpiklio arba skiediklio tipo, turi būti naudojamas vanduo. Paprastai vanduo demineralizuojamas arba distiliuojamas. Konkrečiais atvejais, nurodytais analizės metode, jam turi būti taikomos specialios gryninimo procedūros.

3. Atsižvelgiant į paprastai kontrolės laboratorijų turimą įrangą, analizės metoduose nurodomi tik specialios paskirties arba tam tikru būdu naudojami prietaisai ir aparatūra. Jie turi būti švarūs, ypač kai reikia nustatyti labai mažus cheminių medžiagų kiekius.

▼M3

C. ANALIZĖS METODŲ TAIKYMAS IR REZULTATŲ IŠRAIŠKA

1. **Ekstrahavimo procedūra**

Keliems metodams yra nustatyta tam tikra ekstrahavimo procedūra. Paprastai galima taikyti kitas nei metodui nustatyta ekstrahavimo procedūras, jei įrodoma, kad analizuojamai matricai taikant tą kitą procedūrą gautas ekstrahavimo veiksmingumas atitinka metodu nustatytos procedūros veiksmingumą.

2. **Gryninimo procedūra**

Keliems metodams yra nustatyta tam tikra gryninimo procedūra. Paprastai galima taikyti kitas nei metodui nustatyta gryninimo procedūras, jei įrodoma, kad analizuojamai matricai taikant tą kitą procedūrą gauti analizės rezultatai atitinka rezultatus, gautus taikant metodu nustatytą procedūrą.

3. **Nustatymų skaičius**

Jei analizuojant nepageidaujamas medžiagas, pirmojo nustatymo rezultatas yra gerokai (> 50 %) mažesnis nei kontroliuojama specifikacijos vertė, papildomas nustatymas nebūtinas, jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros. Kitais atvejais kartotinė analizė (antrasis nustatymas) yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinio tarpusavio užteršimo arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Du nustatymai, atsižvelgus į matavimo neapibrėžtį, yra naudojami atitikčiai patikrinti.

Jei atliekant nurodyto medžiagos arba sudedamosios dalies kiekio kontrolę, pirmojo nustatymo rezultatas patvirtina nurodytą kiekį, t. y. analizės rezultatas atitinka priimtiną nurodyto kiekio kitimo intervalą, papildomas nustatymas nebūtinas, jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros. Kitais atvejais kartotinė analizė (antrasis nustatymas) yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinio tarpusavio užteršimo arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Du nustatymai, atsižvelgus į matavimo neapibrėžtį, yra naudojami atitikčiai patikrinti.

Kai kuriais atvejais priimtinas nuokrypis yra nustatytas teisės aktuose, kaip antai 2009 m. liepos 13 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 767/2009 dėl pašarų tiekimo rinkai ir naudojimo, iš dalies keičiančiame Reglamentą (EB) Nr. 1831/2003 ir panaikinančiame Direktyvas 79/373/EEB, 80/511/EEB, 82/471/EEB, 83/228/EEB, 93/74/EEB, 93/113/EEB, 96/25/EB bei Komisijos sprendimą 2004/217/EB ([1]).

4. **Taikyto analizės metodo pateikimas ataskaitoje**

Analizės ataskaitoje nurodomas taikytas analizės metodas.

5. **Analizės rezultato pateikimas ataskaitoje**

Analizės rezultatas turi būti išreikštas analizės metode nustatytu būdu; nurodant atitinkamą reikšminių skaitmenų skaičių ir prireikus darant pataisą dėl drėgmės kiekio galutiniame ėminyje prieš ruošimą.

([1]) OL L 229, 2009 9 1, p. 1.

▼M3

6. **Matavimo neapibrėžtis ir išgavos dydis atliekant nepageidaujamų medžiagų analizę**

Dėl nepageidaujamų medžiagų, kaip apibrėžta Direktyvoje 2002/32/EB, laikoma, kad gyvūnų pašarams skirtas produktas neatitinka nustatyto didžiausio kiekio, jei manoma, kad su pašaru, kurio drėgmės kiekis yra 12 %, susijęs analizės rezultatas viršija didžiausią kiekį, įskaitant išplėstinę matavimo neapibrėžtį ir išgavos dydžio pataisą. Atitikčiai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija, atlikus išgavos dydžio pataisą ir atėmus išplėstinę matavimo neapibrėžtį. Ši procedūra taikoma tais atvejais, kai galima įvertinti analizės metodo matavimo neapibrėžtį ir išgavos dydžio pataisą (tai, pvz., neįmanoma, kai atliekama mikroskopinė analizė).

Analizės rezultatas užrašomas taip (jei taikant analizės metodą galima įvertinti matavimo neapibrėžtį ir išgavos dydį):

a) su pataisa dėl išgavos dydžio, nurodant išgavos dydį. Pataisa dėl išgavos dydžio nebūtina, jei jis yra 90–110 %;

b) kaip „x +/– U“, čia x – analizės rezultatas, U – išplėstinė matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties faktorių 2, kuris užtikrina maždaug 95 % patikimumo lygį.

Tačiau jei analizės rezultatas yra gerokai (> 50 %) mažesnis nei kontroliuojama specifikacijos vertė ir jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros, o analizės tikslas yra tik patikrinti atitiktį teisinėms nuostatoms, analizės rezultatą būtų galima pateikti ataskaitoje be išgavos dydžio pataisos ir išgavos dydžio bei matavimo neapibrėžties tais atvejais galima nenurodyti.

▼B

III PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI, TAIKOMI PAŠARINIŲ MEDŽIAGŲ IR KOMBINUOTŲJŲ PAŠARŲ SUDĖČIAI KONTROLIUOTI

A. DRĖGMĖS KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti pašarų drėgmės kiekį. Jei pašarai turi lakiųjų medžiagų, pvz., organinių rūgščių, reikia turėti omenyje, kad nustatant drėgmės kiekį nustatomas didelis kiekis lakiųjų medžiagų.

Jis netaikomas analizuojant pieno produktus kaip pašarus, mineralines medžiagas ir mišinius, kuriuos iš esmės sudaro mineralinės medžiagos, gyvūninius ir augalinius riebalus bei aliejus arba aliejingąsias sėklas ir vaisius.

2. **Metodas**

Ėminys džiovinamas nurodytomis sąlygomis, kurios priklauso nuo pašarų tipo. Masės sumažėjimas nustatomas sveriant. Tiriant kietuosius pašarus, kurių drėgmės kiekis didelis, būtina atlikti pradinį džiovinimą.

3. **Aparatūra**

3.1 Smulkintuvas, pagamintas iš drėgmės nesugeriančių medžiagų, kuris būtų lengvai valomas, kuriuo būtų galima greitai ir vienodai susmulkinti ėminį, per daug jam neįkaistant, ir kuris kiek įmanoma apsaugotų ėminį nuo sąlyčio su išorės oru ir atitiktų 4.1.1 ir 4.1.2 nustatytus reikalavimus (pvz., plaktukiniai ar vandeniu aušinami mikrosmulkintuvai, sudedamieji kūginiai malūnėliai, mažo apsisukimų dažnio arba krumpliaratiniai smulkintuvai).

3.2 Analizinės svarstyklės, tikslumas 1 mg.

3.3 Sausi korozijai atsparaus metalo arba stikliniai indai su sandariai uždengiamais dangčiais; darbinis paviršius ėminiui paskleisti maždaug 0,3 g/cm^2 tankiu.

3.4 Elektrinė pastovios temperatūros džiovinimo spinta (± 2 °C), tinkamai ventiliuojama ir užtikrinanti greitą temperatūros reguliavimą ([1]).

3.5 Reguliuojama elektrinė vakuuminė džiovinimo spinta, turinti alyvos siurblį ir mechanizmą, kuriuo galima įleisti karšto sauso oro, arba naudojanti džioviklį (pvz., kalcio oksidą).

3.6 Eksikatorius su stora perforuota metalo arba porceliano plokšte ir veiksmingu džiovikliu.

4. **Procedūra**

N.B Šiame skirsnyje aprašyti veiksmai turi būti atliekami iškart po ėminių pakuočių atidarymo. Analizė turi būti atliekama bent du kartus.

([1]) Džiovinimo spintos grūdams, miltams, kruopoms ir miltams džiovinti šiluminė galia turi būti tokia, kad nustačius 131 °C temperatūrą, spinta, į kurią džiūti vienu metu sudedamas didžiausias galimas ėminių kiekis, vėl pasiektų tą temperatūrą per mažiau kaip 45 min. Ventiliacija turi būti tokia, kad rezultatų, gautų dvi valandas spintoje džiovinant tiek paprastų kviečių ėminių, kiek jų gali tilpti, ir rezultatų, gautų po 4 valandų džiovinimo, skirtumas būtų mažesnis kaip 0,15 %.

▼B

4.1 *Ėminių ruošimas*

4.1.1 Pašarai, išskyrus pašarus pagal 4.1.2 ir 4.1.3

Paimama bent 50 g ėminio. Prireikus ėminys susmulkinamas arba sumalamas taip, kad būtų išvengta drėgmės kiekio pokyčio (žr. 6).

4.1.2 Javai ir kruopos

Paimama bent 50 g ėminio. Susmulkinama į daleles, kurių bent 50 % išbyra per 0,5 mm akučių sietą ir ant 1 mm skersmens apvalių akučių sieto lieka ne daugiau kaip 10 %.

4.1.3 Skysti ar pastų tipo pašarai, kuriuos daugiausia sudaro aliejai ir riebalai

Maždaug 25 g ėminio pasveriama 10 mg tikslumu, įdedamas reikiamas kiekis sauso smėlio, pasverto 10 mg tikslumu, ir maišoma tol, kol gaunamas vienalytis produktas.

4.2 *Džiovinimas*

4.2.1 Pašarai, išskyrus pašarus pagal 4.2.2 ir 4.2.3

Indas su dangčiu (3.3) pasveriamas 1 mg tikslumu. Maždaug 5 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu, ėminys supilamas į pasvertą indą ir lygiai paskleidžiamas. Neuždengtas indas dedamas į džiovinimo spintą, įkaitintą iki 103 °C. Indą reikia įdėti kiek įmanoma greičiau, kad per daug nenukristų temperatūra spintoje. Džiovinama keturias valandas, skaičiuojant nuo to momento, kai spintos temperatūra vėl pasiekia 103 °C. Indas uždengiamas dangčiu, išimamas iš džiovinimo spintos, 30–45 min laikomas eksikatoriuje (3.6), kad atvėstų, ir pasveriamas 1 mg tikslumu.

Jei pašarus daugiausia sudaro aliejai ir riebalai, džiovinama spintoje dar 30 min 130 °C temperatūroje. Dviejų svėrimo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,1 % drėgmės kiekio.

4.2.2 Javai, miltai, kruopos ir rupūs miltai

Indas su dangčiu (3.3) pasveriamas 0,5 mg tikslumu. Maždaug 5 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu, ėminys supilamas į pasvertą indą ir lygiai paskleidžiamas. Neuždengtas indas dedamas į džiovinimo spintą, įkaitintą iki 130 °C. Indą reikia įdėti kiek įmanoma greičiau, kad per daug nenukristų temperatūra spintoje. Džiovinama dvi valandas, skaičiuojant nuo to momento, kai spintos temperatūra vėl pasiekia 130 °C. Indas uždengiamas dangčiu, išimamas iš džiovinimo spintos, 30–45 min laikomas eksikatoriuje (3.6), kad atvėstų, ir pasveriamas 1 mg tikslumu.

4.2.3 Kombinuotieji pašarai, kurie turi daugiau nei 4 % sacharozės arba laktozės: pašarinės žaliavos, pvz., saldžiosios ceratonijos ankštys, hidrolizuotieji javų produktai, salyklas, džiovinti runkelių griežiniai, žuvų hidrolizatai ir cukraus žlaugtai; kombinuotieji pašarai, turintys daugiau nei 25 % mineralinių druskų, įskaitant kristalizacinį vandenį.

Indas su dangčiu (3.3) pasveriamas 0,5 mg tikslumu. Maždaug 5 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu, ėminys supilamas į pasvertą indą ir lygiai paskleidžiamas. Neuždengtas indas dedamas į vakuuminę džiovinimo spintą (3.5), įkaitintą iki 80–85 °C. Indą reikia įdėti kiek įmanoma greičiau, kad per daug nenukristų temperatūra spintoje.

Slėgis sumažinamas iki 100 mm Hg stulpelio ir tokiame slėgyje keturias valandas džiovinama karšto sauso oro srove arba džiovikliu (20 ėminių reikia apie 300 g). Pastaruoju atveju, pasiekus nurodytą slėgį, vakuuminis siurblys išjungiamas. Džiovinimo trukmė skaičiuojama nuo to

▼B

momento, kai džiovinimo spintos temperatūra vėl pakyla iki 80–85 °C. Džiovinimo spintos slėgis atsargiai padidinamas iki atmosferos slėgio. Spinta atidaroma, indas nedelsiant uždengiamas dangčiu, išimamas iš spintos, laikomas 30–45 min eksikatoriuje (3.6), kad atvėstų, ir pasveriamas 1 mg tikslumu. Džiovinama dar 30 min vakuuminėje džiovinimo spintoje 80–85 °C temperatūroje ir dar kartą pasveriama. Šių dviejų svėrimų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,1 % drėgmės kiekio.

4.3 *Pradinis džiovinimas*

4.3.1 Pašarai, išskyrus išvardytus 4.3.2

Kietieji labai drėgni pašarai, kuriuos sunku susmulkinti, turi būti iš anksto džiovinami taip:

Į tinkamą indą (pvz., ant 20 × 12 cm aliuminio plokštės su 0,5 cm kraštu) pasveriama 50 g *nesusmulkinto* ėminio 10 mg tikslumu (prireikus presuotus arba į gabalus sulipusius pašarus galima kažkiek sutrupinti). Džiovinama džiovinimo spintoje 60–70 °C temperatūroje tol, kol drėgmės kiekis nesumažėja iki 8–12 %. Ėminys išimamas iš džiovinimo spintos, neuždengtas valandą vėsinamas laboratorijoje ir pasveriamas 10 mg tikslumu. Nedelsiant susmulkinamas, kaip nurodyta 4.1.1, ir džiovinamas, kaip nurodyta 4.2.1 arba 4.2.3, atsižvelgiant į pašarų tipą.

4.3.2 Javai

Javai, kurių drėgmės kiekis didesnis nei 17 % turi būti iš anksto džiovinami taip:

Į tinkamą indą (pvz., ant 20 × 12 cm aliuminio plokštės su 0,5 cm kraštu) pasveriama 50 g nesusmulkinto ėminio 10 mg tikslumu. 5–7 min džiovinama džiovinimo spintoje 130 °C temperatūroje. Ėminys išimamas iš džiovinimo spintos, neuždengtas dvi valandas vėsinamas laboratorijoje ir pasveriamas 10 mg tikslumu. Nedelsiant susmulkinamas, kaip nurodyta 4.1.2, ir džiovinamas, kaip nurodyta 4.2.2.

5. **Rezultatų apskaičiavimas**

Drėgmės kiekis ėminio masės procentais (*X*) apskaičiuojamas pagal šias formules:

5.1 *Džiovinimas, kai netaikomas pradinis džiovinimas*

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

kurioje:

m = tiriamojo ėminio pradinis svoris gramais;
m_0 = išdžiovinto tiriamojo ėminio svoris gramais.

5.2 *Džiovinimas, kai taikomas pradinis džiovinimas*

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1\right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2}\right)$$

kurioje:

m = tiriamojo ėminio pradinis svoris gramais,
m_1 = tiriamojo ėminio svoris po pradinio džiovinimo gramais,
m_2 = tiriamojo ėminio svoris po smulkinimo arba malimo gramais,
m_0 = išdžiovinto tiriamojo ėminio svoris gramais.

▼B

5.3 *Pakartojamumas*

Dviejų to paties ėminio lygiagrečių matavimų rezultatų skirtumas ne didesnis nei 0,2 % drėgmės kiekio absoliučiosios vertės.

6. **Pastaba**

Jei paaiškėja, kad ėminį būtina susmulkinti, ir pastebima, kad produkto drėgmės kiekis pakito, pašarų komponentų analizės rezultatus reikia perskaičiuoti pagal pradinės būklės ėminio drėgmės kiekį.

B. GYVŪNINIŲ IR AUGALINIŲ RIEBALŲ BEI ALIEJŲ DRĖGMĖS KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti vandens ir lakiųjų medžiagų kiekį gyvūninės ir augalinės kilmės riebaluose bei aliejuose.

2. **Metodas**

Ėminys džiovinamas 103 °C temperatūroje iki pastoviosios masės (masės sumažėjimas tarp dviejų paeiliui atliekamų svėrimų turi būti mažesnis arba lygus 1 mg). Nuodžiūvis nustatomas sveriant.

3. **Aparatūra**

3.1 Indas plokščiu dugnu iš korozijai atsparios medžiagos, skersmuo 8–9 cm, aukštis – 3 cm.

3.2 Maždaug 10 cm ilgio gyvsidabrio termometras, su padalomis nuo 80 °C iki bent 110 °C, su pastorintu burbuliuku ir plėtimosi vamzdžiu viršutiniame gale.

3.3 Smėlio vonia arba elektrinė kaitlentė.

3.4 Eksikatorius su veiksmingu džiovikliu.

3.5 Analizinės svarstyklės.

4. **Procedūra**

Į sausą pasvertą indą (3.1), į kurį įdėtas termometras (3.2), 1 mg tikslumu pasveriama apie 20 g homogenizuoto ėminio. Nuolat maišant termometru, kaitinama ant smėlio vonios arba kaitlentės (3.3) taip, kad maždaug per 7 min temperatūra pasiektų 90 °C.

Kaitinimas sumažinamas, stebint, kaip dažnai nuo indo dugno kyla burbuliukai. Temperatūra turi būti ne aukštesnė kaip 105 °C. Maišoma toliau, braukiant per indo dugną tol, kol nebesusidaro burbuliukų.

Siekiant užtikrinti visišką drėgmės pašalinimą, dar keletą kartų kaitinama iki 103 °C ± 2 °C, kaskart tarp kaitinimų atvėsinant ėminį iki 93 °C. Tada paliekama eksikatoriuje (3.4) atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriama. Šis veiksmas kartojamas tol, kol ėminio svoris tarp iš eilės atliekamų kaitinimo veiksmų sumažėja ne daugiau kaip 2 mg.

N.B Ėminio svorio padidėjimas po kartotinių kaitinimo veiksmų rodo, kad oksiduojasi riebalai, todėl šiuo atveju rezultatai skaičiuojami pagal svėrimo duomenis, gautus prieš tai, kai svoris pradėjo didėti.

5. **Rezultatų apskaičiavimas**

Drėgmės kiekis ėminio procentine dalimi (X) apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

▼B

kurioje:

m = tiriamojo ėminio svoris gramais;
m_1 = indo su turiniu svoris prieš kaitinimą gramais;
m_2 = indo du turiniu svoris po kaitinimo gramais.

Mažesni nei 0,05 % rezultatai turi būti užrašomi kaip „mažiau nei 0,05 %“.

Pakartojamumas

Dviejų to paties ėminio lygiagrečiai atliktos drėgmės kiekio analizės rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,05 % absoliučiąja verte.

C. ŽALIŲ BALTYMŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti žalių baltymų kiekį pašaruose pagal Kjeldalio metodu nustatomą azoto kiekį.

2. **Metodas**

Ėminys skaidomas sieros rūgštimi esant katalizatoriui. Rūgštus tirpalas šarminamas natrio hidroksido tirpalu. Gautas amoniakas distiliuojamas ir surenkamas žinomame kiekyje sieros rūgšties, kurios perteklius titruojamas natrio hidroksido standartiniu tirpalu.

Pagal kitą metodą išsiskyręs amoniakas distiliuojamas į tirpalą su boro rūgšties pertekliumi, tada titruojama vandenilio chlorido rūgšties arba sieros rūgšties tirpalu.

3. **Reagentai**

3.1 Kalio sulfatas

3.2 Katalizatorius: vario (II) oksidas CuO arba vario (II) sulfato pentahidratas $CuSO_4\ 5H_2O$

3.3 Cinko granulės

3.4 Sieros rūgštis, ρ_{20} = 1,84 g/ml

3.5 Sieros rūgštis, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, c(H_2SO_4) = 0,25 mol/l

3.6 Sieros rūgštis, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, c(H_2SO_4) = 0,10 mol/l

3.7 Sieros rūgštis, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, c(H_2SO_4) = 0,05 mol/l

3.8 Indikatorius metilraudonasis: 300 mg metilraudonojo ištirpinama 100 ml etanolio, σ = 95–96 % (V/V)

3.9 Natrio hidroksido tirpalas (galima naudoti techninį hidroksidą) β = 40 g/100 ml (m/V: 40 %)

3.10 Natrio hidroksidas, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, c(NaOH) = 0,25 mol/l

3.11 Natrio hidroksidas, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, c(NaOH) = 0,10 mol/l

3.12 Pemzos granulės, išplautos vandenilio chlorido rūgštyje ir iškaitintos

3.13 Acetanilidas (lyd. temp. = 114 °C, N kiekis = 10,36 %)

3.14 Sacharozė (neturinti azoto)

3.15 Boro rūgštis (H_3BO_3)

3.16 Indikatoriaus metilraudonojo tirpalas: 100 mg metilraudonojo ištirpinama 100 ml etanolio arba metanolio

▼B

3.17 Bromkrezolio žaliojo tirpalas: 100 mg bromkrezolio žaliojo ištirpinama 100 ml etanolio arba metanolio

3.18 Boro rūgšties tirpalas (10 g/l–40 g/l atsižvelgiant į naudojamą aparatūrą)

Kai ekvivalentinis taškas nustatomas kolorimetriškai, į boro rūgšties tirpalus turi būti įdėta metilraudonojo ir bromkrezolio žaliojo indikatorių. Jei ruošiamas 1 litras boro rūgšties tirpalo, prieš skiedžiant iki žymės įpilama 7 ml metilraudonojo indikatoriaus tirpalo (3.16) ir 10 ml bromkrezolio žaliojo tirpalo (3.17).

Priklausomai nuo naudojamo vandens, skirtingų partijų boro rūgšties tirpalų pH vertė gali skirtis. Dažnai būtina koreguoti nedideliu šarmo tirpalo tūriu, kad būtų gautas teigiamas tuščiasis ėminys.

Pastaba. Paprastai tinkamai korekcijai pakanka maždaug 3 ml–4 ml NaOH (3.11) 1 litrui 10 g/l boro rūgšties. Tirpalas laikomas kambario temperatūroje, apsaugotas nuo šviesos ir amoniako garų šaltinių.

3.19 Vandenilio chlorido rūgšties standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas c(HCl) = 0,10 mol/l

Pastaba. Galima naudoti kitokios koncentracijos tūrinės titrimetrijos tirpalus (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 ir 3.19), jei apskaičiuojant būtų daroma korekcija dėl koncentracijos. Koncentracijos vertės visuomet išreiškiamos keturiais skaičiais po kablelio.

4. **Aparatūra**

Aparatūra, tinkama skaidyti, distiliuoti ir titruoti pagal Kjeldalio procedūrą.

5. **Procedūra**

5.1 *Skaidymas*

1 g ėminio pasveriama 0,001 g tikslumu ir ėminys supilamas į skaidymo aparato kolbą. Įdedama 15 g kalio sulfato (3.1) ir atitinkamas kiekis katalizatoriaus (3.2) (0,3–0,4 g vario oksido arba 0,9–1,2 g vario (II) sulfato pentahidrato), įpilama 25 ml sieros rūgšties (3.4, prireikus įmetamos kelios pemzos granulės (3.12) ir sumaišoma.

Kolba iš pradžių šildoma, kartkartėmis ją sukiojant, ant nestiprios ugnies tol, kol masė suanglėja ir nelieka putų; tada šildoma stipriau tol, kol tirpalas pradeda nuolat virti. Kaitinimas yra pakankamas, jei verdanti rūgštis kondensuojasi ant kolbos sienelių. Reikia žiūrėti, kad neperkaistų šoninės kolbos sienelės ir prie jų nepriliptų organinių medžiagų dalelių.

Kai tirpalas tampa skaidrus ir šviesiai žalias, virinama dar dvi valandas, vėliau paliekama atvėsti.

5.2 *Distiliavimas*

Atsargiai įpilama pakankamai vandens, kad visiškai ištirptų sulfatai. Paliekama atvėsti ir įdedamos kelios cinko granulės (3.3). Tęsiama pagal 5.2.1 arba 5.2.2.

5.2.1 Distiliavimas į sieros rūgštį

Į distiliavimo aparato surinkimo kolbą įpilama lygiai 25 ml sieros rūgšties (3.5) arba (3.7) tirpalo, atsižvelgiant į tai, kiek ėminyje galėtų būti azoto. Įlašinami keli lašai metilraudonojo indikatoriaus (3.8).

▼B

Skaidymo aparato kolba prijungiama prie distiliavimo aparato kondensatoriaus, kurio antgalis ne mažiau kaip per centimetrą įmerkiamas į surinkimo kolboje esantį skystį (žr. 8.3 pastabą). Neleidžiant amoniakui garuoti (žr. 8.1 pastabą), į kolbą lėtai įpilama 100 ml natrio hidroksido tirpalo (3.9). Kolba kaitinama tol, kol amoniakas baigiamas distiliuoti.

5.2.2 Distiliavimas į boro rūgštį

Jei amoniakas distiliate titruojamas rankiniu būdu, taikoma toliau nurodyta procedūra. Jei distiliavimo įrenginys yra visiškai automatizuotas, įskaitant amoniako distiliate titravimą, laikomasi gamintojo instrukcijų dėl distiliavimo įrenginio naudojimo.

Surinkimo kolba su 25 ml–30 ml boro rūgšties tirpalo (3.18) statoma po kondensatoriaus išleidžiamuoju antgaliu taip, kad tiekimo vamzdis būtų žemiau boro rūgšties perteklių turinčio tirpalo paviršiaus. Distiliavimo įrenginys nustatomas dozuoti 50 ml natrio hidroksido tirpalo (3.9). Distiliavimo įrenginys naudojamas pagal gamintojo instrukcijas ir amoniakas distiliuojamas įpilant natrio hidroksido tirpalo. Distiliatas surenkamas į boro rūgšties tirpalą. Distiliato kiekis (distiliavimo garais trukmė) priklauso nuo azoto kiekio ėminyje. Laikomasi gamintojo instrukcijų.

Pastaba. Pusiau automatizuotame distiliavimo įrenginyje natrio hidroksido pertekliaus įpylimas ir distiliavimas garais atliekamas automatiškai.

5.3 *Titravimas*

Tęsiama pagal 5.3.1 arba 5.3.2.

5.3.1 Sieros rūgštis

Atsižvelgiant į naudotos sieros rūgšties koncentraciją, sieros rūgšties perteklius surinkimo kolboje titruojamas natrio šarmo (3.10 arba 3.11) tirpalu tol, kol pasiekiamas ekvivalentinis taškas.

5.3.2 Boro rūgštis

Surinkimo kolbos turinys titruojamas iš biuretės vandenilio chlorido rūgšties standartiniu tūrinės titrimetrijos tirpalu (3.19) arba sieros rūgšties standartiniu tūrinės titrimetrijos tirpalu (3.6) ir užrašomas sunaudoto titranto tūris.

Kai ekvivalentinis taškas nustatomas kolorimetriškai, ekvivalentinis taškas pasiekiamas, pirmą kartą atsiradus tirpalo rožinei spalvai. Biuretės rodmuo įvertinamas 0,05 ml tikslumu. Apšviesta magnetinė maišyklė arba fotometrinis detektorius gali padėti lengviau pamatyti ekvivalentinį tašką.

Tai galima atlikti automatiškai, naudojant distiliavimo garais įrenginį su automatiniu titravimu.

Konkretus distiliatorius (titratorius) naudojamas pagal gamintojo instrukcijas.

Pastaba. Naudojant automatizuotą titravimo sistemą, titruoti pradedama iškart, kai prasideda distiliavimas ir sunaudojama 1 % boro rūgšties tirpalo (3.18).

▼B

Jei naudojamas visiškai automatizuotas distiliavimo įrenginys, amoniako automatinį titravimą galima atlikti naudojant potenciometrinę pH sistemą ekvivalentiniam taškui nustatyti.

Šiuo atveju naudojamas automatinis titratorius su pH-metru. pH-metras tinkamai sukalibruotas pH 4–pH 7 intervale pagal įprastas laboratorines pH-metro kalibravimo procedūras.

Titravimo ekvivalentinis taškas pagal pH atitinka pH vertę 4,6, šis taškas yra stačiausias titravimo kreivės taškas (perlinkio taškas).

5.4 *Tuščiasis bandymas*

Siekiant patvirtinti, kad reagentai neturi azoto, atliekamas tuščiasis bandymas (skaidymas, distiliavimas ir titravimas), vietoj ėminio naudojant 1 g sacharozės (3.14).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Apskaičiuojama pagal 6.1 arba 6.2.

6.1 *Apskaičiavimas titruojant pagal 5.3.1*

Žalių baltymų kiekis, išreikštas svorio procentais, apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0{,}014 \times 100 \times 6{,}25}{m}$$

kurioje:

V_0 = NaOH (3.10 arba 3.11) tūris, sunaudotas tuščiajam bandymui, ml;
V_1 = NaOH (3.10 arba 3.11) tūris, sunaudotas ėminiui titruoti, ml;
c = natrio hidroksido (3.10 arba 3.11) koncentracija, mol/l;
m = ėminio svoris, g.

6.2 *Apskaičiavimas titruojant pagal 5.3.2*

6.2.1 Titravimas vandenilio chlorido rūgštimi

Žalių baltymų kiekis, išreikštas svorio procentais, apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1{,}4 \times 6{,}25}{m}$$

kurioje:

m = tiriamosios dalies svoris, g;
c = vandenilio chlorido rūgšties standartinio tūrinės titrimetrijos tirpalo (3.19) koncentracija, mol/l;
V_0 = tuščiajam bandymui sunaudotas vandenilio chlorido rūgšties tūris, ml;
V_1 = tiriamajai daliai sunaudotas vandenilio chlorido rūgšties tūris, ml.

6.2.2 Titravimas sieros rūgštimi

Žalių baltymų kiekis, išreikštas svorio procentais, apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2{,}8 \times 6{,}25}{m}$$

▼B

kurioje:

m = tiriamosios dalies svoris, g;
c = sieros rūgšties standartinio tūrinės titrimetrijos tirpalo (3.6) koncentracija, mol/l;
V_0 = tuščiajam bandymui sunaudotas sieros rūgšties (3.6) tūris, ml;
V_1 = tiriamajai daliai sunaudotas sieros rūgšties (3.6) tūris, ml.

7. **Metodo tikrinimas**

7.1 *Pakartojamumas*

Dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius to paties ėminio matavimus, skirtumas neturi būti didesnis nei:

— 0,2 % absoliučiąja verte, kai žalių baltymų kiekis mažesnis nei 20 %,

— 1,0 % didžiausios vertės, kai žalių baltymų kiekis 20–40 %,

— 0,4 % absoliučiąja verte, kai žalių baltymų kiekis didesnis nei 40 %.

7.2 *Tikslumas*

Atliekama 1,5–2,0 g acetanilido (3.13) analizė (skaidymas, distiliavimas ir titravimas), įdėjus 1 g sacharozės (3.14). 1 g acetilanilido sunaudoja 14,80 ml sieros rūgšties (3.5). Išgavos dydis turi būti ne mažesnis nei 99 %.

8. **Pastabos**

8.1 Aparatūra gali būti rankinio, pusiau automatinio arba automatinio tipo. Jei naudojama aparatūra, kai ėminį po skaidymo reikia supilti į distiliavimo įrenginį, turi būti supilama be nuostolių. Jei distiliavimo aparato kolba neturi lašinamojo piltuvo, natrio šarmo tirpalas įpilamas prieš pat kolbą prijungiant prie kondensatoriaus, skystį iš lėto pilant kolbos sienele.

8.2 Jei skaidymo produktas sukietėja, analizė pradedama iš naujo su didesniu nei pirmiau nurodyta sieros rūgšties tirpalo (3.4) kiekiu.

8.3 Produktams, kuriuose azoto kiekis nedidelis, į surinkimo kolbą įpilamo sieros rūgšties tirpalo (3.7) tūris prireikus gali būti sumažintas iki 10 arba 15 ml, skiedžiant vandeniu iki 25 ml.

8.4 Atliekant įprastą analizę, galima taikyti alternatyviuosius metodus žalių baltymų kiekiui nustatyti, bet šioje C dalyje aprašytas Kjeldalio metodas yra pamatinis metodas. Rezultatų gautų alternatyviaisiais metodais (pvz., DUMAS) lygiavertiškumas palyginti su pamatiniu metodu turi būti įrodytas kiekvienai matricai atskirai. Kadangi alternatyviuoju metodu gauti rezultatai ir pamatiniu metodu gauti rezultatai gali šiek tiek skirtis, netgi patikrinus lygiavertiškumą, analizės ataskaitoje būtina nurodyti žalių baltymų kiekiui nustatyti taikytą analizės metodą.

D. KARBAMIDO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti karbamido kiekį pašaruose.

▼B

2. **Metodas**

Ėminys suspenduojamas vandenyje kartu su skaidrinančiąja medžiaga. Suspensija filtruojama. Dedama 4-dimetilaminobenzaldehido (4-DMAB) ir karbamido kiekis filtrate nustatomas matuojant optinį tankį, esant bangos ilgiui 420 nm.

3. **Reagentai**

3.1 4-dimetilaminobenzaldehido tirpalas: 1,6 g 4-DMAB ištirpinama 100 ml 96 % etanolio ir įpilama 10 ml vandenilio chlorido rūgšties (ρ_{20} = 1,19 g/ml). Šį reagentą galima laikyti ne ilgiau kaip dvi savaitės.

3.2 *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.3 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.4 Aktyvintosios anglys, kurios nesugeria karbamido (turi būti patikrinta).

3.5 Karbamido 0,1 % (m/V) tirpalas.

4. **Aparatūra**

4.1 Maišiklis (vartytuvas), apsisukimų dažnis maždaug 35–40 min^{-1}.

4.2 Mėgintuvėliai: 160 × 16 mm su šlifo kamščiais.

4.3 Spektrofotometras.

5. **Procedūra**

5.1 *Ėminio analizė*

1 mg tikslumu pasveriama 2 g ėminio, kuris kartu su 1 g aktyvintų anglių (3.4) supilamas į 500 ml matavimo kolbą. Įpilama 400 ml vandens ir 5 ml *Carrez* I (3.2) tirpalo, maždaug 30 s maišoma ir įpilama 5 ml *Carrez* II (3.3) tirpalo. Trisdešimt minučių tirpalas maišomas vartytuve. Tirpalas skiedžiamas vandeniu iki žymės, sumaišomas ir filtruojamas.

Į mėgintuvėlius su šlifo kamščiais įpilama 5 ml skaidraus bespalvio filtrato, 5 ml 4-DMAB tirpalo (3.1) ir sumaišoma. Mėgintuvėliai statomi į vandens vonią 20 °C (+/- 4 °C) temperatūroje. Po penkiolikos minučių spektrofotometru matuojamas ėminio tirpalo optinis tankis, esant 420 nm bangos ilgiui. Palyginamuoju tirpalu naudojamas tuščiam ėminiui ruošti naudojamų reagentų tirpalas.

5.2 *Kalibravimo kreivė*

Į 100 ml matavimo kolbas įpilama 1, 2, 4, 5 ir 10 ml karbamido tirpalo (3.5) ir skiedžiama vandeniu iki žymės. Paimama po 5 ml kiekvieno tirpalo, į kiekvieną iš jų įpilama 5 ml 4-DMAB tirpalo (3.1), sumaišoma ir, kaip nurodyta anksčiau, matuojamas jų optinis tankis, lyginant su kontroliniu tirpalu, turinčiu 5 ml 4-DMAB ir 5 ml vandens, neturinčio karbamido. Brėžiama kalibravimo kreivė.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Pagal kalibravimo kreivę nustatomas karbamido kiekis ėminyje.

Rezultatas išreiškiamas ėminio masės procentais.

7. **Pastabos**

7.1 Tais atvejais, kai karbamido kiekis yra didesnis nei 3 %, imama 1 g ėminio arba pradinis tirpalas skiedžiamas tiek, kad jo 500 ml būtų ne daugiau nei 50 mg karbamido.

▼B

7.2 Tuo atveju, kai karbamido yra mažai, ėminio kiekis padidinamas tiek, kad filtratas dar liktų skaidrus ir bespalvis.

7.3 Jei ėminyje yra nesudėtingų azoto junginių, pvz., aminorūgščių, optinis tankis matuojamas esant 435 nm bangos ilgiui.

E. LAKIŲJŲ AZOTO BAZIŲ NUSTATYMAS

I. **MIKRODIFUZIJOS METODAS**

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti pašaruose esančių lakiųjų azoto bazių kiekį, išreikštą amoniaku.

2. **Metodas**

Ėminys ekstrahuojamas vandeniu, tirpalas skaidrinamas ir filtruojamas. Lakiosios azoto bazės išstumiamos mikrodifuzijos būdu, naudojant kalio karbonato tirpalą, surenkamos boro rūgšties tirpale ir titruojamos sieros rūgštimi.

3. **Reagentai**

3.1 Trichloracto rūgšties tirpalas, 20 % (m/V).

3.2 Indikatorius: 33 mg bromkrezolio žaliojo ir 65 mg metilraudonojo ištirpinama 100 ml 95–96 % (V/V) etanolio.

3.3 Boro rūgšties tirpalas: 1 l matavimo kolboje ištirpinama 10 g boro rūgšties, 200 ml 95–96 % (V/V) etanolio ir 700 ml vandens. Įpilama 10 ml indikatoriaus (3.2). Sumaišoma ir, jei reikia, gaunama šviesiai raudona tirpalo spalva, įpilant natrio hidroksido tirpalo. 1 ml šio tirpalo suriša ne daugiau nei 300 μg NH_3.

3.4 Sotusis kalio karbonato tirpalas: 100 ml verdančio vandens ištirpinama 100 g kalio karbonato. Atvėsinama ir filtruojama.

3.5 Sieros rūgštis 0,01 mol/l.

4. **Aparatūra**

4.1 Maišiklis (vartytuvas), apsisukimų dažnis maždaug 35–40 min^{-1}.

4.2 Stiklinės arba plastikinės *Conway* kiuvetės (žr. schemą).

4.3 Mikrobiuretės, graduotos 1/100 ml padalomis.

5. **Procedūra**

10 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu ir naudojant 100 ml vandens supilama į 200 ml matavimo kolbą. 30 min maišoma maišymo būgne. Įpilama 50 ml trichloracto rūgšties tirpalo (3.1), skiedžiama vandeniu iki žymės, stipriai supurtoma ir filtruojama per gofruotąjį filtrą.

Pipete įlašinama 1 ml boro rūgšties tirpalo (3.3) į *Conway* kiuvetės centrinę dalį ir 1 ml ėminio filtrato į kiuvetės išorinį žiedą. Iš dalies uždengiama tepalu suteptu dangčiu. Į išorinį žiedą greitai įlašinama 1 ml sočiojo kalio karbonato tirpalo (3.4) ir uždengiama taip, kad į kiuvetę nepatektų oro. Kiuvetė atsargiai sukiojama apie ašį horizontalioje plokštumoje taip, kad abu reagentai susimaišytų. Inkubuojama kambario temperatūroje bent keturias valandas arba 40 °C temperatūroje vieną valandą.

Lakiosios bazės boro rūgšties tirpale iš mikrobiuretės (4.3) titruojamos 0,01 mol/l sieros rūgštimi (3.5).

Pagal tą pačią procedūrą atliekamas tuščiasis bandymas, bet be analizuojamo ėminio.

▼B

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

1 ml 0,01 mol/l H_2SO_4 atitinka 0,34 mg amoniako.

Rezultatai išreiškiami ėminio masės procentais.

Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečiai atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas ne didesnis nei:

— 10 % santykinės vertės, kai amoniako kiekis mažesnis nei 1,0 %;

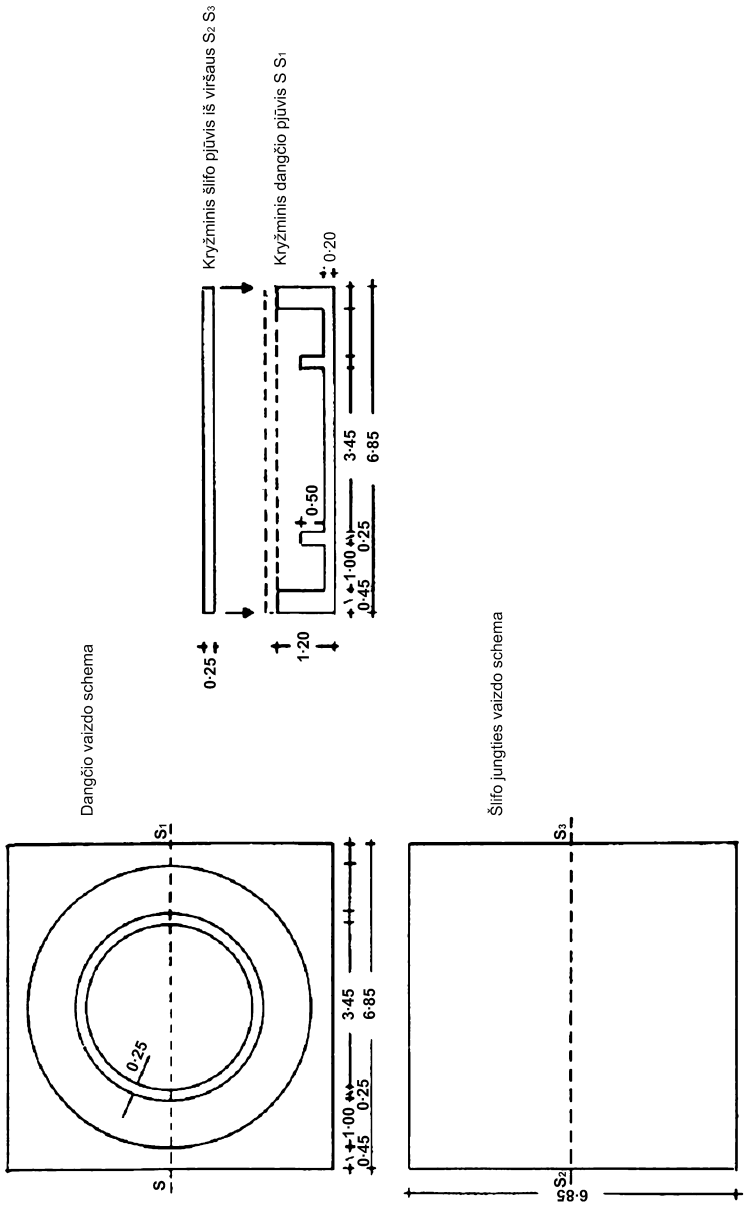
— 0,1 % absoliučiąja verte, kai amoniako kiekis 1,0 % arba didesnis.

7. **Pastaba**

Jei amoniako kiekis ėminyje didesnis nei 0,6 %, pradinis filtratas skiedžiamas.

CONWAY CELL

Scale 1/1



▼B

II **DISTILIAVIMO METODAS**

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti lakiųjų azoto bazių kiekį, išreikštą amoniaku, žuvies miltuose, kuriuose beveik nėra karbamido. Jį galima taikyti tik mažesniam nei 0,25 % amoniako kiekiui.

2. **Metodas**

Ėminys ekstrahuojamas vandeniu, tirpalas skaidrinamas ir filtruojamas. Lakiosios azoto bazės išstumiamos virimo temperatūroje, pridedant magnio oksido, ir surenkamos tam tikrame kiekyje sieros rūgšties, kurios perteklius atvirkščiai titruojamas natrio hidroksido tirpalu.

3. **Reagentai**

3.1 Trichloracto rūgšties tirpalas, 20 % (m/V).

3.2 Magnio oksidas.

3.3 Priešpučio emulsija (pvz., siloksanas).

3.4 Sieros rūgšties 0,05 mol/l tirpalas.

3.5 Natrio hidroksido 0,1 mol/l tirpalas.

3.6 Metilraudonojo tirpalas, 0,3 % tirpalas 95–96 % (V/V) etanolyje.

4. **Aparatūra**

4.1 Maišiklis (vartytuvas), dažnis maždaug 35–40 sūk./min.

4.2 Distiliavimo aparatas, Kjeldalio tipo.

5. **Procedūra**

10 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu ir naudojant 100 ml vandens supilama į 200 ml matavimo kolbą. 30 min maišoma maišymo būgne. Įpilama 50 ml trichloracto rūgšties tirpalo (3.1), skiedžiama vandeniu iki žymės, stipriai supurtoma ir filtruojama per gofruotąjį filtrą.

Paimamas skaidraus filtrato kiekis, atitinkantis numatomą lakiųjų azoto bazių kiekį (paprastai reikia 100 ml). Skiedžiama iki 200 ml, įdedama 2 g magnio oksido (3.2) ir įlašinami keli lašai priešpučio emulsijos (3.3). Tirpalas turi būti šarminis pagal lakmusą; priešingu atveju įdedama dar šiek tiek magnio oksido (3.2). Tęsiama pagal analizės metodo, taikomo žalių baltymų kiekiui nustatyti (šio priedo C dalis), 5.2 ir 5.3 punktus.

Pagal tą pačią procedūrą atliekamas *tuščiasis bandymas*, bet be analizuojamo ėminio.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

1 ml 0,05 mol/l H_2SO_4 atitinka 1,7 mg amoniako.

Rezultatai išreiškiami ėminio masės procentais.

Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečiai atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas ne didesnis nei 10 % amoniako santykinės vertės.

F. AMINO RŪGŠČIŲ (IŠSKYRUS TRIPTOFANĄ) NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Naudojant aminorūgščių analizatorių, šiuo metodu galima nustatyti laisvųjų (sintetinių ir gamtinių) amino rūgščių ir suminį (peptidų ir laisvųjų) aminorūgščių kiekį pašaruose. Šis metodas tinka šioms aminorūgštims:

▼B

cisteinui (cistinui), metioninui, lizinui, treoninui, alaninui, argininui, asparto ir glutamino rūgštims, glicinui, histidinui, izoleucinui, leucinui, fenilalaninui, prolinui, serinui, tirozinui ir valinui.

Šiuo metodu negalima atskirti aminorūgščių druskų ir negalima atskirti aminorūgščių D-ir L-formų. Metodas netinka triptofano arba hidroksigrupę turintiems aminorūgščių analogams nustatyti.

2. **Metodas**

2.1 *Laisvosios aminorūgštys*

Laisvosios aminorūgštys ekstrahuojamos praskiesta vandenilio chlorido rūgštimi. Kartu ekstrahuojamos azoto turinčios makromolekulės nusodinamos sulfosalicilo rūgštimi ir atskiriamos filtruojant. Nustatoma filtruoto tirpalo pH vertė 2,20. Aminorūgštys atskiriamos jonų mainų chromatografija ir nustatomos fotometriškai vykdant reakciją su ninhidrinu, kai bangos ilgis 570 nm.

2.2 *Suminis aminorūgščių kiekis*

Pasirinkta procedūra priklauso nuo tiriamų aminorūgščių. Cisteinas (cistinas) ir metioninas prieš hidrolizę turi būti oksiduojami iki cistino rūgšties ir metionino sulfono. Tirozinas turi būti nustatomas neoksiduotų ėminių hidrolizatuose. Visos kitos 1 skirsnyje išvardytos aminorūgštys gali būti nustatomos arba oksiduotuose, arba neoksiduotuose ėminiuose.

Oksidacija atliekama peroksiskruzdžių rūgšties ir fenolio mišiniu 0 °C temperatūroje. Oksidacijos reagento perteklius skaidomas natrio disulfitu. Oksiduoti ar neoksiduoti ėminiai 23 valandas hidrolizuojami vandenilio chlorido rūgštimi (3.20). Nustatoma hidrolizatų pH vertė 2,20. Aminorūgštys atskiriamos taikant jonų mainų chromatografiją ir nustatomos fotometriniu metodu vykdant reakciją su ninhidrinu, esant 570 nm (prolinui – 440 nm).

3. **Reagentai**

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

3.1 Vandenilio peroksidas, w (w/w) = 30 %.

3.2 Skruzdžių rūgštis, w (w/w) = 98–100 %.

3.3 Fenolis.

3.4 Natrio disulfitas.

3.5 Natrio hidroksidas.

3.6 5-sulfosalicilo rūgšties dihidratas.

3.7 Vandenilio chlorido rūgštis, tankis maždaug 1,18 g/ml.

3.8 trinatrio citrato dihidratas.

3.9 2,2'-tiodietanolis (tiodiglikolis).

3.10 Natrio chloridas.

3.11 Ninhidrinas.

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

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

▼B

3.14 Azoto dujos (< 10 ppm deguonies).

3.15 1-oktanolis.

3.16 Aminorūgštys.

3.16.1 1 skirsnyje išvardytų medžiagų etalonai. Grynieji junginiai, neturintys kristalizacinio vandens. Džiovinami vakuume virš P_2O_5 arba 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 skiedžiama iki 1 litro.

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

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

3.19 Skruzdžių rūgšties ir fenolio tirpalas:

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

3.20 Hidrolizės mišinys, c = 6 mol/l HCl tirpalas, turintis 1 g/l fenolio:

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

3.21 Ekstrahavimo mišinys, c = 0,1 mol/l HCl tirpalas, turintis 2 % tiodiglikolio: paimama 8,2 ml HCl (3.7), skiedžiama maždaug 900 ml vandens, įpilama 20 ml tiodiglikolio (3.9) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro (tiesiogiai nemaišyti 3.7 ir 3.9).

3.22 5-sulfosalicilo rūgštis, ß = 6 %:

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

3.23 Oksidavimo mišinys (peroksiskruzdžių rūgštis ir fenolis):

Mažoje stiklinėje sumaišoma 0,5 ml vandenilio peroksido (3.1) ir 4,5 ml skruzdžių rūgšties bei fenolio tirpalo (3.19). Laikoma 1 val. 20–30 °C temperatūroje, kad susidarytų peroksiskruzdžių rūgštis, ir prieš supilant į ėminį šaldoma ledo ir vandens vonioje (15 min).

Įspėjimas. Vengiama patekimo ant odos ir dėvimi apsauginiai drabužiai.

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

maždaug 800 ml vandens ištirpinama 19,61 g natrio citrato (3.8), 5 ml tiodiglikolio (3.9), 1 g fenolio (3.3) ir 16,50 ml HCl (3.7). Nustatoma pH vertė 2,20. Skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

3.25 Plovimo buferiniai tirpalai, paruošti pagal naudojamo analizatoriaus (4.9) sąlygas.

3.26 Ninhidrino reagentas ruošiamas pagal analizatoriaus (4.9) sąlygas.

3.27 Aminorūgščių etaloniniai tirpalai. Šie tirpalai laikomi žemesnėje nei 5 °C temperatūroje.

▼B

3.27.1 Aminorūgščių pradiniai etaloniniai tirpalai (3.16.1).

c = 2,5 μmol/ml kiekvienos rūgšties tirpalas vandenilio chlorido rūgštyje.

Galima naudoti esančius prekyboje.

3.27.2 Cistino rūgšties ir metionino sulfono pradinis etaloninis 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 skiedžiama citratiniu buferiniu tirpalu. Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 12 mėnesių. Šis tirpalas nenaudojamas, jei pradiniame etaloniniame tirpale (3.27.1) yra cistino rūgšties ir metionino sulfono.

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

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

3.27.4 Etaloninių aminorūgščių kalibravimo tirpalas, naudojamas hidrolizatams, c = 5 nmol/50 μl cistino rūgšties ir metionino sulfono ir c = 10 nmol/50 μl kitų aminorūgščių. 2,2 g natrio chlorido (3.10) ištirpinama 30 ml citratinio buferinio tirpalo (3.24) 100 ml stiklinėje. Įpilama 4,00 ml aminorūgščių pradinio etaloninio tirpalo (3.27.1), 4,00 ml cistino rūgšties ir metionino sulfono pradinio etaloninio tirpalo (3.27.2) ir 0,50 ml pradinio vidinio etalono tirpalo (3.27.3), jei naudojamas. Natrio hidroksidu (3.18) nustatoma pH vertė 2,20.

Kiekybiškai supilama į 50 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės citratiniu buferiniu tirpalu (3.24) ir sumaišoma.

Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 3 mėnesius.

Žr. dar 9.1 pastabą.

3.27.5 Etaloninių aminorūgščių kalibravimo tirpalas, naudojamas hidrolizatams, paruoštiems pagal 5.3.3.1 punktą, ir ekstraktams (5.2). Kalibravimo tirpalas ruošiamas pagal 3.27.4, bet nededama natrio chlorido.

Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 3 mėnesius.

4. **Aparatūra**

4.1 100 arba 250 ml apvaliadugnė kolba su grįžtamuoju kondensatoriumi.

4.2 100 ml borosilikatinio stiklo butelis su užsukamu kamščiu ir guminiu ar teflioniniu tarpikliu (pvz.: *Duran, Schott*), tinkamas naudoti krosnyje.

4.3 Ventiliuojama krosnis su temperatūros reguliatoriumi, kurio tikslumas geresnis nei ± 2 °C.

4.4 pH-metras (trys skaičiai po kablelio).

4.5 Membraninis filtras (0,22 μm).

4.6 Centrifuga.

4.7 Sukamasis vakuuminis garintuvas.

4.8 Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.

▼B

4.9 Aminorūgščių analizatorius arba HPLC įranga su jonų mainų kolonėle, reakcijos su ninhidrinu įtaisu, darinių gavimo įtaisu ir fotometriniu detektoriumi.

Kolonėlės įkrova – sulfoninto polistireno dervos, galinčios atskirti aminorūgštis vieną nuo kitos ir nuo kitų su ninhidrinu reaguojančių medžiagų. Srautas buferinio tirpalo ir ninhidrino sistemose reguliuojamas siurbliais, srauto stabilumas – ±0,5 % kalibravimo tirpalo ir ėminio analizės metu.

Su kai kuriais aminorūgščių analizatoriais galima naudoti hidrolizės procedūras, kai hidrolizato natrio jonų koncentracija c = 0,8 mol/l ir jame yra visas po oksidacijos likęs skruzdžių rūgšties perteklius. Kitais analizatoriais negalima tinkamai atskirti tam tikras aminorūgštis, jei hidrolizate yra skruzdžių rūgšties perteklius ir (arba) didelė natrio jonų koncentracija. Tokiu atveju po hidrolizės ir prieš pH nustatymą, rūgšties tūris sumažinamas maždaug iki 5 ml ją garinant. Garinama vakuume ne aukštesnėje nei 40 °C temperatūroje.

5. **Procedūra**

5.1 *Ėminio ruošimas*

Ėminys sumalamas taip, kad jį būtų galima sijoti per 0,5 mm sietą. Daug drėgmės turintys ėminiai prieš malimą turi būti džiovinami ore ne didesnėje nei 50 °C temperatūroje arba liofilizuojami. Daug riebalų turintys ėminiai prieš malimą ekstrahuojami petroleteriu (3.12).

5.2 *Laisvųjų amino rūgščių nustatymas pašaruose ir premiksuose*

Į kūginę kolbą 0,2 mg tikslumu pasveriamas atitinkamas paruošto ėminio (5.1) kiekis (1–5 g) ir įpilama 100,0 ml ekstrahavimo mišinio (3.21). Mišinys maišomas 60 min mechanine purtykle arba magnetine maišykle (4.8). Nuosėdoms leidžiama nusėsti ir 10,0 ml tirpalo virš nuosėdų paimama pipete į 100 ml stiklinę.

Maišant įpilama 5,0 ml sulfosalicilo rūgšties tirpalo (3.22) ir maišoma magnetine maišykle 5 min. Tirpalas virš nuosėdų filtruojamas arba centrifuguojamas visoms nuosėdoms pašalinti. 10,0 ml gauto tirpalo įpilama į 100 ml stiklinę, natrio hidroksido tirpalu (3.18) nustatoma pH vertė 2,20, plaunant citratiniu buferiniu tirpalu (3.24) supilama į tinkamo tūrio matavimo kolbą ir citratiniu buferiniu tirpalu (3.24) skiedžiama iki žymės.

Jei naudojamas vidinis etalonas, įpilama 1,00 ml vidinio etalono (3.27.3) kiekvienam 100 ml gauto tirpalo ir skiedžiama iki žymės buferiniu tirpalu (3.24).

Atliekama chromatografinė analizė pagal 5.4 punktą.

Jei ekstraktai netiriami tą pačią dieną, jie turi būti laikomi žemesnėje nei 5 °C temperatūroje.

5.3 *Suminio aminorūgščių kiekio nustatymas*

5.3.1 O k s i d a v i m a s

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

— į 100 ml apvaliadugnę kolbą (4.1) hidrolizei atvirame inde (5.3.23), arba

▼B

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

— į 100 ml butelį su užsukamu kamščiu (4.2) hidrolizei uždarytame inde (5.3.2.4).

Pasvertojoje ėminio dalyje azoto turi būti apie 10 mg, o drėgmės ne daugiau nei 100 mg.

Kolba (butelis) dedama į ledo ir vandens vonią, atšaldoma iki 0 °C, įpilama 5 ml oksidavimo mišinio (3.23) ir maišoma stikline mentele su lenktu galu. Kolba (butelis) kartu su viduje esančia mentele uždengiama orui nepralaidžia plėvele, ledo ir vandens vonia su taip uždarytu indu dedama į šaldytuvą, kuriame temperatūra 0 °C, ir laikoma jame 16 valandų. Po 16 valandų indas išimamas iš šaldytuvo ir oksidavimo reagento perteklius suskaidomas, pridedant 0,84 g natrio disulfito (3.4).

Tęsiama pagal 5.3.2.1.

5.3.2 Hidrolizė

5.3.2.1 *Oksiduotų ėminių hidrolizė*

Į oksiduotą ėminį, paruoštą pagal 5.3.1, įpilama 25 ml hidrolizavimo mišinio (3.20), nuplaunant prie indo sienelių ir mentelės prilipusius ėminio likučius.

Atsižvelgiant į taikomą procedūrą, tęsiama pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4.

5.3.2.2 *Neoksiduotų ėminių hidrolizė*

Į 100 ml ar 250 ml apvaliadugnę kolbą (4.1) ar į 100 ml butelį su užsukamu kamščiu (4.2) 0,2 mg tikslumu pasveriama 0,1–1 g paruošto ėminio (5.1). Pasvertoje ėminio dalyje azoto turi būti apie 10 mg. Atsargiai įpilama hidrolizavimo mišinio (3.20) ir sumaišoma su ėminiu. Tęsiama pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4.

5.3.2.3 *Hidrolizė atvirame inde*

Į kolbą su mišiniu (paruoštu pagal 5.3.2.1 ar 5.3.2.2) įdedami 3 stikliniai rutuliukai ir 23 valandas virinama su grįžtamuoju kondensatoriumi. Hidrolizei pasibaigus, kondensatorius išplaunamas 5 ml citratinio buferinio tirpalo (3.24). Kolba nuimama ir atšaldoma ledo vonioje.

Tęsiama pagal 5.3.3.

5.3.2.4 *Hidrolizė uždarame inde*

Butelis su mišiniu, paruoštu pagal 5.3.2.1 arba 5.3.2.2, dedamas į krosnį (4.3) 110 °C temperatūroje. Kad slėgis nedidėtų (dėl dujinių medžiagų susidarymo) ir būtų išvengta sprogimo, pirmąją hidrolizės valandą užsukamas kamštis dedamas ant indo viršaus. Kamštis neužsukamas. Po valandos kamštis užsukamas ir indas laikomas krosnyje 23 valandas. Hidrolizei pasibaigus, indas išimamas iš krosnies, kamštis atsargiai atsukamas ir butelis statomas į ledo ir vandens vonią. Paliekama atvėsti.

Atsižvelgiant į pH reguliavimo procedūrą (5.3.3), butelio turinys kiekybiškai supilamas į 250 ml stiklinę arba 250 ml apvaliadugnę kolbą, naudojant citratinį buferinį tirpalą (3.24).

Tęsiama pagal 5.3.3.

▼B

5.3.3 pH reguliavimas

Atsižvelgiant į aminorūgščių analizatoriaus (4.9) jautrumą natriui, pH reguliavimas tęsiamas pagal 5.3.3.1 arba 5.3.3.2.

5.3.3.1 *Chromatografinės analizės sistemos (4.9), kurioms reikia mažos natrio koncentracijos*

Kai naudojami aminorūgščių analizatoriai, kuriems reikia mažos natrio jonų koncentracijos (kai turi būti sumažintas rūgšties tūris), patariama naudoti pradinį vidinio etalono tirpalą (3.27.3).

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

Į hidrolizatus, gautus pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4, įlašinami 2 lašai 1-oktanolio.

Sukamajame garintuve (4.7) garinant vakuume ir 40 °C temperatūroje, tūris sumažinamas iki 5–10 ml. Jei netyčia tūris sumažėja iki mažesnio nei 5 ml tūrio, hidrolizatas turi būti išpiltas ir analizė atliekama iš naujo.

Natrio hidroksido tirpalu (3.18) nustatoma pH vertė 2,20 ir toliau tęsiama pagal 5.3.4.

5.3.3.2 *Visiems kitiems aminorūgščių analizatoriams (4.9)*

Hidrolizatai, gauti pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4, iš dalies neutralizuojami atsargiai įpilant 17 ml natrio hidroksido tirpalo (3.17), tirpalą visą laiką maišant ir žiūrint, kad temperatūra būtų žemesnė nei 40 °C.

Kambario temperatūroje nustatoma pH vertė 2,20, naudojant natrio hidroksido tirpalą (3.17) ir vėliau natrio hidroksido tirpalą (3.18). Tęsiama pagal 5.3.4.

5.3.4 Ėminio tirpalas chromatografijai

Hidrolizatas, kurio pH vertė nustatyta (5.3.3.1 arba 5.3.3.2), kiekybiškai supilamas į 200 ml matavimo kolbą naudojant citratinį buferinį tirpalą (3.24), ir skiedžiama iki žymės buferiniu tirpalu (3.24).

Jei vidinis etalonas dar nebuvo naudotas, įpilama 2,00 ml vidinio etalono (3.27.3) ir iki žymės skiedžiama citratiniu buferiniu tirpalu (3.24). Gerai sumaišoma.

Atliekama chromatografinė analizė (5.4).

Jei ėminių tirpalai netiriami tą pačią dieną, jie turi būti laikomi žemesnėje nei 5 °C temperatūroje.

5.4 *Chromatografija*

Prieš atliekant chromatografinę analizę ekstraktui (5.2) arba hidrolizatui (5.3.4) leidžiama pasiekti kambario temperatūrą. Mišinys kratomas ir filtruojamas per 0,22 μm membraninį filtrą (4.5). Aminorūgščių analizatoriumi (4.9) atliekama gauto skaidraus tirpalo jonų mainų chromatografija.

Įpurkšti galima rankiniu būdu arba automatiškai. Svarbu, kad matuojant etalonus ir ėminius į kolonėlę ± 0,5 % tikslumu būtų įpurškiamas vienodas tirpalo tūris, išskyrus atvejus, kai naudojamas vidinis etalonas, ir kad natrio bei aminorūgščių santykis etalone ir ėminio tirpale būtų kiek įmanoma vienodesnis.

▼B

Paprastai kalibravimo dažnis priklauso nuo ninhidrino reagento stabilumo ir analizinės sistemos. Etalonas arba ėminys skiedžiamas citratiniu buferiniu tirpalu (3.24), kad etalono smailės plotas sudarytų 30–200 % ėminio aminorūgšties smailės ploto.

Priklausomai nuo naudojamo analizatoriaus ir dervos tipo, aminorūgščių chromatografija šiek tiek skirsis. Pasirinkta sistema turi atskirti vieną aminorūgštį nuo kitos ir nuo kitų su ninhidrinu reaguojančių junginių. Atsakas į kolonėlėje analizuojamų aminorūgščių kiekio pokyčius turi būti tiesinis chromatografinės sistemos naudojimo intervale.

Atliekant chromatografinę analizę, taikomi toliau nurodyti įdubos ir viršūnės aukščių santykiai, kai analizuojamas (nustatomų aminorūgščių) ekvimolinis tirpalas. Šis ekvimolinis tirpalas turi turėti mažiausiai 30 % kiekvienos aminorūgšties, kurią galima tiksliai išmatuoti aminorūgščių analizatoriaus sistema (4.9), įkrovos didžiausio kiekio.

Norint atskirti treoniną ir seriną, žemesnės iš dviejų persiklojančių aminorūgščių smailių įdubos ir viršūnės aukščių santykis chromatogramoje neturi būti didesnis nei 2:10 (jei nustatomas tik cisteinas (cistinas), metioninas, treoninas ir lizinas, nepakankamas gretimų smailių atsiskyrimas neigiamai veiktų nustatymui). Visoms kitoms aminorūgštims atskyrimas turi būti geresnis nei 1: 10.

Sistema turi užtikrinti, kad lizinas būtų atskirtas nuo „lizino darinių“ ir ornitino.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Matuojamas ėminio ir etalono kiekvienos aminorūgšties smailės plotas ir apskaičiuojamas kiekis (*X*) aminorūgšties gramais kg ėminio:

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

Jei naudojamas vidinis etalonas, dauginama iš: $\frac{D}{C}$

A = hidrolizato arba ekstrakto smailės plotas
B = kalibravimo etaloninio tirpalo smailės plotas
C = vidinio etalono hidrolizate arba ekstrakte smailės plotas
D = vidinio etalono, kalibravimo etaloninio tirpalo smailės plotas
M = nustatomos aminorūgšties molinė masė
c = etalono koncentracija μmol/ml
m = ėminio masė (g) (su pataisa pradinei masei, jei ėminys buvo džiovinamas ar iš jo šalinami riebalai)
V = visas hidrolizato tūris (5.3.4) arba apskaičiuotas visas praskiesto ekstrakto tūris (6.1) ml

Oksiduotų ėminių hidrolizatuose cistinas ir cisteinas nustatomi kaip cistino rūgštis, bet apskaičiuojami kaip cistinas ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M = 240,30 g/mol), naudojant M = 120,15 g/mol (0,5 × 240,30).

Metioninas nustatomas kaip metionino sulfonas oksiduoto ėminio hidrolizatuose, bet apskaičiuojamas kaip metioninas, naudojant metionino M = 149,21 g/mol.

▼B

Įdėtas laisvasis metioninas nustatomas po ekstrakcijos kaip metioninas, apskaičiavimui naudojant tą pačią molinę masę.

6.1 Visas praskiesto ekstrakto tūris (F) laisvosioms aminorūgštims (5.2) nustatyti apskaičiuojamas taip:

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

V = galutinio ekstrakto tūris

7. **Metodo įvertinimas**

Metodas buvo patikrintas 1990 m. atliekant palyginimą tarptautiniu lygiu, naudojant keturis skirtingus pašarus (mišriuosius kiaulių pašarus, broilerių kombinuotuosius pašarus, baltymų koncentratą, premiksus). Vidurkio ir standartinio nuokrypio rezultatai, gauti atmetus riktus, pateikiami šio punkto lentelėse:

Vidurkiai g/kg

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrieji kiaulių pašarai	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Broilerių kombinuotieji pašarai	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Baltymų 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 = dalyvavusių laboratorijų skaičius.

7.1 *Pakartojamumas*

Pirmiau nurodyto tarplaboratorinio palyginimo pakartojamumas, išreikštas kaip laboratorijos standartinis nuokrypis, pateiktas šiose lentelėse:

Laboratorijos standartinis nuokrypis (S_r) g/kg

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrieji kiaulių pašarai	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Broilerių kombinuotieji pašarai	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Baltymų 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 = dalyvavusių laboratorijų skaičius.

▼B

Laboratorijos standartinio nuokrypio (S_r) variacijos koeficientas (%)

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrieji kiaulių pašarai	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Broilerių kombinuotieji pašarai	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Baltymų 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 = dalyvavusių laboratorijų skaičius.

7.2 *Atkuriamumas*

Pirmiau nurodyto tarplaboratorinio palyginimo atkuriamumas, išreikštas kaip tarplaboratorinis standartinis nuokrypis, pateiktas šiose lentelėse:

Tarplaboratorinis standartinis nuokrypis (S_R) g/kg

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrieji kiaulių pašarai	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Broilerių kombinuotieji pašarai	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Baltymų 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 = dalyvavusių laboratorijų skaičius.

Tarplaboratorinis standartinio nuokrypio (S_R) variacijos koeficientas (%)

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrieji kiaulių pašarai	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Broilerių kombinuotieji pašarai	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Baltymų 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 = dalyvavusių laboratorijų skaičius.

▼B

8. **Pamatinių medžiagų naudojimas**

Tinkamas šio metodo taikymas turi būti patikrintas atliekant kartotinius sertifikuotųjų pamatinių medžiagų matavimus, jei jos yra. Rekomenduojama kalibruoti sertifikuotaisiais aminorūgščių kalibravimo tirpalais.

9. **Pastabos**

9.1 Dėl aminorūgščių analizatorių skirtumų tikrinama pagal galutinę etaloninių aminorūgščių kalibravimo tirpalų (žr. 5.27.4 ir 5.27.5) ir hidrolizatų (žr. 5.3.4) koncentraciją.

Prietaiso tiesinio atsako intervalas turi būti tikrinamas visoms aminorūgštims.

Etaloninis tirpalas skiedžiamas citratiniu buferiniu tirpalu, kad smailių plotai būtų intervalo viduryje.

9.2 Jei hidrolizatams analizuoti naudojama efektyviosios skysčių chromatografijos įranga, bandymų sąlygas reikia optimizuoti pagal gamintojo rekomendacijas.

9.3 Taikant metodą pašarams, kuriuose yra daugiau nei 1 % chloridų (koncentratai, mineraliniai pašarai, papildai), gali būti gauti sumažinti metionino rezultatai, todėl reikia numatyti specialų apdorojimą.

G. TRIPTOFANO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti pašaruose esančio triptofano suminį kiekį ir laisvąjį triptofaną. Šiuo metodu D- ir L-formos neatskiriamos.

2. **Metodas**

Suminiam triptofanui nustatyti ėminys 20 valandų hidrolizuojamas šarminėje terpėje sočiuoju bario hidroksido tirpalu 110 °C temperatūroje. Po hidrolizės įpilama vidinio etalono.

Laisvajam triptofanui nustatyti ėminys ekstrahuojamas silpnai rūgštinėje terpėje esant vidiniam etalonui.

Triptofanas ir vidinis etalonas hidrolizate ar ekstrakte nustatomi HPLC metodu naudojant fluorescencinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Turi būti naudojamas du kartus distiliuotas arba tokios pat kokybės vanduo (laidis < 10 μS/cm).

3.2 Etaloninė medžiaga: triptofanas (grynumas/kiekis ≥ 99 %), išdžiovintas vakuume virš fosforo pentoksido.

3.3 Vidinio etalono medžiaga: α-metiltriptofanas (grynumas/kiekis ≥ 99 %), išdžiovintas vakuume virš fosforo pentoksido.

3.4 Bario hidroksido oktahidratas (siekiant išvengti $BaCO_3$ susidarymo, kuris galėtų trukdyti nustatymui, užtikrinama, kad $Ba(OH)_2$ $8H_2O$ visiškai nesiliestų su oru) (žr. 9.3 pastabą).

3.5 Natrio hidroksidas.

3.6 Ortofosforo rūgštis, w = 85 %.

3.7 Vandenilio chlorido rūgštis, ρ_{20} = 1,19 g/ml.

3.8 Metanolis, HPLC grynumo.

3.9 Petroleteris, virimo temperatūros intervalas – 40–60 °C.

▼B

3.10 Natrio hidroksido tirpalas, c = 1 mol/l:

40,0 g NaOH (3.5) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 l vandeniu (3.1).

3.11 Vandenilio chlorido rūgštis, c = 6 mol/l:

paimama 492 ml HCl (3.7) ir skiedžiama iki 1 l vandeniu.

3.12 Vandenilio chlorido rūgštis, c = 1 mol/l:

paimama 82 ml HCl (3.7) ir skiedžiama iki 1 l vandeniu.

3.13 Vandenilio chlorido rūgštis, c= 0,1 mol/l:

paimama 8,2 ml HCl (3.7) ir skiedžiama iki 1 l vandeniu.

3.14 Orto fosforo rūgštis, c = 0,5 mol/l:

paimama 34 ml ortofosforo rūgšties (3.6) ir skiedžiama iki 1 l vandeniu (3.1).

3.15 Koncentruotas triptofano tirpalas (3.2), c = 2,50 μmol/ml:

į 500 ml matavimo kolbą įdedama 0,2553 g triptofano (3.2), ištirpinama vandenilio chlorido rūgštyje (3.13) ir skiedžiama iki žymės vandenilio chlorido rūgštimi (3.13). Laikoma –18 °C ne ilgiau kaip keturias savaites.

3.16 Koncentruotas vidinio etalono tirpalas, c = 2,50 μmol/ml:

į 500 ml matavimo kolbą įdedama 0,2728 g α-metiltriptofano (3.3), ištirpinama vandenilio chlorido rūgštyje (3.13) ir skiedžiama iki žymės vandenilio chlorido rūgštimi (3.13). Laikoma –18 °C ne ilgiau kaip keturias savaites.

3.17 Triptofano kalibravimo etaloninis tirpalas ir vidinis etalonas:

paimama 2,00 ml koncentruoto triptofano tirpalo (3.15) ir 2,00 ml koncentruoto vidinio etalono (α-metiltriptofano) tirpalo (3.16). Skiedžiama vandeniu (3.1) ir metanoliu (3.8) iki maždaug tokio pat tūrio ir maždaug iki tokios pat metanolio koncentracijos (10–30 %) kaip galutinio hidrolizato tūris ir koncentracija.

Šis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo prieš naudojimą.

Ruošiamas tirpalas saugomas nuo tiesioginių saulės spindulių.

3.18 Acto rūgštis

3.19 1,1,1-trichlor-2-metil-2-propanolis.

3.20 Etanolaminas, w (w/w) > 98 %.

3.21 1 g 1,1,1-trichlor-2-metil-2-propanolio (3.19) tirpalas 100 ml metanolio (3.8).

3.22 HPLC judančioji fazė: 3,00 g acto rūgšties (3.18) + 900 ml vandens (3.1) +50,0 ml 1,1,1-trichlor-2-metil-2-propanolio (3.19) tirpalo (3.21) metanolyje (3.8) (1 g/100 ml). Etanolaminu (3.20) nustatoma pH vertė 5,00. Vandeniu (3.1) skiedžiama iki 1 000 ml.

4. **Aparatūra**

4.1 HPLC įranga ir fluorescencinis detektorius.

4.2 Skysčių chromatografijos kolonėlė, 125 mm × 4 mm, C_{18}, 3 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.

4.3 pH-metras.

4.4 Kolba iš polipropileno, talpa 125 ml, su plačiu kaklu ir užsukamu dangčiu.

▼B

4.5 Membraninis filtras, 0,45 μm.

4.6 Autoklavas, 110 (± 2) °C, 1,4 (±0,1) bar.

4.7 Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.

4.8 Sūkurinė maišyklė.

5. **Procedūra**

5.1 *Ėminių ruošimas*

Ėminys sumalamas taip, kad jį būtų galima sijoti per 0,5 mm sietą. Daug drėgmės turintys ėminiai prieš malimą turi būti džiovinami ore ne didesnėje nei 50 C temperatūroje arba liofilizuojami. Daug riebalų turintys ėminiai prieš malimą ekstrahuojami petroleteriu (3.9).

5.2 *Laisvojo triptofano nustatymas (ekstraktas)*

Į kūginę kolbą 1 mg tikslumu pasveriamas atitinkamas kiekis (1–5 g) paruošto ėminio (5.1). Įpilama 100,0 ml vandenilio chlorido rūgšties, c = 0,1 mol/l (3.13) ir 5,00 ml koncentruoto vidinio etalono tirpalo (3.16). 60 min purtoma mechanine purtykle arba maišoma magnetine maišykle (4.7). Nuosėdoms leidžiama nusėsti, pipete paimama į cheminę stiklinę 10,0 ml tirpalo virš nuosėdų. Įpilama 5 ml ortofosforo rūgšties, c = 0,5 mol/l (3.14). Natrio hidroksido tirpalu, c = 1,0 mol/l, (3.10) nustatoma pH vertė 3,0. Įpilamas pakankamas kiekis metanolio (3.8), kad galutinio tirpalo metanolio koncentracija būtų 10–30 %. Supilama į atitinkamo tūrio matavimo kolbą ir skiedžiama vandeniu iki chromatografinei analizei tinkamo tūrio (maždaug iki to paties tūrio, kaip kalibravimo etaloninio tirpalo tūris (3.17)).

Prieš įpurškiant į HPLC kolonėlę keli ml tirpalo filtruojami per 0,45 μm membraninį filtrą (4.5). Atliekama chromatografinė analizė pagal 5.4 skirsnį.

Etaloninis tirpalas ir ekstraktai saugomi nuo tiesioginių saulės spindulių. Jei ekstraktų neįmanoma analizuoti tą pačią dieną, ekstraktus ne ilgiau kaip tris paras galima laikyti 5 C temperatūroje.

5.3 *Suminio triptofano kiekio nustatymas (hidrolizatas)*

Į kolbą iš polipropileno (4.4) 0,2 mg tikslumu pasveriama 0,1–1 g paruošto ėminio (5.1). Pasvertojoje ėminio dalyje yra apie 10 mg azoto. Įpilama 8,4 g bario hidroksido oktahidrato (3.4) ir 10 ml vandens. Sumaišoma sūkurine maišykle (4.8) arba magnetine maišykle (4.7). Teflonu padengtas magnetas paliekamas mišinyje. Indo sienelės nuplaunamos 4 ml vandens. Kolba uždengiama užsukamuoju dangčiu jo neužveržiant. Kolba įdedama į autoklavą (4.6) su verdančiu vandeniu ir garais ir laikoma 30–60 min. Autoklavas uždaromas ir 20 valandų kaitinama 110 (± 2) C temperatūroje.

Prieš atidarant autoklavą temperatūra sumažinama iki šiek tiek žemesnės nei 100 °C. Siekiant išvengti $Ba(OH)_2 \times 8H_2O$ išsikristalizavimo, į šiltą mišinį įpilama 30 ml kambario temperatūros vandens. Švelniai purtoma arba maišoma. Įpilama 2,00 ml koncentruoto vidinio etalono (α-metiltriptofano) tirpalo (3.16). Indai 15 min aušinami ant vandens arba ledo vonios.

Tada įpilama 5 ml ortofosforo rūgšties, c = 0,5 mol/l (3.14). Indą laikant ant aušinamosios vonios ir maišant, turinys neutralizuojama HCl, c = 6 mol/l (3.11), ir HCl, c = 1 mol/l (3.12) nustatoma pH vertė 3,0. Įpilamas pakankamas kiekis metanolio, kad galutinio tirpalo metanolio koncentracija būtų 10–30 %. Supilama į atitinkamo tūrio matavimo kolbą ir skiedžiama vandeniu iki chromatografinei analizei reikiamo tūrio (pvz., 100 ml). Įpylus metanolio, nuosėdos nesusidaro.

▼B

Prieš įpurškiant į HPLC kolonėlę keli ml tirpalo filtruojami per 0,45 μm membraninį filtrą (4.5). Chromatografinė analizė atliekama pagal 5.4 skirsnį.

Etaloninis tirpalas ir hidrolizatai saugomi nuo tiesioginių saulės spindulių. Jei ekstraktų neįmanoma analizuoti tą pačią dieną, ekstraktus ne ilgiau kaip tris paras galima laikyti 5 °C temperatūroje.

5.4 *HPLC nustatymas*

Rekomenduojamos šios izokratinio eliuavimo sąlygos; gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai (žr. dar 9.1 ir 9.2 pastabas):

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.2):	125 mm × 4 mm, C_{18}, 3 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
Kolonėlės temperatūra:	kambario temperatūra
Judančioji fazė (3.22):	3,00 g acto rūgšties (3.18) + 900 ml vandens (3.1) +50,0 ml 1,1,1-trichlor-2-metil-2-propanolio (3.19) tirpalo (3.21) metanolyje (3.8) (1 g/100 ml). Etanolaminu (3.20) nustatoma pH vertė 5,00. Skiedžiama iki 1 000 ml vandeniu (3.1)
Srautas:	1 ml/min
Visa eliuavimo trukmė:	maždaug 34 min
Detektoriaus bangos ilgis:	sužadinimas: 280 nm, emisija: 356 nm.
Įpurškiamas tūris	20 μl

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Apskaičiuojamas triptofano kiekis (X) g 100 g ėminio.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = vidinio etalono smailės plotas, kalibravimo etaloninis tirpalas (3.17)
B = triptofano ekstrakte (5.2) ar hidrolizate (5.3) smailės plotas
V_1 = koncentruoto triptofano tirpalo (3.15), įpilamo į kalibravimo tirpalą (3.17), tūris ml (2 ml)
c = koncentruoto triptofano tirpalo (3.15), įpilamo į kalibravimo tirpalą (3.17), koncentracija μmol/ml (= 2,50)
V_2 = koncentruoto vidinio etalono tirpalo (3.16), įpilamo į ekstraktą (5.2) (= 5,00 ml) arba į hidrolizatą (5.3) (= 2,00 ml), tūris
C = ekstrakto (5.2) arba hidrolizato (5.3) vidinio etalono smailės plotas
D = triptofano kalibravimo etaloninio tirpalo (3.17) smailės plotas
V_3 = koncentruoto vidinio etalono tirpalo (3.16), įpilamo į kalibravimo etaloninį tirpalą (3.17), tūris ml (= 2,00 ml)
m = ėminio masė g (su pataisa pradinei masei, jei jis buvo išdžiovintas arba iš jo buvo pašalinti riebalai)
M = triptofano molekulinė masė (= 204,23 g/mol)

7. **Pakartojamumas**

Dviejų lygiagrečiai atliktų to paties ėminio matavimų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 10 % didesniojo rezultato vertės.

▼B

8. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai**

Hidrolizės metodui sertifikuoti buvo parengtas Bendrijos tarplaboratorinis tyrimas (4-asis tarplaboratorinis palyginimas), kurį vykdant ne daugiau kaip 12 laboratorijų analizavo tris ėminius. Buvo atliekamos lygiagrečios (5) kiekvieno ėminio analizės. Rezultatai pateikti šioje lentelėje:

	1 ėminys Kiaulių pašaras	2 ėminys Kiaulių pašaras su L-triptofanu	3 ėminys Kiaulių pašaro koncentratas
L	12	12	12
n	50	55	50
Vidurkis [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = rezultatus pateikusių laboratorijų skaičius
n = atskirų rezultatų, paliekamų po riktų (identifikuotų pagal *Cochran, Dixon* riktų kriterijų) pašalinimo, skaičius
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
S_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
r = pakartojamumas
R = atkuriamumas
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas, %
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas, %

Laisvojo triptofano ekstrahavimo metodui sertifikuoti buvo parengtas kitas Bendrijos tarplaboratorinis tyrimas (3–asis tarplaboratorinis palyginimas), kurį vykdant ne daugiau kaip 13 laboratorijų analizavo du ėminius. Buvo atliekamos lygiagrečios (5) kiekvieno ėminio analizės. Rezultatai pateikti šioje lentelėje:

	4 ėminys Kviečių ir sojų mišinys	5 ėminys Kviečių ir sojų mišinys (4 ėminys) su triptofanu (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Vidurkis [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L = rezultatus pateikusių laboratorijų skaičius
n = atskirų rezultatų, paliekamų po riktų (identifikuotų pagal *Cochran, Dixon* riktų kriterijų) pašalinimo, skaičius
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
S_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
r = pakartojamumas
R = atkuriamumas
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas, %
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas, %

▼B

Triptofano hidrolizės metodui sertifikuoti buvo parengtas dar vienas Bendrijos tarplaboratorinis tyrimas, kurį atliekant ne daugiau kaip 7 laboratorijos analizavo keturis ėminius. Rezultatai pateikti toliau. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas penkis kartus.

	1 ėminys Kiaulių pašaro mišinys (CRM 117)	2 ėminys Žuvų miltai su mažu riebalų kiekiu (CRM 118)	3 ėminys Sojų miltai (CRM 119)	4 ėminys Nugriebto pieno milteliai (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Vidurkis [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = rezultatus pateikusių laboratorijų skaičius
n = atskirų rezultatų, paliekamų po riktų (identifikuotų pagal *Cochran, Dixon* riktų kriterijų) pašalinimo, skaičius
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
S_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
r = pakartojamumas
R = atkuriamumas
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas, %
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas, %

9. **Pastabos**

9.1 Šios specialios chromatografavimo sąlygos gali pagerinti triptofano ir α-metiltriptofano atskyrimą.

Izokratinis eliuavimas, po kurio kolonėlė plaunama taikant gradientinį eliuavimą:

Skysčių chromatografijos kolonėlė:	125 mm × 4 mm, C_{18}, 5 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė		
Kolonėlės temperatūra:	32 °C		
Judančioji fazė:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4/metanolis, 95 + 5 (V + V).		
	B: Metanolis		
Gradiento programa:	0 min	100 % A	0 % B
	15 min	100 % A	0 % B
	17 min	60 % A	40 % B
	19 min	60 % A	40 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	33 min	100 % A	0 % B
Srautas:	1,2 ml/min.		
Visa eliuavimo trukmė:	maždaug 33 min.		

9.2 Chromatografinė analizė bus nevienoda atsižvelgiant į HPLC tipą ir naudojamą kolonėlės įkrovos medžiagą. Pasirinkta sistema turi užtikrinti triptofano ir vidinio etalono smailių atsiskyrimą iki pat bazinės linijos.

▼B

Be to, svarbu, kad irimo produktai būtų gerai atskirti nuo triptofano ir vidinio etalono. Siekiant patikrinti, ar bazinėje linijoje, kur turi būti vidinio etalono smailė, nėra priemaišų, analizuojami hidrolizatai be vidinio etalono. Svarbu, kad eliuavimo trukmė būtų pakankamai ilga visiems irimo produktams išplauti, antraip pavėlavusios eliuavimo smailės gali trukdyti vėliau atliekamoms chromatografavimo procedūroms.

Chromatografavimo sistemos atsakas darbinių koncentracijos verčių intervale yra tiesinis. Atsako tiesiškumas nustatomas naudojant vieną (normalią) vidinio etalono koncentraciją ir keičiant triptofano koncentraciją. Svarbu, kad triptofano ir vidinio etalono smailės būtų HPLC ir fluorescencinio detektoriaus sistemos tiesinėje dalyje. Jei triptofano ir (arba) vidinio etalono smailė (-s) yra per žemos ar per aukštos, analizė kartojama imant kito dydžio ėminį ir (arba) kitą galutinį tūrį.

9.3 *Bario hidroksidas*

Sendamas bario hidroksidas vis blogiau tirpsta. Dėl šios priežasties tirpalas, naudojamas nustatymui HPLC metodu, darosi neskaidrus ir dėl to gali būti gauti mažesni triptofano kiekio rezultatai.

H. ŽALIŲ ALIEJŲ IR RIEBALŲ NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šis metodas taikomas žalių aliejų ir riebalų kiekiui pašaruose nustatyti. Metodas netaikomas aliejingosioms sėkloms ir aliejiniams vaisiams.

Atsižvelgiant į pašarų tipą bei sudėtį ir į analizės atlikimo priežastį taikoma viena iš dviejų aprašytų procedūrų.

1.1 *A procedūra. Tiesiogiai ekstrahuojami žali aliejai ir riebalai*

Šis metodas taikomas augalinės kilmės pašarams, išskyrus pašarus, įtrauktus į B procedūros taikymo sritį.

1.2 *B procedūra. Suminis žalių aliejų ir riebalų kiekis*

Šis metodas taikomas gyvūninės kilmės pašarams ir visiems kombinuotiesiems pašarams. Šis metodas turi būti taikomas visoms medžiagoms, iš kurių žali aliejai ir riebalai negali būti visiškai ekstrahuoti prieš tai neatlikus jų hidrolizės (pvz., grūdų glitimas, mielės, bulvių baltymai ir produktai, kurie apdorojami taikant procesus, pvz., išspaudimo, dribsnių gamybos ir kaitinimo procesus).

1.3 *Rezultatų aiškinimas*

Visais atvejais, kai rezultatas, gautas taikant B procedūrą, yra didesnis nei rezultatas gautas pagal A procedūrą, teisingu turi būti laikomas rezultatas, gautas taikant B procedūrą.

2. **Metodas**

2.1 *A procedūra*

Ėminys ekstrahuojamas petroleteriu. Tirpiklis išgarinamas, o likutis džiovinamas ir sveriamas.

2.2 *B procedūra*

Ėminys apdorojamas vandenilio chlorido rūgštimi kaitinant. Mišinys atvėsinamas ir filtruojamas. Likutis plaunamas, džiovinamas ir ekstrahuojamas pagal A procedūrą.

▼B

3. **Reagentai**

3.1 Petroleteris: virimo temperatūros intervalas – 40–60 °C, bromo skaičius turi būti mažesnis kaip 1, likutis po išgarinimo mažesnis nei 2 mg/100 ml.

3.2 Natrio sulfatas, bevandenis.

3.3 Vandenilio chlorido rūgštis, c = 3 mol/l

3.4 Pagalbinė filtravimo priemonė, pvz., diatomitas, *Hyflo-supercel*.

4. **Aparatūra**

4.1 Ekstrahavimo aparatas. Jei naudojamas sifonas (Soksleto aparatas), grąžinamo skysčio srautas yra toks, kad per valandą būtų 10 ciklų; jei sifonas nenaudojamas, grąžinamo skysčio srautas yra apie 10 ml/min.

4.2 Ekstrahavimo tūtos, kurios neturėtų petroleteryje tirpių medžiagų ir kurių akytumas atitiktų 4.1 punkto reikalavimus.

4.3 Džiovinimo spinta, vakuuminė spinta, nustatyta 75 ± 3 °C, arba spinta su oro cirkuliacija, nustatyta 100 ± 3 °C.

5. **Procedūra**

5.1 *A procedūra (žr. 8.1 punktą)*

5 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu, supilama į ekstrahavimo tūtą (4.2) ir užkemšama riebalų neturinčios vatos kamščiu.

Tūta dedama į ekstrahavimo aparatą (4.1) ir ekstrahuojama šešias valandas petroleteriu (3.1). Petroleterio ekstraktas surenkamas į pasvertą sausą kolbą su pemzos gabaliukais ([1]).

Tirpiklis distiliuojamas. Likutis džiovinamas kolbą laikant džiovinimo spintoje (4.3) pusantros valandos. Kolba atvėsinama eksikatoriuje ir pasveriama. Džiovinama dar 30 min, siekiant patikrinti, ar nekinta riebalų ir aliejų masė (paeiliui sveriant du kartus, masės skirtumas turi būti mažesnis arba lygus 1 mg).

5.2 *B procedūra*

2,5 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu (žr. 8.2 punktą), supilama į 400 ml stiklinę arba 300 ml kūginę kolbą, įpilama 100 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.3) ir įmetami keli pemzos gabaliukai. Stiklinė uždengiama laikrodžio stiklu arba kūginė kolba sujungiama su grįžtamuoju kondensatoriumi. Mišinys atsargiai užverdamas virš mažos liepsnos arba ant kaitlentės ir vieną valandą virinamas. Reikia žiūrėti, kad produktas nepriliptų prie indo sienelių.

Atvėsinama ir pridedama pakankamai pagalbinės filtravimo priemonės (3.4), kad būtų išvengta aliejaus ir riebalų nuostolių filtruojant. Filtruojama per sudrėkintą, dvigubą riebalų neturintį filtravimo popierių. Likutis plaunamas šaltu vandeniu tol, kol gaunamas neutralios reakcijos filtratas. Patikrinama, ar filtrate nėra riebalų. Jų buvimas filtrate rodo, kad prieš hidrolizę ėminys turi būti ekstrahuojamas petroleteriu pagal A procedūrą.

Dvigubas filtravimo popierius su likučiu dedamas ant laikrodžio stiklo ir 100 ± 3 °C temperatūroje džiovinamas pusantros valandos džiovinimo spintoje su oro cirkuliacija (4.3).

([1]) Jei vėliau atliekami aliejaus arba riebalų kokybės bandymai, pemzos gabaliukai pakeičiami stikliniais rutuliukais.

▼B

Dvigubas filtravimo popierius su sausu likučiu įdedamas į ekstrahavimo tūtą (4.2), kuri užkemšama riebalų neturinčios vatos kamščiu. Tūta dedama į ekstrahavimo aparatą (4.1) ir tęsiama, kaip nurodyta 5.1 punkto antroje ir trečioje pastraipose.

6. **Rezultato išraiška**

Likučio masė išreiškiama ėminio masės procentais.

7. **Pakartojamumas**

To paties tyrėjo atliekamų dviejų lygiagrečių to paties ėminio analizės rezultatų skirtumas ne didesnis nei:

— 0,2 %, absoliučiąja verte, kai žalių aliejų ir riebalų kiekis yra mažesnis nei 5 %,

— 4,0 % didžiausio rezultato vertės, kai kiekis 5–10 %,

— 0,4 % absoliučiąja verte, kai kiekis didesnis nei 10 %.

8. **Pastabos**

8.1 Jei produktus, turinčius didelį aliejų ir riebalų kiekį, sunku susmulkinti arba jie yra netinkami sumažintajam vienalyčiam tiriamajam ėminiui paimti, daroma taip.

20 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu ir sumaišoma su 10 g ar didesniu kiekiu bevandenio natrio sulfato (3.2). Ekstrahuojama petroleteriu (3.1), kaip nurodyta 5.1. Gautas ekstraktas skiedžiamas iki 500 ml petroleteriu (3.1) ir tirpalas sumaišomas. 50 ml tirpalo supilama į prieš tai pasvertą nedidelę sausą kolbą su pemzos gabalėliais. Tirpiklis distiliuojamas, likutis džiovinamas ir tęsiama, kaip nurodyta 5.1 punkto paskutinėje pastraipoje.

Pašalinamas tirpiklis iš tūtoje likusio ekstrahavimo likučio, likutis susmulkinamas ne didesnėmis nei 1 mm dydžio dalelėmis, sudedamas atgal į ekstrahavimo tūtą (natrio sulfato nededama) ir atliekamos 5.1 punkto antroje ir trečioje pastraipose nurodytos procedūros.

Aliejų ir riebalų kiekis ėminio masės procentais apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$(10\ m_1 + m_2) \times 5$$

kurioje:

m_1 = likučio po pirmojo ekstrahavimo (alikvotinės ekstrakto dalies) svoris gramais,
m_2 = likučio po antrojo ekstrahavimo svoris gramais.

8.2 Jei produkte yra nedaug aliejų arba riebalų, tiriamojo ėminio masė gali būti padidinta iki 5 g.

8.3 Naminių gyvūnėlių ėdalą, turintį daug vandens, prieš hidrolizę ir ekstrahavimą gali tekti maišyti su bevandeniu natrio sulfatu, kaip tai daroma taikant B procedūrą.

8.4 Atliekant 5.2 punkte aprašytas procedūras, veiksmingiau būtų naudoti ne šaltą, bet karštą vandenį likučiui po filtravimo plauti.

8.5 Kai kurių pašarų atveju 1,5 val. džiovinimo trukmę gali tekti padidinti. Per ilgo džiovinimo vengiama, nes dėl to gali būti gauti mažesni rezultatai. Gali būti naudojama mikrobangų krosnį.

▼B

8.6 Pradinis ekstrahavimas pagal A procedūrą prieš hidrolizę ir pakartotinis ekstrahavimas pagal B procedūrą rekomenduojamas tuo atveju, jei žalių aliejų ir riebalų kiekis yra didesnis nei 15 %. Ekstrahavimo trukmė kažkiek priklauso nuo pašarų ir nuo juose esančių aliejų arba riebalų tipo.

I. ŽALIOS LĄSTELIENOS NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti pašarų neriebalines organines medžiagas, netirpias rūgštinėje ir šarminėje terpėje, kurios paprastai apibūdinamos kaip žalia ląsteliena.

2. **Metodas**

Ėminys, iš kurio prireikus pašalinami riebalai, veikiamas tam tikros koncentracijos sieros rūgšties ir kalio hidroksido tirpalais virimo temperatūroje. Likutis atskiriamas filtruojant, plaunamas, džiovinamas, sveriamas ir sudeginamas 475–500 °C temperatūros intervale. Žalios ląstelienos kiekis tiriamajame ėminyje atitinka masės sumažėjimą po sudeginimo.

3. **Reagentai**

3.1 Sieros rūgštis, c = 0,13 mol/l.

3.2 Priešputis (pvz., n-oktanolis).

3.3 Pagalbinė filtravimo priemonė (*Celite* 545 arba lygiavertė), iškaitinta 500 °C temperatūroje keturias valandas (8.6).

3.4 Acetonas.

3.5 Petroleteris, kurio virimo temperatūros intervalas 40–60 °C.

3.6 Vandenilio chlorido rūgštis, c = 0,5 mol/l.

3.7 Kalio hidroksido tirpalas, c = 0,23 mol/l.

4. **Aparatūra**

4.1 Kaitinimo įrenginys skaidymui sieros rūgštimi arba kalio hidroksido tirpalu, turintis filtravimo tiglio (4.2) laikiklį, išleidimo vamzdį su čiaupu skysčiui išleisti ir vakuuminį siurblį, gali būti suslėgtojo oro. Kiekvieną dieną prieš naudojimą blokas penkias minutes šildomas verdančiu vandeniu.

4.2 Stiklinis filtravimo tiglis su sukepinto stiklo filtro plokšte, kurios akučių dydis 40–90 μm. Prieš naudojant pirmą kartą, tiglis kelias minutes kaitinamas iki 500 °C ir atvėsinamas (8.6).

4.3 Ne mažesnės nei 270 ml talpos cilindras su grįžtamuoju kondensatoriumi, tinkamas virinimui.

4.4 Džiovinimo spinta su šilumine rele.

4.5 Mufelinė krosnis su šilumine rele.

4.6 Ekstrahavimo įrenginys, kurį sudaro filtravimo tiglio (4.2) laikiklio plokštė ir išleidimo vamzdis su čiaupu vakuumui prijungti ir skysčiui išleisti.

4.7 Jungiamieji žiedai kaitinimo įrenginiui (4.1), tigliui (4.2) ir cilindrui (4.3) sujungti ir šaltojo ekstrahavimo įrenginiui (4.6) bei tigliui prijungti.

5. **Procedūra**

1 mg tikslumu pasveriama 1 g paruošto ėminio, ėminys dedamas į tiglį (4.2) (žr. 8.1, 8.2 ir 8.3 pastabas) ir pridedama 1 g pagalbinės filtravimo priemonės.

▼B

Surenkamas kaitinimo įrenginys (4.1) ir filtravimo tiglis (4.2), tada prie tiglio prijungiamas cilindras (4.3). Į cilindro ir tiglio sąranką įpilama 150 ml verdančios sieros rūgšties (3.1) ir prireikus įlašinami keli lašai prieš-pučio (3.2).

Užvirinama per 5 ± 2 min ir stipriai virinama lygiai 30 min.

Atsukamas čiaupas į išleidimo vamzdį (4.1), sieros rūgštis filtruojama vakuumu per filtravimo tiglį ir likutis tris kartus paeiliui plaunamas 30 ml verdančio vandens, užtikrinant, kad po kiekvieno plovimo likutis būtų filtruojamas sausai.

Išleidžiamasis čiaupas užsukamas, į cilindro ir tiglio sąranką įpilama 150 ml verdančio kalio hidroksido tirpalo (3.7) ir įlašinami keli lašai prieš-pučio (3.2). Užvirinama per 5 ± 2 min ir stipriai virinama lygiai 30 min. Filtruojama ir kartojama plovimo procedūra, taikyta sieros rūgščiai.

Po paskutinio plovimo ir džiovinimo tiglis su jame esančia medžiaga atjungiamas ir sujungiamas su šaltojo ekstrahavimo įrenginiu (4.6). Prijungiamas vakuumas ir likutis tiglyje tris kartus iš eilės plaunamas 25 ml acetono porcijomis (3.4) užtikrinant, kad po kiekvieno plovimo likutis būtų filtruojamas sausai.

Tiglis džiovinamas džiovinimo spintoje iki pastoviosios masės 130 °C temperatūroje. Po kiekvieno džiovinimo tiglis atvėsinamas eksikatoriuje ir greitai pasveriamas. Tiglis dedamas į mufelinę krosnį ir ne mažiau nei 30 min iškaitinamas 475–500 °C temperatūroje iki pastoviosios masės.

Po kiekvieno iškaitinimo iš pradžių atvėsinama krosnyje, vėliau eksikatoriuje, ir pasveriama.

Atliekamas tuščiasis bandymas be ėminio. Masės sumažėjimas dėl iškaitinimo neturi būti didesnis nei 4 mg.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Žalios ląstelienos kiekis ėminio masės procentais gaunamas pagal lygtį:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

kurioje:

m = ėminio svoris g;
m_0 = ėminio svorio sumažėjimas po iškaitinimo, g;
m_1 = svorio sumažėjimas po iškaitinimo, atliekant tuščiąjį bandymą, g.

7. **Pakartojamumas**

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

— 0,6 % absoliučiąja verte, kai žalios ląstelienos kiekis mažesnis nei 10 %;

— 6 % didžiausiojo rezultato vertės, kai žalios ląstelienos kiekis lygus ar didesnis nei 10 %.

8. **Pastabos**

8.1 Jei pašarai turi daugiau nei 10 % žalių riebalų, prieš analizę jie turi būti pašalinti petroleteriu (3.5). Filtravimo tiglis (4.2) su jame esančia medžiaga prijungiamas prie šaltojo ekstrahavimo įrenginio (4.6) ir

▼B

prijungus vakuumą likutis tris kartus plaunamas 30 ml petroleterio porcijomis (3.7), užtikrinant, kad likutis būtų sausas. Tiglis su jame esančia medžiaga prijungiamas prie kaitinimo įrenginio (4.1) ir analizė tęsiama, kaip aprašyta 5 punkte.

8.2 Jei pašarai turi riebalų, kurių tiesiogiai negalima ekstrahuoti petroleteriu (3.5), riebalai turi būti pašalinti, kaip nurodyta 8.1, ir dar kartą šalinami po virinimo su rūgštimi. Pavirinus su rūgštimi ir išplovus, tiglis su jame esančia medžiaga prijungiamas prie šalto ekstrahavimo indo (4.6) ir tris kartus plaunamas 30 ml acetono (3.6), tada tris kartus 30 ml petroleterio porcijomis. Filtruojama prijungus vakuumą iki sauso likučio ir analizė tęsiama, kaip aprašyta 5 punkte, pradedant nuo apdorojimo kalio hidroksido tirpalu.

8.3 Jei pašarai turi daugiau kaip 5 % karbonatų, išreikštų kalcio karbonatu, tiglis (4.2) su pasvertu ėminiu prijungiamas prie kaitinimo įrenginio (4.1). Ėminys tris kartus plaunamas 30 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.6). Kiekvieną kartą įpylus rūgšties ėminys paliekamas stovėti prieš filtravimą maždaug vieną minutę. Vieną kartą plaunama 30 ml vandens ir procedūra tęsiama, kaip aprašyta 5 punkte.

8.4 Jei aparatas naudojamas kaip stovas (prie to paties kaitinimo įrenginio prijungti keli tigliai), atliekant vieną bandymų seriją negalima vykdyti dviejų to paties ėminio atskirų nustatymų.

8.5 Jei po virinimo sunku filtruoti rūgštinius ir šarminius tirpalus, per kaitinimo įrenginio išleidimo vamzdį leidžiamas suslėgtasis oras ir filtravimas tęsiamas.

8.6 Siekiant pratęsti stiklinių filtravimo tiglių naudojimo trukmę, iškaitinimo temperatūra yra ne aukštesnė nei 500 °C. Reikia žiūrėti, kad kaitinant ir atvėsinant būtų išvengta staigių temperatūros svyravimų.

J. CUKRAUS NUSTATYMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti redukuojančiųjų sacharidų kiekį ir suminį sacharidų kiekį, išreiškiamą gliukozės kiekiu arba, jei tinka, sacharozės kiekiu, dauginant rezultatą iš faktoriaus 0,95. Metodas tinka kombinuotiesiems pašarams. Kitiems pašarams numatyti specialieji metodai. Jei būtina, laktozė nustatoma atskirai, ir į jos kiekį atsižvelgiama apskaičiuojant rezultatus.

2. Metodas

Sacharidai ekstrahuojami praskiestu etanoliu; tirpalas skaidrinamas I ir II *Carrez* tirpalais. Etanolį pašalinus, sacharidų kiekis prieš ir po inversijos nustatomi *Luff-Schoorl* metodu.

3. Reagentai

3.1 Etanolio tirpalas 40 % (V/V), tankis: 0,948 g/ml 20 °C temperatūroje, neutralizuotas pagal fenolftaleiną.

3.2 *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.3 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $K_4Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.4 Metiloranžinio 0,1 % (m/V) tirpalas.

3.5 Vandenilio chlorido rūgšties 4 mol/l tirpalas.

3.6 Vandenilio chlorido rūgšties 0,1 mol/l tirpalas.

▼B

3.7 Natrio hidroksido 0,1 mol/l tirpalas.

3.8 *Luff-Schoorl* reagentas:

Atsargiai maišant citrinų rūgšties tirpalas (3.8.2) supilamas į natrio karbonato tirpalą (3.8.3). Įpilamas vario sulfato tirpalas (3.8.1) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro. Paliekama nusistovėti per naktį ir tirpalas filtruojamas.

Tikrinama gauto reagento koncentracija (Cu – 0,05 mol/l, Na_2CO_3 – 1 mol/l), žr. 5.4. paskutinę pastraipą. Tirpalo pH yra apie 9,4.

3.8.1 Vario sulfato tirpalas: 25 g vario sulfato, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, neturinčio geležies, ištirpinama 100 ml vandens.

3.8.2 Citrinų rūgšties tirpalas: 50 g citrinų rūgšties, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, ištirpinama 50 ml vandens.

3.8.3 Natrio karbonato tirpalas: 143,8 g bevandenio natrio karbonato, ištirpinama maždaug 300 ml šilto vandens. Paliekama atvėsti.

3.9 Natrio tiosulfato 0,1 mol/l tirpalas.

3.10 Krakmolo tirpalas: 5 g tirpaus krakmolo mišinys su 30 ml vandens supilamas į 1 litrą verdančio vandens. Virinama tris minutes, tirpalas atvėsinamas, prireikus į jį kaip konservanto įdedama 10 mg gyvsidabrio (II) jodido.

3.11 Sieros rūgšties 3 mol/l tirpalas.

3.12 Kalio jodido tirpalas, 30 % (m/V).

3.13 Pemzos granulės, virintos vandenilio chlorido rūgšties tirpale, išplautos ir išdžiovintos.

3.14 3-metilbutan-l-olis.

4. **Aparatūra**

Maišiklis (vartytuvas), apsisukimų dažnis maždaug 35–40 min^{-1}.

5. **Procedūra**

5.1 *Ėminio ekstrahavimas*

2,5 g ėminio, pasverto 1 mg tikslumu, supilama į 250 ml matavimo kolbą. Įpilama 200 ml etanolio (3.1) ir vieną valandą maišoma maišikliu. Įpilama 5 ml *Carrez* I tirpalo (3.2) ir maišoma maždaug 30 s. Įpilama 5 ml *Carrez* II tirpalo (3.3) ir vėl maišoma 1 min. Etanoliu (3.1) skiedžiama iki žymės, sumaišoma ir filtruojama. Imama 200 ml filtrato ir garinama didesnei daliai etanolio pašalinti tol, kol tūris sumažėja maždaug du kartus. Likutis po išgarinimo naudojant šiltą vandenį kiekybiškai supilamas į 200 ml matavimo kolbą, tirpalas atvėsinamas, skiedžiamas iki žymės vandeniu, sumaišomas ir prireikus filtruojamas. Šis tirpalas naudojamas redukuojančiųjų sacharidų kiekiui nustatyti ir, po inversijos, suminiam sacharidų kiekiui nustatyti.

5.2 *Redukuojančiųjų sacharidų nustatymas*

Pipete paimama ne daugiau 25 ml tirpalo, turinčio mažiau nei 60 mg redukuojančiųjų sacharidų, kurių kiekis išreiškiamas gliukozės kiekiu. Prireikus skiedžiama distiliuotu vandeniu iki 25 ml ir redukuojančiųjų sacharidų kiekis nustatomas *Luff-Schoorl* metodu. Rezultatas išreiškiamas gliukozės kiekiu ėminyje procentais.

5.3 *Suminio invertuotų sacharidų kiekio nustatymas*

Pipete paimama 50 ml tirpalo ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Įlašinami keli lašai metiloranžinio tirpalo (3.4) ir atsargiai, nuolat maišant, pilama vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.5) tol, kol neišnyksta tirpalo raudona spalva. Įpilama 15 ml vandenilio chlorido rūgšties

▼B

(3.6), kolba nuleidžiama į stipriai verdančio vandens vonią, kurioje laikoma trisdešimt minučių. Tirpalas greitai atvėsinamas iki maždaug 20 °C temperatūros ir į jį įpilama 15 ml natrio hidroksido tirpalo (3.7). Skiedžiama vandeniu iki 100 ml ir sumaišoma. Paimama ne daugiau 25 ml šio tirpalo, turinčio mažiau nei 60 mg redukuojančiųjų sacharidų, perskaičiuotų į gliukozės kiekį. Prireikus distiliuotu skiedžiama vandeniu iki 25 ml ir redukuojančiųjų sacharidų kiekis nustatomas *Luff-Schoorl* metodu. Rezultatas išreiškiamas gliukozės procentiniu kiekiu arba, jei tinka, sacharozės kiekiu, gautą rezultatą padauginus iš faktoriaus 0,95.

5.4 *Titravimas Luff-Schoorl metodu*

Pipete įpilama 25 ml *Luff-Schoorl* reagento (3.8) ir supilama į 300 ml Erlenmejerio kolbą; įpilama lygiai 25 ml skaidrinto sacharidų tirpalo. Įdedamos dvi pemzos (3.13) granulės, tirpalas šildomas ir maišomas, laikant kolbą rankoje virš vidutinės atviros liepsnos, kad tirpalas užvirtų maždaug per dvi minutes. Erlenmejerio kolba iš karto statoma ant asbestu padengto vielos tinklelio su maždaug 6 cm skersmens skyle, po kuria dega liepsna. Liepsna reguliuojama taip, kad būtų šildomas tik Erlenmejerio kolbos dugnas. Prie kūginės kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius. Virinama lygiai dešimt minučių. Iš karto po to kolba atvėsinama šaltame vandenyje ir maždaug po penkių minučių titruojama taip:

įpilama 10 ml kalio jodido tirpalo (3.12) ir tuojau pat (atsargiai, nes gali stipriai putoti) įpilama 25 ml sieros rūgšties tirpalo (3.11). Titruojama natrio tiosulfato tirpalu (3.9) tol, kol spalva tampa vos gelsva, įpilama krakmolo tirpalo (3.10) indikatoriaus ir baigiama titruoti.

Toks pats titravimas, tik nevirinant, atliekamas su tiksliai 25 ml *Luff-Schoorl* reagento (3.8) ir 25 ml vandens mišiniu, įpilant 10 ml kalio jodido tirpalo (3.12) ir 25 ml sieros rūgšties tirpalo (3.11).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Pagal pridedamą lentelę nustatomas laktozės kiekis mg, kuris atitinka dviejų titravimų rezultatų skirtumą, išreiškiamą 0,1 mol/l natrio tiosulfato tirpalo ml. Rezultatas išreiškiamas ėminio masės procentais.

7. **Specialiosios procedūros**

7.1 Pašarų, turinčių daug melasos, ir kitų nelabai vienalyčių pašarų atveju pasveriama 20 g pašarų ir su 500 ml vandens jie supilami į 1 l matavimo kolbą. Maišikliu maišoma vieną valandą. Skaidrinama, naudojant *Carrez* I (3.2) ir II (3.3) tirpalus, kaip aprašyta 5.1 punkte, tačiau naudojant keturiskart didesnius reagentų kiekius. Skiedžiama iki žymės 80 % (V/V) etanoliu.

Sumaišoma ir filtruojama. Etanolis pašalinamas, kaip aprašyta 5.1 punkte. Jei ėminyje nėra dekstrinizuoto krakmolo, skiedžiama iki žymės vandeniu.

7.2 Melasos ir pašarinių žaliavų, kuriuose yra daug cukraus ir beveik nėra krakmolo (*ceratonia siliqua* vaisiai, džiovinti runkelių griežiniai ir pan.) atveju 5 g ėminio sudedama į 250 ml matavimo kolbą, įpilama 200 ml distiliuoto vandens ir valandą maišoma maišikliu, prireikus, ir ilgiau. Skaidrinama, naudojant *Carrez* I (3.2) ir II (3.3) tirpalus, kaip aprašyta 5.1 punkte. Skiedžiama iki žymės šaltu vandeniu, sumaišoma ir filtruojama. Norint nustatyti suminį sacharidų, daroma, kaip aprašyta 5.3 punkte.

8. **Pastabos**

8.1 Siekiant išvengti putojimo, prieš virinant su *Luff-Schoorl* reagentu įpilama (nepaisant tūrio) apie 1 ml 3-metilbutan-1-olio (3.14).

▼B

8.2 Suminio sacharidų po inversijos kiekio, perskaičiuoto į gliukozės kiekį, ir redukuojančiųjų sacharidų kiekio, perskaičiuoto į gliukozės kiekį, skirtumą padauginus iš 0,95 gaunamas sacharozės kiekis procentais.

8.3 Norint nustatyti redukuojančiųjų sacharidų, išskyrus laktozę, kiekį, galima taikyti du metodus.

8.3.1 Skaičiuojant apytiksliai, kitu analizės metodu nustatytas laktozės kiekis dauginamas iš 0,675 ir gautas rezultatas atimamas iš redukuojančiųjų sacharidų kiekio.

8.3.2 Redukuojančių sacharidų, išskyrus laktozę, kiekį skaičiuojant tiksliai, tas pats ėminys turi būti naudojamas dviem galutiniams nustatymams. Viena analizė atliekama su alikvotine dalimi tirpalo, gauto pagal 5.1 punktą, kita – su alikvotine dalimi tirpalo, gauto nustatant laktozę pagal šiam tikslui nustatytą metodą (atlikus kitų sacharidų fermentaciją ir skaidrinimą).

Abiem atvejais turimas sacharidų kiekis nustatomas *Luff-Schoorl* metodu ir perskaičiuojamas į gliukozės kiekį miligramais. Viena iš verčių atimama iš kitos ir skirtumas išreiškiamas ėminio masės procentais.

Pavyzdys

Du kiekvienam nustatymui paimti tūriai atitinka 250 mg ėminį.

Pirmuoju atveju sunaudota 17 ml natrio tiosulfato 0,1 mol/l tirpalo ir tai atitinka 44,2 mg gliukozės; antruoju atveju sunaudota 11 ml ir tai atitinka 27,6 mg gliukozės.

Skirtumas yra 16,6 mg gliukozės.

Taigi redukuojančiųjų sacharidų (išskyrus laktozę) kiekis, perskaičiuotas į gliukozės kiekį, yra lygus:

$$\frac{4 \times 16{,}6}{10} = 6{,}64\%$$

Verčių lentelė, naudojant 25 ml *Luff-Schoorl* reagento

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l tūris ml, dviejų minučių trukmės šildymas, dešimties minučių trukmės virimas

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Gliukozė, fruktozė, invertuoti sacharidai $C_6H_{12}O_6$		Laktozė $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltozė $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	skirtumas	mg	skirtumas	mg	skirtumas	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

▼B

K. LAKTOZĖS NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti laktozės kiekį pašaruose, kai jos yra daugiau nei 0,5 %.

2. **Metodas**

Cukrūs ištirpinami vandenyje. Tirpalas fermentuojamas, pridedant mielių *Saccharomyces cerevisiae*, kurios laktozės neliečia. Po skaidrinimo ir filtravimo laktozės kiekis filtrate nustatomas *Luff-Schoorl* metodu.

3. **Reagentai**

3.1 *Saccharomyces cerevisiae* suspensija: 25 g šviežių mielių maišoma su 100 ml vandens. Šaldytuve suspensija galima laikyti ne ilgiau kaip savaitę.

3.2 *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.3 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $K_4Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.4 *Luff-Schoorl* reagentas:

Atsargiai maišant citrinų rūgšties tirpalas (3.4.2) supilamas į natrio karbonato tirpalą (3.4.3). Įpilamas vario sulfato tirpalas (3.4.1) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro. Paliekama nusistovėti per naktį ir tirpalas filtruojamas. Tikrinama gauto reagento koncentracija (Cu – 0,05 mol/l; Na_2CO_3 – 1 mol/l). Tirpalo pH yra apie 9,4.

3.4.1 Vario sulfato tirpalas: 25 g vario sulfato, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, neturinčio geležies, ištirpinama 100 ml vandens.

3.4.2 Citrinų rūgšties tirpalas: 50 g citrinų rūgšties, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, ištirpinama 50 ml vandens.

3.4.3 Natrio karbonato tirpalas: 143,8 g bevandenio natrio karbonato, ištirpinama maždaug 300 ml šilto vandens. Paliekama atvėsti.

3.5 Pemzos granulės, virintos vandenilio chlorido rūgšties tirpale, išplautos ir išdžiovintos.

3.6 Kalio jodido tirpalas, 30 % (m/V).

3.7 Sieros rūgšties 3 mol/l tirpalas.

3.8 Natrio tiosulfato 0,1 mol/l tirpalas.

3.9 Krakmolo tirpalas: 5 g tirpaus krakmolo mišinys su 30 ml vandens supilamas į 1 litrą verdančio vandens. Virinama tris minutes, tirpalas atvėsinamas, prireikus į jį kaip konservanto įdedama 10 mg gyvsidabrio (II) jodido.

4. **Aparatūra**

Vandens vonia su šilumine rele, nustatyta 38–40 °C.

5. **Procedūra**

1 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Įpilama 25–30 ml vandens. Kolba 30 min laikoma verdančio vandens vonioje ir atvėsinama iki maždaug 35 °C temperatūros. Įpilama apie 5 ml mielių suspensijos (3.1) ir sumaišoma. Kolba laikoma dvi valandas vandens vonioje 38–40 °C temperatūroje. Atvėsinama iki maždaug 20 °C temperatūros.

Įpilama 2,5 ml *Carrez* I tirpalo (3.2) ir 30 s maišoma, tada įpilama 2,5 ml *Carrez* II tirpalo (3.3) ir vėl maišoma 30 s. Skiedžiama vandeniu

▼B

iki 100 ml, sumaišoma ir filtruojama. Ne daugiau nei 25 ml šio tirpalo, kuriame turėtų būti 40–80 mg laktozės, pipete paimama į 300 ml Erlenmejerio kolbą. Prireikus iki 25 ml skiedžiama vandeniu.

Tokiu pačiu būdu atliekamas tuščiasis bandymas su 5 ml mielių suspensijos (3.1). Laktozės kiekis *Luff-Schoorl* metodu nustatomas taip: įpilama lygiai 25 ml *Luff-Schoorl* reagento (3.4) ir įdedamos dvi pemzos (3.5) granulės. Tirpalas maišomas laikant kolbą rankoje ir tuo pat metu šildant virš vidutinės atviros liepsnos, kad tirpalas užvirtų maždaug per dvi minutes. Erlenmejerio kolba iš karto statoma ant asbestu padengto vielos tinklelio su maždaug 6 cm skersmens skyle, po kuria dega liepsna. Liepsna reguliuojama taip, kad būtų šildomas tik kūginės kolbos dugnas. Prie Erlenmejerio kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius. Virinama lygiai dešimt minučių. Iš karto po to kolba atvėsinama šaltame vandenyje ir maždaug po penkių minučių titruojama taip:

įpilama 10 ml kalio jodido tirpalo (3.6) ir tuojau pat (atsargiai, nes gali stipriai putoti) įpilama 25 ml sieros rūgšties tirpalo (3.7). Titruojama natrio tiosulfato tirpalu (3.8) tol, kol spalva tampa vos gelsva, įpilama krakmolo tirpalo (3.9) indikatoriaus ir baigiama titruoti.

Toks pats titravimas, tik nevirinant, atliekamas su tiksliai 25 ml *Luff-Schoorl* reagento (3.4) ir 25 ml vandens mišiniu, įpilant 10 ml kalio jodido tirpalo (3.6) ir 25 ml sieros rūgšties tirpalo (3.7).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Pagal pridedamą lentelę nustatomas laktozės kiekis mg, kuris atitinka dviejų titravimų rezultatų skirtumą, išreiškiamą 0,1 mol/l natrio tiosulfato tirpalo ml.

Rezultatas pateikiamas kaip bevandenės laktozės kiekis, išreikštas ėminio masės procentais.

7. **Pastaba**

Jei produktai turi daugiau nei 40 % fermentuojamo sacharido, naudojama daugiau nei 5 ml mielių suspensijos.

Verčių lentelė, naudojant 25 ml *Luff-Schoorl* reagento

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l tūris ml, dviejų minučių trukmės šildymas, dešimties minučių trukmės virimas

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Gliukozė, fruktozė, invertuoti sacharidai $C_6H_{12}O_6$		Laktozė $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltozė $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	skirtumas	mg	skirtumas	mg	skirtumas	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

▼B

L. KRAKMOLO NUSTATYMAS

POLIARIMETRINIS METODAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti krakmolo ir didelės molekulinės masės krakmolo skilimo produktų kiekį pašaruose, siekiant patikrinti atitiktį nurodomai energinei vertei (VII priedo nuostatoms) ir Tarybos direktyvai 96/25/EB ([1]).

2. **Metodas**

Metodas susideda iš dviejų nustatymų. Nustatant pirmuoju būdu, ėminys veikiamas praskiesta vandenilio chlorido rūgštimi. Po tirpalo skaidrinimo ir filtravimo poliarimetriškai matuojamas per jį praeinančios poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas.

Analizuojant antruoju būdu, ėminys ekstrahuojamas 40 % etanoliu. Filtratas rūgštinamas vandenilio chlorido rūgštimi, skaidrinamas, filtruojamas ir matuojamas per jį praeinančios poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, kaip tai buvo daroma pirmuoju būdu.

Dviejų matavimų skirtumas, padaugintas iš žinomo faktoriaus, atitinka krakmolo kiekį ėminyje.

3. **Reagentai**

3.1 Vandenilio chlorido rūgštis, 25 % (m/m) tirpalas, tankis 1,126 g/ml.

3.2 Vandenilio chlorido rūgštis, 1,13 % (m/V) tirpalas.

Koncentracija turi būti patikrinta titruojant 0,1 mol/l natrio hidroksido tirpalu, įlašinus metilraudonojo 0,1 % (m/V) tirpalo 94 % (V/V) etanolyje. Reikia 30,94 ml 0,1 mol/l NaOH, norint neutralizuoti 10 ml.

3.3 *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.4 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $K_4Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.5 Etanolis, 40 % (V/V) tirpalas, tankis 0,948 g/ml 20 °C temperatūroje.

4. **Aparatūra**

4.1 250 ml Erlenmejerio kolba su tipine šlifo jungtimi ir grįžtamasis kondensatorius

4.2 Poliarimetras arba sacharimetras

5. **Procedūra**

5.1 *Ėminio ruošimas*

Ėminys susmulkinamas taip, kad jį visą būtų galima persijoti per sietą su 0,5 mm apvaliomis akutėmis.

5.2 *Suminio poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo (P ir S) nustatymas (žr. 7.1 pastabą)*

1 mg tikslumu pasveriama 2,5 g sumalto ėminio, kuris supilamas į 100 ml matavimo kolbą. Įpilama 25 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.2), kratoma, kad ėminys tolygiai pasiskirstytų, ir dar įpilama 25 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.2). Kolba panardinama į verdančio vandens vonią, pirmąsias tris minutes stipriai ir visą laiką

([1]) OL L 125, 1996 5 23, p. 35.

▼B

kratoma, kad nesusidarytų aglomeratų. Vandens vonioje turi būti pakankamai daug, kad panardinus į ją matavimo kolbą, jis nenustotų virę̨s. Kratomos kolbos negalima išimti iš vonios. Lygiai po 15 min kolba išimama iš vonios, įpilama 30 ml šalto vandens ir iš karto atvėsinama iki 20 °C.

Įpilama 5 ml *Carrez* I tirpalo (3.3) ir kratoma 30 s. Įpilama 5 ml *Carrez* II tirpalo (3.4) ir vėl kratoma maždaug 30 s. Skiedžiama iki žymės vandeniu, sumaišoma ir filtruojama. Jei filtratas nėra visiškai skaidrus (tai pasitaiko retai), nustatymas kartojamas naudojant daugiau *Carrez* I ir II tirpalų, pvz., 10 ml.

200 mm ilgio vamzdyje poliarimetru arba sacharimetru matuojama, kokiu kampu tirpalas suka poliarizuotos šviesos plokštumą.

5.3 *Medžiagų, tirpstančių 40 % etanolyje, poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo (P′ ir S′) nustatymas*

1 mg tikslumu pasveriama 5 g ėminio, ėminys supilamas į 100 ml matavimo kolbą ir įpilama apie 80 ml etanolio (3.5) (žr. 7.2 pastabą). Kolba laikoma vieną valandą kambario temperatūroje; per tą laiką šešis kartus kolba stipriai kratoma, kad ėminys gerai susimaišytų su etanoliu. Skiedžiama iki žymės etanoliu (3.5), sumaišoma ir filtruojama.

50 ml filtrato (atitinka 2,5 g ėminio) įpilama į 250 ml Erlenmejerio kolbą, įpilama 2,1 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1) ir stipriai kratoma. Prie Erlenmejerio kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius, kolba panardinama į verdančio vandens vonią. Lygiai po 15 min Erlenmejerio kolba išimama iš vonios, jos turinys supilamas į 100 ml matavimo kolbą, plaunant Erlenmejerio kolbą trupučiu šalto vandens, ir atvėsinama iki 20 °C.

Skaidrinama, naudojant *Carrez* I (3.3) ir II (3.4) tirpalus, skiedžiama iki žymės vandeniu, sumaišoma, filtruojama ir matuojamas poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, kaip nurodyta 5.2 punkto 2–oje ir 3–oje pastraipoje.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Krakmolo kiekis (%) ėminyje apskaičiuojamas taip:

6.1 *Matavimas poliarimetru*

$$\text{Krakmolo kiekis (\%)} = \frac{2\,000(\mathrm{P} - \mathrm{P}')}{[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20^\circ}}$$

P = suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, laipsniais;

P' = 40 % etanolyje tirpių medžiagų tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, laipsniais;

$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20^\circ}$ = savitasis gryno krakmolo tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas. Visuotinai priimtos skaitmeninės šio faktoriaus vertės yra šios:

+185,9°: ryžių krakmolo
+185,7°: bulvių krakmolo
+184,6°: kukurūzų krakmolo
+182,7°: kviečių krakmolo
+181,5°: miežių krakmolo
+181,3°: avižų krakmolo
+184,0°: kitų rūšių krakmolo, taip pat krakmolo mišinių kombinuotuose pašaruose

6.2 *Matavimas sacharimetru*

$$\text{Krakmolo kiekis (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20^\circ}} \times \frac{(2\,\mathrm{N} \times 0{,}665) \times (\mathrm{S} - \mathrm{S}')}{100} - \frac{26{,}6\,\mathrm{N} \times (\mathrm{S} - \mathrm{S}')}{[\alpha]_{\mathrm{D}}^{20^\circ}}$$

▼B

S = suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, sacharimetro laipsniais;

S' = 40 % (v/v) etanolyje tirpių medžiagų tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, sacharimetro laipsniais

N = sacharozės masė g/100 ml vandens, kai 200 mm ilgio vamzdyje poliarizuotos šviesos plokštuma pasukama 100^{o} sacharimetro laipsnių

16,29 g prancūziškų sacharimetrų

26,00 g vokiškų sacharimetrų

20,00 g kitų sacharimetrų

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ savitasis gryno krakmolo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas (žr. 6.1 punktą).

6.3 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečių, tam pačiam ėminiui atliktų nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,4 absoliučiąja verte, kai krakmolo yra mažiau nei 40 %, ir 1 % santykine verte, kai krakmolo yra 40 % arba daugiau.

7. **Pastabos**

7.1 Jei ėminyje yra daugiau nei 6 % karbonatų, skaičiuojamų kaip kalcio karbonatas, jie prieš suminio poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo matavimą turi būti suardomi įpilant lygiai tiek, kiek reikia praskiestos sieros rūgšties.

7.2 Jei produkte yra daug laktozės, pvz., pieno miltelių serume ar nugriebto pieno milteliuose, įpylus 80 ml etanolio (3.5), daroma taip: prie kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius ir kolba 30 min panardinama į vandens vonią 50 ^{o}C temperatūroje. Kolba paliekama atvėsti ir analizė tęsiama kaip nurodyta 5.3 punkte.

7.3 Yra žinoma, kad šios medžiagos, kai jų pašaruose yra didelis kiekis, sukelia trukdžius, nustatant krakmolo kiekį poliarimetriniu metodu, todėl gali būti gauti netikslūs rezultatai:

— (cukrinių) runkelių produktai, pvz., (cukrinių) runkelių išspaudos, (cukrinių) runkelių melasa, (cukrinių) runkelių išspaudos su melasa, (cukrinių) runkelių žlaugtai, (runkelių) cukrus,

— citrusų vaisių minkštimas,

— linų sėmenys; linų sėmenų išspaudos; ekstrahuoti linų sėmenys,

— rapso sėklos; rapso sėklų išspaudos; ekstrahuotos rapso sėklos; rapso sėklų lukštai,

— saulėgrąžų sėklos; ekstrahuotos saulėgrąžų sėklos; ekstrahuotos iš dalies išlukštentos saulėgrąžų sėklos,

— kopros išspaudos; ekstrahuota kopra,

— bulvių masė,

— dehidratuotos mielės,

— produktai, turintys daug inulino (pvz., topinambų trupiniai ir miltai),

— spirgučiai.

M. ŽALIŲ PELENŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti žalių pelenų kiekį pašaruose.

▼B

2. **Metodas**

Ėminys sudeginamas 550 °C temperatūroje; likutis pasveriamas.

3. **Reagentai**

Amonio nitrato tirpalas, 20 % (m/V)

4. **Aparatūra**

4.1 Kaitlentė

4.2 Elektrinė mufelinė krosnis su šilumine rele

4.3 Kvarciniai, porcelianiniai arba platininiai tigliai ėminiui sudeginti, stačiakampiai (maždaug 60 × 40 × 25 mm) arba apvalieji (skersmuo: 60–75 mm, aukštis: 20–40 mm)

5. **Procedūra**

Maždaug 5 g ėminio (2,5 g tuo atveju, kai analizuojami linkę išsipūsti produktai) pasveriama 1 mg tikslumu ir supilama į ėminiui sudeginti skirtą tiglį, kuris pats prieš tai buvo iškaitintas 550 °C temperatūroje, atvėsintas ir pasvertas. Tiglis statomas ant kaitlentės ir iš lėto kaitinamas tol, kol medžiaga suanglėja. Iškaitinama pagal 5.1 arba 5.2.

5.1 Tiglis dedamas į reguliuojamos temperatūros mufelinę krosnį, nustatytą 550 °C. Medžiaga laikoma toje temperatūroje, kol virsta baltais, šviesiai pilkais ar rausvais pelenais, kuriuose greičiausiai nebeliko anglingųjų dalelių. Tiglis dedamas į eksikatorių atvėsti ir iš karto sveriamas.

5.2 Tiglis dedamas į reguliuojamos temperatūros mufelinę krosnį, nustatytą 550 °C. Kaitinama 3 h. Tiglis dedamas į eksikatorių atvėsti ir iš karto sveriamas. Kaitinama dar 30 min, siekiant užtikrinti, kad pelenų masė nekinta (masės skirtumas tarp dviejų nuoseklių svėrimų turi būti mažesnis arba lygus 1 mg).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Likučio masė apskaičiuojama, atimant tiglio masę.

Rezultatas išreiškiamas ėminio masės procentais.

7. **Pastabos**

7.1 *Medžiagų, kurias sunku paversti pelenais*, pelenai iš pradžių turi būti kaitinami ne trumpiau kaip tris valandas, atvėsinami ir į juos įlašinami keli lašai 20 % amonio nitrato tirpalo arba vandens (lašinama atsargiai, kad pelenai neišsisklaidytų arba nesušoktų į gabalus). Išdžiovinus, toliau kaitinama krosnyje. Prireikus veiksmas kartojamas tol, kol medžiaga visiškai virsta pelenais.

7.2 Jei *medžiagos atsparios apdorojimui*, aprašytam 7.1 punkte, daroma taip: po trijų valandų kaitinimo, pelenai supilami į šiltą vandenį ir filtruojami per mažą bepelenį filtrą. Filtras su turiniu sudeginamas prieš tai naudotame tiglyje. Į atvėsintą tiglį supilamas filtratas, tirpalas išgarinamas iki sauso likučio, likutis iškaitinamas ir pasveriamas.

7.3 Analizuojant a*liejus ir riebalus,* tinkamo dydžio tiglyje tiksliai pasveriamas 25 g ėminys. Ėminys anglinamas padegant jį bepelenio filtravimo popieriaus juostele. Sudeginus likutis sudrėkinamas kiek įmanoma mažesniu kiekiu vandens. Likutis džiovinamas ir iškaitinamas, kaip aprašyta 5 skyriuje.

▼B

N. VANDENILIO CHLORIDO RŪGŠTYJE NETIRPIŲ PELENŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti neorganinių medžiagų, kurios netirpsta vandenilio chlorido rūgštyje, kiekį pašaruose. Atsižvelgiant į bandinio tipą, galima taikyti du metodus.

1.1 *A metodas.* Taikomas organiniams pašarams ir didesnei daliai kombinuotųjų pašarų;

1.2 *B metodas.* Taikomas neorganiniams junginiams ir mišiniams, taip pat kombinuotiesiems pašarams, kuriuose A metodu nustatytas vandenilio chlorido rūgštyje netirpių medžiagų kiekis yra didesnis nei 1 %.

2. **Metodas**

2.1 *A metodas.* Ėminys paverčiamas pelenais, pelenai virinami vandenilio chlorido rūgštyje, neištirpusi dalis filtruojama ir sveriama.

2.2 *B metodas.* Ėminys apdorojamas vandenilio chlorido rūgštimi. Tirpalas filtruojamas, likutis paverčiamas pelenais, kurie apdorojami pagal A metodą.

3. **Reagentai**

3.1 Vandenilio chlorido rūgštis 3 mol/l

3.2 Trichloracto rūgštis, 20 % (m/V) tirpalas

3.3 Trichloracto rūgštis, 1 % (m/V) tirpalas

4. **Aparatūra**

4.1 Kaitlentė

4.2 Elektrinė mufelinė krosnis su šilumine rele

4.3 Kvarciniai, porcelianiniai arba platininiai tigliai ėminiui sudeginti, stačiakampiai (maždaug 60 × 40 × 25 mm) arba apvalieji (skersmuo: 60–75 mm, aukštis: 20–40 mm)

5. **Procedūra**

5.1 *A metodas*

Ėminys sudeginamas taip pat, kaip nustatant žalių pelenų kiekį. Galima panaudoti pelenus, gautus atliekant šią analizę.

Pelenai supilami į 250–400 ml cheminę stiklinę, naudojant 75 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1). Mišinys lėtai užvirinamas ir atsargiai virinamas penkiolika minučių. Šiltas tirpalas filtruojamas per bepelenį filtrą ir likutis plaunamas šiltu vandeniu tol, kol plovimo vanduo nerodo rūgščios reakcijos. Filtras su likučiu džiovinamas ir pasvertame tiglyje sudeginamas ne žemesnėje nei 550 °C, bet ne aukštesnėje nei 700 °C temperatūroje. Tiglis atvėsinamas eksikatoriuje ir pasveriamas.

5.2 *B metodas*

5 g ėminio pasveriama 1 mg tikslumu ir supilama į 250–400 ml cheminę stiklinę. Įpilama 25 ml vandens ir 25 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1), sumaišoma ir palaukiama dujų skyrimosi pabaigos. Įpilama dar 50 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1). Palaukiama dar galimo dujų skyrimosi pabaigos, stiklinė statoma į verdančio vandens vonią ir laikoma joje trisdešimt minučių, prireikus ir ilgiau, kad visiškai būtų hidrolizuotas krakmolas, kurio galėjo būti ėminyje. Šiltas tirpalas filtruojamas per bepelenį filtrą, likutis plaunamas 50 ml šilto vandens (žr. 7 pastabą). Filtras su likučiu dedamas į tiglį ėminiui sudeginti,

▼B

džiovinamas ir sudeginamas ne žemesnėje nei 550 °C, bet ne aukštesnėje nei 700 °C temperatūroje. Pelenai supilami į 250–400 ml cheminę stiklinę, naudojant 75 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1); tęsiama, kaip nurodyta antroje 5.1 punkto pastraipoje.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Likučio masė apskaičiuojama, atimant tiglio masę. Rezultatas išreiškiamas ėminio masės procentais.

7. **Pastaba**

Jei ėminys sunkiai filtruojamas, analizė atliekama iš naujo, 50 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1) pakeičiant 50 ml 20 % trichloracto rūgšties (3.2) ir plaunant filtrą šiltu 1 % trichloracto rūgšties tirpalu (3.3).

O. KARBONATŲ NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti pašaruose karbonatų kiekį, kuris paprastai išreiškiamas kalcio karbonato kiekiu.

Tačiau tam tikrais atvejais (pvz., naudojant geležies karbonatą) būtina taikyti specialųjį metodą.

2. **Metodas**

Karbonatai skaidomi vandenilio chlorido rūgštimi; išsiskyręs anglies dioksidas surenkamas į matavimo biuretę ir jo tūris palyginamas su tūriu, kuris tomis pačiomis sąlygomis susidaro iš žinomo kalcio karbonato kiekio.

3. **Reagentai**

3.1 Vandenilio chlorido rūgštis, tankis 1,10 g/ml

3.2 Kalcio karbonatas

3.3 Sieros rūgštis, maždaug 0,05 mol/l, nudažyta metilraudonuoju

4. **Aparatūra**

Scheibler-Dietrich aparatas (žr. piešinį) ar panašus aparatas.

5. **Procedūra**

Atsižvelgiant į karbonatų kiekį ėminyje, sveriamas toks ėminio kiekis:

— 0,5 g produktų, kuriuose karbonatai, išreikšti kalcio karbonato kiekiu, sudaro nuo 50 iki 100 %,

— 1 g produktų, kuriuose karbonatai, išreikšti kalcio karbonato kiekiu, sudaro nuo 40 iki 50 %,

— 2–3 g kitų produktų.

Ėminys supilamas į specialų aparato butelį (4), į kurį įstatytas iš nedūžtančios medžiagos pagamintas mažas mėgintuvėlis su 10 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1), ir butelis prijungiamas prie aparato. Trišakis čiaupas (5) pasukamas taip, kad vamzdis (1) susijungtų su atmosfera. Kilnojamu vamzdžiu (2), kuris yra pripildytas nudažytos sieros rūgšties (3.3) ir prijungtas prie matavimo biuretės (1), skysčio lygis nustatomas ties nulio padala. Čiaupas (5) pasukamas taip, kad biuretė (1) ir vamzdis (3) būtų sujungti, ir patikrinama, ar skysčio lygis yra ties nulio padala.

Vandenilio chlorido rūgštis (3.1) palenkiant butelį (4) po truputį supilama ant ėminio. Slėgis išlyginamas nuleidžiant vamzdį (2). Butelis (4) kratomas tol, kol anglies dioksidas nustoja skirtis.

Grąžinamas pradinis slėgis, sulyginant skysčio lygį biuretėje (1) ir vamzdyje (2). Po *kelių minučių*, jei dujų tūris daugiau nekinta, rodmuo užrašomas.

Tomis pačiomis sąlygomis atliekamas kontrolinis bandymas su 0,5 g kalcio karbonato (3.2).

▼B

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Karbonatų, išreikštų kalcio karbonatu, kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

kurioje:

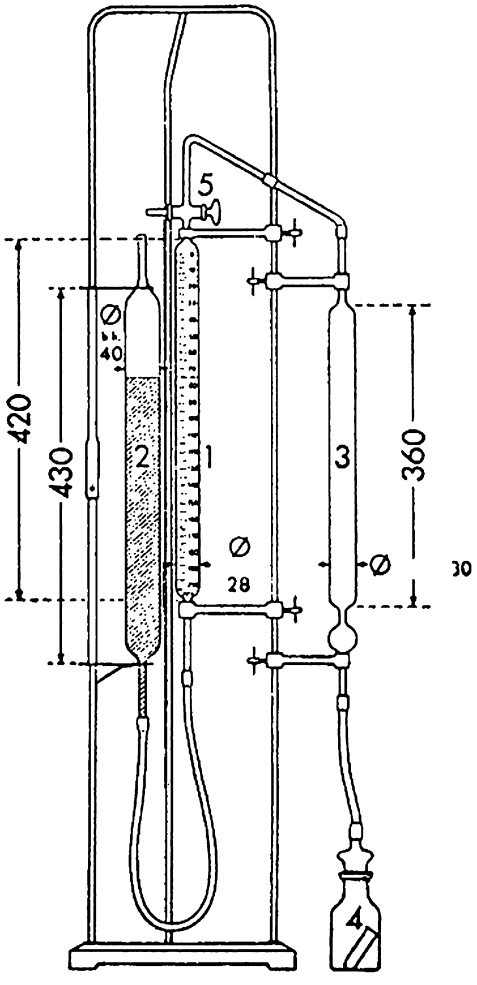
X = karbonatų, išreikštų kalcio karbonatu, procentinis kiekis ėminyje (w/w)
V = CO_2 tūris, kuris susidaro iš ėminio, ml;
V_1 = CO_2 tūris, kuris susidaro iš 0,5 g $CaCO_3$, ml;
m = ėminio tiriamosios dalies masė gramais.

7. **Pastabos**

7.1 Jei ėminio masė didesnė nei 2 g, iš pradžių į butelį (4) įpilama 15 ml distiliuoto vandens ir prieš bandymo pradžią sumaišoma. Toks pats vandens tūris naudojamas atliekant kontrolinį bandymą.

7.2 Jei naudojamas aparatas turi kitokį tūrį, nei *Scheibler-Dietrich* aparato tūris, sveriamo ėminio masė ir kontrolinio ėminio masė bei rezultatų apskaičiavimas turi būti atitinkamai pakeisti.

SCHEIBLER-DIETRICH APARATAS CO_2 NUSTATYMUI



(matuojama mm)

▼B

P. SUMINIO FOSFORO KIEKIO NUSTATYMAS

FOTOMETRINIS METODAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti suminio fosforo kiekį pašaruose. Jis labiausiai tinka analizuoti produktus, kuriuose nedaug fosforo. Kai kuriais atvejais (kai produkte daug fosforo) galima taikyti gravimetrinį metodą.

2. **Metodas**

Ėminys mineralizuojamas sausuoju deginimu (organinių pašarų) arba skaidant rūgštyje (mineralinių junginių ir skystųjų pašarų) ir ir įdedamas į rūgšties tirpalą. Tirpalas veikiamas molibdovanadato reagentu. Taip susidariusio geltono tirpalo optinis tankis matuojamas spektrofotometru esant 430 nm bangos ilgiui.

3. **Reagentai**

3.1 Kalcio karbonatas

3.2 Vandenilio chlorido rūgštis, ρ_{20} = 1,10 g/ml (maždaug 6 mol/l)

3.3 Azoto rūgštis, ρ_{20} = 1,045 g/ml

3.4 Azoto rūgštis, ρ_{20} = 1,38–1,42 g/ml

3.5 Sieros rūgštis, ρ_{20} = 1,84 g/ml

3.6 Molibdovanadato reagentas: 1 litro matavimo kolboje sumaišoma 200 ml amonio heptamolibdato tirpalo (3.6.1), 200 ml amonio monovanadato tirpalo (3.6.2) ir 134 ml azoto rūgšties (3.4). Skiedžiama vandeniu iki žymės.

3.6.1 Amonio heptamolibdato tirpalas: karštame vandenyje ištirpinama 100 g amonio heptamolibdato tetrahidrato $(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$. Įpilama 10 ml amoniako (tankis 0,91 kg/l) ir skiedžiama vandeniu iki 1 l.

3.6.2 Amonio monovanadato tirpalas: 2,35 g amonio monovanadato, NH_4VO_3 ištirpinama 400 ml karšto vandens. Nuolat maišant lėtai įpilama 20 ml praskiestos azoto rūgšties (7 ml HNO_3 (3.4) ir 13 ml H_2O) ir skiedžiama vandeniu iki 1 l.

3.7 Etaloninis fosforo tirpalas 1 mg/ml: ištirpinkite 4,387 g kalio dihidrofosfato, KH_2PO_4 vandenyje. Skiedžiama vandeniu iki 1 l.

4. **Aparatūra**

4.1 Kvarciniai, porcelianiniai arba platininiai tigliai ėminiui sudeginti.

4.2 Elektrinė mufelinė krosnis su šilumine rele, nustatyta 550 °C temperatūrai.

4.3 250 ml Kjeldalio kolba.

4.4 Matavimo kolbos ir tikslios pipetės.

4.5 Spektrofotometras.

4.6 Maždaug 16 mm skersmens mėgintuvėliai su 14,5 mm skersmens kamščiais; talpa: 25–30 ml.

5. **Procedūra**

5.1 *Tirpalo ruošimas*

Atsižvelgiant į ėminio tipą, ruošiamas tirpalas, kaip nurodyta 5.1.1. arba 5.1.2.

5.1.1 Įprastinė procedūra

Pasveriama 1 g arba daugiau ėminio 1 mg tikslumu. Ėminys dedamas į Kjeldalio kolbą, įpilama 20 ml sieros rūgšties (3.5), kolba kratoma, kad medžiaga visiškai susimaišytų su rūgštimi ir nepriliptų ant kolbos sienelių, pakaitinama iki virimo ir virinama 10 min. Kolba paliekama

▼B

šiek tiek atvėsti, įpilama 2 ml azoto rūgšties (3.4), nestipriai pakaitinama, šiek tiek atvėsinama, įpilamas dar nedidelis kiekis azoto rūgšties (3.4) ir vėl užvirinama. Procedūra kartojama tol, kol gaunamas bespalvis tirpalas. Atvėsinama, įpilama truputį vandens, skystis supilamas į 500 ml matavimo kolbą, Kjeldalio kolbą plaunant karštu vandeniu. Paliekama atvėsti, skiedžiama vandeniu iki žymės, sumaišoma ir filtruojama.

5.1.2 Ėminiai, kuriuose yra organinių medžiagų ir nėra kalcio ir magnio dihidrofosfatų

Deginimo tiglyje pasveriama 1 mg tikslumu maždaug 2,5 g ėminio. Ėminys labai gerai sumaišomas su 1 g kalcio karbonato (3.1). Deginama krosnyje 550 °C temperatūroje tol, kol gaunami balti ar pilki pelenai (nedidelis anglių kiekis netrukdo). Pelenai supilami į 250 ml cheminę stiklinę. Įpilama 20 ml vandens ir vandenilio chlorido rūgšties (3.2) tol, kol nustoja skirtis burbuliukai. Įpilama dar 10 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.2). Stiklinė statoma ant smėlio vonios ir skystis garinamas iki sauso likučio netirpiam silicio dioksidui gauti. Likutis ištirpinamas 10 ml azoto rūgšties (3.3) ir tirpalas virinamas ant smėlio vonios arba kaitlentės 5 min, neišgarinant iki sauso likučio. Skystis supilamas į 500 ml matavimo kolbą, keletą kartų stiklinę plaunant karštu vandeniu. Kolba paliekama atvėsti, skiedžiama vandeniu iki žymės, sumaišoma ir filtruojama.

5.2 *Spalvos gavimas ir optinio tankio matavimas*

Pagal 5.1.1 arba 5.1.2 gauto filtrato alikvotinė dalis skiedžiama taip, kad gauta fosforo koncentracija būtų ne didesnė nei 40 µg/ml. Į mėgintuvėlį (4.6) įpilama 10 ml šio tirpalo ir 10 ml molibdovanadato reagento (3.6). Sumaišoma ir tirpalas paliekamas stovėti bent 10 min 20 °C temperatūroje. Spektrofotometru matuojamas optinis tankis, esant 430 nm bangos ilgiui ir palyginamuoju tirpalu naudojant tirpalą, gautą įpilant 10 ml molibdovanadato reagento (3.6) į 10 ml vandens.

5.3 *Kalibravimo kreivė*

Iš etaloninio tirpalo (3.7) ruošiami tirpalai, kurių fosforo koncentracija 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml ir 40 µg/ml. Paimama po 10 ml kiekvieno iš šių tirpalų ir į juos įpilama po 10 ml molibdovanadato reagento (3.6). Tirpalai sumaišomi ir paliekami stovėti bent 10 min 20 °C temperatūroje. Matuojamas optinis tankis, kaip nurodyta 5.2. Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinatė – optinis tankis, abscisė – fosforo koncentracija. Koncentracijos verčių intervale nuo 0 µg/ml iki 40 µg/ml kreivės dalis yra tiesinė.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Fosforo kiekis tiriamajame ėminyje nustatomas pagal kalibravimo kreivę.

Rezultatas išreiškiamas ėminio masės procentais.

Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio bandymų rezultatų skirtumas ne didesnis nei:

— 3 % didžiausiojo rezultato vertės, kai fosforo kiekis mažesnis nei 5 %,

— 0,15 % absoliučiąja verte, kai fosforo kiekis 5 % arba didesnis.

▼B

Q. CHLORIDŲ CHLORO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti vandenyje tirpių chloridų chloro kiekį, paprastai išreiškiamą natrio chlorido kiekiu. Metodas tinka visiems pašarams.

2. **Metodas**

Chloridai ištirpinami vandenyje. Jei produkte yra organinių medžiagų, jis skaidrinamas. Tirpalas šiek tiek parūgštinamas azoto rūgštimi ir chloridai nusodinami sidabro chlorido pavidalu, veikiant sidabro nitrato tirpalu. Sidabro perteklius yra titruojamas amonio tiocianatu pagal Volhardo metodą.

3. **Reagentai**

3.1 Amonio tiocianato tirpalas, 0,1 mol/l.

3.2 Sidabro nitrato tirpalas, 0,1 mol/l.

3.3 Sotusis amonio-geležies (III) sulfato $(NH_4)Fe(SO_4)_2$ tirpalas.

3.4 Azoto rūgštis, tankis: 1,38 g/ml.

3.5 Dietileteris.

3.6 Acetonas.

3.7 *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.8 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.9 Aktyvintosios anglys, neturinčios chloridų ir jų neabsorbuojančios.

4. **Aparatūra**

Maišiklis (vartytuvas), apsisukimų dažnis maždaug 35–40 min^{-1}.

5. **Procedūra**

5.1 *Tirpalo ruošimas*

Atsižvelgiant į ėminio pobūdį, tirpalas ruošiamas pagal 5.1.1, 5.1.2 arba 5.1.3 punktą.

Kartu atliekamas *tuščiasis bandymas*, nededant analizuojamo ėminio.

5.1.1 Organinių medžiagų neturintys ėminiai

1 mg tikslumu pasveriama ne daugiau nei 10 g ėminio, kuriame chloro chloridų pavidalu būtų ne daugiau nei 3 g. 500 ml matavimo kolboje ėminys ištirpinamas 400 ml vandens, kurio temperatūra maždaug 20 °C. Trisdešimt minučių tirpalas maišomas maišymo būgne, praskiedžiamas iki žymės, sumaišomas ir filtruojamas.

5.1.2 Organinių medžiagų turintys ėminiai, išskyrus 5.1.3 punkte išvardytus produktus

1 mg tikslumu pasveriama ne daugiau nei 5 g ėminio, kuris kartu su 1 g aktyvintųjų anglių supilamas į 500 ml matavimo kolbą. Įpilama 400 ml vandens, kurio temperatūra apie 20 °C, ir 5 ml *Carrez* I tirpalo (3.7), maišoma 30 s, įpilama 5 ml *Carrez* II tirpalo (3.8). Maišymo būgne maišoma trisdešimt minučių, skiedžiama iki žymės, sumaišoma ir filtruojama.

▼B

5.1.3 Virti pašarai, linų sėmenų išspaudos ir miltai, produktai, kuriuose daug linų sėmenų miltų, ir kiti produktai, kuriuose daug glitėsių ar koloidinių medžiagų (pvz., dekstrinuotas krakmolas)

Tirpalas ruošiamas taip, kaip aprašyta 5.1.2 punkte, bet nefiltruojamas. Skystis nupilamas nuo nuosėdų (prireikus, centrifuguojamas), 100 ml skysčio įpilama į 200 ml matavimo kolbą. Skystis maišomas su acetonu (3.6), šiuo tirpikliu skiedžiamas iki žymės, tirpalas sumaišomas ir filtruojamas.

5.2 *Titravimas*

Pipete į Erlenmejerio kolbą paimama 25–100 ml (pagal numatomą chlorido kiekį) tirpalo, paruošto pagal 5.1.1, 5.1.2 ar 5.1.3 punktus. Paimtoje alikvotinėje tirpalo dalyje turi būti ne daugiau nei 150 mg chloro (Cl). Prireikus tirpalas skiedžiamas ne mažiau nei 50 ml vandens, įpilama 5 ml azoto rūgšties (3.4), 20 ml sočiojo amonio-geležies (III) sulfato tirpalo (3.3) ir du lašai amonio tiocianato tirpalo (3.1), lašinamo iš biuretės, pripildytos iki nulinės žymės. Iš biuretės įpilama tiek sidabro nitrato tirpalo (3.2), kad susidarytų 5 ml perteklius. Įpilama 5 ml dietileterio (3.5) ir stipriai purtoma, kad nuosėdos koaguliuotų. Sidabro nitrato perteklius titruojamas amonio tiocianato tirpalu (3.1) tol, kol atsiradusi raudonai ruda spalva neišnyksta per vieną minutę.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Chloro kiekis, išreikštas natrio chlorido kiekio % (X), apskaičiuojamas pagal tokią formulę:

$$X = \frac{5{,}845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

čia:

V_1 = įpilto 0,1 mol/l sidabro nitrato tirpalo tūris ml,
V_2 = analizei suvartoto 0,1 mol/l amonio tiocianato tirpalo tūris ml,
m = ėminio svoris.
Jei tuščiasis bandymas rodo, kad 0,1 mol/l sidabro nitrato tirpalo buvo sunaudota, šis tūris atimamas iš tūrio ($V_1 - V_2$).

7. **Pastabos**

7.1 Titravimą taip pat galima atlikti potenciometriškai.

7.2 Tuo atveju, jei produktuose yra daug aliejų ir riebalų, iš pradžių dietileteriu ar petroleteriu pašalinami riebalai.

7.3 Analizuojant žuvų miltus, chloridus galima titruoti Mohro metodu.

▼B

IV PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI LEIDŽIAMŲ PAŠARŲ PRIEDŲ KONCENTRACIJAI KONTROLIUOTI

A. A VITAMINO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šis metodas taikomas A vitaminui A (retinoliui) pašaruose ir premiksuose nustatyti. A vitaminą sudaro visų-*trans*-(padėčių)-retinolis ir jo *cis*-izomerai, kurie yra nustatomi šiuo metodu. A vitamino kiekis yra išreiškiamas tarptautiniais vienetais (IU) vienam kg. Vienas IU atitinka 0,300 µg visų-*trans*-(padėčių)-vitamino A ar 0,344 µg visų-*trans*-(padėčių)-vitamino A acetato arba 0,550 µg visų-*trans*-(padėčių)-vitamino A palmitato aktyvumą.

Kiekybinio nustatymo riba – 2 000 IU A vitamino/kg.

2. **Metodas**

Ėminys hidrolizuojamas šarminiu kalio hidroksido tirpalu ir A vitaminas ekstrahuojamas petroleteriu. Tirpiklis išgarinamas, likutis ištirpinamas metanolyje ir, jei reikia, skiedžiamas iki reikiamos koncentracijos. A vitamino kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (RP-HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį arba fluorescencinį detektorių. Chromatografavimo parametrai pasirenkami taip, kad neatsiskiria visų-*trans*-(padėčių)-vitamino A alkoholis ir jo *cis*-izomerai.

3. **Reagentai**

3.1 Etanolis, σ = 96 %.

3.2 Petroleteris, virimo temperatūros intervalas 40 °C–60 °C.

3.3 Metanolis.

3.4 Kalio hidroksido tirpalas, c = 50 g/100 ml.

3.5 Natrio askorbato tirpalas, c = 10 g/100 ml (žr. 7.7 pastabas).

3.6 Natrio sulfidas, $Na_2S \cdot xH_2O$ (x = 7–9).

3.6.1 Natrio sulfido tirpalas glicerolyje, c = 0,5 mol/l, ß = 120 g/l (kai x = 9) (žr. 7.8 pastabas).

3.7 Fenolftaleino tirpalas etanolyje (3.1), c = 2 g/100 ml.

3.8 2-propanolis.

3.9 HPLC judančioji fazė: metanolio (3,3) ir vandens mišinys, pvz., 980 + 20 (V + V). Tikslus santykis nustatomas pagal naudojamos kolonėlės charakteristikas.

3.10 Azotas, be deguonies.

3.11 Visos-*trans*-vitamino A acetatas, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo, pvz., $2{,}80 \times 10^6$ IU/g

3.11.1 Visos-*trans*-vitamino A acetato pradinis tirpalas: į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg A vitamino acetato (3.11). Ištirpinama 2-propanolyje (3.8) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. Šio tirpalo vardinė koncentracija yra lygi 1 400 IU A vitamino viename ml. Tikslus kiekis turi būti nustatytas pagal 5.6.3.1.

3.12 Visos-*trans*-vitamino A palmitatas, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo, pvz., $1{,}80 \times 10^6$ IU/g

▼B

3.12.1 Visos-*trans*-vitamino A palmitato pradinis tirpalas: į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 80 mg A vitamino palmitato (3.12). Ištirpinama 2-propanolyje (3.8) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. Šio tirpalo vardinė koncentracija yra lygi 1 400 IU A vitamino viename ml. Tikslus kiekis turi būti nustatytas pagal 5.6.3.2.

3.13 2,6-di-*tret*-butil-4-metilfenolis (BHT) (žr. 7.5 pastabas)

4. **Aparatūra**

4.1 Vakuuminis sukamasis garintuvas

4.2 Rudo stiklo indai

4.2.1 plokščiadugnės arba kūginės kolbos, 500 ml, su šlifo mova;

4.2.2 matavimo kolbos su šlifo kamščiais, siaurakaklės, 10, 25, 100 ir 500 ml;

4.2.3 kūginiai dalijamieji piltuvai, 1 000 ml, su šlifo kamščiais;

4.2.4 kriaušės formos kolbos, 250 ml, su šlifo mova.

4.3 *Allihn* kondensatorius, apvalkalo ilgis 300 mm, su šlifo jungtimi, su dujų tiekimo vamzdžio adapteriu

4.4 Gofruotasis filtravimo popierius fazėms atskirti, skersmuo 185 mm (pvz., *Schleicher & Schuell* 597 HY 1/2)

4.5 HPLC įranga su įpurškimo sistema

4.5.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė, 250 mm × 4 mm, C_{18}, 5 ar 10 μm įkrova, ar lygiavertė kolonėlė (veikimo kriterijus: tik viena visų retinolio izomerų smailė HPLC sąlygomis)

4.5.2 Reguliuojamo bangos ilgio fluorescencinis arba ultravioletinis detektorius

4.6 Spektrofotometras ir 10 mm kvarco kiuvetės

4.7 Vandens vonia ir magnetinė maišyklė

4.8 Ekstrahavimo aparatas (žr. 1 paveikslą), kurį sudaro:

4.8.1 1 l talpos stiklinis cilindras su šlifo mova ir kamščiu;

4.8.2 šlifo įmova su atšaka ir reguliuojamo ilgio vamzdžiu, einančiu per centrą. Reguliuojamo ilgio vamzdžio apatinis galas yra U formos, viršutinis – siaurėjančio antgalio formos, kad cilindre esančio tirpalo viršutinis sluoksnis galėtų būti supiltas į dalijamąjį piltuvą.

5. **Procedūra**

Pastaba. A vitaminas yra jautrus ultravioletinei spinduliuotei ir oksidavimui. Visi veiksmai atliekami tamsoje (naudojami rudo stiklo indai arba aliuminio folija apvynioti indai) ir nesant deguonies (šalinamas azoto srove). Ekstrahuojant oras virš skysčio pakeičiamas azotu (vengiant per didelio slėgio kartkartėmis reikia ištraukti kamštį).

5.1 *Ėminio ruošimas*

Ėminys sumalamas, kad jį būtų galima sijoti per sietą su 1 mm dydžio akutėmis, vengiant šilumos susidarymo. Turi būti malama **prieš pat** svėrimą ir muilinimą, kad nebūtų A vitamino nuostolių.

▼B

5.2 *Muilinimas*

Atsižvelgiant į A vitamino kiekį, 1 mg tikslumu pasveriama 2–25 g ėminio, ėminys supilamas į plokščiadugnę ar kūginę 500 ml tūrio kolbą (4.2.1). Maišant iš eilės įpilama 130 ml etanolio (3.1), maždaug 100 mg BHT (3.13), 2 ml natrio askorbato tirpalo (3.5) ir 2 ml natrio sulfido tirpalo (3.6). Prie kolbos prijungiamas kondensatorius (4.3) ir kolba įmerkiama į vandens vonią su magnetine maišykle (4.7). Šildoma iki virimo ir verdama 5 min su grįžtamuoju kondensatoriumi. Tuomet per kondensatorių (4.3) įpilama 25 ml kalio hidroksido tirpalo (3.4) ir dar 25 min. verdama su grįžtamuoju kondensatoriumi, maišant silpna azoto srove. Kondensatorius plaunamas maždaug 20 ml vandens ir kolbos turinys aušinamas iki kambario temperatūros.

5.3 *Ekstrahavimas*

Muilinimo tirpalas dekantuojant kiekybiškai supilamas į 1 000 ml dalijamąjį piltuvą (4.2.3) ar į ekstrahavimo aparatą (4.8), iš viso plovimui sunaudojant 250 ml vandens. Muilinimo kolba iš eilės plaunama 25 ml etanolio (3.1) ir 100 ml petroleterio (3.2), plovimo skysčiai supilami į dalijamąjį piltuvą ar į ekstrahavimo aparatą. Vandens ir etanolio santykis gautame bendrame tirpale turi būti apie 2:1. Stipriai purtoma 2 min ir 2 min paliekama nusistovėti.

5.3.1 Ekstrahavimas naudojant dalijamąjį piltuvą (4.2.3)

Kai sluoksniai atsiskiria (žr. 7.3 pastabą), petroleterio sluoksnis supilamas į kitą dalijamąjį piltuvą (4.2.3). Ekstrahavimas kartojamas du kartus su 100 ml petroleterio (3.2) ir du kartus su 50 ml petroleterio (3.2).

Dalijamajame piltuve sujungti ekstraktai du kartus plaunami 100 ml vandens, švelniai sukant piltuvą (kad nesusidarytų emulsija), purtant piltuvą ekstraktai toliau plaunami 100 ml vandens porcijomis tol, kol vandeninis sluoksnis lieka bespalvis, kai įpilama fenolftaleino tirpalo (3.7) (paprastai pakanka plauti keturis kartus). Išplautas ekstraktas filtruojamas per sausą gofruotąjį filtrą fazėms atskirti (4.4) į 500 ml matavimo kolbą (4.2.2), kad būtų pašalintas visas suspenduotas vanduo. Dalijamasis piltuvas ir filtras plaunami 50 ml petroleterio (3.2), skiedžiama petroleteriu (3.2) iki žymės ir gerai sumaišoma.

5.3.2 Ekstrahavimas naudojant ekstrahavimo aparatą (4.8)

Sluoksniams atsiskyrus (žr. 7.3 pastabą), stiklinio cilindro (4.8.1) kamštis keičiamas šlifo įmova (4.8.2) ir reguliuojamo vamzdžio apatinis U formos galas nustatomas taip, kad jis būtų šiek tiek virš sluoksnių skiriamosios ribos. Iš azoto tiekimo linijos per atšaką pučiant suslėgtąjį azotą, viršutinis petroleterio sluoksnis supilamas į 1 000 ml dalijamąjį piltuvą (4.2.3). Į stiklinį cilindrą įpilama 100 ml petroleterio (3.2), cilindras užkemšamas ir gerai supurtomas. Sluoksniams leidžiama atsiskirti ir kaip pirmiau viršutinis sluoksnis supilamas į dalijamąjį piltuvą. Ekstrahavimo procedūra kartojama dar kartą su 100 ml petroleterio (3.2), vėliau du kartus su 50 ml petroleterio (3.2) ir petroleterio sluoksniai supilami į dalijamąjį piltuvą.

Sujungti petroleterio ekstraktai plaunami, kaip aprašyta 5.3.1, ir tęsiama, kaip ten aprašyta.

5.4 *Ėminio tirpalo ruošimas HPLC analizei*

Į 250 ml kriaušės formos kolbą (4.2.4) pipete paimama alikvotinė petroleterio tirpalo (5.3.1 ar 5.3.2) dalis. Sukamajame garintuve (4.1) esant sumažintam slėgiui tirpiklis išgarinamas beveik iki sauso likučio, kai vonios temperatūra ne aukštesnė nei 40 ^{o}C. Įleidžiant azoto (3.10), slėgis

▼B

didinamas iki atmosferos slėgio, kolba nuimama nuo sukamojo garintuvo. Likęs tirpiklis pašalinamas azoto srove (3.10) ir likutis iš karto tirpinamas žinomame tūryje (10–100 ml) metanolio (3.3) (A vitamino koncentracija turi būti 5 IU/ml–30 IU/ml intervale).

5.5 *Nustatymas HPLC metodu*

A vitaminas atskiriamas C_{18} atvirkštinių fazių kolonėlėje (4.5.1), koncentracija matuojama naudojant ultravioletinį detektorių (325 nm) arba fluorescencinį detektorių (sužadinimas: 325 nm, emisija: 475 nm) (4.5.2).

Alikvotinė metanolinio tirpalo, gauto pagal 5.4 dalį, dalis (pvz., 20 µl) įpurškiama ir plaunama judančiąja faze (3.9). Apskaičiuojamas kelių to paties ėminio įpurkštų tirpalų vidutinis smailių aukštis (plotas) ir kelių įpurkštų kalibravimo tirpalų (5.6.2) vidutiniai smailių aukščiai (plotai).

HPLC sąlygos

Rekomenduojamos šios sąlygos; galima taikyti kitas sąlygas, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C_{18}, 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė
Judančioji fazė (3.9):	metanolio (3.3) ir vandens mišinys, pvz., 980 + 20 (V + V).
Srautas:	1–2 ml/min
Detektorius (4.5.2):	ultravioletinis (325 nm) arba fluorescencinis detektorius (sužadinimas: 325 nm, emisija: 475 nm)

5.6 *Kalibravimas*

5.6.1 Darbinių etaloninių tirpalų ruošimas

Į 500 ml plokščiadugnę ar kūginę kolbą (4.2.1) pipete paimama 20 ml A vitamino acetato pradinio tirpalo (3.11.1) arba 20 ml A vitamino palmitato pradinio tirpalo (3.12.1) ir hidrolizuojama, kaip aprašyta 5.2, bet be BHT. Vėliau ekstrahuojama petroleteriu (3.2) pagal 5.3 dalį ir skiedžiama petroleteriu (3.2) iki 500 ml. 100 ml šio ekstrakto sukamajame garintuve (žr. 5.4) išgarinama beveik iki sauso likučio, likęs tirpiklis pašalinamas azoto srove (3.10) ir likutis ištirpinamas 10,0 ml metanolio (3.3). Šio tirpalo vardinė koncentracija yra 560 IU A vitamino viename ml. Tikslus kiekis nustatomas pagal 5.6.3.3. Darbinis etaloninis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo prieš naudojimą.

Į 20 ml matavimo kolbą pipete paimama 2,0 ml šio darbinio etaloninio tirpalo, skiedžiama iki žymės metanoliu (3.3) ir sumaišoma. Šio **praskiesto** darbinio tirpalo vardinė koncentracija yra 56 IU A vitamino viename ml.

5.6.2 Kalibravimo tirpalų ruošimas ir kalibravimo kreivės gavimas

Į keletą 20 ml tūrio matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 5,0 ir 10,0 ml **praskiesto** darbinio etaloninio tirpalo, skiedžiama iki žymės metanoliu (3.3) ir sumaišoma. Šių tirpalų vardinė koncentracija yra 2,8, 5,6, 14,0 ir 28,0 IU A vitamino viename ml.

Kelis kartus įpurškiama 20 µl kiekvieno etaloninio tirpalo ir nustatomi vidutiniai smailių aukščiai (plotai). Pagal vidutinius smailių aukščius (plotus) brėžiama kalibravimo kreivė, atsižvelgiant į UV kontrolės rezultatus (5.6.3.3).

▼B

5.6.3 Etaloninių tirpalų UV etalonavimas

5.6.3.1 *A vitamino acetato pradinis tirpalas*

Į 50 ml matavimo kolbą (4.2.2) pipete paimama 2,0 ml A vitamino acetato pradinio tirpalo (3.11.1) ir 2-propanoliu (3.8) skiedžiama iki žymės. Vardinė šio tirpalo koncentracija yra 56 IU A vitamino viename ml. Į 25 ml matavimo kolbą pipete paimama 3,0 ml šio praskiesto A vitamino acetato tirpalo ir 2-propanoliu (3.8) skiedžiama iki žymės. Vardinė šio tirpalo koncentracija yra 6,72 IU A vitamino viename ml. Spektrofotometru (4.6) matuojamas šio tirpalo ultravioletinis spektras pagal 2-propanolį (3.8) 300 nm–400 nm diapazone. Ekstinkcijos maksimumas turi būti nuo 325 nm iki 327 nm.

A vitamino kiekio apskaičiavimas:

$$\text{A vitamino IU/ml} = E_{326} \times 19{,}0$$

($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ A vitamino acetato = 1 530, esant 326 nm, 2-propanolyje)

5.6.3.2 *A vitamino palmitato pradinis tirpalas*

Į 50 ml matavimo kolbą (4.2.2) pipete paimama 2,0 ml A vitamino palmitato pradinio tirpalo (3.12.1) ir 2-propanoliu (3.8) skiedžiama iki žymės. Vardinė šio tirpalo koncentracija yra 56 IU A vitamino viename ml. Į 25 ml matavimo kolbą pipete paimama 3,0 ml šio praskiesto A vitamino palmitato tirpalo ir 2-propanoliu (3.8) skiedžiama iki žymės. Vardinė šio tirpalo koncentracija yra 6,72 IU A vitamino viename ml. Spektrofotometru (4.6) matuojamas šio tirpalo ultravioletinis spektras pagal 2-propanolį (3.8) 300 nm–400 nm diapazone. Ekstinkcijos maksimumas turi būti nuo 325 nm iki 327 nm.

A vitamino kiekio apskaičiavimas:

$$\text{A vitamino IU/ml} = E_{326} \times 19{,}0$$

($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ A vitamino palmitato = 957, esant 326 nm, 2-propanolyje)

5.6.3.3 *A vitamino darbinis etaloninis tirpalas*

Į 50 ml matavimo kolbą (4.2.2) pipete paimama 3,0 ml **nepraskiesto** A vitamino darbinio etaloninio tirpalo, paruošto pagal 5.6.1, ir 2-propanoliu (3.8) skiedžiama iki žymės. Į 25 ml matavimo kolbą pipete paimama 5,0 ml šio tirpalo ir 2-propanoliu (3.8) skiedžiama iki žymės. Vardinė šio tirpalo koncentracija yra 6,72 IU A vitamino viename ml. Spektrofotometru (4.6) matuojamas šio tirpalo ultravioletinis spektras pagal 2-propanolį (3.8) 300 nm–400 nm diapazone. Ekstinkcijos maksimumas turi būti nuo 325 nm iki 327 nm.

A vitamino kiekio apskaičiavimas:

$$\text{A vitamino IU/ml} = E_{325} \times 18{,}3$$

($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ A vitamino alkoholio = 1 821 esant 326 nm, 2-propanolyje)

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Naudojant ėminio tirpalo A vitamino smailių vidutinį aukštį (plotą), pagal kalibravimo kreivę (5.6.2) nustatoma ėminio tirpalo koncentracija IU/ml.

▼B

A vitamino kiekis ėminyje IU/kg apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [UI/kg]}$$

kurioje:

c = A vitamino koncentracija ėminio tirpale (5.4) IU/ml
V_1 = ėminio tirpalo (5.4) tūris ml
V_2 = alikvotinės tirpalo (5.4) dalies tūris ml
m = tiriamosios dalies svoris g

7. **Pastabos**

7.1 Jei ėminių A vitamino koncentracija yra maža, gali būti naudinga sujungti dviejų po muilinimo gautų įkrovų (pasvertas kiekis: 25 g) petroleterio ekstraktus į vieną ėminio tirpalą, skirtą nustatymui HPLC metodu.

7.2 Analizei paimtame ėminyje riebalų ne daugiau nei 2 g.

7.3 Jei fazės neatsiskiria, emulsijai suardyti įpilama maždaug 10 ml etanolio (3.1).

7.4 Jei tai menkės kepenų aliejus ir kiti grynieji riebalai, muilinimo trukmė prailginama iki 45 min–60 min.

7.5 Vietoje BHT galima naudoti hidrochinoną.

7.6 Naudojant tiesioginių fazių kolonėlę įmanomas retinolio izomerų atskyrimas. Bet šiuo atveju atliekant apskaičiavimus visų *cis*- ir *trans*-izomerų smailių aukščiai (plotai) turi būti sudėti.

7.7 Vietoje natrio askorbato tirpalo galima naudoti maždaug 150 mg askorbo rūgšties.

7.8 Vietoje natrio sulfido tirpalo galima naudoti maždaug 50 mg EDTA.

7.9 Analizuojant A vitaminą pieno pakaitaluose, ypač reikia kreipti dėmesį į:

— muilinimą (5.2): dėl ėminyje esančio riebalų kiekio gali tekti naudoti didesnį kalio hidroksido tirpalo (3.4) tūrį,

— ekstrahavimą (5.3): dėl emulsijų buvimo gali tekti keisti vandens ir etanolio santykį 2:1.

Norint patikrinti, ar šiai konkrečiai matricai (pieno pakaitalui) taikomu analizės metodu gaunami patikimi rezultatai, išgavos dydis patikrinamas, paėmus papildomą tiriamąją dalį. Jei išgavos dydis mažesnis nei 80 %, turi būti daroma analizės rezultato pataisa dėl išgavos dydžio.

8. **Pakartojamumas**

Dviejų lygiagrečiai atliekamų to paties ėminio matavimų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 15 % didžiausiojo rezultato vertės.

▼B

9. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai** [1]

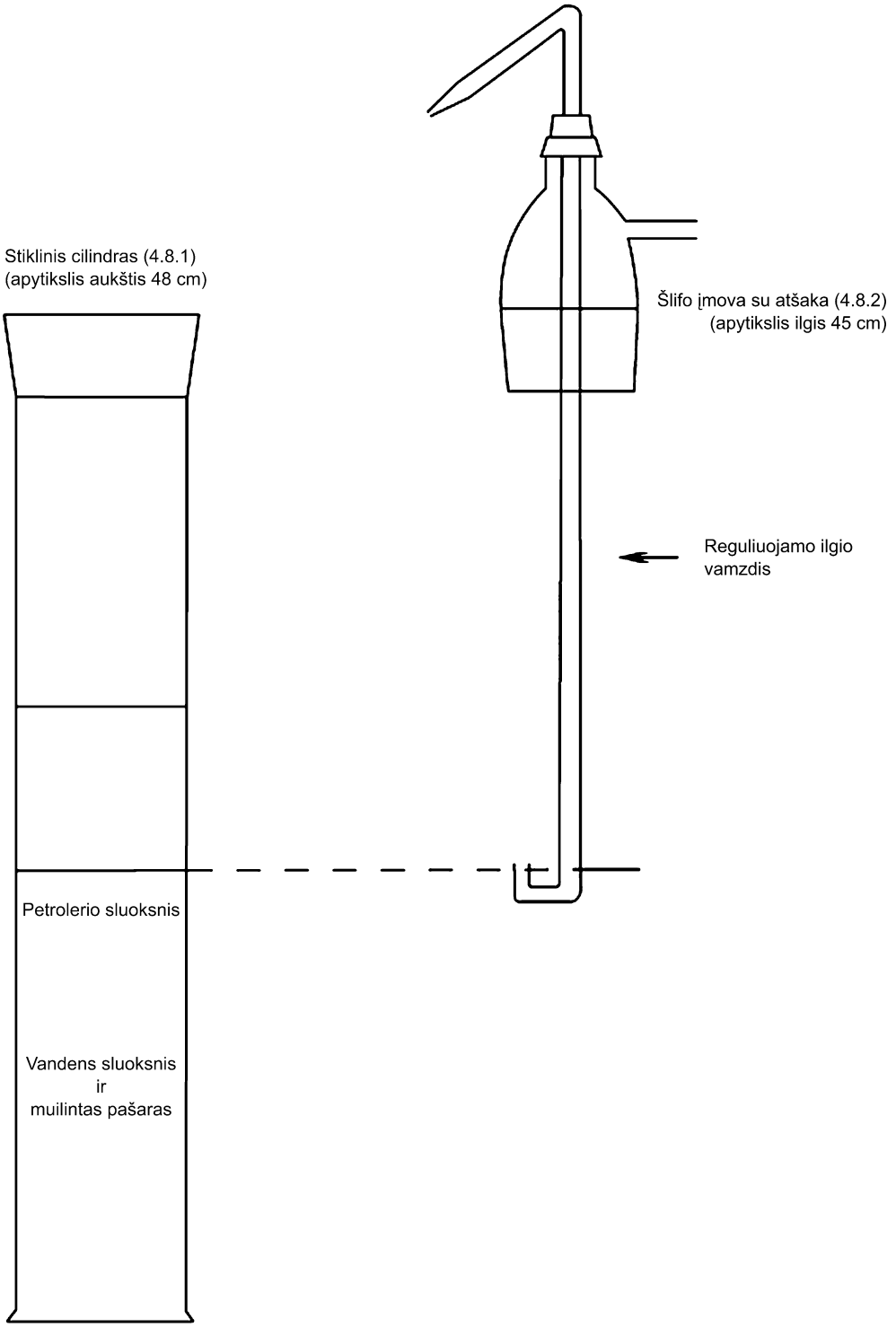
	Premiksai	Pašarai su premiksais	Mineralų koncentratas	Baltyminiai pašarai	Paršelių pašarai
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
vidurkis [IU/kg]	$17{,}02 \times 10^6$	$1{,}21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IU/kg]	$0{,}51 \times 10^6$	$0{,}039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1{,}43 \times 10^6$	$0{,}109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [IU/kg]	$1{,}36 \times 10^6$	$0{,}069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3{,}81 \times 10^6$	$0{,}193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = laboratorijų skaičius
n = atskirų verčių skaičius
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
s_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
r = pakartojamumas
R = atkuriamumas
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas

[1] Atliko Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten (VDLUFA) pašarų darbo grupė (VDLUFA).

▼B

1 paveikslas Ekstrahavimo aparatas (4.8)



▼B

B. E VITAMINO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Metodas taikomas E vitaminui pašaruose ir premiksuose nustatyti. E vitamino kiekis išreiškiamas mg DL-α-tokoferolio acetato vienam kg pašaro. 1 mg DL-α-tokoferolio acetato atitinka 0,91 mg α-tokoferolio (E vitamino).

Kiekybinio nustatymo riba – 2 mg E vitamino/kg. Šią kiekybinio nustatymo ribą galima pasiekti tik naudojant fluorescencinį detektorių. Naudojant ultravioletinį detektorių, kiekybinio nustatymo riba – 10 mg/kg.

2. **Metodas**

Ėminys hidrolizuojamas etanoliniu kalio hidroksido tirpalu ir E vitaminas ekstrahuojamas petroleteriu. Tirpiklis išgarinamas, likutis ištirpinamas metanolyje ir, jei reikia, skiedžiamas iki reikiamos koncentracijos. E vitamino kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (RP-HPLC) metodu naudojant fluorescencinį arba ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Etanolis, σ = 96 %

3.2 Petroleteris, virimo temperatūros intervalas 40 °C–60 °C

3.3 Metanolis

3.4 Kalio hidroksido tirpalas, c = 50 g/100 ml

3.5 Natrio askorbato tirpalas, c = 10 g/100 ml (žr. 7.7 pastabas)

3.6 Natrio sulfidas, $Na_2S \cdot x\ H_2O$ (x = 7–9)

3.6.1 Natrio sulfido tirpalas glicerolyje, c = 0,5 mol/l, β = 120 g/l (kai x = 9) (žr. 7.8 pastabas)

3.7 Fenolftaleino tirpalas etanolyje (3.1), c = 2 g/100 ml

3.8 HPLC judančioji fazė: metanolio (3.3) ir vandens mišinys, pvz., 980 + 20 (V + V). Tikslus santykis nustatomas pagal naudojamos kolonėlės charakteristikas

3.9 Azotas, be deguonies

3.10 DL-α-tokoferolio acetatas, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo

3.10.1 DL-α-tokoferolio acetato pradinis tirpalas. 100 mg DL-α-tokoferolio acetato (3.10) pasveriama 0,1 mg tikslumu ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Ištirpinama etanolyje (3.1) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. 1 ml šio tirpalo yra 1 mg DL-α-tokoferolio acetato (apie UV kontrolę žr. 5.6.1.3; apie stabilizavimą žr. 7.4 pastabas).

3.11 DL-α-tokoferolis, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo

3.11.1 DL-α-tokoferolio pradinis tirpalas. 100 mg DL-α-tokoferolio (3.11) pasveriama 0,1 mg tikslumu ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Ištirpinama etanolyje (3.1) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. 1 ml šio tirpalo yra 1 mg DL-α-tokoferolio (apie UV kontrolę žr. 5.6.2.3; apie stabilizavimą žr. 7.4 pastabas).

3.12 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenolis (BHT) (žr. 7.5 pastabas)

4. **Aparatūra**

4.1 Sukamasis garintuvas

▼B

4.2 Rudo stiklo indai

4.2.1 plokščiadugnės arba kūginės kolbos, 500 ml, su šlifo mova

4.2.2 matavimo kolbos su šlifo kamščiais, siaurakaklės, 10, 25, 100 ir 500 ml

4.2.3 kūginiai dalijamieji piltuvai, 1 000 ml, su šlifo kamščiais

4.2.4 kriaušės formos kolbos, 250 ml, su šlifo mova

4.3 *Allihn* kondensatorius, apvalkalo ilgis 300 mm, su šlifo jungtimi, su dujų tiekimo vamzdžio adapteriu

4.4 Gofruotasis filtravimo popierius fazėms atskirti, skersmuo 185 mm (pvz., *Schleicher & Schuell* 597 HY 1/2)

4.5 HPLC įranga su įpurškimo sistema

4.5.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė, 250 mm × 4 mm, C_{18}, 5 ar 10 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

4.5.2 Reguliuojamo bangos ilgio fluorescencinis arba ultravioletinis detektorius

4.6 Spektrofotometras ir 10 mm kvarco kiuvetės

4.7 Vandens vonia ir magnetinė maišyklė

4.8 Ekstrahavimo aparatas (žr. 1 paveikslą), kurį sudaro:

4.8.1 1 l talpos stiklinis cilindras su šlifo mova ir kamščiu

4.8.2 šlifo įmova su atšaka ir reguliuojamo ilgio vamzdžiu, einančiu per centrą. Reguliuojamo ilgio vamzdžio apatinis galas yra U formos, viršutinis – siaurėjančio antgalio formos, kad cilindre esančio tirpalo viršutinis sluoksnis galėtų būti supiltas į dalijamąjį piltuvą.

5. **Procedūra**

Pastaba E vitaminas yra jautrus ultravioletinei spinduliuotei ir oksidavimui. Visi veiksmai atliekami tamsoje (naudojami rudo stiklo indai arba aliuminio folija apvynioti indai) ir nesant deguonies (šalinamas azoto srove). Ekstrahuojant oras virš skysčio pakeičiamas azotu (vengiant per didelio slėgio kartkartėmis reikia ištraukti kamštį).

5.1 *Ėminio ruošimas*

Ėminys sumalamas, kad jį būtų galima sijoti per sietą su 1 mm dydžio akutėmis, vengiant šilumos susidarymo. Turi būti malama **prieš pat** svėrimą ir muilinimą, kad nebūtų E vitamino nuostolių.

5.2 *Muilinimas*

Atsižvelgiant į E vitamino kiekį, 0,01 g tikslumu pasveriama 2–25 g ėminio, ėminys supilamas į plokščiadugnę ar kūginę 500 ml tūrio kolbą (4.2.1). Maišant iš eilės įpilama 130 ml etanolio (3.1), maždaug 100 mg BHT (3.12), 2 ml natrio askorbato tirpalo (3.5) ir 2 ml natrio sulfido tirpalo (3.6). Prie kolbos prijungiamas kondensatorius (4.3) ir kolba įmerkiama į vandens vonią su magnetine maišykle (4.7). Šildoma iki virimo ir verdama 5 min su grįžtamuoju kondensatoriumi. Tuomet per kondensatorių (4.3) įpilama 25 ml kalio hidroksido tirpalo (3.4) ir dar 25 min. verdama su grįžtamuoju kondensatoriumi, maišant silpna azoto srove. Kondensatorius plaunamas maždaug 20 ml vandens ir kolbos turinys aušinamas iki kambario temperatūros.

▼B

5.3 *Ekstrahavimas*

Muilinimo tirpalas dekantuojant kiekybiškai supilamas į 1 000 ml dalijamąjį piltuvą (4.2.3) ar į ekstrahavimo aparatą (4.8), iš viso plovimui sunaudojant 250 ml vandens. Muilinimo kolba iš eilės plaunama 25 ml etanolio (3.1) ir 100 ml petroleterio (3.2), plovimo skysčiai supilami į dalijamąjį piltuvą ar į ekstrahavimo aparatą. Vandens ir etanolio santykis gautame bendrame tirpale turi būti apie 2:1. Stipriai purtoma 2 min ir 2 min paliekama nusistovėti.

5.3.1 Ekstrahavimas naudojant dalijamąjį piltuvą (4.2.3)

Kai sluoksniai atsiskiria (žr. 7.3 pastabą), petroleterio sluoksnis supilamas į kitą dalijamąjį piltuvą (4.2.3). Ekstrahavimas kartojamas du kartus su 100 ml petroleterio (3.2) ir du kartus su 50 ml petroleterio (3.2).

Dalijamajame piltuve sujungti ekstraktai du kartus plaunami 100 ml vandens, švelniai sukant piltuvą (kad nesusidarytų emulsija), purtant piltuvą ekstraktai toliau plaunami 100 ml vandens porcijomis tol, kol vandeninis sluoksnis lieka bespalvis, kai įpilama fenolftaleino tirpalo (3.7) (paprastai pakanka plauti keturis kartus). Išplautas ekstraktas filtruojamas per sausą gofruotąjį filtrą fazėms atskirti (4.4) į 500 ml matavimo kolbą (4.2.2), kad būtų pašalintas visas suspenduotas vanduo. Dalijamasis piltuvas ir filtras plaunami 50 ml petroleterio (3.2), skiedžiama petroleteriu (3.2) iki žymės ir gerai sumaišoma.

5.3.2 Ekstrahavimas naudojant ekstrahavimo aparatą (4.8)

Sluoksniams atsiskyrus (žr. 7.3 pastabą), stiklinio cilindro (4.8.1) kamštis keičiamas šlifo įmova (4.8.2) ir reguliuojamo vamzdžio apatinis U formos galas nustatomas taip, kad jis būtų šiek tiek virš sluoksnių skiriamosios ribos. Iš azoto tiekimo linijos per atšaką pučiant suslėgtąjį azotą, viršutinis petroleterio sluoksnis supilamas į 1 000 ml dalijamąjį piltuvą (4.2.3). Į stiklinį cilindrą įpilama 100 ml petroleterio (3.2), cilindras užkemšamas ir gerai supurtomas. Sluoksniams leidžiama atsiskirti ir kaip pirmiau viršutinis sluoksnis supilamas į dalijamąjį piltuvą. Ekstrahavimo procedūra kartojama dar kartą su 100 ml petroleterio (3.2), vėliau du kartus su 50 ml petroleterio (3.2) ir petroleterio sluoksniai supilami į dalijamąjį piltuvą.

Sujungti petroleterio ekstraktai plaunami, kaip tai aprašyta 5.3.1, ir tęsiama, kaip ten aprašyta.

5.4 *Ėminio tirpalo ruošimas HPLC analizei*

Į 250 ml kriaušės formos kolbą (4.2.4) pipete paimama alikvotinė petroleterio tirpalo (5.3.1 ar 5.3.2) dalis. Sukamajame garintuve (4.1) esant sumažintam slėgiui tirpiklis išgarinamas beveik iki sauso likučio, kai vonios temperatūra ne aukštesnė nei 40 °C. Įleidžiant azoto (3.9), slėgis didinamas iki atmosferos slėgio, kolba nuimama nuo sukamojo garintuvo. Likęs tirpiklis pašalinamas azoto srove (3.10) ir likutis iš karto tirpinamas žinomame tūryje (10–100 ml) metanolio (3.3) (DL-α-tokoferolio koncentracija turi būti 5 μg/ml–30 μg/ml intervale).

5.5 *Nustatymas HPLC metodu*

E vitaminas atskiriamas C_{18} atvirkštinių fazių kolonėlėje (4.5.1), koncentracija matuojama naudojant fluorescencinį detektorių (sužadinimas: 295 nm, emisija: 330 nm) ar ultravioletinį detektorių (292 nm) (4.5.2).

▼B

Alikvotinė metanolinio tirpalo, gauto pagal 5.4 dalį, dalis (pvz., 20 µl) įpurškiama ir plaunama judančiąja faze (3.9). Apskaičiuojamas kelių to paties ėminio įpurkštų tirpalų vidutinis smailių aukštis (plotas) ir kelių įpurkštų kalibravimo tirpalų (5.6.2) vidutiniai smailių aukščiai (plotai).

HPLC sąlygos

Rekomenduojamos šios sąlygos; galima taikyti kitas sąlygas, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C_{18}, 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė
Judančioji fazė (3.8):	metanolio (3.3) ir vandens mišinys pvz., 980 + 20 (V + V).
Srautas:	1–2 ml/min.
Detektorius (4.5.2):	fluorescencinis detektorius (sužadinimas: 295 nm, emisija 330 nm) arba ultravioletinis detektorius (292 nm)

5.6 *Kalibravimas (DL-α-tokoferolio acetato ar DL-α-tokoferolio)*

5.6.1 DL-α-tokoferolio acetato etalonas

5.6.1.1 *Darbinio etaloninio tirpalo ruošimas*

Į 500 ml plokščiadugnę ar kūginę kolbą (4.2.1) pipete paimama 25 ml DL-α-tokoferolio acetato pradinio tirpalo (3.10.1) ir hidrolizuojama, kaip aprašyta 5.2. Vėliau ekstrahuojama petroleteriu (3.2), kaip aprašyta 5.3, ir skiedžiama petroleteriu iki 500 ml. 25 ml šio ekstrakto garinama sukamajame garintuve (žr. 5.4) beveik iki sauso likučio, likęs tirpiklis pašalinamas azoto srove (3.9) ir likutis ištirpinamas 25,0 ml metanolio (3.3). Šio tirpalo vardinė koncentracija yra 45,5 µg DL-α-tokoferolio viename ml, tai atitinka 50 µg DL-α-tokoferolio acetato viename ml. Darbinis etaloninis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo prieš naudojimą.

5.6.1.2 *Kalibravimo tirpalų ruošimas ir kalibravimo kreivės gavimas*

Į keletą 20 ml tūrio matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 4,0 ir 10,0 ml darbinio etaloninio tirpalo, skiedžiama iki žymės metanoliu (3.3) ir sumaišoma. Šių tirpalų vardinė koncentracija yra 2,5, 5,0, 10,0 ir 25,0 µg/ml DL-α-tokoferolio acetato, t. y. 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml ir 22,8 µg/ml DL-α-tokoferolio.

Kelis kartus įpurškiama 20 µl kiekvieno etaloninio tirpalo ir nustatomi vidutiniai smailių aukščiai (plotai). Pagal vidutinius smailių aukščius (plotus) brėžiama kalibravimo kreivė.

5.6.1.3 *DL-α-tokoferolio acetato pradinio tirpalo (3.10.1) UV etalonavimas*

5,0 ml DL-α-tokoferolio acetato pradinio tirpalo (3.10.1) etanoliu skiedžiama iki 25,0 ml ir spektrofotometru (4.6) matuojamas pagal etanolį (3.1) šio tirpalo ultravioletinis spektras 250 nm–320 nm diapazone.

Absorbcijos maksimumas atitinka 284 nm:

$E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 43,6 esant 284 nm etanolyje

Esant šiam praskiedimui, gauta ekstinkcijos koeficiento vertė turi būti 0,84–0,88.

▼B

5.6.2. DL-α-tokoferolio etalonas

5.6.2.1 *Darbinio etaloninio tirpalo ruošimas*

Į 50 ml matavimo kolbą pipete paimama 2,0 ml DL-α-tokoferolio pradinio tirpalo (3.11.1), ištirpinama metanolyje (3.3) ir metanoliu skiedžiama iki žymės. Šio tirpalo vardinė koncentracija yra 40 µg DL-α-tokoferolio viename ml, tai atitinka 44,0 µg DL-α-tokoferolio acetato viename ml. Darbinis etaloninis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo prieš naudojimą.

5.6.2.2 *Kalibravimo tirpalų ruošimas ir kalibravimo kreivės gavimas*

Į keletą 20 ml tūrio matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 4,0 ir 10,0 ml darbinio etaloninio tirpalo, skiedžiama iki žymės metanoliu (3.3) ir sumaišoma. Šių tirpalų vardinė koncentracija yra 2,0, 4,0, 8,0 ir 20,0 µg/ml DL-α-tokoferolio, t. y. 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml ir 22,0 µg/ml DL-α-tokoferolio acetato.

Kelis kartus įpurškiama 20 µl kiekvieno etaloninio tirpalo ir nustatomi vidutiniai smailių aukščiai (plotai). Pagal vidutinius smailių aukščius (plotus) brėžiama kalibravimo kreivė.

5.6.2.3 *DL-α-tokoferolio pradinio tirpalo (3.11.1) UV etalonavimas*

2,0 ml DL-α-tokoferolio pradinio tirpalo (3.11.1) etanoliu skiedžiama iki 25,0 ml ir spektrofotometru (4.6) matuojamas pagal etanolį (3.1) šio tirpalo ultravioletinis spektras 250–320 nm diapazone. Absorbcijos maksimumas atitinka 292 nm:

$E^{1\%}_{1cm}$ = 75,8 esant 292 nm, etanolyje

Esant šiam praskiedimui, ekstinkcijos koeficiento vertė turi būti 0,6.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Naudojant ėminio tirpalo E vitamino smailių vidutinį aukštį (plotą), pagal kalibravimo kreivę (5.6.1.2 ar 5.6.2.2) nustatoma ėminio tirpalo koncentracija µg/ml (apskaičiuota α-tokoferolio acetatui).

E vitamino kiekis ėminyje w, mg/kg, nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

kurioje:

c = ėminio tirpalo (5.4) E vitamino (kaip α-tokoferolio acetato) koncentracija µg/ml
V_1 = ėminio tirpalo (5.4) tūris ml
V_2 = tirpalo (5.4) paimtos alikvotinės dalies tūris ml
m = tiriamosios dalies svoris g

7. **Pastabos**

7.1 Jei ėminių E vitamino koncentracija yra maža, gali būti naudinga sujungti dviejų po muilinimo gautų įkrovų (pasvertas kiekis: 25 g) petroleterio ekstraktus į vieną ėminio tirpalą, skirtą nustatymui HPLC metodu.

7.2 Analizei paimtame ėminyje riebalų ne daugiau nei 2 g.

7.3 Jei fazės neatsiskiria, emulsijai suardyti įpilama maždaug 10 ml etanolio (3.1).

▼B

7.4 Po DL-α-tokoferolio acetato ar DL-α-tokoferolio tirpalų spektrofotometrinių matavimų atitinkamai pagal 5.6.1.3 ar 5.6.2.3, į tirpalą (3.10.1 ar 3.10.2) įdedama maždaug 10 mg BHT (3.12) ir tirpalas laikomas šaldytuve (laikymo trukmė ne ilgesnė kaip keturios savaitės).

7.5 Vietoje BHT galima naudoti hidrochinoną.

7.6 Naudojant tiesioginių fazių kolonėlę, įmanoma atskirti α-, β-, γ- ir δ-tokoferolius.

7.7 Vietoje natrio askorbato tirpalo galima naudoti maždaug 150 mg askorbo rūgšties.

7.8 Vietoje natrio sulfido tirpalo galima naudoti maždaug 50 mg EDTA.

7.9 E vitamino acetatas labai greitai hidrolizuojasi šarminėje terpėje, taigi yra labai jautrus oksidavimui, ypač jei yra metalų pėdsakų, pvz., geležies arba vario. Dėl šios priežasties nustatant E vitaminą premiksuose, kai jo koncentracija didesnė nei 5 000 mg/kg, gali vykti jo skilimas. Todėl patvirtinimui reikia rekomenduoti HPLC metodą ir E vitamino preparato skaidymą fermentais, netaikant šarminio muilinimo stadijos.

8. **Pakartojamumas**

Dviejų lygiagrečiai atliekamų to paties ėminio matavimų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 15 % didžiausiojo rezultato vertės.

9. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai** ([1])

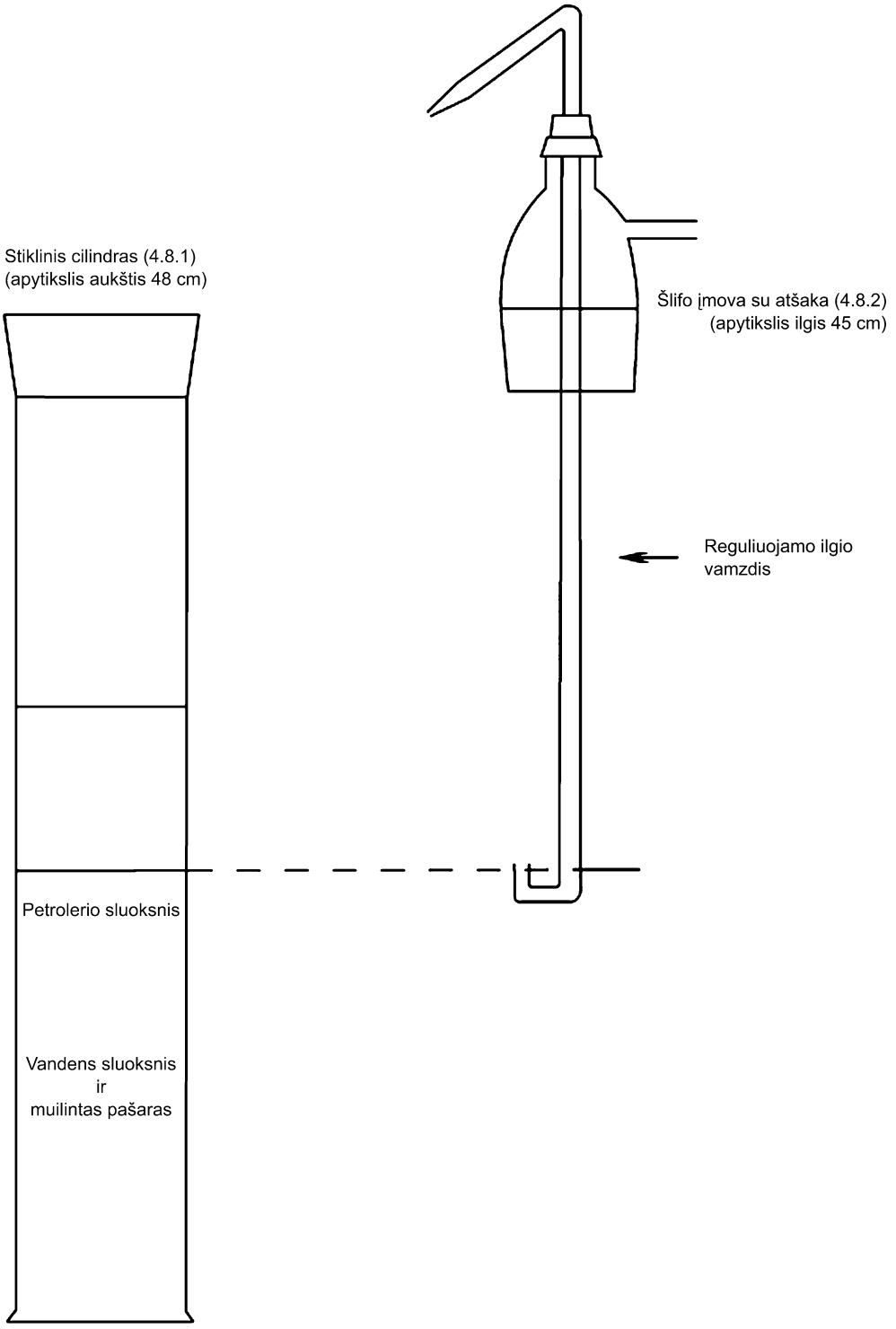
	Premiksas	Pašarai su premiksais	Mineralų koncentratas	Baltyminiai pašarai	Paršelių pašarai
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
vidurkis [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = laboratorijų skaičius
n = atskirų verčių skaičius
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
s_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
r = pakartojamumas
R = atkuriamumas
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas

([1]) Atliko *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten (VDLUFA)* pašarų darbo grupė (VDLUFA).

▼B

1 paveikslas Ekstrahavimo aparatas (4.8)



▼B

C. GELEŽIES, VARIO, MANGANO IR CINKO MIKROELEMENTŲ NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti geležies, vario, mangano ir cinko mikroelementų kiekį pašaruose. Kiekybinio nustatymo riba:

— geležies (Fe): 20 mg/kg

— vario (Cu): 10 mg/kg

— mangano (Mn): 20 mg/kg

— cinko (Zn): 20 mg/kg

2. **Principas**

Ėminys po organinės medžiagos (jei ji buvo) suskaidymo ištirpinamas druskos rūgštyje. Po atitinkamo praskiedimo geležis, varis, manganas ir cinkas nustatomi atominės absorbcijos spektrometrijos metodu.

3. **Reagentai**

Įvadinės pastabos

Reagentams ir analizei skirtiems tirpalams ruošti reikia naudoti vandenį, kuriame nebūtų nustatomų katijonų, todėl vanduo gaunamas du kartus distiliuojant distiliatoriuje iš borosilikatinio ar kvarcinio stiklo arba du kartus apdorojant jonitine derva.

Reagentai turėtų būti bent analiziškai gryni. Nustatomų elementų nebuvimas turi būti tikrinamas atliekant tuščiąjį bandymą. Prireikus reagentai turi būti papildomai gryninami.

Vietoje žemiau aprašomų etaloninių tirpalų galima naudoti prekyboje esančius etaloninius tirpalus, jei tik jie turi garantiją ir prieš naudojimą buvo patikrinti.

3.1 Vandenilio chlorido rūgštis (d:1,19 g/ml).

3.2 Vandenilio chlorido rūgštis (6 mol/l).

3.3 Vandenilio chlorido rūgštis (0,5 mol/l).

3.4 Vandenilio fluorido rūgšties 38–40 % (V/V) tirpalas, kuriame geležies (Fe) būtų mažiau nei 1 mg/l, o likučio po išgarinimo masė (sulfato pavidalu) mažesnė nei 10 mg/l.

3.5 Sieros rūgštis (d: 1,84 g/ml).

3.6 Vandenilio peroksidas (maždaug 100 tūrių deguonies (30 % masės)).

3.7 Etaloninis geležies tirpalas (1 000 µg Fe/ml), ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas: 1 g geležies vielos ištirpinama 200 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2), įpilama 16 ml vandenilio peroksido (3.6) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

3.7.1 Darbinis etaloninis geležies tirpalas (100 µg Fe/ml) ruošiamas etaloninį tirpalą (3.7) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.

3.8 Etaloninis vario tirpalas (1 000 µg Cu/ml) ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas:

— 1 g vario miltelių užpilama 25 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2), įpilama 5 ml vandenilio peroksido (3.6) ir gautas tirpalas skiedžiamas vandeniu iki 1 litro.

3.8.1 Darbinis etaloninis vario tirpalas (10 µg Cu/ml) ruošiamas etaloninį tirpalą (3.8) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9 ir taip gautą tirpalą dar kartą skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.

▼B

3.9 Etaloninis mangano tirpalas (1 000 µg Mn/ml) ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas:

— 1 g mangano miltelių tirpinama 25 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

3.9.1 Darbinis etaloninis mangano tirpalas (10 µg Mn/ml) ruošiamas etaloninį tirpalą (3.9) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9 ir taip gautą tirpalą dar kartą skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.

3.10 Etaloninis cinko tirpalas (1 000 µg Zn/ml) ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas:

— 1 g cinko strypelio arba lapelių (a. g.) tirpinama 25 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

3.10.1 Darbinis etaloninis cinko tirpalas (10 µg Zn/ml) ruošiamas etaloninį tirpalą (3.10) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9 ir taip gautą tirpalą dar kartą skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.

3.11 Lantano chlorido tirpalas: 12 g lantano oksido ištirpinama 150 ml vandens, įpilama 100 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

4. **Aparatūra**

4.1 Mufelinė krosnis su temperatūros reguliatoriumi ir pageidautina su rašytuvu.

4.2 Stikliniai indai turi būti iš atsparaus borosilikatinio stiklo, rekomenduojama naudoti aparatūrą, kuri būtų skirta tik mikroelementams nustatyti.

4.3 Spektrofotometras atominei absorbcinei analizei atlikti, atitinkantis metodo jautrio ir glaudumo reikalavimus reikiamame koncentracijos intervale.

5. **Procedūra** ([1])

5.1 *Ėminiai, turintys organinių medžiagų*

5.1.1 Ėminio sudeginimas ir analizei skirto tirpalo ruošimas ([2])

5.1.1.1. 5–10 g ėminio, pasverto 0,2 mg tikslumu, įdedama į platininį arba kvarcinį tiglį (4.3) (žr. (b) pastabą), džiovinama 105 °C temperatūroje džiovinimo spintoje, tada tiglis dedamas į šaltą mufelinę krosnį (4.1). Krosnis uždaroma (žr. (c) pastabą) ir per maždaug 90 min temperatūra laipsniškai pakeliama iki 450–475 °C. Tokioje temperatūroje tiglis laikomas 4–16 h (pvz., per naktį), kad būtų pašalintos visos organinės medžiagos, krosnis atidaroma ir paliekama atausti (žr. d) pastabą).

([1]) Galima taikyti kitus skaidymo būdus, jei būtų įrodyta, kad gaunami panašūs rezultatai (pvz., skaidymas autoklave aukšto dažnio spinduliuote).

([2]) Žaliuose pašaruose (šviežiuose arba džiovintuose) gali būti didelis kiekis augalinio silicio dioksido, kuriame gali būti mikroelementų, todėl jis turi būti pašalintas. Todėl šių pašarų ėminiams turi būti taikoma ši pakeista procedūra. Veiksmas 5.1.1.1 atliekamas iki filtravimo. Filtravimo popierius su netirpiu likučiu du kartus plaunamas verdančiu vandeniu ir dedamas į kvarcinį arba platininį tiglį. Filtras deginamas mufelinėje krosnyje (4.1) žemesnėje kaip 550 °C temperatūroje tol, kol visiškai išnyksta anglinė medžiaga. Paliekama atausti, įlašinami keli lašai vandens, 10–15 ml vandenilio fluorido rūgšties (3.4) ir garinama iki sauso likučio maždaug 150 °C temperatūroje. Jei likutyje dar lieka kažkiek silicio dioksido, likutis pakartotinai tirpinamas keliuose mililitruose vandenilio fluorido rūgšties (3.4) ir išgarinamas iki sauso likučio. Įlašinami penki lašai sieros rūgšties (3.5) ir kaitinama tol, kol nustoja skirtis balti dūmai. Įpylus 5 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2) ir apie 30 ml vandens, tirpalas pašildomas, filtruojamas į 250 ml matavimo kolbą ir skiedžiamas vandeniu iki žymės (HCl koncentracija apie 0,5 mol/l). Toliau nustatymas tęsiamas nuo 5.1.2 punkto.

▼B

Pelenai sudrėkinami vandeniu ir supilami į 250 ml tūrio cheminę stiklinę.Tiglio turinys išplaunamas į cheminę stiklinę, tam sunaudojant iš viso maždaug 5 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1), kuri pilama lėtai ir atsargiai (dėl CO_2 susidarymo gali vykti audringa reakcija). Vandenilio chlorido rūgštis (3.1) į stiklinę lašinama maišant tirpalą tol, kol nustoja skirtis dujų burbuliukai. Išgarinama iki sauso likučio, retkarčiais maišant stikline lazdele.

Į likutį įpilama 15 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2) ir apie 120 ml vandens. Maišoma stikline lazdele, kuri paliekama stiklinėje, stiklinė uždengiama laikrodžio stiklu. Stiklinės turinys lėtai užverdamas ir virinamas tol, kol galima pamatyti, kad daugiau pelenų nebeištirpsta. Filtruojama per bepelenį filtravimo popierių ir filtratas supilamas į 250 ml matavimo kolbą. Stiklinė ir filtras plaunami 5 ml karšto vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.2) ir du kartus verdančiu vandeniu. Matavimo kolbos turinys skiedžiamas vandeniu iki žymės (HCl koncentracija maždaug 0,5 mol/l).

5.1.1.2. Jei likutis ant filtro yra juodas (anglis), filtras vėl dedamas į krosnį ir sudeginamas 450–475 °C temperatūroje. Šis sudeginimas, kuris trunka tik kelias valandas (tris–penkias valandas), yra baigtas, kai pelenai tampa balti arba beveik balti. Likutis tirpinamas maždaug 2 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1), garinamas iki sauso likučio ir įpilama 5 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2). Pakaitinama, tirpalas filtruojamas į matavimo kolbą ir skiedžiamas vandeniu iki žymės (HCl koncentracija yra apie 0,5 mol/l).

Pastabos:

a) Atliekant pėdsakų analizę, svarbu visą laiką turėti omenyje užteršimo, ypač cinku, variu ir geležimi, pavojų. Dėl šios priežasties įrangoje, kuri naudojama ėminiams ruošti, šių elementų turi nebūti.

Bendram užteršimo pavojui sumažinti dirbama dulkių neturinčioje aplinkoje su labai švaria įranga ir rūpestingai išplautais stikliniais indais. Cinko nustatymas yra ypač jautrus įvairių rūšių teršalams, pvz., teršalams ant stiklinių indų, reagentuose, dulkėms ir pan.

b) Sudeginamo ėminio masė apskaičiuojama pagal apytikrį mikroelementų kiekį pašaruose, atsižvelgiant į naudojamo spektrofotometro jautrį. Tam tikriems pašarams, kuriuose mikroelementų mažai, gali prireikti 10–20 g masės ėminio ir gauti iš jo tik 100 ml tūrio galutinį tirpalą.

c) Turi būti deginama uždarytoje krosnyje, nepučiant oro arba deguonies.

d) Pirometro rodoma temperatūra neturi būti aukštesnė nei 475 °C.

5.1.2 Spektrofotometrinis nustatymas

5.1.2.1 *Kalibravimo tirpalų ruošimas*

Iš darbinių etaloninių tirpalų, nurodytų 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 ir 3.10.1 punktuose, kiekvienam nustatomam elementui ruošiama keletas kalibravimo tirpalų, kurių kiekvieno HCl koncentracija yra apie 0,5 mol/l ir lantano chlorido koncentracija (geležies, mangano ir cinko atveju) atitinka 0,1 % (m/V) La koncentraciją.

Pasirenkama mikroelementų koncentracija turi atitikti naudojamo spektrofotometro jautrio ribas. Toliau kaip pavyzdys pateikiamose lentelėse rodoma kalibruoti naudojamų tirpalų sudėties tipiniai intervalai, tačiau, atsižvelgiant į naudojamo spektrofotometro tipą ir jautrį, gali tekti pasirinkti kitas koncentracijos vertes.

▼B

Geležis

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml darbinio etaloninio tirpalo (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11) ir skiedžiama vandeniu iki 100 ml							

Varis

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml darbinio etaloninio tirpalo (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Manganas

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml darbinio etaloninio tirpalo (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11) ir skiedžiama vandeniu iki 100 ml							

Cinkas

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml darbinio etaloninio tirpalo (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11) ir skiedžiama vandeniu iki 100 ml							

5.1.2.2 *Tirpalo ruošimas analizei*

Variui nustatyti pagal 5.1.1 punktą paruoštą tirpalą paprastai galima naudoti tiesiogiai. Jei reikia, kad jo koncentracija būtų kalibruoti naudojamų tirpalų koncentracijos verčių intervale, alikvotinė dalis gali būti paimta pipete į 100 ml matavimo kolbą ir skiedžiama iki žymės 0,5 mol/l vandenilio chlorido rūgšties tirpalu (3.3).

Geležiai, manganui ir cinkui nustatyti pagal 5.1.1 punktą paruošto tirpalo alikvotinė dalis paimama pipete į 100 ml matavimo kolbą, įpilama 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11) ir skiedžiama iki žymės 0,5 mol/l vandenilio chlorido rūgšties tirpalu (3.3). (Be to, žr. 8 punkto pastabą).

5.1.2.3 *Tuščiasis bandymas*

Tuščiąjį bandymą turi sudaryti visos nurodytos procedūros pakopos, išskyrus tai, kad nededama ėminio medžiagos. Kaip tuščiasis ėminys neturi būti naudojamas „0“ koncentracijos kalibravimo tirpalas.

5.1.2.4 *Atominės absorbcijos matavimas*

Matuojama kalibravimo tirpalų ir analizuojamo tirpalo atominė absorbcija, naudojant oro-acetileno oksiduojančiąją liepsną, esant šiems bangų ilgiams:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

▼B

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Kiekvienas matavimas atliekamas keturis kartus.

5.2 *Mineraliniai pašarai*

Jei ėminyje nėra organinių medžiagų, sudeginimas prieš analizę nereikalingas. Daroma kaip aprašyta 5.1.1.1 punkte, pradedant nuo antrosios pastraipos. Galima praleisti išgarinimo su fluoro vandenilio rūgštimi pakopą.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Naudojant kalibravimo kreivę, apskaičiuojama mikroelementų koncentracija analizuojamame tirpale ir rezultatas išreiškiamas mikroelemento mg kiekiu vienam ėminio kilogramui (milijonosiomis dalimis).

7. **Pakartojamumas**

Dviejų rezultatų, gautų tam pačiam analizę atliekančiam asmeniui atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu ėminiu, skirtumas ne didesnis nei:

— 5 mg/kg, absoliučiąja verte, kai nustatomo mikroelemento kiekis ne didesnis nei 50 mg/kg,

— 10 % didžiausio rezultato, kai nustatomo mikroelemento kiekis yra 50–100 mg/kg,

— 10 mg/kg, absoliučiąja verte, kai nustatomo mikroelemento kiekis yra 100–200 mg/kg,

— 5 % didžiausio rezultato, kai nustatomo mikroelemento kiekis yra didesnis nei 200 mg/kg.

8. **Pastaba**

Dideli fosfatų kiekiai gali trukdyti nustatyti geležį, manganą ir cinką. Tokie trukdžiai turi būti pašalinti, įpilant lantano chlorido tirpalo (3.11). Tačiau, jei ėminyje masių santykis (Ca + mg)/P > 2, lantano chlorido tirpalo (3.11) į analizės tirpalą ir etaloninius tirpalus galima nepilti.

D. HALOFUGINONO NUSTATYMAS

DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-ono hidrobromidas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Metodas taikomas halofuginonui nustatyti pašaruose. Kiekybinio nustatymo riba – 1 mg/kg.

2. **Metodas**

Apdorotas karštu vandeniu halofuginonas ekstrahuojamas kaip laisvoji bazė į etilacetatą ir po to atskiriamas kaip vandenilio chloridas į vandeninį rūgšties tirpalą. Ekstraktas gryninamas, taikant jonų mainų chromatografiją. Halofuginono kiekis nustatomas atvirkštinės fazės efektyviąja skysčių chromatografija (HPLC), naudojant ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Acetonitrilas, HPLC grynumo.

3.2 Amberlito XAD-2 derva.

3.3 Amonio acetatas.

3.4 Etilacetatas.

3.5 Acto rūgštis, ledinė.

▼B

3.6 Halofuginono etaloninė medžiaga (DL-*trans*-7-brom-6-chlor-3-[3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-ono hidrobromidas, E 764).

3.6.1 Halofuginono pradinis etaloninis tirpalas, 100 µg/ml

Į 500 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg halofuginono (3.6), ištirpinama amonio acetato buferiniame tirpale (3.18), iki žymės skiedžiama buferiniu tirpalu ir sumaišoma. Šis tirpalas lieka stabilus tris savaites 5 °C temperatūroje, jei laikomas tamsoje.

3.6.2 Kalibravimo tirpalai

Į keletą 100 ml matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ir 6,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.6.1). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.21) ir sumaišoma. Šių tirpalų halofuginono koncentracija yra 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ir 6,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.7 Vandenilio chlorido rūgštis (ρ_{20} maždaug 1,16 g/ml).

3.8 Metanolis.

3.9 Sidabro nitratas.

3.10 Natrio askorbatas.

3.11 Natrio karbonatas.

3.12 Natrio chloridas.

3.13 EDTA (etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska).

3.14 Vanduo, HPLC grynumo.

3.15 Natrio karbonato tirpalas, c = 10 g/100 ml.

3.16 Natrio karbonato tirpalas sočiajame natrio chlorido tirpale, c = 5 g/100 ml.

Vandenyje ištirpinama 50 g natrio karbonato (3.11), skiedžiama iki 1 litro ir dedama natrio chlorido (3.12) tiek, kad gaunamas sotus tirpalas.

3.17 Vandenilio chlorido rūgštis, maždaug 0,1 mol/l.

10 ml HCI (3.7) skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

3.18 Amonio acetato buferinis tirpalas, maždaug 0,25 mol/l.

Vandenyje (3.14) ištirpinama 19,3 g amonio acetato (3.3), 30 ml acto rūgšties (3.5) ir skiedžiama iki 1 litro.

3.19 Amberlito XAD-2 dervos ruošimas.

Reikiamas kiekis amberlito (3.2) plaunamas vandeniu tol, kol pašalinami visi chlorido jonai, kaip rodo bandymas su sidabro nitrato tirpalu (3.20), atliekamas su išpilama vandenine faze. Derva plaunama 50 ml metanolio (3.8), metanolis išpilamas ir derva laikoma ant jos užpylus švaraus metanolio.

3.20 Sidabro nitrato tirpalas, maždaug 0,1 mol/l.

0,17 g sidabro nitrato (3.9) ištirpinama 10 ml vandens.

3.21 HPLC judančioji fazė.

500 ml acetonitrilo (3.1) maišoma su 300 ml amonio acetato buferiniu tirpalo (3.18) ir 1 200 ml vandens (3.14). Acto rūgštimi (3.5) nustatoma pH 4,3. Tirpalas filtruojamas per 0,22 µm filtrą (4.8) ir degazuojamas (pvz., 10 min ultragarsu). Šis tirpalas stabilus vieną mėnesį, jei laikomas uždarame inde ir tamsoje.

▼B

4. **Aparatūra**

4.1 Ultragarso vonia.

4.2 Sukamasis garintuvas.

4.3 Centrifuga.

4.4 HPLC įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu detektoriumi arba diodų matricos detektoriumi.

4.4.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė, 300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.

4.5 Stiklinė kolonėlė (300 mm × 10 mm) su sukepinto stiklo filtru ir čiaupu.

4.6 Stiklo pluošto filtrai, skersmuo 150 mm.

4.7 Membraniniai filtrai, 0,45 μm.

4.8 Membraniniai filtrai, 0,22 μm.

5. **Procedūra**

Pastaba. Halofuginonas kaip laisvoji bazė yra nepatvarus šarminiuose ir etilacetato tirpaluose, todėl etilacetate laikomas ne ilgiau nei 30 min.

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1. Siekiant patikrinti, ar nėra halofuginono arba trukdančiųjų medžiagų, atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė.

5.1.2. Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant halofuginono, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. 3 mg/kg koncentracijai gauti į 10 g pašaro tuščiojo ėminio reikia įpilti 300 μl pradinio etaloninio tirpalo (3.6.1), sumaišyti ir prieš ekstrahavimą (5.2) palaukti 10 min.

Pastaba Šiame metode pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptikta halofuginono.

5.2 *Ekstrahavimas*

Į 200 ml centrifugos mėgintuvėlį 0,1 g tikslumu pasveriama 10 g paruošto ėminio, įdedama 0,5 g natrio askorbato (3.10), 0,5 g EDTA (3.13), 20 ml vandens ir sumaišoma. Mėgintuvėlis įdedamas 5 min į vandens vonią (80 °C). Atvėsinus iki kambario temperatūros, įpilama 20 ml natrio karbonato tirpalo (3.15) ir sumaišoma. Tuoj pat įpilama 100 ml etilacetato (3.4) ir 15 s stipriai purtoma ranka. Atkimštas mėgintuvėlis dedamas trims minutėms į ultragarso vonią (4.1). Centrifuguojama 2 min ir etilacetato fazė per stiklo pluošto filtrą (4.6) nupilama į 500 ml dalijamąjį piltuvą. Kartojamas ėminio ekstrahavimas dar su 100 ml etilacetato. Sujungti ekstraktai vieną minutę plaunami 50 ml natrio chloridu prisotintu natrio karbonato tirpalu (3.16), vandeninis sluoksnis išpilamas.

Organinis sluoksnis 1 min. ekstrahuojamas 50 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalu (3.17). Apatinis rūgšties sluoksnis išleidžiamas į 250 ml dalijamąjį piltuvą. Organinis sluoksnis dar kartą 1,5 min ekstrahuojamas kita 50 ml vandenilio chlorido rūgšties porcija ir gautas ekstraktas sujungiamas su pirmuoju ekstraktu. Abu sujungti rūgšties ekstraktai maždaug 10 s plaunami 10 ml etilacetatu (3.4), atliekant sukamuosius judesius.

▼B

Visas vandeninis sluoksnis kiekybiškai supilamas į 250 ml talpos apvaliadugnę kolbą, organinė fazė išpilama. Visas likęs etilacetatas pašalinamas iš rūgšties tirpalo garinant sukamajame garintuve (4.2). Vandens vonios temperatūra neturi būti aukštesnė nei 40 °C. Esant maždaug 25 milibar vakuumui, visas likęs etilacetatas turėtų būti pašalintas per 5 min, kai temperatūra 38 °C.

5.3 *Gryninimas*

5.3.1 Amberlito kolonėlės ruošimas

XAD-2 kolonėlė ruošiama kiekvienam ėminio ekstraktui. 10 g paruošto amberlito (3.19) supilama į stiklinę kolonėlę (4.5) su metanoliu (3.8). Ant dervos sluoksnio uždedamas nedidelis stiklo vatos kamštis. Metanolis išleidžiamas iš kolonėlės ir derva plaunama 100 ml vandens, paliekant jo tiek, kad skystis apsemtų dervos paviršių. Prieš naudojimą kolonėlė 10 min paliekama pusiausvyrai nusistovėti. Niekuomet neleidžiama skysčiui visiškai ištekėti iš kolonėlės.

5.3.2 Ėminio gryninimas

Visas ekstraktas (5.2) kiekybiškai supilamas ant paruoštos amberlito kolonėlės (5.3.1) viršaus ir plaunama, išpilant eliuatą. Eliuavimo srautas neturi būti didesnis nei 20 ml/min. Apvaliadugnė kolba plaunama 20 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.17) ir šiuo tirpalu plaunama dervos kolonėlė. Rūgšties tirpalo likutis išpučiamas oro srautu. Plovimo tirpalai išpilami. Į kolonėlę įpilama 100 ml metanolio (3.8) ir į 250 ml apvaliadugnę kolbą ir surenkama nuo 5 ml iki 10 ml eliuato. Likęs metanolis 10 min. laikomas pusiausvyrai su derva nusistovėti ir eliuavimas tęsiamas esant ne didesniam nei 20 ml/min srautui, surenkant eliuatą į tą pačią kolbą. Metanolis išgarinamas sukamajame garintuve (4.2). Vandens vonios temperatūra neturi būti aukštesnė nei 40 °C. Plaunant judančiąja faze (3.21), likutis kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Skiedžiama judančiąja faze iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė dalis filtruojama per membraninį filtrą (4.7). Šis tirpalas naudojamas HPLC nustatymui (5.4).

5.4 *HPLC nustatymas*

5.4.1 Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos, gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1).

HPLC judančioji fazė (3.21).

Srautas: 1,5 ml/min.–2 ml/min.

Detektoriaus bangos ilgis: 243 nm.

Įpurškiamas tūris: 40 µl–100 µl.

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 3,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.6.2) tol, kol nustoja keistis smailės aukštis (arba plotas) ir sulaikymo trukmė.

5.4.2 Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.6.2) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių (arba plotų) vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

▼B

5.4.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.3.2), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas halofuginono smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Ėminio tirpalo koncentracija µg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo halofuginono smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.4.2).

Halofuginono kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

kurioje:

c = halofuginono koncentracija ėminio tirpale µg/ml,
m = tiriamosios dalies svoris gramais.

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto ir 6,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.6.2) spektrai.

7.1.1 Kochromatografija

Ėminio ekstrakto tirpalo koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.6.2.) tūrį. Pridėto halofuginono kiekis turi atitikti ėminio ekstrakte nustatytą halofuginono kiekį.

Turi padidėti tik halofuginono smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje turi atitikti pradinį plotį ± 10 % tikslumu.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai vertinami pagal šiuos kriterijus:

a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;

b) nuo 225 nm iki 300 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis nei 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;

c) nuo 225 nm iki 300 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis nei 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

▼B

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečiai atliktų to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,5 mg/kg, kai halofuginono yra iki 3 mg/kg.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas tuščiajam ėminiui su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 80 %.

8. **Tarplaboratorinių tyrimų rezultatai**

Buvo atlikti tarplaboratoriniai tyrimai ([1]), kurių metu aštuonios laboratorijos analizavo tris ėminius.

Rezultatai

	A ėminys (tuščiasis) Kaip gautas	B ėminys (miltai)		C ėminys (granulės)	
		Kaip gautas	Po dviejų mėnesių	Kaip gautas	Po dviejų mėnesių
Vidurkis [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = neaptikta
S_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas (%)
Rec = išgavos dydis (%)

E ROBENIDINO NUSTATYMAS

1,3-bi[(4-chlorbenziliden)amino]guanidino hidrochloridas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatoma robenidino koncentracija pašaruose. Kiekybinio nustatymo riba – 5 mg/kg.

2. **Metodas**

Ėminys ekstrahuojamas parūgštintu metanoliu. Ekstraktas džiovinamas, alikvotinė ekstrakto dalis gryninama, naudojant kolonėlę su aliuminio oksidu. Robenidinas iš kolonėlės plaunamas metanoliu, koncentruojamas ir judančiąja faze skiedžiamas iki reikiamo tūrio. Robenidino kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu naudojant ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Metanolis

3.2 Parūgštintas metanolis

4,0 ml vandenilio chlorido rūgšties (ρ_{20} = 1,18 g/ml) įpilama į 500 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės metanoliu (3.1) ir sumaišoma. Tirpalas turi būti ruošiamas prieš naudojimą.

([1]) *The Analyst*, 108, 1983, p. 1 252–1 256.

▼B

3.3 Acetonitrilas, HPLC grynumo

3.4 Molekulinis sietas

3A tipo, 8 – 12 mešų granulės (1,6–2,5 mm granulės, kristalinis aliumosilikatas, akučių skersmuo 0,3 mm).

3.5 Aliuminio oksidas, I laipsnio rūgštinio aktyvumo, skirtas chromatografijai kolonėlėje

100 g aliuminio oksido supilama į tinkamą indą ir įpilama 2 ml vandens. Indas užkemšamas ir kratomas maždaug 20 min. Laikomas gerai uždarytame inde.

3.6 Kalio dihidrofosfato tirpalas, c = 0,025 mol/l

3,40 g kalio dihidrofosfato ištirpinama vandenyje (HPLC grynumo), skiedžiama 1 000 ml matavimo kolboje iki žymės ir sumaišoma.

3.7 Natrio hidrofosfato tirpalas, c = 0,025 mol/l

3,55 g bevandenio natrio hidrofosfato (arba 4,45 g dihidrato, arba 8,95 g dodekahidrato) ištirpinama vandenyje (HPLC grynumo), skiedžiama 1 litro matavimo kolboje iki žymės ir sumaišoma.

3.8 HPLC judančioji fazė

Sumaišomi šie reagentai:

650 ml acetonitrilo (3.3),

250 ml vandens (HPLC grynumo),

50 ml kalio dihidrofosfato tirpalo (3.6),

50 ml natrio hidrofosfato tirpalo (3.7).

Filtruojama per 0,22 µm akytumo filtrą (4.6), tirpalas degazuojamas (pvz., 10 min veikiant ultragarsu).

3.9 Etaloninė medžiaga

Grynas robenidinas: 1,3-bi[(4-chlorbenziliden)amino]guanidino hidrochloridas.

3.9.1 Robenidino pradinis etaloninis tirpalas: 300 µg/ml

0,1 mg tikslumu pasveriama 30 mg robenidino etaloninės medžiagos (3.9). 100 ml matavimo kolboje ištirpinama parūgštintame metanolyje (3.2), tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma tamsioje vietoje.

3.9.2 Robenidino tarpinis etaloninis tirpalas: 12 µg/ml

10 ml pradinio tirpalo (3.9.1) įpilama į 250 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.8) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma tamsioje vietoje.

3.9.3 Kalibravimo tirpalai

Į keletą 50 ml matavimo kolbų įpilama 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 ir 25,0 ml tarpinio etaloninio tirpalo (3.9.2). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.8) ir sumaišoma. Šių tirpalų koncentracija atitinkamai yra 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 ir 6,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.10 Vanduo, HPLC grynumo

▼B

4. **Aparatūra**

4.1 Stiklinė kolonėlė

Pagaminta iš geltono stiklo, yra su čiaupu ir maždaug 150 ml talpos, vidinis skersmuo 10–15 mm, ilgis 250 mm.

4.2 Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė

4.3 Sukamasis garintuvas

4.4 HPLC įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu detektoriumi arba diodinės matricos detektoriumi, veikiančiu 250–400 nm bangų ilgio intervale

4.4.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė: 300 mm × 4 mm, C_{18} 10 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

4.5 *Stiklo pluošto filtravimo popierius* (*Whatman* GF/A arba lygiavertis)

4.6 Membraniniai filtrai, 0,22 μm

4.7 Membraniniai filtrai, 0,45 μm

5. **Procedūra**

Pastaba. Robenidinas yra jautrus šviesai. Atliekant visus veiksmus naudojami rudo stiklo indai.

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1 Siekiant patikrinti, ar nėra robenidino arba trukdančiųjų medžiagų, atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė.

5.1.2 Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant robenidino, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. 60 mg/kg koncentracijai gauti, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 3,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.9.1). Azoto srovėje tirpalas garinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 15 g pašaro tuščiojo ėminio, sumaišoma ir prieš ekstrahavimą (5.2) palaukiama 10 min.

Pastaba. Taikant šį metodą pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptinkama robenidino.

5.2 *Ekstrahavimas*

0,01 g tikslumu pasveriama maždaug 15 g paruošto ėminio. Ėminys supilamas į 250 ml kūginę kolbą, į ją įpilama 100 ml parūgštinto metanolio (3.2), kolba užkemšama ir vieną valandą kratoma ant purtyklės (4.2). Tirpalas filtruojamas per stiklo pluošto filtravimo popierių (4.5), visas filtratas surenkamas į 150 ml kūginę kolbą. Pridedama 7,5 g molekulinio sieto (3.4), kolba užkemšama ir kratoma penkias minutes. Iš karto filtruojama per stiklo pluošto filtravimo popierių. Toliau tirpalas gryninamas (5.3).

5.3 *Gryninimas*

5.3.1 Aliuminio oksido kolonėlės ruošimas

Į stiklinės kolonėlės (4.1) apačią įkišamas mažas stiklo vatos kamštis, kuris stikline lazdele sutankinamas. Pasveriama 11,0 g paruošto aliuminio oksido (3.5) ir supilama į kolonėlę. Siekiama, kad pilant sąlytis su oru būtų kiek įmanoma mažesnis. Švelniai tapšnojama per užpildomos kolonėlės apačią, kad aliuminio oksidas suslūgtų.

▼B

5.3.2 Ėminio gryninimas

Į kolonėlę pipete įpilama 5,0 ml pagal 5.2 punktą paruošto ėminio ekstrakto. Pipetės galiukas laikomas prie kolonėlės sienelės ir leidžiama tirpalui susigerti į aliuminio oksidą. Robenidinas iš kolonėlės išplaunamas 100 ml metanolio (3.1), esant 2–3 ml/min. srautui, eliuatas surenkamas į 250 ml apvaliadugnę kolbą. Metanolinis tirpalas išgarinamas iki sauso likučio sukamajame garintuve (4.3) esant sumažintam slėgiui, kai temperatūra 40 °C. Likutis ištirpinamas 3–4 ml judančiosios fazės (3.8) ir kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Apvaliadugnė kolba kelis kartus plaunama 1–2 ml judančiosios fazės ir šie plovimo tirpalai supilami į matavimo kolbą. Tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per 0,45 µm filtrą (4.7). Tirpalas naudojamas analizei HPLC metodu (5.4).

5.4 *HPLC nustatymas*

5.4.1 Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos; galima taikyti kitas sąlygas, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai:

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1),

HPLC judančioji fazė (3.8),

Srautas: 1,5–2 ml/min.,

Detektoriaus bangos ilgis: 317 nm,

Įpurškiamas tūris: 20–50 µl.

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 3,6 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.9.3) tol, kol nustoja keistis smailių aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.4.2 Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.9.3) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių arba plotų vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.4.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.3.2), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas robenidino smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Ėminio tirpalo koncentracija µg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo robenidino smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.4.2).

Robenidino kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

c = robenidino koncentracija ėminio tirpale µg/ml,
m = tiriamosios dalies svoris gramais.

▼B

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto ir 6,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.9.3) spektrai.

7.1.1 Kochromatografija

Ėminio ekstrakto tirpalo koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.9.3) tūrį. Pridėto robenidino kiekis turi atitikti ėminio ekstrakte nustatytą robenidino kiekį.

Padidinamas tik robenidino smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje turi atitikti pradinį plotį maždaug 10 % tikslumu.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė paprastai yra maždaug 2 nm;

b) nuo 250 nm iki 400 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis nei 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;

c) nuo 250 nm iki 400 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis nei 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečiai atliktų to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 10 % didžiausio rezultato, gauto didesniam nei 15 mg/kg robenidino kiekiui.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas tuščiajam ėminiui su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 85 %.

8. **Tarplaboratorinių tyrimų rezultatai**

Bendrija surengė tarplaboratorinį tyrimą, kuriame 12–oje laboratorijų buvo analizuojami keturi paukščių ir triušių pašaro miltų arba granulių pavidalu ėminiai. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas du kartus. Rezultatai pateikiami lentelėje:

▼B

	Paukščiai		Triušiai	
	Miltai	Granulės	Miltai	Granulės
Vidurkis [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Išgavos dydis [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas, %
S_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas, %

F. DIKLAZURILO NUSTATYMAS

(+)-4-chlorphenil[2,6-dichlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil]acetonitrilas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Metodas taikomas diklazurilui pašaruose ir premiksuose nustatyti. Aptikimo riba – 0,1 mg/kg, ribinė nustatymo vertė – 0,5 mg/kg.

2. **Metodas**

Pridėjus vidinio etalono, ėminys ekstrahuojamas parūgštintu metanoliu. Jei tai pašarai, ekstrakto alikvotinė dalis gryninama C_{18} kietosios fazės ekstrahavimo tūta. Iš tūtos diklazurilas išplaunamas parūgštinto metanolio ir vandens mišiniu. Eliuatą išgarinus, likutis ištirpinamas DMF ir vandens mišinyje. Jei tai premiksai, ekstraktas išgarinamas ir likutis ištirpinamas DMF ir vandens mišinyje. Diklazurilo kiekis nustatomas atvirkštinių fazių trigubo gradiento efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), naudojant ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Vanduo, HPLC grynumo

3.2 Amonio acetatas

3.3 Tetrabutilamonio hidrosulfatas (TBHS)

3.4 Acetonitrilas, HPLC grynumo

3.5 Metanolis, HPLC grynumo

3.6 N, N-dimetilformamidas (DMF)

3.7 Vandenilio chlorido rūgštis, ρ_{20} = 1,19 g/ml

3.8 Etaloninė medžiaga: garantuoto grynumo diklazurilas II-24: (+)-4-chlorfenil[2,6-dichlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil]acetonitrilas, E 771

3.8.1 Diklazurilo pradinis etaloninis tirpalas, 500 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 25 mg diklazurilo etaloninės cheminės medžiagos (3.8). Ištirpinama DMF (3.6), skiedžiama DMF (3.6) iki žymės ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

▼B

3.8.2 Diklazurilo etaloninis tirpalas, 50 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą įpilama 5,00 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.8.1.), skiedžiama iki žymės DMF (3.6) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.9 Vidinio etalono medžiaga: 2,6-dichlor-α-(4-chlorfenil)-4-(4,5-dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2(3H)-il)-α-metilbenzenacetonitrilas

3.9.1 Vidinio etalono pradinis tirpalas, 500 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 25 mg vidinio etalono (3.9). Ištirpinama DMF (3.6), skiedžiama DMF (3.6) iki žymės ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.9.2 Vidinio etalono tirpalas, 50 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą įpilama 5,00 ml pradinio vidinio etalono tirpalo (3.9.1), skiedžiama iki žymės DMF (3.6) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir dedama į šaldytuvą. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.9.3 Premiksų vidinio etalono tirpalas, p/1000 mg/ml

(p – diklazurilo vardinė koncentracija premikse, mg/kg)

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama p/10 mg vidinio etalono, ultragarso vonioje (4.6) jis ištirpinamas DMF (3.6), skiedžiama iki žymės DMF ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.10 Kalibravimo tirpalas, 2 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą pipete įpilama 2,00 ml diklazurilo etaloninio tirpalo (3.8.2) ir 2,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2). Įpilama 16 ml DMF (3.6), skiedžiama vandeniu iki žymės ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.11 C_{18} kietosios fazės ekstrahavimo tūta, pvz., *Bond Elut*, dydis: 1 cm^3, sorbento svoris: 100 mg

3.12 Ekstrahavimo tirpiklis: parūgštintas metanolis.

Į 1 000 ml metanolio (3.5) pipete įpilama 5,0 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.7) ir sumaišoma.

3.13 HPLC judančioji fazė

3.13.1 Eliuentas A: amonio acetato ir tetrabutilamonio hidrosulfato mišinio tirpalas.

5 g amonio acetato (3.2) ir 3,4 g TBHS (3.3) ištirpinama 1 000 ml vandens (3.1) ir sumaišoma.

3.13.2 Eliuentas B: acetonitrilas (3.4).

3.13.3 Eliuentas C: metanolis (3.5).

▼B

4. **Aparatūra**

4.1 Mechaninė purtyklė

4.2 Įranga trigubo gradiento HPLC

4.2.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė, *Hypersil ODS*, 3 μm dalelių įkrova, 100 mm × 4,6 mm, arba lygiavertė

4.2.2 Reguliuojamo bangos ilgio ultravioletinis detektorius arba diodų matricos detektorius

4.3 Sukamasis garintuvas

4.4 Membraninis filtras, 0,45 μm

4.5 Vakuumavimo sistema

4.6 Ultragarso vonia

5. **Procedūra**

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1 Pašaro tuščiasis ėminys

Analizuojamas pašaro tuščiasis ėminys, siekiant patikrinti, ar jame nėra diklazurilo ir trukdančių cheminių medžiagų. Taikant šį metodą pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptinkama diklazurilo arba trukdančių medžiagų.

5.1.2 Išgavos dydžio nustatymo bandymas

Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant diklazurilo, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. Norint pridėti 1 mg/kg, į 50 g pašaro tuščiojo ėminio įpilama 0,1 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.8.1), gerai sumaišoma, paliekama 10 min ir prieš atliekant kitą pakopą (5.2) kelis kartus sumaišoma.

Jei nėra pašaro tuščiojo ėminio, kuris būtų panašus į ėminio pašarą (žr. 5.1.1), išgavos dydį galima nustatyti, taikant etalono pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą ėminį pridedamas diklazurilo kiekis, maždaug atitinkantis diklazurilo kiekį ėminyje. Šis ėminys analizuojamas kartu su ėminiu be pridėto diklazurilo ir išgavos dydis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2 *Ekstrahavimas*

5.2.1 Pašarai

Maždaug 50 g ėminio pasveriama 0,01 g tikslumu. Ėminys supilamas į 500 ml kūginę kolbą, įpilama 1,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2), 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12) ir kolba užkemšama. Mišinys kratomas ant purtyklės (4.1) per naktį. Paliekamas 10 min nusistovėti. Į tinkamą stiklinį indą paimama tirpalo virš nuosėdų alikvotinė 20 ml dalis ir skiedžiama 20 ml vandens. Šis tirpalas supilamas į ekstrahavimo tūtą (3.11) ir siurbiamas, prijungus vakuumą (4.5). Tūta plaunama 25 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12) ir vandens mišinio, 65 + 35 (V + V). Surinktos frakcijos išpilamos ir junginiai išplaunami 25 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12) ir vandens mišinio, 80 + 20 (V + V). Ši frakcija garinama beveik iki sauso likučio sukamajame garintuve (4.3) esant 60 °C. Likutis ištirpinamas 1,0 ml DMF (3.6), įpilama 1,5 ml vandens (3.1) ir sumaišoma. Filtruojama per membraninį filtrą (4.4). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).

5.2.2 Premiksai

Maždaug 1 g ėminio pasveriama 0,001 g tikslumu. Ėminys supilamas į 500 ml kūginę kolbą, įpilama 1,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.3), 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12) ir kolba užkemšama. Mišinys kratomas ant purtyklės (4.1) per naktį. Paliekamas 10 min nusistovėti. Į tinkamo tūrio apvaliadugnę kolbą paimama alikvotinė tirpalo virš

▼B

nuosėdų dalis 10 000/p ml (p – vardinė diklazurilo koncentracija premikse, mg/kg). Garinama 60 °C temperatūroje beveik iki sauso likučio sukamajame garintuve (4.3), esant sumažintam slėgiui. Likutis ištirpinamas 10,0 ml DMF (3.6), įpilama 15,0 ml vandens (3.1) ir sumaišoma. Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).

5.3 *HPLC nustatymas*

5.3.1 Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos, gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, *Hypersil* ODS, 3 µm įkrova, arba lygiavertė	
Judančioji fazė:	Eliuentas A (3.13.1):	vandeninis amonio acetato ir tetrabutilamonio hidrosulfato mišinio tirpalas
	Eliuentas B (3.13.2):	acetonitrilas
	Eliuentas C (3.13.3):	metanolis
Eliuavimo būdas:	— tiesinis gradientas — pradinės sąlygos: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — po 10 min gradientinis eliuavimas 30 min, kol: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). 10 min plovimas eliuentu B.	
Srautas:	1,5–2 ml/min	
Įpurškiamas tūris:	20 µl	
Detektoriaus bangos ilgis:	280 nm	

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 2,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.10) tol, kol nustoja keistis smailės aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.3.2 Kalibravimo tirpalas

Kelis kartus įpurškiama 20 µl kalibravimo tirpalo (3.10) ir nustatomas diklazurilo bei vidinio etalono smailių vidutinis smailės aukštis (plotas).

5.3.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiama 20 µl ėminio tirpalo (5.2.1 arba 5.2.2) ir nustatomas diklazurilo bei vidinio etalono smailių vidutinis smailės aukštis (plotas).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

6.1 *Pašarai*

Diklazurilo kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

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

▼B

kurioje:

$h_{d,\ s}$ = ėminio tirpalo (5.2.1) diklazurilo smailės aukštis (plotas);
$h_{i,\ s}$ = ėminio tirpalo (5.2.1) vidinio etalono smailės aukštis (plotas);
$h_{d,\ c}$ = kalibravimo tirpalo (3.10) diklazurilo smailės aukštis (plotas);
$h_{i,\ c}$ = kalibravimo tirpalo (3.10) vidinio etalono smailės aukštis (plotas);
$c_{d,\ c}$ = diklazurilo koncentracija kalibravimo tirpale (3.10) µg/ml;
m = tiriamosios dalies svoris g.
V = ėminio ekstrakto tūris pagal 5.2.1 (t. y. 2,5 ml).

6.2 *Premiksai*

Diklazurilo kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{\ d,c} \times 0{,}02\ V \times p}{m}\ [mg/kg]$$

kurioje:

$h_{d,\ c}$ = kalibravimo tirpalo (3.10) diklazurilo smailės aukštis (plotas);
$h_{i,\ c}$ = kalibravimo tirpalo (3.10) vidinio etalono smailės aukštis (plotas);
$h_{d,\ s}$ = ėminio tirpalo (5.2.2) diklazurilo smailės aukštis (plotas);
$h_{i,\ s}$ = ėminio tirpalo (5.2.2) vidinio etalono smailės aukštis (plotas);
$c_{d,\ c}$ = diklazurilo koncentracija kalibravimo tirpale (3.10) µg/ml;
m = tiriamosios dalies svoris g;
V = ėminio ekstrakto tūris pagal 5.2.2 (t. y. 2,5 ml);
p = vardinė diklazurilo koncentracija premikse mg/kg.

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto (5.2.1 arba 5.2.2) ir kalibravimo tirpalo (3.10) spektrai.

7.1.1 Kochromatografija

Ėminio ekstrakto (5.2.1 arba 5.2.2) koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.10) tūrį. Pridėto diklazurilo kiekis turi atitikti ėminio ekstrakte nustatytą diklazurilo kiekį.

Padidinamas tik diklazurilo ir vidinio etalono smailių aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Diklazurilo arba vidinio etalono smailių plotis jų pusaukštyje turi atitikti nepadidintos koncentracijos ėminio ekstrakto smailių plotį ± 10 % tikslumu.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;

▼B

b) nuo 230 nm iki 320 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis nei 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;

c) nuo 230 nm iki 320 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis nei 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

— 30 % didesnės vertės, jei diklazurilo kiekis 0,5 mg/kg – 2,5 mg/kg;

— 0,75 mg/kg, jei diklazurilo kiekis 2,5 mg/kg – 5 mg/kg;

— 15 % didesnės vertės, jei diklazurilo kiekis didesnis nei 5 mg/kg.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas (tuščiajam ėminiui) su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 80 %.

8. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai**

Buvo parengtas tarplaboratorinis tyrimas, kurį atliekant 11 laboratorijų tyrė penkių tipų ėminius. Šiuos ėminius sudarė du premiksai, vienas sumaišytas su organine matrica (O 100), kitas su neorganine matrica (A 100). Teorinė diklazurilo koncentracija – 100 mg/kg. Trijų tipų naminių paukščių pašarų mišinius pagamino trys skirtingi gamintojai (NL) (L1/Z1/K1). Teorinė diklazurilo koncentracija – 1 mg/kg. Laboratorijoms buvo nurodyta kiekvieną ėminį analizuoti vieną arba du kartus. (Išsamesnė informacija apie šį tarplaboratorinį tyrimą yra pateikta *Journal of AOAC International*, *Volume* 77, Nr. 6, 1994, p. 1 359–1 361). Rezultatai pateikti šioje lentelėje.

	1 ėminys A 100	2 ėminys O 100	3 ėminys L1	4 ėminys Z1	5 ėminys K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Vidurkis	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
Vardinis kiekis mg/kg)	100	100	1	1	1

L = laboratorijų skaičius
n = atskirų verčių skaičius
S_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas

▼B

S_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis

CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas

9. **Pastabos**

Turi būti iš anksto parodyta, kad diklazurilo atsakas matuojamų koncentracijos verčių intervale yra tiesinis.

G. NATRIO LASALOCIDO NUSTATYMAS

Polieterio monokarboksirūgšties natrio druska, gauta iš Streptomyces lasaliensis

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti lasalocido natrio druskos koncentraciją pašaruose ir premiksuose. Aptikimo riba – 5 mg/kg, kiekybinio nustatymo riba – 10 mg/kg.

2. **Metodas**

Natrio lasalocido druska ekstrahuojama iš ėminio parūgštintu metanoliu ir jos kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu naudojant fluorescencinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4)

3.2 Ortofosforo rūgštis, w (w/w) = 85 %

3.3 Ortofosforo rūgšties tirpalas, c = 20 %

23,5 ml ortofosforo rūgšties (3.2) skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.4 6-metil-2-heptilaminas (1,5-dimetilheksilaminas), w (w/w) = 99 %

3.5 Metanolis, HPLC grynumo

3.6 Vandenilio chlorido rūgštis, tankis = 1,19 g/ml

3.7 Fosfatinis buferinis tirpalas, c = 0,01 mol/l

500 ml vandens (3.11) ištirpinama 1,36 g KH_2PO4 (3.1), įpilama 3,5 ml ortofosforo rūgšties (3.2) ir 10,0 ml 6-metil-2-heptilamino (3.4). Ortofosforo rūgštimi (3.3) nustatoma tirpalo pH 4,0, vandeniu (3.11) skiedžiama iki 1 000 ml.

3.8 Parūgštintas metanolis

Į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 5,0 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.6), iki žymos skiedžiama metanoliu (3.5) ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.9 HPLC judančioji fazė, fosfatinio buferinio tirpalo ir metanolio mišinys 5 + 95 (V + V)

5 ml fosfatinio buferinio tirpalo (3.7) sumaišoma su 95 ml metanolio (3.5).

3.10 Garantuoto grynumo natrio lasalocido etaloninė medžiaga, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (polieterio monokarboksirūgšties natrio druska, gauta iš *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1 Natrio lasalocido pradinis etaloninis tirpalas, 500 µg/ml, 500 µg/ml

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg natrio lasalocido (3.10), ištirpinama parūgštintame metanolyje (3.8), iki žymos skiedžiama tuo pačiu tirpikliu ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

▼B

3.10.2 Natrio lasalocido tarpinis etaloninis tirpalas, 50 µg/ml

Į 100 ml matavimo kolbą pipete paimama 10 ml natrio lasalocido pradinio etaloninio tirpalo (3.10.1), iki žymos skiedžiama parūgštintu metanoliu (3.8) ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.10.3 Kalibravimo tirpalai

Į keletą 50 ml matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ir 10,0 ml tarpinio etaloninio tirpalo (3.10.2), iki žymos skiedžiama parūgštintu metanoliu (3.8) ir sumaišoma. Natrio lasalocido koncentracija šiuose tirpaluose yra 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 5,0 µg/ml ir 10,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.11 Vanduo HPLC grynumo

4. **Aparatūra**

4.1 Ultragarso vonia (arba purtoma vandens vonia) su temperatūros reguliavimu

4.2 Membraniniai filtrai, 0,45 µm

4.3 HPLC įranga su įpurškimo sistema, kuria būtų galima įpurkšti 20 µl tūrį

4.3.1 Atvirkštinių fazių skysčių chromatografijos kolonėlė 125 mm × 4 mm, C_{18}, 5 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

4.3.2 Reguliuojamo sužadinimo ir emisijos bangų ilgio fluorescencinis detektorius

5. **Procedūra**

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1 Pašaro tuščiasis ėminys

Norint nustatyti išgavos dydį (5.1.2), analizuojamas pašaro tuščiasis ėminys, siekiant patikrinti, ar jame nėra natrio lasalocido ir trukdančių cheminių medžiagų. Taikant šį metodą pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptinkama natrio lasalocido arba trukdančių medžiagų.

5.1.2 Išgavos dydžio nustatymo bandymas

Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant natrio lasalocido, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. Norint gauti 100 mg/kg koncentraciją, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 10,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.10.1) ir tirpalas išgarinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 50 g pašaro tuščiojo ėminio, gerai sumaišoma ir paliekama 10 min. Prieš ekstrahavimą (5.2) dar keletą kartų maišoma.

Jei nėra pašaro tuščiojo ėminio, kuris būtų panašus į ėminio pašarą (žr. 5.1.1), išgavos dydį galima nustatyti, taikant etalono pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą ėminį pridedamas natrio lasalocido kiekis, maždaug atitinkantis natrio lasalocido kiekį ėminyje. Šis ėminys analizuojamas kartu su ėminiu be pridėto natrio lasalocido ir išgavos dydis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2 *Ekstrahavimas*

5.2.1 Pašarai

Į užkemšamą 250 ml kūginę kolbą 0,01 g tikslumu pasveriama 5–10 g ėminio. Įpilama 100 ml parūgštinto metanolio (3.8). Kolba užkemšama ir sukama, kad ėminys galėtų susimaišyti. Kolba 20 min

▼B

dedama į ultragarso vonią (4.1), kurioje yra maždaug 40 °C temperatūra, tada išimama ir atvėsinama iki kambario temperatūros. Kolba paliekama maždaug 1 h, kad nusėstų suspenduotos medžiagos. Alikvotinė ekstrakto dalis filtruojama į tinkamą indą per 0,45 μm membraninį filtrą (4.2). Toliau atliekamas nustatymas HPLC metodu (5.3).

5.2.2 Premiksai

Į 250 ml matavimo kolbą 0,001 g tikslumu pasveriama apie 2 g nemalto premikso. Įpilama 100 ml parūgštinto metanolio (3.8). Kolba sukama, kad ėminys galėtų susimaišyti. Kolba 20 min dedama į ultragarso vonią (4.1), kurioje yra maždaug 40 °C temperatūra, tada išimama ir atvėsinama iki kambario temperatūros. Iki žymos skiedžiama parūgštintu metanoliu (3.8) ir gerai sumaišoma. Kolba paliekama maždaug 1 h, kad nusėstų suspenduotos medžiagos, tada alikvotinė ekstrakto dalis filtruojama per 0,45 μm membraninį filtrą (4.2). Tinkamas skaidraus filtrato tūris skiedžiamas parūgštintu metanoliu (3.8), kad natrio lasalocido koncentracija galutiniame bandymo tirpale būtų apie 4 μg/ml. Toliau atliekamas nustatymas HPLC metodu (5.3).

5.3 *HPLC nustatymas*

5.3.1 Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos, gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai:

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.3.1):	125 mm × 4 mm, atvirkštinių fazių, C_{18}, 5 μm įkrova, arba lygiavertė
Judančioji fazė (3.9):	Fosfatinio buferinio tirpalo (3.7) ir metanolio (3.5) mišinys, 5 + 95 (V + V)
Srautas:	1,2 ml/min
Detektoriaus bangų ilgiai:	
sužadinimo:	310 nm
emisijos:	419 nm
Įpurškiamas tūris:	20 μl

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 4,0 μg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.10.3) tol, kol nustoja keistis smailės aukščio (arba ploto) ir sulaikymo trukmės vertės.

5.3.2 Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.10.3) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių (arba plotų) vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija μg/ml.

5.3.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiama ėminio ekstrakto tirpalo, gauto 5.2.1 arba 5.2.2, kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalų tūrį, ir nustatomas natrio lasalocido smailių vidutiniai smailės aukščiai (plotai).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Natrio lasalocido koncentracija (μg/ml) nustatoma pagal įpurkšto ėminio tirpalo (5.3.3) smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę.

▼B

6.1 *Pašarai*

Natrio lasalocido kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kurioje:

c = natrio lasalocido koncentracija ėminio tirpale (5.2.1) µg/ml;
V_1 = ėminio ekstrakto pagal 5.2.1 tūris ml (t. y. 100);
m = tiriamosios dalies svoris g.

6.2 *Premiksai*

Natrio lasalocido kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kurioje:

c = natrio lasalocido koncentracija ėminio tirpale (5.2.2) µg/ml
V_2 = ėminio ekstrakto pagal 5.2.2 tūris ml (t. y. 250);
f = praskiedimo faktorius pagal 5.2.2;
m = tiriamosios dalies svoris g.

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Spektrofluorimetrija pagrįsti metodai mažiau jautrūs trukdžiams palyginti su metodais, kuriuose naudojamas ultravioletinis detektorius. Analitės tapatumas gali būti patvirtintas kochromatografijos metodu.

7.1.1 Kochromatografija

Į ėminio ekstraktą (5.2.1 ar 5.2.2) koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.10.3) tūrį. Pridėto natrio lasalocido kiekis turi atitikti ėminio ekstrakte nustatytą natrio lasalocido kiekį. Padidinamas tik natrio lasalocido smailių aukštis, atsižvelgiant į pridėtą natrio lasalocido kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje turi atitikti pradinio ėminio ekstrakto smailių plotį ± 10 % tikslumu.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

— 15 % didesnės vertės, jei natrio lasalocido kiekis 30 mg/kg–100 mg/kg,

— 15 mg/kg, jei natrio lasalocido kiekis 100 mg/kg–200 mg/kg,

— 7,5 % didesnės vertės, jei natrio lasalocido kiekis didesnis nei 200 mg/kg.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas (tuščiajam ėminiui) su analitės priedu, turėtų būti ne mažesnis kaip 80 %. Išgavos dydis, gautas premiksams su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

▼B

8. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai**

Buvo parengtas tarplaboratorinis tyrimas (*)[1]), kurio metu 12 laboratorijų analizavo du premiksus (1 ir 2 ėminiai) ir penkis pašarus (3–7 ėminiai). Kiekvienas ėminys analizuotas du kartus. Rezultatai pateikti šioje lentelėje:

	1 ėminys Premiksas viščiukams	2 ėminys Premiksas kalakutams	3 ėminys Granuliuotas lesalas kalakutams	4 ėminys Trupininis lesalas viščiukams	5 ėminys Lesalas kalakutams	6 ėminys Lesalas paukščiams A	7 ėminys Lesalas paukščiams B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Vidurkis [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Vardinis kiekis [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Gamintojo nurodytas kiekis
(**) Laboratorijoje paruošti pašarai

L = laboratorijų skaičius
n = atskirų rezultatų skaičius
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
s_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas, %
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas, %

(*) *Analyst*, 1995, 120, 2 175–2 180.

▼B

V PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI NEPAGEIDAUJAMOMS MEDŽIAGOMS PAŠARUOSE KONTROLIUOTI

A. LAISVOJO IR SUMINIO GOSIPOLIO KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas laisvojo gosipolio, suminio gosipolio ir chemiškai gimininių medžiagų kiekis medvilnės sėklose, sėklų miltuose ir išspaudose bei šių pašarinių žaliavų turinčiuose kombinuotuose pašaruose, kuriuose yra daugiau nei 20 mg/kg laisvojo gosipolio, suminio gosipolio ir chemiškai gimininių medžiagų.

2. **Metodas**

Gosipolis, esant 3-aminopropan-1-oliui, ekstrahuojamas propan-2-olio ir heksano mišiniu, kai reikia nustatyti laisvąjį gosipolį, arba dimetilformamidu – suminiam gosipoliui nustatyti. Anilino veikiamas gosipolis paverčiamas gosipoldianilinu, kurio tirpalo optinis tankis matuojamas esant 440 nm.

3. **Reagentai**

3.1 Propan-2-olio ir heksano mišinys: sumaišoma 60 tūrio dalių propan-2-olio ir 40 tūrio dalių *n*-heksano.

3.2 Tirpiklis A. Į 1 litro matavimo kolbą įpilama maždaug 500 ml propan-2-olio ir heksano mišinio (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-olio, 8 ml ledinės acto rūgšties ir 50 ml vandens. Skiedžiama iki žymės propan-1-olio ir heksano mišiniu (3.1). Šis reagentas stabilus vieną savaitę.

3.3 Tirpiklis B. 2 ml 3-aminopropan-1-olio ir 10 ml ledinės acto rūgšties pipete įpilama į 100 ml matavimo kolbą. Atvėsinama iki kambario temperatūros ir skiedžiama iki žymės *N, N*-dimetilformamidu. Šis reagentas stabilus vieną savaitę.

3.4 Anilinas. *Jei atliekant tuščiąjį bandymą optinis tankis yra didesnis nei 0,022*, anilinas distiliuojamas su cinko dulkėmis, išpilant pirmąją ir paskutiniąją 10 % tūrio distiliato frakcijas. Laikomas šaldytuve užkimštame rudo stiklo butelyje, reagentas išsilaiko keletą mėnesių.

3.5 Etaloninis gosipolio tirpalas A. 27,9 mg gosipolio acetato dedama į 250 ml matavimo kolbą. Druska ištirpinama ir tirpalas skiedžiamas iki žymės tirpikliu A (3.2). 50 ml šio tirpalo pipete paimama į 250 ml matavimo kolbą ir skiedžiama iki žymės tirpikliu A. Gosipolio koncentracija šiame tirpale yra 0,02 mg/ml. Prieš naudojant tirpalas paliekamas stovėti kambario temperatūroje vieną valandą.

3.6 Etaloninis gosipolio tirpalas B. 27,9 mg gosipolio acetato dedama į 50 ml matavimo kolbą. Druska ištirpinama ir tirpalas skiedžiamas iki žymės tirpikliu B (3.3). Gosipolio koncentracija šiame tirpale yra lygi 0,5 mg/ml.

Etaloniniai gosipolio tirpalai A ir B stabilūs 24 h, jei apsaugomi nuo šviesos.

4. **Aparatūra**

4.1 Maišiklis (vartytuvas), apsisukimų dažnis maždaug 35 min^{-1}.

▼B

4.2 Spektrofotometras.

5. **Procedūra**

5.1 *Tiriamasis ėminys*

Tiriamojo ėminio masė priklauso nuo numatomo gosipolio kiekio jame. Pageidautina dirbti su mažu tiriamuoju ėminiu ir palyginti didele alikvotine filtrato dalimi, kurioje esančio gosipolio kiekio užtektų, kad būtų įmanomas tikslus fotometrinis matavimas. *Laisvojo gosipolio,* esančio medvilnės sėmenyse, medvilnės sėklų miltuose ir išspaudose, *kiekiui nustatyti* tiriamojo ėminio masė yra ne didesnė nei 1 g; kombinuotųjų pašarų ėminio masė gali būti iki 5 g. Daugeliui atvejų pakanka 10 ml tūrio alikvotinės filtrato dalies, joje yra 50–100 μg gosipolio. *Suminio gosipolio kiekiui nustatyti* ėminio masė yra 0,5–5,0 g, taigi 2 ml tūrio alikvotinėje tirpalo dalyje bus 40–200 μg gosipolio.

Analizė atliekama maždaug 20 °C aplinkos temperatūroje.

5.2 *Laisvojo gosipolio nustatymas*

Tiriamasis ėminys supilamas į šlifo kamščiu užkemšamą 250 ml kolbą, kurios dugne būtų stiklo duženų. Pipete įpilama 50 ml tirpiklio A (3.2), kolba užkemšama ir maišoma vieną valandą maišikliu. Filtruojama per sausą filtrą ir filtratas surenkamas į mažą šlifo kamščiu užkemšamą kolbą. Filtruojant filtro piltuvas uždengiamas laikrodžio stiklu.

Filtrato alikvotinės dalys, turinčios 50–100 μg gosipolio, pipete įpilamos į dvi 25 ml matavimo kolbas (A ir B). Prireikus iki 10 ml tūrio skiedžiama tirpikliu A (3.2). Kolbų turinys skiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Šis tirpalas naudojamas kaip palyginamasis, pagal kurį matuojamas ėminio tirpalo optinis tankis.

Į dvi kitas 25 ml matavimo kolbas (C ir D) pipete įpilama 10 ml tirpiklio A (3.2). Kolbos (C) turinys skiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Šis tirpalas yra palyginamasis, pagal kurį matuojamas tuščiojo ėminio tirpalas.

Į kiekvieną kolbą (D) ir (B) įpilama po 2 ml anilino (3.4). Spalvai gauti kolbos 30 min šildomos verdančio vandens vonioje. Atvėsinama iki kambario temperatūros, turinys skiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), tirpalas sumaišomas ir kolbos paliekamos vieną valandą stovėti.

Esant 440 nm bangos ilgiui ir naudojant 1 cm storio kiuvetes, spektrofotometru matuojamas tuščiojo ėminio tirpalo (D) optinis tankis, lyginant jį su palyginamuoju tirpalu (C), ir ėminio tirpalo (B) optinis tankis, lyginant jį su palyginamuoju tirpalu (A).

Iš ėminio tirpalo optinio tankio vertės atimama tuščiojo ėminio tirpalo optinio tankio vertė (pataisytas optinis tankis). Pagal šią vertę, kaip nurodyta 6 skyriuje, apskaičiuojamas gosipolio kiekis ėminyje.

5.3 *Suminio gosipolio kiekio nustatymas*

Tiriamasis ėminys, kuriame yra 1–5 mg gosipolio, dedamas į 50 ml matavimo kolbą ir įpilama 10 ml tirpiklio B (3.3). Tuo pat metu ruošiamas tuščiasis ėminys, į kitą 50 ml matavimo kolbą įpilant 10 ml tirpiklio B (3.3). Abi kolbos 30 min šildomos verdančio vandens vonioje. Atvėsinama iki kambario temperatūros ir kiekvienos kolbos

▼B

turinys skiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Sumaišoma ir 10–15 min paliekama nusistovėti, tada filtruojama ir filtratai supilami į kolbas su šlifo kamščiu.

Į dvi 25 ml matavimo kolbas įpilama po 2 ml ėminio filtrato, o į kitas dvi 25 ml matavimo kolbas – po 2 ml tuščiojo ėminio filtrato. Vienos kolbos iš kiekvieno rinkinio turinys skiedžiamas iki 25 ml žymės popan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1). Šie tirpalai bus palyginamieji tirpalai.

Į kitas dvi kolbas įpilama po 2 ml anilino (3.4). Spalvai gauti kolbos 30 min šildomos verdančio vandens vonioje. Atvėsinama iki kambario temperatūros, skiedžiama iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), sumaišoma ir paliekama stovėti valandą.

Matuojamas optinis tankis, kaip nurodyta 5.2 punkte laisvojo gosipolio atveju. Pagal šią vertę apskaičiuojamas suminis gosipolio kiekis, kaip nurodyta 6 skyriuje.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Rezultatai gali būti skaičiuojami pagal savitąjį optinį tankį (6.1) arba naudojant kalibravimo kreivę (6.2).

6.1 *Pagal savitąjį optinį tankį*

Savitieji optiniai tankiai aprašytomis sąlygomis turi tokias vertes:

laisvojo gosipolio: $E\frac{1\ \%}{1\ cm} = 625$

suminio gosipolio: $E\frac{1\ \%}{1\ cm} = 625$

Laisvojo ar suminio gosipolio kiekis ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{gosipolio kiekis } (\%) = ,\frac{E \times 1\ 250}{E^{1\ \%}_{1\ cm} \times p \times a}$$

kurioje:

E = pataisytas optinis tankis, kaip nurodyta 5.2,
p = tiriamasis ėminys g,
a = alikvotinė filtrato tūrio dalis ml.

6.2 *Pagal kalibravimo kreivę*

6.2.1 Laisvasis gosipolis

Ruošiami du rinkiniai po penkias 25 ml matavimo kolbas. Į kiekvieną rinkinio kolbą įpilamos etaloninio gosipolio tirpalo (3.5) 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ir 10 ml alikvotinės tūrio dalys. Skiedžiama tirpikliu A (3.2) iki 10 ml. Kiekvienam rinkiniui imama dar po vieną 25 ml kolbą, į kurias įpilama tik 10 ml tirpiklio A (3.2) (tuščiasis bandymas).

Pirmojo rinkinio kolbų (įskaitant tuščiojo ėminio kolbą) turinys skiedžiamos iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1) (palyginamasis rinkinys).

▼B

Į kiekvieną antrojo rinkinio kolbą (įskaitant tuščiojo ėminio kolbą) įpilama po 2 ml anilino (3.4). Spalvai gauti kolbos 30 min šildomos verdančio vandens vonioje. Kolbos aušinamos iki kambario temperatūros, jų turinys skiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), sumaišoma ir paliekama stovėti vieną valandą (etalonų rinkinys).

Etalonų rinkinio tirpalų optinis tankis matuojamas kaip nurodyta 5.2, lyginant su atitinkamais palyginamojo rinkinio tirpalais. Braižoma kalibravimo kreivė, optinį tirpalų tankį pateikiant kaip gosipolio kiekio (μg) funkciją.

6.2.2 Suminis gosipolis

Ruošiamos šešios 50 ml tūrio matavimo kolbos. Į pirmą kolbą įpilama 10 ml tirpiklio B (3.3), į kitas – atitinkamai 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ir 10 ml etaloninio gosipolio tirpalo B (3.6). Kiekvienos kolbos turinys skiedžiamas iki 10 ml tirpikliu B (3.3). Šildoma 30 min verdančio vandens vonioje. Atvėsinama iki kambario temperatūros, skiedžiama iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1) ir sumaišoma.

Po 2 ml šių tirpalų įpilama į du rinkinius po šešias 25 ml matavimo kolbas. Pirmojo rinkinio matavimo kolbų turinys skiedžiamas iki 25 ml žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1) (palyginamųjų tirpalų rinkinys).

Į kiekvieną antrojo rinkinio kolbą įpilama po 2 ml anilino (3.4). Kolbos 30 min šildomos verdančio vandens vonioje. Kolbos atvėsinamos iki kambario temperatūros, jų turinys skiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1), sumaišoma ir paliekama stovėti vieną valandą (etalonų rinkinys).

Etaloninio rinkinio tirpalų optinis tankis matuojamas kaip nurodyta 5.2, lyginant su atitinkamais palyginamojo rinkinio tirpalais. Braižoma kalibravimo kreivė, optinį tirpalų tankį pateikiant kaip gosipolio kiekio (μg) funkciją.

6.3 *Pakartojamumas*

Dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius to paties ėminio matavimus, skirtumas neturi būti didesnis nei:

— 15 % didesnės koncentracijos, kai gosipolio kiekis yra mažesnis nei 500 mg/kg,

— 75 mg/kg, absoliučiąja verte, kai gosipolio kiekis yra ne mažesnis nei 500 mg/kg ir ne didesnis kaip 750 mg/kg,

— 10 % didesnės koncentracijos, kai gosipolio kiekis yra didesnis nei 750 mg/kg.

▼M6

B. DIOKSINŲ (PCDD/PCDF) IR PCB KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS

I SKYRIUS

Ėminių ėmimo metodai ir analizės rezultatų aiškinimas

1. **Taikymo sritis ir apibrėžtys**

Ėminiai, skirti polichlorintų dibenzo-p-dioksinų (PCDD), polichlorintų dibenzofuranų PCDF), dioksinų tipo polichlorintų bifenilų (PCB) ([1]) ir ne dioksinų tipo PCB koncentracijai pašaruose oficialiai kontroliuoti, imami vadovaujantis I priedo nuostatomis. Pašaruose tolygiai pasiskirsčiusių medžiagų arba produktų kontrolei taikomi kiekybiniai reikalavimai, kaip numatyta I priedo 5.1 punkte. Laikoma, kad tokiais metodais paimti jungtiniai ėminiai yra reprezentatyvieji partijų arba jų dalių, iš kurių jie paimti, ėminiai. Ar jie atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją, nustatytą Direktyva 2002/32/EB, vertinama pagal laboratoriniuose mėginiuose nustatytą koncentraciją.

Šioje B dalyje vartojamų terminų apibrėžtys nustatytos Komisijos sprendimo 2002/657/EB ([2]) I priede.

([1]) PCDD, PCDF ir dioksinų tipo PCB TEF (toksiškumo ekvivalento koeficientų) lentelė. PSO TEF, skirti žmonėms keliamai rizikai vertinti, pagrįsti Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) tarptautinės cheminės saugos programos (IPCS) specialistų posėdžio, surengto 2005 m. birželio mėn. Ženevoje, išvadomis (*Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds*. *Toxicological Sciences* 93(2), 223–241 (2006)).

Giminingas junginys	TEF vertė	Giminingas junginys	TEF vertė
Dibenzo-p-dioksinai (PCDD) ir dibenzo-p-furanai (PCDF)		Dioksinų tipo PCB Ne orto PCB + mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Vartojamos santrumpos: T – tetra; Pe – penta; Hx – heksa; Hp – hepta; O – okta; CDD – chlordibenzodioksinas; CDF – chlordibenzofuranas; CB – chlorbifenilas.

([2]) 2002 m. rugpjūčio 14 d. Komisijos sprendimas 2002/657/EB dėl Tarybos direktyvos 96/23/EB nuostatų dėl analizės metodų tinkamumo ir rezultatų aiškinimo įgyvendinimo (OL L 221, 2002 8 17, p. 8).

▼M6

Be šių terminų apibrėžčių šioje B dalyje vartojamos šios apibrėžtys:

Atrankiniai metodai – metodai, naudojami atrinkti tuos mėginius, kuriuose PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracija viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių. Jie leidžia pasiekti didelį ekonominį efektyvumą ir našumą ir taip padidinti tikimybę aptikti naujus aktyvius cheminės medžiagos veikimo ir rizikos vartotojų sveikatai šaltinius. Atrankiniai metodai grindžiami bioanalitiniais arba GC-MS metodais. Siekiant nustatyti atitiktį didžiausiai leidžiamajai koncentracijai tikrinami ribinę vertę viršijantys mėginių tyrimo rezultatai – atliekama išsami pakartotinė pirminio mėginio analizė taikant patvirtinamąjį metodą.

Patvirtinamieji metodai – metodai, suteikiantys visą informaciją arba papildomos informacijos, kuri leidžia vienareikšmiškai identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB, kurių kiekis atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba, kai reikia, lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių. Taikant šiuos metodus naudojama dujų chromatografija ir didelės skyros masių spektrometrija (GC-HRMS) arba dujų chromatografija ir dviguboji masių spektrometrija (GC-MS/MS).

2. **Partijos arba jos dalies atitiktis didžiausiai leidžiamajai koncentracijai**

2.1. *Ne dioksinų tipo PCB*

Partija arba jos dalis atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją, jeigu, atsižvelgiant į matavimo neapibrėžtį ([1]), PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 ir PCB 180 (toliau – ne dioksinų tipo PCB) sumos analizės rezultatai neviršija didžiausios leidžiamosios koncentracijos, nustatytos Direktyva 2002/32/EB. Partija arba jos dalis neatitinka Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios koncentracijos, jeigu atlikus kartotinę analizę ([2]), dviejų viršutinių ribinių ([3]) analizės rezultatų vidurkis, atsižvelgiant į išplėstąją matavimo neapibrėžtį, be pagrįstos abejonės viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją, t. y. atitikčiai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija, atėmus išplėstinę matavimo neapibrėžtį.

Išplėstoji matavimo neapibrėžtis apskaičiuojama taikant aprėpties koeficientą 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasikliovimo lygis. Partija arba jos dalis neatitinka reikalavimų, jei išmatuotų verčių vidurkis, atėmus vidurkio išplėstąją neapibrėžtį, yra didesnis už didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

([1]) Kai taikoma, turėtų būti vadovaujamasi dokumente „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) nurodytais principais.

([2]) Kartotinė analizė – atskira tiriamųjų analičių analizė naudojant to paties homogenizuoto mėginio antrą alikvotinę dalį. Paprastai kartotinei analizei taikomi reikalavimai, nustatyti II priedo C skyriaus 3 punkte. Tačiau taikant metodus, naudojant vidinį etaloną su žymėtais ^{13}C atomais atitinkamoms analitėms, kartotinė analizė būtina tik tuomet, jeigu pirmojo nustatymo rezultatas neatitinka didžiausios leidžiamosios koncentracijos. Kartotinė analizė yra būtina tam, kad būtų pašalinta mėginių vidinės tarpusavio taršos arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Jeigu analizė atliekama nustačius atsitiktinę taršą ir galima atsekti, kad analizei paimti ėminiai yra susiję su tarša, o nustatyta koncentracija yra daug didesnė nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, to nereikia patvirtinti atliekant kartotinę analizę.

([3]) Vartojant sampratą „viršutinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto gimininго junginio indėlis turi būti prilyginamas kiekybinio nustatymo ribai. Vartojant sampratą „žemutinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto gimininго junginio indėlis turi būti prilyginamas nulinei ribai. Vartojant sampratą „vidurinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto gimininго junginio indėlis turi būti prilyginamas pusei kiekybinio nustatymo ribos.

▼M6

Ankstesnėse šio punkto pastraipose nurodytos taisyklės taikomos analizės rezultatui, kuris gaunamas tiriant oficialiai kontrolei skirtą ėminį. Jeigu analizė atliekama atsiliepimo į ieškinį arba informacijos tikslais, taikomos nacionalinės taisyklės.

2.2. *Dėl PCDD/F ir dioksinų tipo PCB*

Partija arba jos dalis atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją, jeigu pavienės analizės rezultatas:

— gautas taikant atrankinį metodą, kai klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis mažesnė nei 5 %, rodo, kad, koncentracija neviršija atitinkamos Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios PCDD/F koncentracijos ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracijos,

— gautas taikant patvirtinamąjį metodą, neviršija atitinkamos Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios PCDD/F koncentracijos ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracijos, atsižvelgiant į išplėstąją matavimo neapibrėžtį.

Atliekant atrankinius tyrimus nustatoma ribinė vertė, siekiant priimti sprendimą dėl mėginių atitikties atitinkamai nustatytai PCDD/F arba PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos didžiausiajai leidžiamajai koncentracijai.

Partija arba jos dalis neatitinka Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios koncentracijos, jeigu atlikus kartotinę analizę ([1]), taikant patvirtinamąjį metodą dviejų viršutinių ribinių ([2]) analizės rezultatų vidurkis, atsižvelgiant į išplėstąją matavimo neapibrėžtį, be pagrįstos abejonės viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją, t. y. atitikčiai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija, atėmus išplėstinę matavimo neapibrėžtį.

Išplėstoji matavimo neapibrėžtis apskaičiuojama taikant aprėpties koeficientą 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasikliovimo lygis. Partija arba jos dalis neatitinka reikalavimų, jei išmatuotų verčių vidurkis, atėmus vidurkio išplėstąją neapibrėžtį, yra didesnis už didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

Siekiant nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumą naudojama PCDD/F ir dioksinų tipo PCB atskirų analizės rezultatų išplėstosios neapibrėžties suma.

Ankstesnėse šio punkto pastraipose nurodytos taisyklės taikomos analizės rezultatui, kuris gaunamas tiriant oficialiai kontrolei skirtą ėminį. Jeigu analizė atliekama atsiliepimo į ieškinį arba informacijos tikslais, taikomos nacionalinės taisyklės.

([1]) Paprastai kartotinei analizei taikomi reikalavimai, nustatyti II priedo C skyriaus 2 punkte. Tačiau taikant patvirtinamuosius metodus, naudojant vidinį etaloną su žymėtais ^{13}C atomais atitinkamoms analitėms, kartotinė analizė būtina tik tuomet, jeigu pirmojo nustatymo rezultatas neatitinka didžiausios leidžiamosios koncentracijos. Kartotinė analizė yra būtina tam, kad būtų pašalinta mėginių vidinės tarpusavio taršos arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Jeigu analizė atliekama nustačius atsitiktinę taršą ir galima atsekti, kad analizei paimti ėminiai yra susiję su tarša, o nustatyta koncentracija yra daug didesnė nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, to nereikia patvirtinti atliekant kartotinę analizę.

([2]) Vartojant sampratą „viršutinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto gimininго junginio indėlis į toksiškumo ekvivalentą (toliau – TEQ) turi būti prilyginamas kiekybinio nustatymo ribai. Vartojant sampratą „žemutinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto gimininго junginio indėlis į TEQ turi būti prilyginamas nulinei ribai. Vartojant sampratą „vidurinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto gimininго junginio indėlis į TEQ turi būti prilyginamas pusei kiekybinio nustatymo ribos.

▼M6

3. **Rezultatai, viršijantys direktyvos 2002/32/EB II priede nustatytą lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių**

Lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, taikymas padeda atrinkti ėminius tais atvejais, kai svarbu nustatyti taršos šaltinį ir imtis priemonių sumažinti ar pašalinti taršą. Taikant atrankinius metodus nustatomos atitinkamos ribinės tų ėminių atrankos vertės. Jeigu taršos šaltiniui nustatyti ir taršai sumažinti ar pašalinti reikia didelių pastangų, tikslinga patvirtinti lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijimą kartotine analize, taikant patvirtinamąjį metodą ir atsižvelgiant į išplėstąją matavimo neapibrėžtį ([1]).

II SKYRIUS

Mėginių ruošimas ir reikalavimai, keliami analizės metodams, kurie taikomi vykdant oficialią dioksinų (PCDD/F) ir dioksinų tipo PCB koncentracijos pašaruose kontrolę

1. **Taikymo sritis**

Šiame skyriuje nustatyti reikalavimai taikomi, kai pašarai tiriami vykdant oficialią 2, 3, 7, 8 padėtyse pakeistų PCDD/F ir dioksinų tipo PCB kontrolę ir atsižvelgiant į mėginių ruošimo ir analizės reikalavimus, taikomus kitais reguliavimo tikslais, įskaitant pašarų ūkio subjekto atliekamą kontrolę, kuria siekiama užtikrinti atitiktį Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 183/2005 nuostatoms ([2]).

PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracijos pašaruose stebėsena gali būti atliekama taikant dviejų skirtingų tipų analizės metodus:

a) *Atrankiniai metodai*

Atrankinių metodų tikslas – atrinkti tuos mėginius, kuriuose PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracija viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių. Atrankiniais metodais sudaromos sąlygos pasiekti didelį ekonominį efektyvumą ir našumą ir taip padidinti tikimybę aptikti naujus aktyvius cheminės medžiagos veikimo ir rizikos vartotojų sveikatai šaltinius. Juos taikant siekiama išvengti klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų. Jiems galima priskirti bioanalitinius metodus ir GC-MS metodus.

Taikant atrankinius metodus analizės rezultatas palyginamas su ribine verte ir gaunamas teigiamas arba neigiamas atsakymas dėl galimo didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijimo. PCDD/F koncentracija ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracija mėginiuose, kuriuose ji, kaip įtariama, neatitinka didžiausios leidžiamosios koncentracijos, nustatoma (patvirtinama) taikant patvirtinamąjį metodą.

Be to, atrankiniai metodai gali parodyti, kokia yra PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracija mėginyje. Taikant bioanalitinius atrankinius metodus rezultatas išreiškiamas bioanalitiniais ekvivalentais (BEQ), o taikant fizikinius cheminius GC-MS metodus – toksiškumo ekvivalentais (TEQ). Skaičiais išreikšti atrankinių metodų rezultatai yra tinkami siekiant įrodyti atitiktį ar įtariamą neatitiktį arba lygio,

([1]) Kartotinės analizės, atliekamos vykdant lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, kontrolę, paaiškinimas ir reikalavimai yra identiški nurodytiesiems 2 išnašoje ir taikomiems didžiausios leidžiamosios koncentracijos kontrolės atveju.

([2]) 2005 m. sausio 12 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 183/2005, nustatantis pašarų higienos reikalavimus (OL L 35, 2005 2 8, p. 1).

▼M6

kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijimą ir parodyti koncentracijos ribas, jeigu reikėtų toliau taikyti patvirtinamuosius metodus. Jie netinkami tokiems tikslams kaip, pavyzdžiui, foninio lygio koncentracijos ir suvartojimo įvertinimas, koncentracijos pokyčio per tam tikrą laiką stebėsena arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, ir didžiausios leidžiamosios koncentracijos pakartotinis įvertinimas.

b) *Patvirtinamieji metodai*

Patvirtinamieji metodai leidžia vienareikšmiškai identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB mėginyje ir suteikia visą gimininių junginių lygmens informaciją. Todėl tuos metodus galima taikyti kontroliuojant didžiausią leidžiamąją koncentraciją ir lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, taip pat siekiant patvirtinti rezultatus, gautus taikant atrankinius metodus. Be to, jų rezultatai gali būti naudojami kitiems tikslams, pavyzdžiui, siekiant nustatyti mažą foninio lygio koncentraciją atliekant pašarų stebėseną, stebint pokyčius per tam tikrą laiką, vertinant poveikį ir kuriant duomenų bazę, kad būtų galima iš naujo įvertinti lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, ir didžiausią leidžiamąją koncentraciją. Jie taip pat svarbūs nustatant gimininių junginių struktūras, kad būtų galima identifikuoti galimus taršos šaltinius. Taikant šiuos metodus naudojama GC-HRMS. Siekiant patvirtinti atitiktį arba neatitiktį didžiausiai leidžiamajai koncentracijai, taip pat gali būti naudojama GC-MS/MS.

2. **Pagrindiniai faktai**

Apskaičiuojant TEQ koncentracijos vertes, atskirų medžiagų koncentracijos konkrečiame mėginyje vertės dauginamos iš jų atitinkamo toksiškumo ekvivalento koeficiento (TEF) (žr. I skyriaus 1 išnašą), gautos sandaugos sudedamos ir gaunama suminė dioksinų tipo junginių koncentracija, išreikšta TEQ.

Šioje B dalyje priimtina specifinė atskiro gimininго junginio kiekybinio nustatymo riba – mažiausioji analitės koncentracija, kuri gali būti statistiškai patikimai išmatuota pagal nustatymo kriterijus, aprašytus tarptautiniu mastu pripažintuose standartuose, pvz., standarte EN 16215:2012 „Pašarai. Dioksinų ir dioksinų tipo polichlorbifenilų (PCB) bei polichlorbifenilų indikatorių nustatymas, taikant dujų chromatografiją ir didelės skyros masių spektrometriją (GC-HRMS)“ ir (arba) EPA 1613 ir 1668 metoduose (nauja redakcija).

Atskiro gimininго junginio kiekybinio nustatymo riba gali būti nustatoma kaip:

a) mėginio ekstrakto analitės koncentracija, kuriai esant gaunamas prietaiso atsakas dviem skirtingiems kontroliuojamiems jonams, kai mažesnio intensyvumo neapdorotų duomenų signalo S/T (signalo ir triukšmo) santykis yra 3:1, arba

b) jeigu dėl techninių priežasčių negalima gauti patikimų signalo ir triukšmo skaičiavimo rezultatų, žemiausias koncentracijos taškas kalibravimo kreivėje, kuriame gaunamas priimtinas (≤ 30 %) ir pastovus (matuojama bent analitinės mėginių serijos pradžioje ir pabaigoje) nuokrypis, palyginti su vidutiniu santykiniu atsako koeficientu, apskaičiuotu visiems taškams kalibravimo kreivėje kiekvienoje mėginių serijoje. Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) apskaičiuojama remiantis žemiausiu koncentracijos tašku, atsižvelgiant į vidinių etalonų išgavą ir mėginio kiekį.

▼M6

Taikant bioanalitinius atrankinius metodus, gauti rezultatai rodys ne gimininго junginio, o TEQ lygį ([1]), ir bus išreikšti BEQ, atsižvelgiant į tai, kad ne visi mėginio ekstrakto junginiai, prisidedantys prie bandymo atsako gavimo, gali tenkinti ar atitikti visus TEQ principo reikalavimus.

Atrankiniai ir patvirtinamieji metodai gali būti taikomi tik atliekant tam tikros matricos kontrolę, jeigu metodai yra pakankamai tikslūs, kad būtų galima patikimai nustatyti lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, arba didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

3. **Kokybės užtikrinimo reikalavimai**

3.1. Kiekvienu ėminių ėmimo ir mėginių analizės procedūros etapu turi būti imtasi priemonių kryžminei taršai išvengti.

3.2. Ėminiai saugomi ir vežami stiklinėse, aliumininėse, polipropileno arba polietileno talpose, pritaikytose taip, kad saugojimas neturėtų poveikio PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracijai ėminiuose. Iš ėminių talpyklų pašalinami popieriaus dulkių pėdsakai.

3.3. Pašaro ėminiai saugomi ir vežami taip, kad nebūtų sugadinti.

3.4. Prireikus kiekvienas laboratorinis mėginys smulkiai sumalamas ir kruopščiai išmaišomas, kad homogenizavimo procesas atitiktų visus reikalavimus (pvz., sumalamas taip, kad prasisijotų pro 1 mm sietelį). Jei drėgnis yra pernelyg didelis, prieš malant mėginiai išdžiovinami.

3.5. Patikrinama, ar reagentai, stikliniai indai ir įranga negali turėti įtakos TEQ ar BEQ pagrįstiems rezultatams.

3.6. Tuščiasis tyrimas atliekamas atliekant visą analizę, tik be mėginio.

3.7. Taikant bioanalitinius metodus, patikrinama, ar nė viename analizei naudojamame stikliniame inde ir tirpikliuose nėra junginių, galinčių sutrukdyti aptikti tikslinius junginius, patenkančius į darbinę sritį. Stikliniai indai praskalaujami naudojant tirpiklius arba kaitinami tokioje temperatūroje, kad nuo paviršiaus būtų pašalinti PCDD/F, dioksinų tipo junginių ir trukdančiųjų junginių pėdsakai.

3.8. Ekstrahuojant naudojamo mėginio kiekis yra pakankamas, kad būtų paisoma reikalavimų, susijusių su pakankamai siaura darbine sritimi, įskaitant didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygį arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių.

3.9. Specialios nagrinėjamųjų produktų mėginių ruošimo procedūros turi atitikti tarptautiniu mastu pripažintas gaires.

([1]) Bioanalitiniai metodai netaikomi į TEF sistemą įtrauktiems gimininگiems junginiams. Mėginio ekstrakte gali būti kitų struktūriškai gimininگų aktyvuoto aromatinių angliavandenilių (Ah) receptoriaus junginių, prisidedančių prie bendro atsako. Todėl bioanalitiniai rezultatai negali būti laikomi įverčiais, o greičiau mėginio TEQ lygio indikacija.

▼M6

4. **Laboratorijoms taikomi reikalavimai**

4.1. Vadovaujantis Reglamento (EB) Nr. 882/2004 nuostatomis, laboratorijos turi gauti patvirtintos institucijos, veikiančios pagal ISO vadovą 58, akreditaciją, kad būtų užtikrinta analizės kokybė. Laboratorijos turi būti akredituotos pagal standartą EN ISO/IEC 17025. Kai taikoma, turėtų būti vadovaujamasi dokumente „Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis“ nurodytais principais ([1]).

4.2. Laboratorijos atliekamų tyrimų ar bandymų kokybė turi būti įrodyta nuolat sėkmingai dalyvaujant tarplaboratoriniuose PCDD/F ir dioksinų tipo PCB atitinkamose pašarų matricose ir koncentracijos lygio nustatymo tyrimuose.

4.3. Įprastinės mėginių kontrolės tikslais atrankinius metodus taikančios laboratorijos glaudžiai bendradarbiauja su patvirtinamuosius metodus taikančiomis laboratorijomis, siekdamos užtikrinti kokybės kontrolę ir patvirtinti įtartinų mėginių analitinį rezultatą.

5. **Pagrindiniai reikalavimai, keliami dioksinų (PCDD/F) ir dioksinų tipo PCB analizei**

5.1. *Darbinės srities siaurumas ir kiekybinio nustatymo riba*

Dėl ypatingo kai kurių šių junginių toksiškumo turi būti įmanoma aptikti didesnės kaip vieno femtogramo (10^{-15} g) eilės PCDD/F kiekį. Daugumos gimininių PCB junginių kiekybinio nustatymo riba gali būti ir vieno nanogramo (10^{-9} g) eilės. Matuojant toksiškesnius dioksinų tipo PCB gimininius junginius (visų pirma pakeistuosius ne orto gimininius junginius), žemesnioji darbinės srities dalis turi atitikti žemesniąją pikogramo (10^{-12} g) eilę. Visų kitų gimininių PCB junginių kiekybinio nustatymo riba gali būti ir vieno nanogramo (10^{-9} g) eilės.

5.2. *Didelis atrankumas (specifiškumas)*

5.2.1. Reikia skirti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ir daugybę kitų kartu ekstrahuojamų ir galinčių trukdyti junginių, kurių koncentracija gali būti keliomis eilėmis didesnė nei tiriamų analičių. Taikant GC-MS metodus, būtina skirti įvairius gimininius junginius, pvz., toksiškus gimininius junginius (pvz., septyniolika 2, 3, 7, 8 padėtyse pakeistų PCDD/F ir dvylika dioksinų tipo PCB) ir kitus gimininius junginius.

5.2.2. Bioanalitiniai metodai turi būti tokie, kad juos taikant būtų įmanoma aptikti tikslinius junginius kaip PCDD/F ir (arba) dioksinų tipo PCB sumą. Mėginio gryninimo tikslas – pašalinti junginius, dėl kurių gaunami klaidingi neatitikimo nustatymo rezultatai, arba junginius, dėl kurių gali būti ribojamas atsakas ir taip gaunami klaidingi atitikimo nustatymo rezultatai.

5.3. *Didelis tikslumas (teisingumas ir glaudumas, tikroji bioanalizės išgava)*

5.3.1. Taikant GC-MS metodus, apskaičiuojamas pagrįstas tikrosios koncentracijos mėginyje įvertis. Kad būtų galima išvengti mėginio analizės rezultato atmetimo, remiantis labai nepatikimai apskaičiuotu TEQ lygiu,

([1]) „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ (http://ec.europa.eu/food/-safety/animal-feed_en), „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ (http://ec.europa.eu/food/-safety/animal-feed_en).

▼M6

būtinas didelis tikslumas. Tikslumas išreiškiamas kaip *teisingumas* (išmatuotos vidutinės analitės koncentracijos sertifikuotoje medžiagoje vertės ir analitės koncentracijos sertifikuotos vertės skirtumas, išreikštas šios vertės procentais) ir kaip *glaudumas* (RSD_R, variacijos koeficientas, kitaip santykinis standartinis nuokrypis, apskaičiuotas pagal atkuriamumo sąlygomis gautus rezultatus).

5.3.2. Taikant bioanalitinius metodus, nustatoma tikroji bioanalizės išgava. Tikroji bioanalizės išgava – BEQ lygis, apskaičiuotas remiantis TCDD arba PCB 126 kalibravimo kreive, atlikus tuščiojo mėginio pataisą, padalytas iš TEQ lygio, nustatyto patvirtinamuoju metodu. Ja stengiamasi patikslinti tokius veiksnius kaip PCDD/F ir dioksinų tipo junginių nuostoliai ekstrahavimo ir gryninimo etapais, kartu ekstrahuojami junginiai, padidinantys arba sumažinantys atsaką (agonistinis ir antagonistinis poveikis), kreivės atitikimo savybė arba TEF ir santykinio stiprumo (toliau – REP) verčių skirtumai. Tikroji bioanalizės išgava apskaičiuojama naudojant tinkamus kontrolinius mėginius su panašios struktūros gimininga is junginiais, tiriamais dominančios koncentracijos lygmeniu.

5.4. *Pagrįstumo tikrinimas didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmeniu ir bendrosios kokybės kontrolės priemonės*

5.4.1. Atlikdamos pagrįstumo tikrinimą ir įprastinę analizę, laboratorijos įrodo metodo tinkamumą didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmeniui tirti, pavyzdžiui, didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmenį padauginus iš 0,5, 1 ir 2, esant priimtinam kartotinės analizės variacijos koeficientui.

5.4.2. Turi būti taikomos vidaus kokybės kontrolės priemonės – nuolat atliekama tuščiųjų mėginių kontrolė, žymėtų etalonų įdėjimo bandymai arba kontrolinių mėginių (jei įmanoma, geriau naudoti sertifikuotą pamatinę medžiagą) analizė. Turi būti registruojamos ir tikrinamos tuščiųjų mėginių kontrolės, žymėtų etalonų įdėjimo bandymų arba kontrolinių mėginių analizės kokybės kontrolės diagramos, siekiant užtikrinti, kad analizė atitiktų tinkamumo reikalavimus.

5.5. *Kiekybinio nustatymo riba*

5.5.1. Taikant bioanalitinį atrankinį metodą, nereikalaujama būtinai apibrėžti kiekybinio nustatymo ribą, tačiau turi būti įrodyta, kad taikant šį metodą įmanoma atskirti, kuri vertė yra tuščioji, o kuri – ribinė. Turi būti nustatytas registruojamasis lygis, kad būtų galima pranešti apie mėginius, kurių atveju atsakas neviršija nustatyto BEQ lygio. Kai atsakas nesiekia darbinės srities, registruojamasis lygis turi skirtis nuo tuščiųjų mėginių bent tris kartus. Todėl jis apskaičiuojamas pagal mėginius, kurių sudėtyje yra tikslinių junginių, kurių lygis maždaug atitinka mažiausią reikalaujamą lygį, o ne pagal S/T santykį arba tuščiojo bandymo vertę.

5.5.2. Taikant patvirtinamąjį metodą, kiekybinio nustatymo riba turi būti maždaug viena penktoji didžiausios leidžiamosios koncentracijos.

5.6. *Analizės kriterijai*

Siekiant gauti patikimus rezultatus, kai taikomi patvirtinamieji ar atrankiniai metodai, TEQ arba BEQ vertė didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu turi atitikti toliau nurodytus kriterijus, nesvarbu, ar ji apskaičiuojama kaip bendra PCDD/F ir dioksinų tipo PCB TEQ arba BEQ vertė (kaip PCDD/F ir dioksinų tipo PCB suma), ar kaip atskiros jų vertės.

▼M6

	Atranka, taikant bioanalitinius arba fizikinius ir cheminius metodus	Patvirtinamieji metodai
Klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis ([1])	< 5 %	
Teisingumas		nuo – 20 % iki + 20 %
Pakartojamumas (RSD_r)	< 20 %	
Tarpinis glaudumas (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

([1]) Nustatant didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

5.7. *Atrankiniams metodams taikomi specialieji reikalavimai*

5.7.1. Atrankos tikslais galima taikyti ir GC-MS, ir bioanalitinius metodus. Taikant GC-MS metodus, turi būti paisoma 6 punkto reikalavimų. Bioanalitiniams ląstelių metodams taikomi 7 punkte nustatyti specialieji reikalavimai.

5.7.2. Įprastinės mėginių kontrolės tikslais atrankinius metodus taikančios laboratorijos glaudžiai bendradarbiauja su patvirtinamuosius metodus taikančiomis laboratorijomis.

5.7.3. Atliekant įprastinę analizę, būtina patikrinti atrankinio metodo tinkamumą; tai daroma taikant analizės kokybės kontrolę ir nuolat tikrinant metodo pagrįstumą. Vykdoma tęstinė reikalavimus atitinkančių rezultatų kontrolės programa.

5.7.4. Galimo ląstelių atsako slopinimo ir citoksiškumo tikrinimas

20 % mėginio ekstraktų matuojama atliekant įprastinę atranką pridėjus didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, 2, 3, 7, 8 eilės TCDD arba jų nepridėjus, siekiant patikrinti, ar atsaką gali slopinti mėginio ekstrakte esančios jam galinčios trukdyti medžiagos. Išmatuota įdėtosios analitės koncentracija palyginama su nežymėto ekstrakto koncentracijos ir žymėtų etalonų koncentracijos suma. Jeigu ši išmatuota koncentracija yra daugiau kaip 25 % mažesnė nei apskaičiuota (suminė) koncentracija, tai reiškia galimą signalo slopinimą ir kad turi būti atlikta atitinkamo mėginio patvirtinamoji analizė, taikant GC-HRMS. Rezultatai registruojami ir stebimi naudojant kokybės kontrolės diagramas.

5.7.5. Reikalavimus atitinkančių mėginių kokybės kontrolė

Priklausomai nuo mėginių matricos ir laboratorijos patirties, taikant GC/HRMS, patikrinama maždaug 2–10 % reikalavimus atitinkančių mėginių.

5.7.6. Klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies nustatymas pagal kokybės kontrolės duomenis

Atlikus mėginių atrankinį tyrimą, nustatoma didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijanti arba jų neviršijanti klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis. Faktinė klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis turi būti mažesnė kaip 5 % Kai po reikalavimus atitinkančių mėginių kokybės kontrolės gaunama mažiausiai 20 patvirtintų kiekvienos matricos (matricos grupės) rezultatų,

▼M6

išvados dėl klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies daromos iš šių duomenų. Žiedinės reakcijos tyrimo arba atsitiktinės taršos metu tirtų mėginių, kurių koncentracija yra, pvz., iki dviejų kartų didesnė nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, rezultatai taip pat gali būti įtraukti tarp tų mažiausiai 20 rezultatų, kuriais remiantis vertinama klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis. Mėginiai imami taip, kad būtų atsižvelgta į dažniausiai pasitaikančias gimininguų junginių struktūras ir šaltinių įvairovę.

Nors atliekant atrankinius tyrimus reikėtų siekti nustatyti mėginius, viršijančius lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies nustatymo kriterijumi laikoma didžiausia leidžiamoji koncentracija, atsižvelgiant į patvirtinamojo metodo išplėstąją matavimo neapibrėžtį.

5.7.7. Po atrankinio tyrimo mėginiai, kurie gali neatitikti reikalavimų, turi būti visuomet tikrinami atliekant išsamią pakartotinę pirminio mėginio analizę patvirtinamuoju analizės metodu. Šiuos mėginius galima naudoti ir tada, kai vertinama klaidingų neatitikimo nustatymo rezultatų dalis. Taikant atrankinius metodus, klaidingų neatitikimo nustatymo rezultatų dalis – tie rezultatai, kurių atitiktis reikalavimams patvirtinama patvirtinamosios analizės būdu, nors ankstesnės atrankos metu ir nustatyta, kad mėginys gali neatitikti reikalavimų. Atrankinio metodo naudingumo vertinimas grindžiamas reikalavimų neatitinkančių klaidingų mėginių ir bendro patikrintų mėginių skaičiaus palyginimu. Minėta dalis turi būti pakankamai maža, kad atrankinis metodas pasiteisintų.

5.7.8. Tikrinant pagrįstumą, kai taikomi bioanalitiniai metodai, turi būti įmanoma gauti pagrįstą TEQ lygį, apskaičiuotą ir išreikštą BEQ.

Taip pat ir tuo atveju, kai bioanalitiniai metodai taikomi pakartojamumo sąlygomis, RSD_r vienoje laboratorijoje paprastai bus mažesnis nei atkuriamumo sąlygomis (RSD_R).

6. **GC-MS metodams taikomi specialieji reikalavimai, kurių būtina laikytis atliekant atranką arba patvirtinimo tikslais**

6.1. *Priimtinas PSO-TEQ rezultatų viršutinės ir žemutinės ribinės koncentracijos skirtumas*

Siekiant patvirtinti, kad viršyta didžiausia leidžiamoji koncentracija arba prireikus lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršutinės ir žemutinės ribinės koncentracijos skirtumas turi neviršyti 20 %.

6.2. *Išgavos kontrolė*

6.2.1. Siekiant patikrinti analizės pagrįstumą, prieš pat taikant analizės metodą, pvz., prieš ekstrahavimą, pridedama 2, 3, 7, 8 pozicijose chlorintų PCDD/F vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais ir dioksinų tipo PCB vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais. Pridedama bent po vieną gimininginį junginį, skirtą kiekvienai homologinei eilei nuo tetrachlorintų iki oktachlorintų PCDD/F ir bent po vieną gimininginį junginį, skirtą kiekvienai dioksinų tipo PCB homologinei eilei (arba bent po vieną gimininginį junginį, skirtą kiekvieno jono, atrinkto taikant masių spektrometriją, registravimo funkcijai atlikti, kad būtų galima stebėti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB). Taikant patvirtinamuosius metodus, naudojami visi 17 2, 3, 7, 8 padėtyse pakeistų PCDD/F vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais ir visi 12 dioksinų tipo PCB vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais.

▼M6

6.2.2. Taip pat nustatomi santykiniai atsako koeficientai, taikomi tiems giminingiems junginiams, kurių atveju į atitinkamus kalibravimo tirpalus nepridėta jokių žymėtų ^{13}C analogų.

6.2.3. Jeigu augalinių ir gyvūninių pašarų sudėtyje yra mažiau kaip 10 % riebalų, vidinius etalonus būtina įdėti prieš ekstrahavimą. Jeigu gyvūninių pašarų sudėtyje yra daugiau kaip 10 % riebalų, vidiniai etalonai įdedami prieš ekstrahuojant riebalus arba po to. Atliekamas atitinkamas ekstrahavimo efektyvumo pagrįstumo tikrinimas, atsižvelgiant į tai, kuriuo etapu buvo įdėta vidinių etalonų.

6.2.4. Prieš GC-MS analizę įdedamas vienas arba du (pakaitiniai) išgavos etalonai.

6.2.5. Būtina atlikti išgavos kontrolę. Taikant patvirtinamuosius metodus, atskirų vidinių etalonų išgavos vertės turi būti nuo 60 iki 120 % Mažesnės ar didesnės atskirų giminingų junginių išgavos vertės, ypač kai kurių heptachlorintų ir oktachlorintų dibenzo-p-dioksinų ir dibenzofuranų, priimtinos su sąlyga, kad jų indėlis į TEQ vertę yra ne didesnis kaip 10 % suminės TEQ vertės (remiantis PCDD/F ir dioksinų tipo PCB suma). Taikant GC-MS atrankinius metodus, išgavos vertės turi būti nuo 30 iki 140 %

6.3. *Trukdančiųjų medžiagų pašalinimas*

— PCDD/F nuo trukdančiųjų chlorintų junginių, tokių kaip ne dioksinų tipo PCB ir chlorinti difenileteriai, atskiriami taikant tinkamus chromatografijos metodus (pageidautina naudoti florisilio, aliuminio oksido ir (arba) anglies kolonėlę).

— Izomerų atskyrimas, taikant dujų chromatografiją, turi būti < 25 % nuo 1,2,3,4,7,8-HxCDF smailės iki 1,2,3,6,7,8-HxCDF smailės.

6.4. *Kalibravimas standartine kreive*

Kalibravimo kreivės intervalas turi atitikti atitinkamą didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, intervalą.

6.5. *Specialieji patvirtinamųjų metodų kriterijai*

— Taikant GC-HRMS

Atliekant HRMS skyra paprastai turi būti ne mažesnė nei 10 000 visame masės intervale esant 10 % įdubai.

Atitiktis kitiems nustatymo ir patvirtinimo kriterijams, aprašytiems tarptautiniu mastu pripažintuose standartuose, pvz., standarte EN 16215:2012 „Pašarai. Dioksinų ir dioksinų tipo polichlorbifenilų (PCB) bei polichlorbifenilų indikatorių nustatymas, taikant dujų chromatografiją ir didelės skyros masių spektrometriją (GC-HRMS)“ ir (arba) EPA 1613 ir 1668 metoduose (nauja redakcija).

— Taikant GC-MS/MS

Turi būti stebimi bent 2 konkretūs pradiniai jonai, kiekvienas su vienu konkrečiu atitinkamu tarpiniu antriniu jonu visose paženklintose ir nepaženklintose analitėse analizės taikymo srityje.

Didžiausias leidžiamas ± 15 % dydžio santykinio jonų intensyvumo nuokrypis, taikomas pasirinktiems tarpiniams antriniams jonams, palyginti su apskaičiuotomis arba išmatuotomis vertėmis (etalonų kalibravimo vidurkis) taikant vienodas MS/MS sąlygas, ypač susidūrimo energiją ir susidūrimo dujų slėgį, kiekvienam analitės pereinamajam etapui.

▼M6

Kiekvieno kvadrupolio skyra turi būti lygi ar didesnė nei vieneto masės skyra (vieneto masės skyra – pakankama skyra, kad dvi smailės būtų atskirtos per vieną masės vienetą), siekiant kuo labiau sumažinti galimus trukdžius tiriamose analitėse.

Atitiktis kitiems kriterijams, aprašytiems tarptautiniu mastu pripažintuose standartuose, pvz., standarte EN 16215:2012 „Pašarai. Dioksinų ir dioksinų tipo polichlorbifenilų (PCB) bei polichlorbifenilų indikatorių nustatymas, taikant dujų chromatografiją ir didelės skyros masių spektrometriją (GC-HRMS)“ ir (arba) EPA 1613 ir 1668 metoduose (nauja redakcija), išskyrus reikalavimą taikyti GC-HRMS.

7. **Specialieji bioanalitinių metodų reikalavimai**

Bioanalitiniai metodai – biologinių principų taikymu pagrįsti metodai, pvz., ląstelių, juslių arba imuniniai tyrimai. Šiame 7 punkte nustatomi bendrieji reikalavimai, taikomi bioanalitiniams metodams.

Taikant atrankinį metodą, iš esmės pripažįstama, kad mėginys atitinka reikalavimus arba kad jo atitiktis kelia įtarimų. Šiuo tikslu apskaičiuotas BEQ lygis palyginamas su ribine verte (žr. 7.3 punktą). Ribinės vertės nesiekiantys mėginiai pripažįstami atitinkančiais reikalavimus, o ją siekiančių arba viršijančių mėginių atitiktis pripažįstama keliančia įtarimų, todėl juos būtina ištirti taikant patvirtinamąjį metodą. Praktikoje BEQ lygis, atitinkantis du trečdalius didžiausios leidžiamosios koncentracijos, gali būti naudojamas kaip ribinė vertė, jeigu klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis yra mažesnė nei 5 % ir užtikrinama priimtina klaidingų neatitikimo nustatymo rezultatų dalis. PCDD/F ir PCDD/F bei dioksinų tipo PCB sumai nustačius skirtingą didžiausią leidžiamąją koncentraciją ir tikrinant mėginių atitiktį be frakcionavimo, būtina nustatyti atitinkamas ribines bioanalizės vertes, taikomas PCDD/F. Tikrinant mėginius, viršijančius lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, ribine verte gali būti laikoma atitinkama to lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, procentinė dalis.

Jei orientacinė koncentracija išreikšta BEQ, rezultatai pateikiami kai mėginiai patenka į darbinės srities dalį ir viršija registruojamąjį lygį (žr. 7.1.1 ir 7.1.6 punktus).

7.1. *Bandymo atsako vertinimas*

7.1.1. Bendrieji reikalavimai

— Kai koncentracija apskaičiuojama pagal TCDD kalibravimo kreivę, bus pastebimas didelis skirtumas tarp viršutinėje kreivės dalyje nurodytų koncentracijos verčių (didelis pokyčio koeficientas). Darbinė sritis – dalis, kurioje tas pokytis yra mažesnis nei 15 % Žemutinė darbinės srities dalis (registruojamasis lygis) padidinama bent tris kartus ir nustatoma virš procedūrinių tuščiųjų mėginių. Viršutinė darbinės srities dalis paprastai išreiškiama EC_{70} verte (70 % didžiausios efektyviosios koncentracijos), tačiau ji yra žemesnė, jeigu šioje srityje pokytis yra didesnis kaip 15 % Darbinė sritis nustatoma tikrinant pagrįstumą. Ribinės vertės (žr. 7.3 punktą) turi neabejotinai būti darbinės srities ribose.

— Lygiagrečiai triskart arba bent dukart tiriami standartiniai tirpalai ir mėginių ekstraktai. Atliekant lygiagrečiuosius tyrimus, standartinio tirpalo arba kontrolinio ekstrakto tyrimas atliekamas 4–6 plokštelės akutėse, o atsakas arba koncentracija gaunami, kai pokyčio koeficientas yra mažesnis nei 15 % (įmanoma tik darbinės srities ribose).

▼M6

7.1.2. Kalibravimas

7.1.2.1. Kalibravimas standartine kreive

— Koncentracija mėginiuose įvertinama lyginant bandymo atsaką ir TCDD (arba PCB 126 ar standartinio PCDD/PCDF ir dioksinų tipo PCB mišinio) kalibravimo kreivę, siekiant apskaičiuoti BEQ lygį ekstrakte, o vėliau ir mėginyje.

— Kalibravimo kreivės turi būti sudarytos iš 8–12 koncentracijos verčių (sugrupuotų bent po dvi), kad jų netrūktų žemutinėje kreivės dalyje (darbinėje srityje). Ypač atkreipiamas dėmesys į tai, kad kreivė atitiktų darbinę sritį. Pati R^2 vertė neturi jokios arba beveik jokios reikšmės vertinant kreivių atitikimo savybę nelinijinės regresijos būdu. Geresnis kreivių atitikimas pasiekiamas minimaliai sumažinus skirtumą tarp apskaičiuoto ir išmatuoto lygių kreivės darbinėje srityje, pvz., kuo labiau sumažinus kvadratu pakeltų liekanų sumą.

— Vėliau apskaičiuotoji koncentracija mėginio ekstrakte patikslinama atsižvelgiant į BEQ lygį, apskaičiuotą pagal matricą arba tuščiąjį tirpiklio mėginį (siekiant atsižvelgti į naudojamų tirpiklių ir cheminių medžiagų priemaišas) ir tikrąją išgavą (apskaičiuotą pagal BEQ lygį tinkamuose kontroliniuose mėginiuose su panašios struktūros giminingais junginiais, tiriamais didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu arba lygiu, kurį pasiekus imamasi priemonių). Norint patikslinti išgavą, tikroji išgava turi neviršyti reikiamo intervalo (žr. 7.1.4 punktą). Tikslinant išgavą naudojami kontroliniai mėginiai turi atitikti 7.2 punkte nustatytus reikalavimus.

7.1.2.2. Kalibravimas naudojant kontrolinius mėginius

Kaip alternatyva gali būti naudojama kalibravimo kreivė, parengta bent iš keturių kontrolinių mėginių (žr. 7.2.4 punktą): viena tuščioji matrica ir trys kontroliniai mėginiai, didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu arba lygiu, kurį pasiekus imamasi priemonių, padauginti iš 0,5, 1 ir 2, kurios nereikėtų tikslinti pagal tuščiąją vertę ir išgavą, jei kontrolinių mėginių matricos savybės atitinka nežinomų mėginių matricos savybes. Šiuo atveju du trečdalius didžiausios leidžiamosios koncentracijos atitinkantis bandymo atsakas (žr. 7.3 punktą) gali būti apskaičiuotas tiesiogiai pagal šiuos mėginius ir naudojamas kaip ribinė vertė. Tikrinant mėginius, viršijančius lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, ribine verte gali būti laikoma to lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, procentinė dalis.

7.1.3. Atskiras PCDD/F ir dioksinų tipo PCB nustatymas

Ekstraktai gali būti dalijami į frakcijas, kurių sudėtyje yra PCDD/F ir dioksinų tipo PCB, kad būtų galima atskirai nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB TEQ lygius (išreikštus BEQ). Frakcijos, kurios sudėtyje yra dioksinų tipo PCB, rezultatams įvertinti geriausia naudoti standartinę PCB 126 kalibravimo kreivę.

7.1.4. Tikrosios bioanalizės išgavos vertės

Tikroji bioanalizės išgava apskaičiuojama analizuojant tinkamus kontrolinius mėginius su panašios struktūros giminingais junginiais, tiriamais didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu arba lygiu, kurį pasiekus imamasi priemonių, ir kurie, palyginti su TEQ lygiu, yra išreikšti kaip BEQ lygio procentinis dydis. Priklausomai nuo taikomos analizės tipo ir TEF ([1]), dėl TEF ir REP koeficientų, taikomų dioksinų tipo PCB, tikrosios dioksinų tipo PCB išgavos vertės, palyginti su PCDD/F, gali būti mažesnės. Dėl to, kai PCDD/F ir dioksinų tipo PCB yra nustatomi

([1]) Dabartiniai reikalavimai grindžiami TEF sistema, paskelbta leidinyje *Toxicol Sci* (M. Van den Berg *et al*, 93 (2), 223–241 (2006)).

▼**M6**

atskirai, tikrosios bioanalizės išgavos vertės turi būti tokios: dioksinų tipo PCB – nuo 20 iki 60 %, PCDD/F – nuo 50 iki 130 % (intervalai, taikomi TCDD kalibravimo kreivei). Dioksinų tipo PCB indėlis į PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumą skirtingose matricose ir mėginiuose skiriasi, tad tuos intervalus atitinka PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos tikrosios bioanalizės išgavos vertės, kurios turi būti nuo 30 iki 130 % Jeigu Sąjungos teisės aktuose būtų iš esmės keičiamos PCDD/F ir dioksinų tipo PCB TEF vertės, šiuos intervalus taip pat reiktų peržiūrėti.

7.1.5. Išgavos verčių kontrolė gryninant

Tikrinant pagrįstumą patikrinama, ar gryninant nesumažėjo junginių. Turi būti išgrynintas (kai n yra bent 3) tuščiasis mėginys, į kurį įdėta įvairių gimingų junginių mišinio, ir, taikant patvirtinamąjį metodą, turi būti patikrinta išgava ir kintamumas. Išgava turi būti nuo 60 iki 120 %, visų pirma tų gimingų junginių, kurių indėlis į TEQ lygį įvairiuose mišiniuose viršija 10 %

7.1.6. Registruojamasis lygis

Kai registruojami BEQ lygiai, registruojamasis lygis nustatomas pagal atitinkamų matricų mėginius, kuriuose yra tipiškos struktūros gimingų junginių, o ne pagal etalonų kalibravimo kreivę, kadangi žemutinėje jos intervalo dalyje trūksta duomenų glaudumo. Atsižvelgiama į ekstrahavimo ir gryninimo poveikį. Registruojamasis lygis padidinamas bent tris kartus ir nustatomas virš procedūrinių tuščiųjų mėginių.

7.2. *Kontrolinių mėginių naudojimas*

7.2.1. Kontroliniai mėginiai išreiškia į didžiausios leidžiamosios koncentracijos ar lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, intervalą patenkančių PCDD/F ir dioksinų tipo PCB mėginių matricą, gimingų junginių struktūrą ir koncentracijos verčių intervalus.

7.2.2. Į kiekvieną bandymų eilę įtraukiama didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmeniu ar lygiu, kurį pasiekus imamasi priemonių, tiriama tuščioji matrica arba, jei neįmanoma, procedūrinis tuščiasis mėginys ir kontrolinis mėginys. Šie mėginiai ekstrahuojami ir tiriami tuo pat metu tapačiomis sąlygomis. Naudojant kontrolinį mėginį, palyginti su tuščiuoju mėginiu, turi būti gautas akivaizdžiai aukštesnės vertės atsakas, taip užtikrinant bandymo tinkamumą. Šiuos mėginius galima naudoti tuščiosios vertės ir išgavos tikslinimo tikslais.

7.2.3. Išgavos tikslinimo tikslais atrinkti kontroliniai mėginiai turi atitikti bandomuosius mėginius, t. y. koncentracija neturi būti nepakankamai įvertinta dėl gimingų junginių struktūros.

7.2.4. Gali būti papildomai įtraukta iš 0,5 ir 2 padaugintų didžiausios leidžiamosios koncentracijos ar lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, kontrolinių mėginių, siekiant įrodyti, kad tiriamos koncentracijos verčių bandymas tinka didžiausiai leidžiamajai koncentracijai ar lygiui, kurį pasiekus imamasi priemonių, kontroliuoti. Šie mėginiai gali būti kartu naudojami apskaičiuojant BEQ lygį bandomuosiuose mėginiuose (žr. 7.1.2.2 punktą).

▼M6

7.3. *Ribinių verčių nustatymas*

Turi būti nustatomas BEQ išreikštų bioanalizės rezultatų ir TEQ išreikštų rezultatų, gautų taikant patvirtinamąjį metodą, ryšys, pavyzdžiui, atliekant kalibravimo matricomis bandymus, naudojant žymėtus kontrolinius mėginius, kurių didžiausia leidžiamoji koncentracija padauginama iš 0, 0,5, 1 ir 2 ir kiekvienu lygiu atliekant šešis pakartojimus (n = 24). Remiantis šiuo ryšiu galima įvertinti korekcijos koeficientus (tuščiąją vertę ir išgavą), tačiau jie turi būti patikrinti vadovaujantis 7.2.2 punktu.

Ribinės vertės nustatomos priimant sprendimus dėl mėginių atitikties didžiausiai leidžiamajai koncentracijai arba kontroliuojant lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, jei taikytina, atitinkamą didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, nustatant arba atskirai PCDD/F ir dioksinų tipo PCB, arba PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumai. Jos atitinka *žemutinę* bioanalitinių rezultatų pasiskirstymo dalį (patikslinus pagal tuščiąją vertę ir išgavą), atitinkančią patvirtinamojo metodo sprendimo ribą, remiantis 95 % pasikliovimo lygiu, kai klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis yra mažesnė nei 5 % ir RSD_R yra mažesnis nei 25 % Patvirtinamojo metodo sprendimo riba reiškia didžiausią leidžiamąją koncentraciją, atsižvelgiant į išplėstąją matavimo neapibrėžtį.

Ribinė vertė (išreikšta BEQ) gali būti apskaičiuota remiantis vienu iš 7.3.1, 7.3.2 ir 7.3.3 punktuose nustatytų būdų (žr. 1 pav.).

7.3.1. *Žemutinės* 95 % prognozavimo intervalo srities taikymas patvirtinamojo metodo sprendimo ribai

$$\text{Ribinė vertė} = BEQ_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2}\sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2/Q_{xx}}$$

čia:

BEQ_{DL} — BEQ, atitinkantis patvirtinamojo metodo sprendimo ribą, t. y. didžiausią leidžiamąją koncentraciją, atsižvelgiant į išplėstąją matavimo neapibrėžtį;

$s_{y,x}$ — liekamasis standartinis nuokrypis;

$t_{\alpha,f = m - 2}$ — Stjudento faktorius (α = 5 %, f = laisvės laipsniai, vienpusiai);

m — bendras kalibravimo taškų skaičius (j indeksas);

n — pakartojimų kiekvienu lygiu skaičius;

x_i — mėginio koncentracija (išreikšta TEQ) i kalibravimo taške, nustatyta patvirtinamuoju metodu;

$\bar{x}$ — visų kalibruotų mėginių koncentracijos verčių (išreikštų TEQ) vidurkis;

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^{m}(x_i - \bar{x})^2$ kvadratinė suminė vertė, i = i kalibravimo taško indeksas.

7.3.2. Apskaičiavimas pagal bioanalitinius mėginių, užterštų ties patvirtinamojo metodo sprendimo riba, atitinkančia *žemutinį* galinį duomenų pasiskirstymo atitinkamoje vidutinėje BEQ vertėje tašką, daugkartinės analizės (n≥ 6) rezultatus (patikslintus pagal tuščiąją vertę ir išgavą):

$$\text{Ribinė vertė} = BEQ_{DL} - 1{,}64 \times SD_R$$

čia:

SD_R — bioanalizės rezultatų standartinis nuokrypis BEQ_{DL} taške, išmatuotas atkuriamumo vienoje laboratorijoje sąlygomis.

▼**M6**

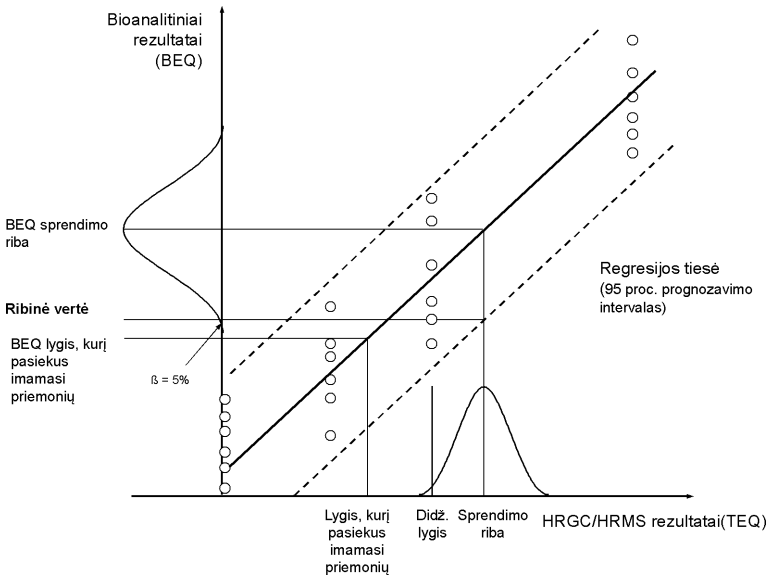
7.3.3. Mėginių, užterštų esant dviem trečdaliams didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, daugkartinės analizės ($n \geq 6$) bioanalitinių rezultatų (išreikštų BEQ ir patikslintų pagal tuščiąją vertę ir išgavą), kaip vidutinės vertės, apskaičiavimas, atsižvelgiant į pastabą, kad minėta koncentracija apytikriai atitiks pagal 7.3.1 arba 7.3.2 punktą nustatytą ribinę vertę:

Ribinių verčių apskaičiavimas, remiantis 95 % pasikliovimo lygiu, darant prielaidą, kad klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis yra mažesnė nei 5 %, o RSD_R yra mažesnis nei 25 %:

1. remiantis *žemutine* 95 % prognozavimo intervalo sritimi ties patvirtinamojo metodo sprendimo riba;

2. remiantis mėginių, užterštų ties patvirtinamojo metodo sprendimo riba, atitinkančia *žemutinį* galinį duomenų pasiskirstymo (paveiksle atvaizduota išlenkta kreive) atitinkamoje vidutinėje BEQ vertėje tašką, daugkartine analize ($n \geq 6$).

1 paveikslas



7.3.4. Ribinėms vertėms taikomi apribojimai

Pagal RSD_R, gautą tikrinant pagrįstumą ir naudojant ribotą skaičių mėginių, kurių matricos ir (arba) gimininguų junginių struktūros skiriasi, apskaičiuotos BEQ pagrįstos ribinės vertės gali būti didesnės nei TEQ pagrįsta didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių, atsižvelgiant į didesnį glaudumą, skirtingai nei įprastinėmis sąlygomis, kai reikia kontroliuoti nežinomą galimų giminingų junginių struktūrų spektrą. Tokiais atvejais ribinės vertės apskaičiuojamos pagal $RSD_R = 25$ %, arba pasirenkama dvi trečiosios didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių.

7.4. *Tinkamumo charakteristikos*

7.4.1. Kadangi taikant bioanalitinius metodus negalima naudoti vidinių etalonų, turi būti atliekami bioanalitinių metodų pakartojamumo tyrimai, siekiant gauti informacijos apie standartinį nuokrypį per tos pačios eilės tyrimus ir tarp skirtingų eilių tyrimų. Pakartojamumas turi būti mažesnis nei 20 %, atkuriamumas vienoje laboratorijoje – mažesnis nei 25 %. Tai grindžiama apskaičiuota koncentracija, išreikšta BEQ ir patikslinta pagal tuščiąją vertę ir išgavą.

▼M6

7.4.2. Tikrinant pagrįstumą, įrodoma, kad bandymo galimybės leidžia atskirti tuščiąjį mėginį nuo ribinę vertę atitinkančios koncentracijos ir taip identifikuoti mėginius, viršijančius atitinkamą ribinę vertę (žr. 7.1.2 punktą).

7.4.3. Turi būti nustatyti tiksliniai junginiai, galimi trukdžiai ir didžiausia toleruotina tuščiojo mėginio koncentracija.

7.4.4. Atsako arba pagal jį, triskart nustačius mėginio ekstraktą, apskaičiuotos koncentracijos (įmanoma tik darbinės srities ribose) standartinio nuokrypio dydis negali viršyti 15 %.

7.4.5. Atliekant bioanalitinio metodo efektyvumo per pastovų laiką vertinimą, naudojami nepatikslinti kontrolinio (-ių) mėginio (-ių) rezultatai, išreikšti BEQ (tuščiasis mėginys ir didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių).

7.4.6. Turi būti registruojamos ir tikrinamos procedūrinių tuščiųjų mėginių ir kiekvieno tipo kontrolinių mėginių kokybės kontrolės diagramos, siekiant užtikrinti, kad analitinis efektyvumas atitiktų reikalavimus, visų pirma procedūriniams tuštiesiems mėginiams nustatyto mažiausio reikalaujamo atstumo nuo žemutinės darbinės srities dalies ir kontrolinių mėginių atkuriamumo vienoje laboratorijoje. Procedūriniai tuštieji mėginiai kontroliuojami taip, kad būtų išvengta klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų, kai atliekamas atėmimo veiksmas.

7.4.7. Turi būti renkami rezultatai, gauti tiriant įtartinus mėginius ir 2–10 % reikalavimus atitinkančių mėginių (mažiausiai 20 mėginių vienai matricai) taikant patvirtinamuosius metodus; jie naudojami vertinant atrankinio metodo efektyvumą ir BEQ bei TEQ ryšį. Ši duomenų bazė gali būti naudojama atliekant pakartotinį ribinių verčių, taikomų įprastiniams mėginiams, kai naudojamos patvirtintos matricos, vertinimą.

7.4.8. Metodo tinkamumas gali būti įrodytas žiedinės reakcijos tyrimais. Mėginių žiedinės reakcijos tyrimų rezultatai, apimantys, pvz., 2 kartus didesnį koncentracijos verčių intervalą nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, gali būti įtraukti į klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies vertinimą, jeigu pavyksta įrodyti, kad laboratorija yra tinkamai kvalifikuota. Mėginiai imami taip, kad būtų atsižvelgta į dažniausiai pasitaikančias gimininguų junginių struktūras ir šaltinių įvairovę.

7.4.9. Atsitikus incidentui, ribinės vertės gali būti vertinamos pakartotinai, siekiant atsižvelgti į šio konkretaus incidento metu naudotas konkrečias matricas ir gimininguų junginių struktūras.

8. **Rezultatų ataskaita**

8.1. *Patvirtinamieji metodai*

8.1.1. Į analizės rezultatus įtraukiama atskirų PCDD/F ir dioksinų tipo PCB gimininguų junginių koncentracija, o TEQ verčių rezultatai pateikiami kaip žemutinė ribinė, viršutinė ribinė ir vidutinė ribinė koncentracija, kad rezultatų ataskaitoje būtų kuo daugiau informacijos ir juos būtų galima aiškinti laikantis specialiųjų reikalavimų.

8.1.2. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ekstrahavimą.

▼M6

8.1.3. Pateikiamos atskirų vidinių etalonų išgavos vertės, jei išgavos vertės neatitinka 6.2.5 punkte nurodyto intervalo, jei viršijama didžiausia leidžiamoji koncentracija (tokiu atveju vienos iš dviejų kartotinių analizių išgavos vertės) ir visais kitais atvejais, kai to prašoma.

8.1.4. Kadangi sprendžiant, ar mėginys atitinka reikalavimus, reikia atsižvelgti į išplėstąją matavimo neapibrėžtį, šį parametrą reikia pateikti. Todėl analizės rezultatai ataskaitoje pateikiami kaip x +/– U, čia x – analizės rezultatas, U – išplėstoji matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties koeficientą 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasikliovimo lygis. Jeigu PCDD/F ir dioksinų tipo PCB nustatomi atskirai, kaip PCDD/F ir dioksinų tipo PCB suma turi būti naudojama atskirų PCDD/F ir dioksinų tipo PCB analizės rezultatų apskaičiuotoji išplėstosios neapibrėžties suma.

8.1.5. Rezultatai išreiškiami tais pačiais vienetais ir bent tuo pačiu reikšminių skaitmenų skaičiumi, kaip Direktyva 2002/32/EB nustatyta didžiausia leidžiamoji koncentracija.

8.2. *Bioanalitiniai atrankiniai metodai*

8.2.1. Atrankos rezultatas įvardijamas kaip atitinkantis reikalavimus arba įtariamas neatitinkąs reikalavimų (įtartinas).

8.2.2. Be to, gali būti nurodyta orientacinė PCDD/F ir (arba) dioksinų tipo PCB koncentracija, išreikšta BEQ, o ne TEQ.

8.2.3. Mėginiai, kurių atsakas mažesnis nei registruojamasis lygis, nurodomi kaip nesiekiantys registruojamojo lygio. Mėginiai, kurių atsakas didesnis nei darbinė sritis, pateikiami kaip viršijantys darbinę sritį, o lygis, atitinkantis viršutinę darbinės srities dalį, išreiškiamas BEQ.

8.2.4. Dėl kiekvieno mėginio matricos tipo ataskaitoje nurodoma didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių, kuriais grindžiamas vertinimas.

8.2.5. Ataskaitoje nurodomas atlikto bandymo tipas, pagrindinis bandymo principas ir kalibravimo rūšis.

8.2.6. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ekstrahavimą.

8.2.7. Jeigu įtariama, kad mėginiai neatitinka reikalavimų, ataskaitoje turi būti nurodyta, kokių veiksmų bus imtasi. Jeigu mėginiuose yra didelė PCDD/F koncentracija ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracija, ji turi būti nustatyta (patvirtinta) patvirtinamuoju metodu.

8.2.8. Neatitikimo nustatymo rezultatai pateikiami tik pagal patvirtinamąją analizę.

8.3. *Fizikiniai ir cheminiai atrankiniai metodai*

8.3.1. Atrankos rezultatas įvardijamas kaip atitinkantis reikalavimus arba įtariamas neatitinkąs reikalavimų (įtartinas).

8.3.2. Dėl kiekvieno mėginio matricos tipo ataskaitoje nurodoma didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių, kuriais grindžiamas vertinimas.

▼M6

8.3.3. Be to, gali būti nurodoma atskirų PCDD/F ir (arba) dioksinų tipo PCB gimininių junginių koncentracija, o TEQ verčių rezultatai pateikiami kaip žemutinė ribinė, viršutinė ribinė ir vidutinė ribinė koncentracija, Rezultatai išreiškiami tais pačiais vienetais ir bent tuo pačiu reikšminių skaitmenų skaičiumi, kaip Direktyva 2002/32/EB nustatyta didžiausia leidžiamoji koncentracija.

8.3.4. Pateikiamos atskirų vidinių etalonų išgavos vertės, jei išgavos vertės neatitinka 6.2.5 punkte nurodyto intervalo, jei viršijama didžiausia leidžiamoji koncentracija (tokiu atveju vienos iš dviejų kartotinių analizių išgavos vertės) ir visais kitais atvejais, kai to prašoma.

8.3.5. Ataskaitoje nurodomas taikytas GC-MS metodas.

8.3.6. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ekstrahavimą.

8.3.7. Jeigu įtariama, kad mėginiai neatitinka reikalavimų, ataskaitoje turi būti nurodyta, kokių veiksmų bus imtasi. Jeigu mėginiuose yra didelė PCDD/F koncentracija ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracija, ji turi būti nustatyta (patvirtinta) patvirtinamuoju metodu.

8.3.8. Dėl neatitikties gali būti nusprendžiama tik atlikus patvirtinamąją analizę.

III SKYRIUS

Mėginių ruošimas ir reikalavimai, keliami analizės metodams, kurie taikomi vykdant oficialią ne dioksinų tipo PCB koncentracijos pašaruose kontrolę

1. **Taikymo sritis**

Šiame skyriuje nustatyti reikalavimai taikomi, kai pašarai tiriami vykdant oficialią ne dioksinų tipo PCB kontrolę ir atsižvelgiant į mėginių ruošimo ir analizės reikalavimus, taikomus kitais reguliavimo tikslais, įskaitant pašarų ūkio subjekto atliekamą kontrolę, kuria siekiama užtikrinti atitiktį Reglamento (EB) Nr. 183/2005 nuostatoms.

2. **Taikomi nustatymo metodai**

Dujų chromatografija su elektronų pagavos detekcija (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS arba lygiaverčiai metodai.

3. **Tiriamųjų analičių identifikavimas ir patvirtinimas**

3.1. Santykinė sulaikymo trukmė, atsižvelgiant į vidinius ar kontrolinius etalonus (priimtinasis nuokrypis yra +/– 0,25 %).

3.2. Ne dioksinų tipo PCB atskyrimas nuo trukdančiųjų medžiagų, visų pirma nuo kartu išplaunamų PCB, taikant dujų chromatografiją, ypač jeigu mėginių koncentracija neviršija teisėtų ribų ir turi būti patvirtinta neatitiktis ([1]).

3.3. GC-MS metodams taikomi reikalavimai

Turi būti stebimi bent nurodytas skaičius molekulių jonų arba molekulių klasterio būdingų jonų:

a) du konkretūs jonai, kai taikoma HRMS;

([1]) Nustatyta, kad dažnai kartu išplaunami PCB 28 ir 31, PCB 52 ir 69, taip pat PCB 138, 163 ir 164. Be to, taikant GC-MS, atsižvelgiama į galimus didesnės eilės chlorintų gimininių junginių fragmentų trukdžius.

▼M6

b) trys konkretūs jonai, kai taikoma LRMS;

c) du pradiniai jonai, kiekvienas su vienu konkrečiu atitinkamu tarpiniu antriniu jonu, kai taikoma dviguboji masių spektrometrija (MS-MS).

Didžiausios leidžiamosios nuokrypos, taikomos atrinktų masių fragmentų pertekliaus santykiams:

Santykinis pasirinktų masių fragmentų pertekliaus santykio nuokrypis nuo teorinio arba tikslinio jono (dažniausiai kontroliuojamo jono) ir identifikacinio (-ių) jono (-ų) kalibravimo etalono: ± 15 %

3.4. GC-ECD metodams taikomi reikalavimai

Didžiausią leidžiamąją koncentraciją viršijantys rezultatai patvirtinami naudojant dvi dujų chromatografijos kolonėles, kai nejudrios fazės yra skirtingo poliškumo.

4. **Metodo efektyvumo įrodymas**

Metodo efektyvumas patvirtinamas didžiausios leidžiamosios koncentracijos intervale (didžiausia leidžiamoji koncentracija, padauginta iš 0,5–2), taikant priimtiną pakartotos analizės pokyčio koeficientą (žr. 9 punkte nustatytus tarpinio glaudumo reikalavimus).

5. **Kiekybinio nustatymo riba**

Ne dioksinų tipo PCB kiekybinio nustatymo (LOQ ([1])) suma neviršija trečdalio didžiausios leidžiamosios koncentracijos ([2]).

6. **Kokybės kontrolė**

Nuolatinė tuščiųjų mėginių kontrolė, žymėtų etalonų ir kokybės kontrolės mėginių analizė, dalyvavimas atitinkamos srities tarplaboratoriniuose tyrimuose su atitinkamomis matricomis.

7. **Išgavos kontrolė**

7.1. Turi būti naudojami tinkami vidiniai etalonai, kurių fizikinės ir cheminės savybės būtų palyginamos su tiriamosiomis analitėmis.

7.2. Vidinių etalonų įdėjimas

Įdėjimas į produktus (prieš ekstrahavimą ir gryninimą).

7.3. Reikalavimai metodams, kuriuos taikant naudojami visi šeši ne dioksinų tipo PCB giminingi junginiai su žymėtais izotopais:

a) rezultatai patikslinami atsižvelgiant į vidinių etalonų išgavos vertes;

b) vidinių etalonų su žymėtais izotopais išgavos vertės turi būti nuo 60 iki 120 %;

c) mažesnės arba didesnės išgavos vertės priimtinos, jeigu atskiri giminingi junginiai sudaro mažiau nei 10 % ne dioksinų tipo PCB sumos.

7.4. Reikalavimai metodams, kuriuos taikant naudojami ne visi šeši vidiniai etalonai su žymėtais izotopais arba naudojami kiti vidiniai etalonai:

a) atliekama kiekvieno mėginio vidinio (-ių) etalono (-ų) išgavos kontrolė;

([1]) Kai taikoma, turėtų būti vadovaujamasi dokumente „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) nurodytais principais.

([2]) Primygtinai rekomenduojama, kad tuščiosios reagento vertės indėlis į teršalo lygį mėginyje būtų mažesnis. Laboratorija privalo rūpintis, kad tuščiųjų verčių pokytis būtų kontroliuojamas, ypač kai tuščiosios vertės yra atimamos.

▼M6

b) vidinio (-ių) etalono (-ų) išgavos vertės turi būti nuo 60 iki 120 %;

c) rezultatai patikslinami atsižvelgiant į vidinių etalonų išgavos vertes.

7.5. Nežymėtų gimininguų junginių išgavos vertės tikrinamos naudojant žymėtuosius arba kokybės kontrolės mėginius, kurių koncentracijos vertės patenka į didžiausios leidžiamosios koncentracijos intervalą. Šių gimininguų junginių išgavos vertės laikomos priimtinomis, jeigu jos yra nuo 60 iki 120 %.

8. **Laboratorijoms taikomi reikalavimai**

Vadovaujantis Reglamento (EB) Nr. 882/2004 nuostatomis, laboratorijos turi gauti patvirtintos institucijos, veikiančios pagal ISO vadovą 58, akreditaciją, kad būtų užtikrinta analizės kokybė. Laboratorijos turi būti akredituotos pagal standartą EN ISO/IEC 17025. Be to, kai taikoma, turėtų būti vadovaujamasi dokumente „Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCB analysis“ nurodytais principais ([1]).

9. **Tinkamumo charakteristikos. Ne dioksinų tipo PCB sumai didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu taikomi kriterijai**

	Masės spektrometrija su izotopų skleidimu ([1])	Kiti metodai
Teisingumas	nuo – 20 iki + 20 %	nuo – 30 iki + 30 %
Tarpinis glaudumas (RSD, %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Viršutinės ir žemutinės ribinių koncentracijų apskaičiavimo skirtumas	≤ 20 %	≤ 20 %

([1]) Taikomi visi šeši žymėti ^{13}C analogai, kaip reikalaujama pagal vidinius etalonus.

10. **Rezultatų ataskaita**

10.1. Į analizės rezultatus įtraukiama atskirų ne dioksinų tipo PCB koncentracija ir tų PCB gimininguų junginių suma, pateikiamos kaip žemutinė ribinė, viršutinė ribinė ir vidutinė ribinė koncentracija, kad rezultatų ataskaitoje būtų kuo daugiau informacijos ir juos būtų galima aiškinti laikantis specialiųjų reikalavimų.

10.2. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCB ekstrahavimą.

10.3. Turi būti pateiktos atskirų vidinių etalonų išgavos vertės, jei išgavos vertės neatitinka 7 punkte nurodyto intervalo, jei viršijama didžiausia leidžiamoji koncentracija ir visais kitais atvejais, kai to prašoma.

10.4. Kadangi sprendžiant, ar mėginys atitinka reikalavimus, reikia atsižvelgti į išplėstąją matavimo neapibrėžtį, šį parametrą taip pat reikia pateikti. Todėl analizės rezultatai ataskaitoje pateikiami kaip x +/– U, čia x – analizės rezultatas, U – išplėstoji matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties koeficientą 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasikliovimo lygis.

10.5. Rezultatai išreiškiami tais pačiais vienetais ir bent tuo pačiu reikšminių skaitmenų skaičiumi, kaip Direktyva 2002/32/EB nustatyta didžiausia leidžiamoji koncentracija.

([1]) Dabartiniai reikalavimai grindžiami TEF sistema, paskelbta leidinyje *Toxicol Sci* (M. Van den Berg *et al*, 93 (2), 223–241 (2006)).

▼M2

VI PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI GYVŪNINĖMS SUDEDAMOSIOMS DALIMS NUSTATYTI ATLIEKANT OFICIALIĄJĄ PAŠARŲ KONTROLĘ

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Gyvūninės sudedamosios dalys pašaruose nustatomos taikant šviesos mikroskopiją arba PGR vadovaujantis šio priedo nuostatomis.

Šie du metodai leidžia aptikti gyvūnines sudedamąsias dalis pašarinėse žaliavose ir kombinuotajame pašare. Tačiau juos taikant tokių sudedamųjų medžiagų kiekio pašarinėse žaliavose ir kombinuotajame pašare neįmanoma apskaičiuoti. Abiejų metodų aptikimo riba žemesnė nei 0,1 % (m/m).

PGR būdas leidžia nustatyti gyvūninių sudedamųjų dalių pašarinėse žaliavose ir kombinuotajame pašare taksonominę grupę.

Šie metodai taikomi atliekant Reglamento (EB) Nr. 999/2001 7 straipsnio 1 dalyje bei IV priede ir Reglamento (EB) Nr. 1069/2009 11 straipsnio 1 dalyje nustatytų draudimų taikymo kontrolę.

Atsižvelgiant į tiriamą pašarą, šie metodai gali būti naudojami atskirai arba kartu viename bendrame tyrimo protokole, vadovaujantis standartinėmis tyrimo procedūromis, nustatytomis už gyvūninių baltymų pašaruose tyrimus atsakingos ES etaloninės laboratorijos (toliau – EURL-AP laboratorija) ir paskelbtomis jos svetainėje ([1]).

2. METODAI

2.1. **Šviesos mikroskopija**

2.1.1. *Principas*

Gyvūninės sudedamosios dalys, kurių gali būti ištirti atsiųstose pašarinėse žaliavose ir kombinuotajame pašare, identifikuojamos pagal tipines mikroskopu nustatomas savybes, kaip antai raumenų skaidulos ir kitos mėsos dalys, kremzlės, kaulai, ragai, plaukai, šeriai, kraujas, plunksnos, kiaušinių lukštai, žuvų kaulai ir žvynai).

2.1.2. *Reagentai ir įranga*

2.1.2.1. Reagentai

2.1.2.1.1. Koncentravimo medžiaga

2.1.2.1.1.1. Tetrachloretilenas (lyginamasis svoris – 1,62).

2.1.2.1.2. Dažymo reagentas

2.1.2.1.2.1. Alizarino raudonojo tirpalas (2,5 ml 1 mol/l vandenilio chlorido rūgšties skiedžiama 100 ml vandens ir į šį tirpalą pridedama 200 mg alizarino raudonojo tirpalo).

2.1.2.1.3. Padengimo terpė

2.1.2.1.3.1. Šarmas (NaOH 2,5 % m/V arba KOH 2,5 % m/V).

([1]) http://eurl.craw.eu/

▼M2

2.1.2.1.3.2. Glicerolis (nepraskiestas, klampumas – 1 490 cP).

2.1.2.1.3.3. „Norland ® Optical Adhesive 65“ (klampumas – 1 200 cP) arba lygiaverčių savybių turinti derva, skirta paruošti daugkartinio naudojimo objektiniam stikleliui.

2.1.2.1.4. Padengimo terpė su dažymo savybėmis

2.1.2.1.4.1. Liugolio tirpalas (2 g kalio jodido ištirpinama 100 ml vandens ir staigiai kratant pridedama 1 g jodo).

2.1.2.1.4.2. Cistino reagentas (2 g švino acetato, 10 g NaOH/100 ml vandens).

2.1.2.1.4.3. Felingo reagentas (ruošiamas prieš naudojimą iš dviejų pradinių tirpalų (A ir B) vienodų dalių (1/1). A tirpalas: 6,9 g vario sulfato pentahidrato ištirpinama 100 ml vandens. B tirpalas: 34,6 g kalio natrio tartratas tetrahidratas ir 12 g NaOH ištirpinama 100 ml vandens).

2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidinas/vandenilio peroksidas (1 g 3,3’,5,5’ tetrametilbenzidino (toliau – TMB) ištirpinama 100 ml ledinės acto rūgšties ir 150 ml vandens. Prieš naudojimą 4 šio TMB tirpalo dalys sumaišomos su viena dalimi 3 % vandenilio peroksido).

2.1.2.1.5. Plovikliai

2.1.2.1.5.1. Etanolis ≥ 96 % (techninis grynumas).

2.1.2.1.5.2. Acetonas (techninis grynumas).

2.1.2.1.6. Balinimo reagentas

2.1.2.1.6.1. Komercinis natrio hipochlorito tirpalas (9–14 % aktyviojo chloro).

2.1.2.2. Įranga

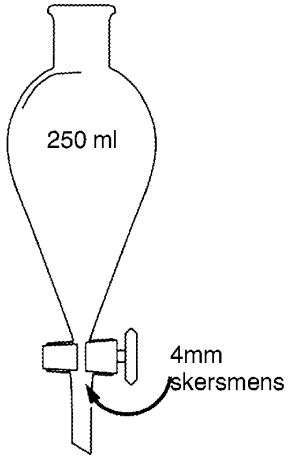
2.1.2.2.1. Analizės svarstyklės, kurių tikslumas – 0,001 g.

2.1.2.2.2. Smulkinimo įranga: malūnas arba grūstuvė.

2.1.2.2.3. Sieteliai, kurių kvadratinių akučių dydis – 0,25 mm, o plotis – 1 mm.

2.1.2.2.4. Kūgio formos 250 ml talpos stiklinis dalijamasis piltuvas su čiaupu iš teflono arba nepoliruoto stiklo kūgio apačioje. Čiaupo skersmuo turi būti ne mažesnis kaip 4 mm. Galima naudoti ir nusodinimo menzūrą kūginiu dugnu su sąlyga, kad laboratorija įrodo, jog aptikimo ribos yra lygiavertės gaunamoms kūgio formos stikliniu dalijamuoju piltuvu.

Dalijamasis piltuvas



▼M2

2.1.2.2.5. Stereomikroskopas, kurio galutinis didinimo intervalas yra ne mažesnis kaip 6,5–40 kartų.

2.1.2.2.6. Sudėtinis mikroskopas, kurio galutinis didinimo intervalas su šviesos lauko praeinamąja šviesa yra mažiausiai 100–400 kartų. Papildomai galima naudoti poliarizuotąją šviesą ir diferencinį interferencinį kontrastą.

2.1.2.2.7. Tipiniai laboratoriniai stikliniai indai

2.1.2.2.8. Objektinio stiklelio paruošimo įranga: tradiciniai mikroskopo stikleliai, tušti stikleliai, dengiamieji stikleliai (20 × 20 mm), pincetai, smulki mentelė.

2.1.3. *Mėginių ėmimas ir mėginių ruošimas*

2.1.3.1. Mėginių ėmimas

Naudojamas reprezentatyvusis mėginys, paimtas pagal I priedo nuostatas.

2.1.3.2. Būtinos atsargumo priemonės

Siekiant išvengti kryžminės laboratorinės taršos, visa daugkartinio naudojimo įranga prieš naudojimą rūpestingai nuvaloma. Prieš valymą išrenkamos dalijamojo piltuvo dalys. Dalijamojo piltuvo dalys ir stikliniai indai pirmiausia išplaunami rankomis, po to – plautuvėje. Sieteliai nuvalomi kietų šerių šepečiu. Jeigu prieš tai buvo sijojama riebi medžiaga, kaip antai žuvų miltai, pabaigoje sietelius rekomenduojama išvalyti acetonu ir suspaustu oru.

2.1.3.3. Mėginių, jei tai ne riebalai ar aliejus, paruošimas

2.1.3.3.1. Mėginių džiovinimas: prieš naudojimą mėginiai, kurių drėgnis didesnis kaip 14 %, išdžiovinami.

2.1.3.3.2. Paruošiamasis mėginių sijojimas: granuliuotą pašarą ir branduolius rekomenduojama iš anksto prasijoti pro 1 mm dydžio akutes, o dvi gautas frakcijas vėliau paruošti ir išanalizuoti kaip atskirus mėginius.

2.1.3.3.3. Mėginio dalijimas ir smulkinimas: analizės tikslais padalijama ir vėliau susmulkinama bent 50 g mėginio.

2.1.3.3.4. Nuosėdų ekstrahavimas ir paruošimas: 10 g susmulkinto pomėginio dalis (0,01 g. tikslumu) perkeliama į dalijamąjį piltuvą arba nusodinimo menzūrą kūginiu dugnu ir įpilama 50 ml tetrachloretileno. Į piltuvą perkelta dalis negali viršyti 3 g, jeigu tai yra žuvų miltai arba kiti gryni gyvūniniai produktai, mineralinės sudedamosios dalys arba premiksai, iš kurių susidaro daugiau kaip 10 % nuosėdų. Mišinys stipriai kratomas bent 30 s, tada įpilama dar bent 50 ml tetrachloretileno, kad bet kokios prie piltuvo vidaus prilipusios dalelės būtų švariai nuplautos į indo vidų. Gautas mišinys pastatomas bent 5 minutėms, tada atidaromas čiaupas ir nuosėdos atskiriamos.

Jeigu naudojama nusodinimo menzūra kūginiu dugnu, mišinys energingai maišomas bent 15 s, tada įpilama dar bent 10 ml švaraus tetrachloretileno, kad bet kokios prie menzūros sienelės prilipusios dalelės būtų švariai nuplautos į indo vidų. Mišinys pastatomas bent 3 minutėms, vėl pamaišomas 15 s, tada įpilama dar bent 10 ml švaraus tetrachloretileno, kad bet kokios prie menzūros sienelės prilipusios dalelės būtų švariai nuplautos į indo vidų Gautas mišinys pastatomas bent 5 minutėms, tada, atlikus dekantavimą, pašalinama skystoji frakcija, stengiantis neprarasti nė trupučio nuosėdų.

▼M2

Nuosėdos išdžiovinamos ir vėliau sveriamos (0,001 g tikslumu). Jeigu daugiau nei 5 % nuosėdų sudaryta iš didesnių nei 0,50 mm dalelių, jos prasijojamos pro 0,25 mm akutes, o abi gautos frakcijos ištiriamos.

2.1.3.3.5. Plūdrių ekstrahavimas ir paruošimas: po to, kai taikant nurodytąjį metodą gaunamos nuosėdos, dalijamajame piltuve turėtų likti dvi fazės: skystoji, sudaryta iš tetrachloretileno, ir kietoji, sudaryta iš plūdriųjų medžiagų. Ši kietoji fazė – tai plūdriai, kurie gaunami atidarius čiaupą ir išpylus iš piltuvo visą tetrachloretileną. Apvertus dalijamąjį piltuvą, plūdriai perkeliami į didelę Petri lėkštelę ir išdžiovinama oro traukos gaubte. Jeigu daugiau nei 5 % plūdrių sudaryta iš didesnių nei 0,50 mm dalelių, jie prasijojama pro 0,25 mm akutes, o abi gautos frakcijos ištiriamos.

2.1.3.3.6. Žaliavos paruošimas: paruošiama bent 5 g masės susmulkinto pomėginio dalis. Jeigu daugiau nei 5 % medžiagos sudaryta iš didesnių nei 0,50 mm dalelių, ji prasijojama pro 0,25 mm akutes, o abi gautos frakcijos ištiriamos.

2.1.3.4. Mėginių, kurių sudėtyje yra riebalų ar aliejaus, paruošimas

Ruošiant mėginius, kurių sudėtyje yra riebalų ar aliejaus, vadovaujamasi šiuo protokolu:

— jeigu riebalai yra kieti, jie šildomi krosnyje tol, kol suskystėja,

— pipete iš mėginio dugno į centrifugavimo mėgintuvėlį perkeliama 40 ml riebalų ar aliejaus,

— centrifuguojama 10 min. 4 000 apsukų per minutę greičiu,

— jeigu po centrifugavimo riebalai yra kieti, jie šildomi krosnyje tol, kol suskystėja,

— centrifuguojama dar kartą 5 min. 4 000 apsukų per minutę greičiu,

— analizės tikslais pusė dekantuotų priemaišų mažu šaukšteliu arba mentele perkeliama ant mikroskopo objektinių stiklelių; kaip terpę rekomenduojama naudoti glicerolį,

— likusios priemaišos naudojamos ruošiant nuosėdas, kaip aprašyta 2.1.3.3 punkte.

2.1.3.5. Dažymo reagentų naudojimas

Kai subjektas ruošia mėginius, siekdamas supaprastinti tinkamą gyvūninių sudedamųjų dalių identifikavimą, jis gali naudoti dažymo reagentus pagal EURL-AP laboratorijos išleistas ir jos svetainėje paskelbtas gaires.

Jeigu nuosėdoms nuspalvinti naudojamas alizarino raudonojo tirpalas, vadovaujamasi šiuo protokolu:

— išdžiovintos nuosėdos perkeliamos į stiklinį mėgintuvėlį ir dukart praskalaujamos maždaug 5 ml etanolio (kiekvieną sykį 30 s naudojamas sūkurinis maišytuvas, po to leidžiama tirpalui 1 min. 30 s nusistovėti ir jis išpilamas),

— nuosėdos nubalinamos pridedant ne mažiau kaip 1 ml natrio hipochlorito tirpalo. Reakcija turėtų trukti 10 min. Mėgintuvėlis pripildomas vandens, nuosėdoms leidžiama 2–3 min. nusistovėti, po to vanduo ir suspenduotosios dalelės atsargiai išpilami,

▼M2

— nuosėdos darkart kelis kartus praskalaujamos 10 ml vandens (30 s naudojamas sūkurinis maišytuvas, po to leidžiama joms nusistovėti ir kaskart išpilamas vanduo),

— pridedama 2–10 lašų alizarino raudonojo tirpalo, tada mišinys išmaišomas sūkuriniu maišytuvu. Reakcija turėtų trukti 30 s, tada nusispalvinusios nuosėdos dukart praskalaujamos maždaug 5 ml etanolio ir vieną kartą acetonu (kaskart 30 s naudojamas sūkurinis maišytuvas, po to leidžiama tirpikliui apie 1 min. nusistovėti ir jis išpilamas),

— nuspalvintos nuosėdos išdžiovinamos.

2.1.4. *Mikroskopinis tyrimas*

2.1.4.1. Objektinio stiklelio paruošimas

Mikroskopo objektiniai stikleliai ruošiami naudojant nuosėdas ir, atsižvelgiant į subjekto pasirinkimą, plūdrius arba žaliavą. Jeigu ruošiant mėginius buvo naudotas sietas, paruošiamos abi gautos frakcijos –smulkioji ir rupioji. Frakcijų dalys ant objektinių stiklelių turi būti būdingos visai frakcijai.

Siekiant įvykdyti visus 2.1.4.2 punkte nustatytus tyrimo protokolo reikalavimus, paruošiama užtektinai objektinių stiklelių.

Mikroskopo objektiniai stikleliai naudojami kartu su tinkama terpe, vadovaujantis EURL-AP laboratorijos nustatytomis ir jos svetainėje paskelbtomis standartinėmis tyrimo procedūromis. Objektiniai stikleliai uždengiami dengiamaisiais stikleliais.

2.1.4.2. Stebėjimo protokolai, leidžiantys aptikti gyvūnines sudedamąsias dalis kombinuotajame pašare ir pašarinėse žaliavose

Paruošti mikroskopo objektiniai stikleliai stebimi vadovaujantis stebėjimo protokolais, nurodytais 1 schemoje (kombinuotasis pašaras ir pašarinės žaliavos, išskyrus grynus žuvų miltus) arba 2 schemoje (gryni miltai).

Stebima pro sudėtinį mikroskopą naudojant nuosėdas ir, atsižvelgiant į subjekto pasirinkimą, plūdrius arba žaliavas. Rupiosios frakcijos gali būti tiriamos stereomikroskopu, ne tik sudėtiniu mikroskopu. Kiekvienas objektinis stiklelis iš pagrindų peržiūrimas nustatant įvairius didinimo lygius.

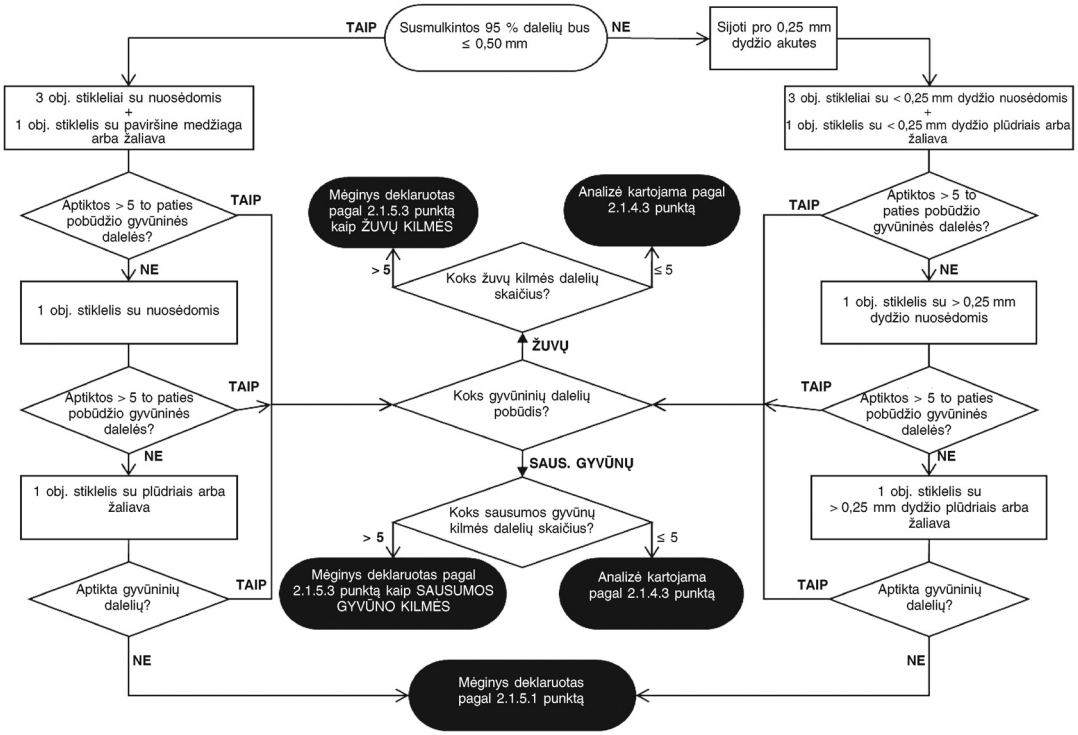
Turi būti griežtai paisoma, kiek mažiausiai objektinių stiklelių turi būti patikrinta kiekvienu stebėjimo protokole numatytu etapu, nebent visos frakcijų medžiagos nepakanka, kad būtų galima laikytis nustatyto objektinių stiklelių skaičiaus. Kaskart analizuojant stebimi ne daugiau kaip 6 objektiniai stikleliai.

Kad būtų lengviau nustatyti dalelių pobūdį ir kilmę, subjektas gali naudoti tokias paramos priemones, kaip sprendimų patvirtinimo sistemos, vaizdo rinkiniai ir etaloniniai mėginiai.

▼M2

1 schema

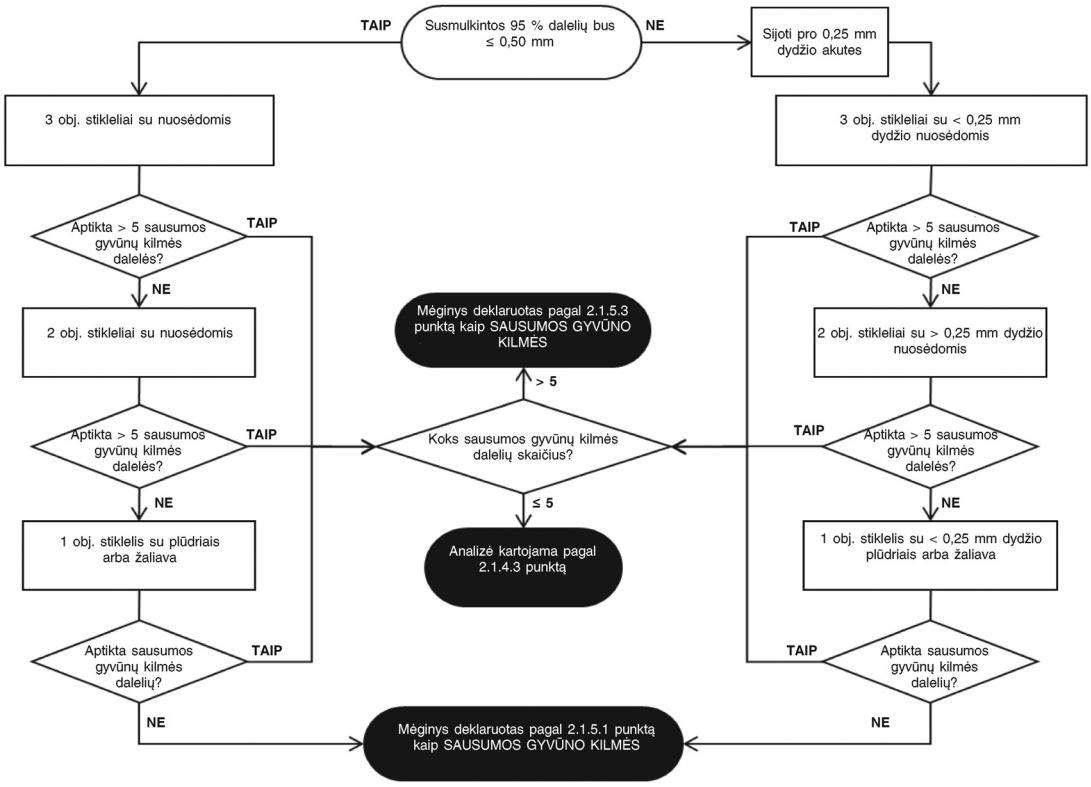
Stebėjimo protokolas, leidžiantis aptikti gyvūninės sudedamąsias dalis kombinuotajame pašare ir pašarinėse žaliavose, išskyrus žuvų miltus



▼M2

2 schema

Stebėjimo protokolas, leidžiantis aptikti gyvūninės daleles žuvų miltuose



▼**M2**

2.1.4.3. Analizių skaičius

Jeigu, atlikus pirmąją analizę atitinkamai pagal 1 schemoje arba 2 schemoje nurodytą stebėjimo protokolą, neaptinkama jokių nurodyto pobūdžio gyvūninių dalelių (t. y. sausumos gyvūno arba žuvies), papildomos analizės atlikti nebereikia, o apie pirmosios analizės rezultatus pranešama pagal 2.1.5.1 punkto nuostatas.

Jeigu, atlikus pirmąją analizę atitinkamai pagal 1 schemoje arba 2 schemoje nurodytus stebėjimo protokolus, bendras aptiktų nurodytos kilmės (t. y. sausumos gyvūno arba žuvies) gyvūninių dalelių kiekis yra nuo 1 iki 5, paimamas naujas 50 g masės pomėginys ir atliekama antroji analizė. Jeigu, atlikus antrąją analizę, aptiktų nurodyto pobūdžio gyvūninių dalelių kiekis yra nuo 0 iki 5, apie analizės rezultatus pranešama pagal 2.1.5.2 punkto nuostatas; priešingu atveju paimamas naujas 50 g masės pomėginys ir atliekama trečioji analizė. Nepaisant to, jeigu, atlikus pirmąją ir antrąją analizes, per jas aptiktų nurodyto pobūdžio dalelių suma yra didesnė nei 15, papildomos analizės atlikti nebereikia, o apie analizės rezultatus pranešama tiesiogiai pagal 2.1.5.3 punkto nuostatas. Jeigu, atlikus trečiąją analizę, per tris analizes aptiktų nurodyto pobūdžio dalelių suma yra didesnė nei 15, apie analizės rezultatus pranešama pagal 2.1.5.3 punkto nuostatas. Priešingu atveju analizės rezultatai pranešami pagal 2.1.5.2 punkto nuostatas.

Jeigu, atlikus pirmąją analizę atitinkamai pagal 1 schemoje arba 2 schemoje nurodytus stebėjimo protokolus, aptinkama daugiau kaip 5 nurodyto pobūdžio gyvūninės dalelės (t. y. sausumos gyvūno arba žuvies), apie analizės rezultatus pranešama pagal 2.1.5.3 punkto nuostatas.

2.1.5. *Rezultatų užrašymas*

Pateikdamas rezultatus laboratorija nurodo, su kokios rūšies medžiaga (nuosėdomis, plūdriai ar žaliava) buvo atliekama analizė ir kiek kartų buvo analizuojama.

Laboratorijos ataskaitoje pateikiama informacija bent apie sudedamąsias dalis, gautas iš sausumos gyvūnų ir žuvies.

Įvairi informacija gali būti pranešta toliau nurodytais būdais.

2.1.5.1. Neaptikta jokių nurodyto pobūdžio gyvūninių dalelių:

— kiek buvo įmanoma įžiūrėti šviesos mikroskopu, pateiktame mėginyje nebuvo aptikta jokių sausumos gyvūnų kilmės dalelių,

— kiek buvo įmanoma įžiūrėti šviesos mikroskopu, pateiktame mėginyje nebuvo aptikta jokių žuvų kilmės dalelių,

2.1.5.2. Vidutiniškai aptikta nuo 1 iki 5 nurodyto pobūdžio gyvūninių dalelių:

— kiek buvo įmanoma įžiūrėti šviesos mikroskopu, pateiktame mėginyje per kiekvieną analizę vidutiniškai aptikta ne daugiau kaip po penkias sausumos gyvūnų kilmės daleles. Dalelės identifikuotos kaip ... [kaulas, kremzlės, raumuo, plaukai, ragas ir kt.]. Toks nedidelis kiekis, nesiekiantis aptikimo mikroskopu ribos, reiškia, kad negalima atmesti klaidingai teigiamo rezultato prielaidos.

▼M2

Arba atitinkamai:

— kiek buvo įmanoma įžiūrėti šviesos mikroskopu, pateiktame mėginyje per kiekvieną analizę vidutiniškai aptikta ne daugiau kaip po penkias žuvų kilmės daleles. Dalelės identifikuotos kaip ... [žuvies kaulas, žuvies žvynai, kremzlės, raumuo, kaulinė vidinės ausies dalis, žiauna ir kt.]. Toks nedidelis kiekis, nesiekiantis aptikimo mikroskopu ribos, reiškia, kad negalima atmesti klaidingai teigiamo rezultato prielaidos.

Kai atliekamas paruošiamasis mėginių sijojimas, laboratorijos ataskaitoje nurodoma, kurioje frakcijoje (prasijotoje, granuliuotoje ar branduolių) buvo aptikta gyvūninių dalelių, kadangi jų aptikimas tik prasijotoje frakcijoje gali būti aplinkos užteršimo požymis.

2.1.5.3. Vidutiniškai aptiktos daugiau kaip penkios nurodyto pobūdžio gyvūninės dalelės

— kiek buvo įmanoma įžiūrėti šviesos mikroskopu, pateiktame mėginyje per kiekvieną analizę vidutiniškai aptikta daugiau kaip po penkias sausumos gyvūnų kilmės daleles. Dalelės identifikuotos kaip ... [kaulas, kremzlė, raumuo, plaukai, ragas ir kt.].

Arba atitinkamai:

— kiek buvo įmanoma įžiūrėti šviesos mikroskopu, pateiktame mėginyje per kiekvieną analizę vidutiniškai aptikta daugiau kaip po penkias žuvų kilmės daleles. Dalelės identifikuotos kaip ... [žuvies kaulas, žuvies žvynai, kremzlės, raumuo, kaulinė vidinės ausies dalis, žiauna ir kt.].

Kai atliekamas paruošiamasis mėginių sijojimas, laboratorijos ataskaitoje nurodoma, kurioje frakcijoje (prasijotoje, granuliuotoje ar branduolių) buvo aptikta gyvūninių dalelių, kadangi jų aptikimas tik prasijotoje frakcijoje gali būti aplinkos užteršimo požymis.

2.2. **PGR**

2.2.1. *Principas*

Gyvūninės deoksiribonukleorūgšties (toliau – DNR) fragmentai, kurių gali būti pašarinėse žaliavose ir kombinuotame pašare, aptinkami PGR būdu, taikant genų amplifikacijos metodą gyvūno rūšiai būdingiems DNR fragmentams.

Taikant PGR metodą, pirmiausia būtina atlikti DNR išskyrimą. Tokiu būdu gautam DNR ekstraktui vėliau taikoma amplifikacija, siekiant aptikti tikslines gyvūnų rūšis.

2.2.2. *Reagentai ir įranga*

2.2.2.1. Reagentai

2.2.2.1.1. DNR išskyrimo etapu naudojami reagentai.

Naudojami tik EURL-AP laboratorijos patvirtinti ir jos svetainėje paskelbti reagentai.

2.2.2.1.2. Atliekant genų amplifikaciją naudojami reagentai

▼M2

2.2.2.1.2.1. Pradmenys ir zondai

Naudojami tik EURL-AP laboratorijos patvirtintų sekų oligonukleotidų pradmenys ir zondai ([1]).

2.2.2.1.2.2. Reakcijų mišiniai

Naudojami tik tie reakcijų mišinių tirpalai, kuriuose nėra reagentų, kurie sudarytų galimybes gauti klaidingus rezultatus, dėl juose pačiuose esančios gyvūnų DNR ([2]).

2.2.2.1.2.3. Dezinfekavimo reagentai

2.2.2.1.2.3.1. Druskos rūgšties tirpalas (0,1 N).

2.2.2.1.2.3.2. Chlorkalkės (natrio hipochlorito tirpalas, kuriame yra 0,15 % aktyviojo chloro).

2.2.2.1.2.3.3. Korozijos neskatinantys reagentai, kuriais dezinfekuojami brangūs prietaisai, kaip antai analizės svarstyklės (pvz., „MP Biomedicals“ siūlomas „DNA Erase™“).

2.2.2.2. Įranga

2.2.2.2.1. Analizės svarstyklės, kurių tikslumas – 0,001 g.

2.2.2.2.2. Smulkinimo įranga.

2.2.2.2.3. Termocikleris, kuriuo galima atlikti PGR realiuoju laiku.

2.2.2.2.4. Mikrocentrifuga, skirta mikrocentrifuginiams mėgintuvėliams.

2.2.2.2.5. Mikropipečių, kuriomis galima įtraukti nuo 1 µl iki 1 000 µl, rinkinys.

2.2.2.2.6. Standartiniai plastikiniai indai, skirti molekulinei biologijai: mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai, plastikiniai mikropipečių antgaliai su filtrais, termociklerio plokštelės.

2.2.2.2.7. Šaldikliai, kuriuose saugomi mėginiai ir reagentai.

2.2.3. *Mėginių ėmimas ir mėginių ruošimas*

2.2.3.1. Mėginių ėmimas

Naudojamas reprezentatyvusis mėginys, paimtas pagal I priedo nuostatas.

2.2.3.2. Mėginių ruošimas

Laboratorinių mėginių paruošimas iki pat DNR išskyrimo turi atitikti II priede nustatytus reikalavimus. Analizės tikslais iš mėginio turi būti paimta bent 50 g pomėginio, kuris vėliau susmulkinamas.

Mėginys ruošiamas patalpoje, kuri nėra skirta DNR išskyrimui ir genų amplifikacijos reakcijoms, kaip aprašyta standarte ISO 24276.

Paruošiamos dvi ne mažesnės kaip 100 mg masės mėginio dalys.

2.2.4. *DNR išskyrimas*

Vadovaujantis EURL-AP laboratorijos nustatytomis ir jos svetainėje paskelbtomis standartinėmis tyrimo procedūromis atliekamas kiekvienos paruošto mėginio dalies DNR išskyrimas.

Kaip aprašyta standarte ISO 24276, paruošiami du kiekvienos mėginių imties DNR išskyrimo kontroliniai mėginiai:

— neigiamas DNR išskyrimo kontrolinis mėginys,

— teigiamas DNR išskyrimo kontrolinis mėginys.

([1]) Šių pradmenų ir zondų, skirtų kiekvienai analizuojamai gyvūnų rūšiai, sąrašas yra pateiktas EURL-AP laboratorijos svetainėje.

([2]) Tinkami „Master Mix“ tirpalų pavyzdžiai pateikti EURL-AP laboratorijos svetainėje.

▼**M2**

2.2.5. *Genų amplifikacija*

Genų amplifikacija atliekama taikant kiekvienai identifikuotinai rūšiai patvirtintus metodus. Šie metodai pateikti EURL-AP laboratorijos nustatytose ir jos svetainėje paskelbtose standartinėse tyrimo procedūrose. Kiekvienas DNR ekstraktas analizuojamas tą patį DNR ekstraktą praskiedžiant bent dviem skirtingais būdais, siekiant įvertinti inhibiciją.

Paruošiami du kiekvienos tikslinės rūšies amplifikacijos kontroliniai mėginiai, kaip aprašyta standarte ISO 24276:

— kiekvienai plokštelei arba PGR tyrimų sekai naudojamas teigiamas DNR tikslinis kontrolinis mėginys;

— kiekvienai plokštelei arba PGR bandymų sekai naudojamas amplifikacijos reagentų kontrolinis mėginys (vadinamasis neigiamas kontrolinis mėginys, angl. *no template control*).

2.2.6. *Rezultatų aiškinimas ir dėstymas*

Kai pranešami rezultatai, laboratorija nurodo bent naudotų mėginių dalių svorį, taikytą išskyrimo būdą, atliktų analizių skaičių ir metodo aptikimo ribą.

Rezultatai nebus interpretuojami ir pranešami, jeigu, analizuojant tikslinius mėginius, teigiamas DNR išskyrimo kontrolinis mėginys ir teigiamas DNR tikslinis kontrolinis mėginys neduoda teigiamų rezultatų, nors amplifikacijos reagentų kontrolės rezultatas yra neigiamas.

Jeigu, naudojant dvi mėginio dalis, gaunami nenuoseklūs rezultatai, pakartojamas bent genų amplifikacijos etapas. Jeigu laboratorija įtaria, kad nenuoseklumo priežastimi gali būti DNR ekstraktai, prieš aiškinant rezultatus atliekamas naujas DNR išskyrimas, o vėliau – genų amplifikacija.

Galiausiai rezultatas išdėstomas atsižvelgiant į dviejų vieno mėginio dalių tyrimų rezultatus, apibendrintus ir paaiškintus vadovaujantis EURL-AP laboratorijos nustatytomis ir jos svetainėje paskelbtomis standartinėmis tyrimo procedūromis.

2.2.6.1. Neigiamas rezultatas

Neigiamas rezultatas pranešamas taip:

Pateiktame mėginyje neaptikta jokios X DNR (X – analizuojama tikslinė gyvūnų rūšis arba gyvūnų rūšių grupė).

2.2.6.2. Teigiamas rezultatas

Teigiamas rezultatas pranešamas taip:

Pateiktame mėginyje aptikta X DNR (X – analizuojama tikslinė gyvūnų rūšis arba gyvūnų rūšių grupė).

▼B

VII PRIEDAS

PAUKŠČIŲ KOMBINUOTŲJŲ PAŠARŲ ENERGINĖS VERTĖS APSKAIČIAVIMO METODAS

1. **Energinės vertės apskaičiavimo metodas ir išraiška**

   Paukščių kombinuotųjų pašarų energinė vertė turi būti apskaičiuojama pagal toliau nurodytą formulę, atsižvelgiant į pašarų tam tikrų analizuojamų komponentų procentines dalis. Ši energinė vertė turi būti išreiškiama kaip medžiagų apykaitos energija (ME) megadžauliais (MJ) vienam kombinuotųjų pašarų kilogramui, darant pataisą azotui:

   ME MJ/kg = 0,1551 × % žalių baltymų kiekio + 0,3431 × % žalių riebalų + 0,1669 × % krakmolo + 0,1301 × % sacharidų kiekio (išreikšto sacharoze).

2. **Leidžiamosios nuokrypos, taikytinos nurodytoms energinėms vertėms**

   Jei oficialaus tikrinimo metu nustatoma tikrinimo rezultatų ir nurodytos energinės vertės neatitiktis (mažesnė arba didesnė pašarų energinė vertė), mažiausia ME leidžiamoji nuokrypa yra 0,4 MJ/kg.

3. **Rezultatų išraiška**

   Pritaikius anksčiau nurodytą formulę, gautas rezultatas turi būti pateikiamas vieno ženklo po kablelio tikslumu.

4. **Ėminių ėmimo ir analizės metodai**

   Apskaičiavimo metode nurodytas kombinuotųjų pašarų ėminių ėmimas ir analizuojamų komponentų kiekio nustatymas turi būti atliekamas pagal Bendrijos mėginių ėmimo metodus ir analizės metodus, taikomus atliekant kombinuotųjų pašarų oficialią kontrolę.

   Būtina taikyti:

   — nustatant žalių riebalų kiekį: III priedo H dalyje pateikto žalių aliejų ir riebalų nustatymo metodo B procedūra;

   — nustatant krakmolo kiekį: poliarimetrinį metodą, pateiktą III priedo L dalyje.

▼B

VIII PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI, TAIKOMI VYKDANT DAUGIAU NELEIDŽIAMŲ NAUDOTI PAŠARŲ PRIEDŲ NETEISĖTO BUVIMO KONTROLĘ

Svarbios pastabos

Atliekant daugiau neleidžiamų naudoti pašarų priedų neteisėto buvimo kontrolę, galima taikyti metodus, kurie būtų jautresni nei šiame priede pateikti metodai.

Šiame priede pateikti analizės metodai naudojami patvirtinimo tikslais.

A. METILBENZOKVATO NUSTATYMAS

7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-chinolonas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti metilbenzokvato koncentraciją pašaruose. Kiekybinio nustatymo riba – 1 mg/kg.

2. **Metodas**

Metilbenzokvatas ekstrahuojamas metansulfonrūgšties tirpalu metanolyje. Ekstraktas gryninamas dichlormetanu, taikant jonų mainų chromatografiją, po to vėl dichlormetanu. Metilbenzokvato kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), naudojant ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Dichlormetanas

3.2 Metanolis, HPLC grynumo

3.3 HPLC judančioji fazė

Metanolio (3.2) ir vandens (*HPLC grynumo*) mišinys 75 + 25 (V + V).

Tirpalas filtruojamas per 0,22 μm filtrą (4.5) ir degazuojamas (pvz., 10 min ultragarsu).

3.4 Metansulfonrūgšties tirpalas, c = 2 %

20,0 ml metansulfonrūgšties skiedžiama iki 1 000 ml metanoliu (3.2).

3.5 Vandenilio chlorido rūgšties tirpalas, c = 10 %

100 ml vandenilio chlorido rūgšties (ρ_{20} 1,18 g/ml) skiedžiama iki 1 000 ml vandeniu.

3.6 Katijonitinė derva Amberlite CG-120 (Na), 100 – 200 mešų

Prieš naudojimą derva apdorojama: paruošiama 100 g dervos ir 500 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.5) suspensija, kuri ant kaitlentės pakaitinama nuolat maišant iki virimo. Paliekama atvėsti, po to rūgštis nupilama. Rūgšties likutis per filtravimo popierių nusiurbiamas vakuume. Derva du kartus plaunama 500 ml vandens ir po to 250 ml metanolio (3.2). Derva plaunama dar 250 ml metanolio ir džiovinama siurbiant orą per dervos sluoksnį ant filtro. Išdžiovinta derva laikoma užkimštame butelyje.

3.7 Etaloninė medžiaga: grynas metilbenzokvatas (7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-chinolonas)

▼B

3.7.1 Metilbenzokvato pradinis etaloninis tirpalas, 500 µg/ml

0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg etaloninės medžiagos (3.7), 100 ml matavimo kolboje ištirpinama metansulfonrūgšties tirpale (3.4), skiedžiama iki žymės ir sumaišoma.

3.7.2 Metilbenzokvato tarpinis etaloninis tirpalas, 50 µg/ml

5 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.7.1) įpilama į 50 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės metanoliu (3.2) ir sumaišoma.

3.7.3 Kalibravimo tirpalai

Į keletą 25 ml matavimo kolbų įpilama 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ir 5,0 ml metilbenzokvato tarpinio etaloninio tirpalo (3.7.2). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.3) ir sumaišoma. Šių tirpalų metilbenzokvato koncentracija atitinkamai yra 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ir 10,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

4. **Aparatūra**

4.1 Laboratorinė purtyklė

4.2 Sukamasis garintuvas

4.3 Stiklinė kolonėlė (250 mm × 15 mm) su čiaupu, maždaug 200 ml talpos

4.4 HPLC įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu detektoriumi arba diodų matricos detektoriumi

4.4.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė, 300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

4.5 Membraniniai filtrai, 0,22 µm

4.6 Membraniniai filtrai, 0,45 µm

5. **Procedūra**

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1 Atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė, siekiant patikrinti, ar nėra metilbenzokvato arba trukdančiųjų medžiagų.

5.1.2 Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant metilbenzokvato, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. 15 mg/kg koncentracijai gauti į 10 g pašaro tuščiojo ėminio reikia įpilti 600 µl pradinio etaloninio tirpalo (3.7.1), sumaišyti ir prieš ekstrahavimą (5.2) palaukti 10 min (5.2).

Pastaba. Šiame metode pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neturi būti aptikta metilbenzokvato.

5.2 *Ekstrahavimas*

0,01 g tikslumu pasveriama maždaug 20 g paruošto ėminio ir supilama į 250 ml kūginę kolbą. Įpilama 100 ml metansulfonrūgšties tirpalo (3.4) ir kolba 30 min mechaniškai kratoma ant purtyklės (4.1). Tirpalas filtruojamas per filtravimo popierių, filtratas naudojamas skysčių fazėms atkirti (5.3).

5.3 *Skysčių fazių atskyrimas*

Į 500 ml talpos dalijamąjį piltuvą, kuriame yra 100 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.5), įpilama 25,0 ml pagal 5.2 punktą gauto filtrato. Į piltuvą įpilama 100 ml dichlormetano ir purtoma vieną minutę. Palaukiama sluoksnių atsiskyrimo ir apatinis (dichlormetaninis) sluoksnis išleidžiamas į apvaliadugnę 500 ml kolbą. Vandeninio sluoksnio ekstrahavimas pakartojamas su dviem papildomomis 40 ml dichlormetano

▼B

porcijomis, šie ekstraktai supilami kartu su pirmuoju ekstraktu į tą pačią apvaliadugnę kolbą. Sukamajame garintuve (4.2), esant sumažintam slėgiui, dichlormetaninis ekstraktas išgarinamas iki sauso likučio 40 °C temperatūroje. Likutis kolboje ištirpinamas 20–25 ml metanolio (3.2), kolba užkemšama, šis visas ekstraktas paliekamas jonų mainų chromatografijai atlikti (5.4).

5.4 *Jonų mainų chromatografija*

5.4.1 Katijonito kolonėlės ruošimas

Į stiklinio vamzdžio (4.3) apačią įkišamas mažas stiklo vatos kamštis. Paruošiama 5,0 g apdoroto katijonito (3.6) ir 50 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.5) suspensija, kuri supilama į stiklinę kolonėlę, kurioje dervai leidžiama nusėsti. Rūgšties perteklius išleidžiamas, kad ji vos apsemtų dervos sluoksnį, kolonėlė plaunama vandeniu tol, kol plovimo vanduo tampa neutralus pagal lakmusą. Į kolonėlę įpilama 50 ml metanolio (3.2), kuris išleidžiamas iki dervos sluoksnio viršaus.

5.4.2 Chromatografinė analizė kolonėlėje

Atsargiai pipete į kolonėlę įpilamas pagal 5.3 punktą gautas ekstraktas. Apvaliadugnė kolba plaunama dviem 5–10 ml metanolio (3.2) porcijomis ir šie plovimo skysčiai supilami į kolonėlę. Ekstraktas nuleidžiamas iki dervos viršaus, kolonėlė plaunama 50 ml metanolio, užtikrinant, kad srautas būtų ne didesnis kaip 5 ml/min. Ištekėjęs skystis išpilamas. Metilbenzokvatas iš kolonėlės plaunamas 150 ml metansulfonrūgšties tirpalo (3.4), eliuatas surenkamas į 250 ml kūginę kolbą.

5.5 *Skysčių fazių atskyrimas*

Pagal 5.4.2 punktą gautas eliuatas supilamas į 1 litro talpos dalijamąjį piltuvą. Kūginė kolba plaunama 5–10 ml metanolio (3.2), plovimo tirpalas sujungiamas su dalijamojo piltuvo turiniu. Įpilama 300 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.5) ir 130 ml dichlormetano (3.1). Purtoma 1 min, palaukiama sluoksnių atsiskyrimo. Apatinis (dichlormetaninis) sluoksnis išleidžiamas į 500 ml apvaliadugnę kolbą. Vandeninio sluoksnio ekstrahavimas kartojamas su dviem papildomomis 70 ml dichlormetano porcijomis, šie ekstraktai supilami kartu su pirmuoju į tą pačią apvaliadugnę kolbą.

Sukamajame garintuve (4.2), esant sumažintam slėgiui, dichlormetaninis ekstraktas išgarinamas iki sauso likučio 40 °C temperatūroje. Likutis kolboje ištirpinamas maždaug 5 ml metanolio (3.2) ir gautas tirpalas kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Apvaliadugnė kolba plaunama dar dviem 1–2 ml metanolio porcijomis, plovimo skysčiai supilami į tą pačią matavimo kolbą. Metanoliu skiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per membraninį filtrą (4.6). Šis tirpalas paliekamas nustatymui HPLC metodu (5.6).

5.6 *HPLC nustatymas*

5.6.1 Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos, gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai:

— skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1),

— HPLC judančioji fazė: metanolio ir vandens mišinys (3.3),

— srautas: 1–1,5 ml/min,

— detektoriaus bangos ilgis: 265 nm,

— įpurškiamas tūris: 20–50 µl.

▼B

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 4,0 μg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3) tol, kol nustoja keistis smailės aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.6.2 Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.7.3) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių arba plotų vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija μg/ml.

5.6.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.5), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas metilbenzokvato smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Ėminio tirpalo koncentracija μg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo metilbenzokvato smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.6.2).

Metilbenzokvato kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

c = metilbenzokvato koncentracija ėminio tirpale μg/ml,
m = tiriamosios dalies svoris gramais.

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto ir 10,0 μg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3) spektrai.

7.1.1 Kochromatografija

Ėminio ekstrakto koncentracija padidinama, įpilant reikiamą tarpinio etaloninio tirpalo (3.7.2) tūrį. Pridėto metilbenzokvato kiekis turi atitikti įvertintą metilbenzokvato kiekį ėminio ekstrakte.

Padidinamas tik metilbenzokvato smailės aukštis, atsižvelgiant į pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje turi atitikti pradinį plotį maždaug 10 % tikslumu.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų maždaug 2 nm;

▼B

b) nuo 220 nm iki 350 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis kaip 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;

c) nuo 220 nm iki 350 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis kaip 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečiai atliktų to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis kaip 10 % didesnės vertės, kai metilbenzokvato kiekis 4–20 mg/kg.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas tuščiajam ėminiui su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

8. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai**

10–yje laboratorijų buvo analizuojami 5 ėminiai. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas du kartus.

	Tuščiasis ėminys	Miltai 1	Granulės 1	Miltai 2	Granulės 2
Vidurkis [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Išgavos dydis [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = neaptikta
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas, %
s_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas, %

B. OLAKVINDOKSO NUSTATYMAS

2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilchinoksalin-N^1,N^4-dioksidas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti olakvindokso koncentraciją pašaruose. Kiekybinio nustatymo riba – 5 mg/kg.

2. **Metodas**

Ėminys ekstrahuojamas vandens ir etanolio mišiniu. Olakvindokso kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį detektorių.

▼B

3. **Reagentai**

3.1 Metanolis

3.2 Metanolis, HPLC grynumo

3.3 Vanduo, HPLC grynumo

3.4 HPLC judančioji fazė

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

3.5 Etaloninė medžiaga: grynas olakvindoksas, 2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilchinoksalin-N^1,N^4-dioksidas, E 851

3.5.1 Olakvindokso pradinis etaloninis tirpalas, 250 µg/ml

Į 200 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg olakvindokso (3.5) ir įpilama apie 190 ml vandens. Kolba 20 min dedama į ultragarso vonią (4.1). Po apdorojimo ultragarsu tirpalas atvėsinamas iki kambario temperatūros, iki žymės skiedžiama vandeniu ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma šaldytuve. Šis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo kiekvieną mėnesį.

3.5.2 Olakvindokso tarpinis etaloninis tirpalas, 25 µg/ml

10,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.5.1) įpilama į 100 ml matavimo kolbą, skiedžiama 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 Kalibravimo tirpalai

Į keletą 50 ml matavimo kolbų įpilama 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml, 15,0 ml ir 20,0 ml tarpinio etaloninio tirpalo (3.5.2). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.4) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija. Šiuose tirpaluose yra 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. **Aparatūra**

4.1 Ultragarso vonia

4.2 Mechaninė purtyklė

4.3 HPLC įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu detektoriumi arba diodų matricos detektoriumi

4.3.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė, 250 mm × 4 mm, C_{18}, 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

4.4 Membraniniai filtrai, 0,45 µm

5. **Procedūra**

Pastaba Olakvindoksas yra jautrus šviesai. Visi veiksmai turėtų būti atliekami susilpnintoje šviesoje arba turėtų būti naudojami rudo stiklo indai.

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1 Atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė, siekiant patikrinti, ar nėra olakvindokso arba trukdančiųjų medžiagų.

5.1.2 Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant olakvindokso, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis.

▼B

50 mg/kg koncentracijai gauti, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 10,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.5.1) ir tirpalas garinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 50 g pašaro tuščiojo ėminio, gerai sumaišoma ir prieš ekstrahavimą (5.2) palaukiama 10 min kelis kartus maišant.

Pastaba Šiame metode pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neturi būti aptikta olakvindokso.

5.2 *Ekstrahavimas*

0,01 g tikslumu pasveriama maždaug 50 g ėminio. Supilama į 1 000 ml kūginę kolbą, įpilama 100 ml metanolio (3.1) ir kolba 5 min dedama į ultragarso vonią (4.1). Įpilama 410 ml vandens ir kolba 15 min paliekama ultragarso vonioje. Kolba išimama iš ultragarso vonios, 30 min purtoma purtykle (4.2) ir filtruojama per gofruotąjį filtrą. 10,0 ml filtrato įpilama į 20 ml matavimo kolbą, iki žymės skiedžiama vandeniu ir sumaišoma. Ėminys filtruojamas per membraninį filtrą (4.4). (žr. 9 pastabą). Atliekami HPLC nustatymas (5.3).

5.3 *HPLC nustatymas*

5.3.1 Parametrai:

Rekomenduojamos šios sąlygos, gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Analizės kolonėlė (4.3.1)	
Judančioji fazė (3.4):	vandens (3.3) ir metanolio (3.2.) mišinys, 900 + 100 (V + V)
Srautas:	1,5–2 ml/min
Detektoriaus bangos ilgis:	380 nm
Įpurškiamas tūris:	20 µl–100 µl

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 2,5 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.5.3) tol, kol nustoja keistis smailės aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.3.2 Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.5.3) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių (plotų) vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.3.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.2), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas olakvindokso smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Ėminio tirpalo koncentracija µg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo olakvindokso smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.3.2).

Olakvindokso kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

▼B

kurioje:

c = olakvindokso koncentracija ėminio ekstrakte (5.2) µg/ml
m = tiriamosios dalies svoris g (5.2)

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto (5.2) ir 5,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.5.3) spektrai.

7.1.1 Kochromatografija

Ėminio ekstrakto (5.2) koncentracija padidinama, įpilant reikiamą tarpinio etaloninio tirpalo (3.5.3) tūrį. Pridėto olakvindokso kiekis turi atitikti ėminio ekstrakte nustatytą olakvindokso kiekį.

Padidinamas tik olakvindokso smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje ± 10 % tikslumu turi atitikti olakvindokso ekstrakto smailės pradinį plotį.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;

b) nuo 220 nm iki 400 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis nei 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;

c) nuo 220 nm iki 400 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis nei 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečiai atliktų to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis kaip 10 % didesnės vertės, kai olakvindokso kiekis 10–200 mg/kg.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas tuščiajam ėminiui su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

▼B

8. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai**

EB surengė tarplaboratorinius tyrimus, kurių metu 13–oje laboratorijų buvo tiriami keturi paršelių pašarų ėminiai, įskaitant pašaro tuščiąjį ėminį. Rezultatai pateikiami toliau:

	1 ėminys	2 ėminys	3 ėminys	4 ėminys
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
vardinis kiekis [mg/kg]	—	15	50	100
Išgavos dydis %	—	97,3	96,0	95,4

L = laboratorijų skaičius
n = atskirų 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 metodo tinkamumas nebuvo patvirtintas pašarams, kuriuose olakvindokso yra daugiau kaip 100 mg/kg, patenkinamus rezultatus galima gauti naudojant mažesnės masės ėminį ir (arba) skiedžiant ekstraktą (5.2) tam, kad būtų gauta koncentracija, atitinkanti kalibravimo kreivės (5.3.2) ribas.

C. AMPROLIUMO NUSTATYMAS

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metilpiridinio chlorido hidrochloridas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti amproliumo koncentraciją pašaruose ir premiksuose. Aptikimo riba – 1 mg/kg, kiekybinio nustatymo riba – 25 mg/kg.

2. **Metodas**

Ėminys ekstrahuojamas metanolio ir vandens mišiniu. Ekstraktas skiedžiamas judančiąja faze, filtruojamas per membraninį filtrą ir amproliumo kiekis nustatomas katijonų mainų efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Metanolis

3.2 Acetonitrilas, HPLC grynumo

3.3 Vanduo, HPLC grynumo

3.4 Natrio dihidrofosfato tirpalas, c = 0,1 mol/l

Vandenyje (3.3) ištirpinama 13,80 g natrio dihidrofosfato monohidrato, 1 000 ml matavimo kolboje skiedžiama iki žymės vandeniu (3.3) ir sumaišoma.

3.5 Natrio perchlorato tirpalas, c = 1,6 mol/l

Vandenyje (3.3) ištirpinama 224,74 g natrio perchlorato, 1 000 ml matavimo kolboje skiedžiama iki žymės vandeniu (3.3) ir sumaišoma.

▼B

3.6 HPLC judančioji fazė (žr. 9.1 pastabą).

Acetonitrilo (3.2), natrio dihidrofosfato tirpalo (3.4) ir natrio perchlorato tirpalo (3.5) mišinys 450 + 450 + 100 (V + V + V). Prieš naudojimą tirpalas filtruojamas per 0,22 µm membraninį filtrą (4.3) ir bent 15 min degazuojamas (pvz., ultragarso vonioje (4.4)).

3.7 Etaloninė cheminė medžiaga: grynas amproliumas, l-[(4-amino-2-propil-pirimidin-5-il)metil]-2-metilpiridinio chlorido hidrochloridas, E 750 (žr. 9.2).

3.7.1 Amproliumo pradinis etaloninis tirpalas, 500 µg/ml

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg amproliumo (3.7), ištirpinama 80 ml metanolio (3.1) ir 10 min kolba dedama į ultragarso vonią (4.4). Po apdorojimo ultragarsu tirpalas atvėsinamas iki kambario temperatūros, skiedžiama vandenius iki žymės ir sumaišomas. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.7.2 Amproliumo tarpinis etaloninis tirpalas, 50 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą pipete paimama 5 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.7.1), skiedžiama iki žymės ekstrahavimo tirpikliu (3.8) ir sumaišoma. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.7.3 Kalibravimo tirpalai

Į 50 ml matavimo kolbas įpilama 0,5, 1 ir 2 ml tarpinio etaloninio tirpalo (3.7.2). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.6) ir sumaišoma. Šie tirpalai atitinka 0,5, 1 ir 2 µg/ml amproliumo. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.8 Ekstrahavimo tirpiklis

Metanolio (3.1) ir vandens mišinys 2 + 1 (V + V)

4. **Aparatūra**

4.1 HPLC įranga su įpurškimo sistema, tinkama įpurkšti 100 µl tūrį

4.1.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė 125 mm × 4 mm, katijonitas *Nucleosil* 10 SA, 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

4.1.2 Kintamo bangos ilgio ultravioletinis detektorius arba diodų matricos detektorius

4.2 Membraninis filtras, medžiaga – PTFE, 0,45 µm

4.3 Membraninis filtras, 0,22 µm

4.4 Ultragarso vonia

4.5 Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė

5. **Procedūra**

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1 Pašaro tuščiasis ėminys

Norint nustatyti išgavos dydį (5.1.2) atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė, siekiant patikrinti, ar nėra amproliumo arba trukdančiųjų medžiagų. Pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir jame neturi būti aptikta amproliumo arba trukdančių medžiagų.

▼B

5.1.2 Išgavos dydžio nustatymo bandymas

Išgavos dydis nustatomas analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant amproliumo, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje. 100 mg/kg koncentracijai gauti, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 10,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.7.1) ir tirpalas garinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 50 g pašaro tuščiojo ėminio, gerai sumaišoma ir prieš ekstrahavimą (5.2) palaukiama 10 min kelis kartus maišant.

Jei nėra pašaro tuščiojo ėminio, kuris būtų panašus į ėminio pašarą (žr. 5.1.1), išgavos dydį galima nustatyti, taikant etalono pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą ėminį pridedamas amproliumo kiekis, maždaug atitinkantis amproliumo kiekį ėminyje. Šis ėminys analizuojamas kartu su ėminiu be pridėto amproliumo ir išgavos dydis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2 *Ekstrahavimas*

5.2.1 Premiksai (amproliumo kiekis < 1 %) ir pašarai

Atsižvelgiant į amproliumo kiekį, į 500 ml kūginę kolbą 0,01 g tikslumu pasveriama 5–40 g ėminio ir įpilama 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.8). Kolba įdedama į ultragarso vonią (4.4) ir laikoma 15 min. Kolba išimama iš ultragarso vonios ir 1 h kratoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.5). Alikvotinė ekstrakto dalis skiedžiama judančiąja faze (3.6), kad amproliumo koncentracija būtų 0,5–2 µg/ml, ir sumaišoma (žr. 9.3 pastabą). 5–10 ml šio praskiesto tirpalo filtruojama per membraninį filtrą (4.2). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).

5.2.2 Premiksai (amproliumo kiekis ≥ 1 %)

Atsižvelgiant į amproliumo kiekį, į 500 ml kūginę kolbą 0,001 g tikslumu pasveriama 1–4 g ėminio ir įpilama 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.8). Kolba įdedama į ultragarso vonią (4.4) ir laikoma 15 min. Kolba išimama iš ultragarso vonios ir 1 h kratoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.5). Alikvotinė ekstrakto dalis skiedžiama judančiąja faze (3.6), kad amproliumo koncentracija būtų 0,5–2 µg/ml, ir sumaišoma. 5–10 ml šio praskiesto tirpalo filtruojama per membraninį filtrą (4.2). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).

5.3 *HPLC nustatymas*

5.3.1 Parametrai:

Rekomenduojamos šios sąlygos, gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.1.1):	125 mm × 4 mm, katijonitas *Nucleosil* 10 SA, 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė
Judančioji fazė (3.6):	acetonitrilo (3.2), natrio dihidrofosfato tirpalo (3.4) ir natrio perchlorato tirpalo (3.5) mišinys, 450 + 450 + 100 (V + V + V).
Srautas:	0,7–1 ml/min
Detektoriaus bangos ilgis:	264 nm
Įpurškiamas tūris:	100 µl

▼B

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 1,0 μg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3) tol, kol nustoja keistis smailės aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.3.2 Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.7.3) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių (plotų) vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija μg/ml.

5.3.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.2), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas amproliumo smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Ėminio tirpalo koncentracija μg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo amproliumo smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.3.2).

Amproliumo kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kurioje:

V = ekstrahavimo tirpiklio (3.8) tūris ml pagal 5.2 (t. y. 200 ml)
c = amproliumo koncentracija ėminio ekstrakte (5.2) μg/ml
f = praskiedimo faktorius pagal 5.2
m = tiriamosios dalies svoris g

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto (5.2) ir 2,0 μg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3) spektrai.

7.1.1 Kochromatografija

Ėminio ekstrakto (5.2) koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.7.3) tūrį. Pridėto amproliumo kiekis turi atitikti ėminio ekstrakte nustatytą amproliumo kiekį.

Padidinamas tik amproliumo smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje ± 10 % tikslumu turi atitikti nepadidintos koncentracijos amproliumo ekstrakto smailės pradinį plotį.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;

▼B

b) nuo 210 nm iki 320 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis kaip 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;

c) nuo 210 nm iki 320 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis kaip 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

— 15 % didesnės vertės, jei amproliumo kiekis 25 mg/kg – 500 mg/kg,

— 75 mg/kg, jei amproliumo kiekis 500 mg/kg – 1 000 mg/kg,

— 7,5 % didesnės vertės, jei amproliumo kiekis didesnis nei 1 000 mg/kg.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas (tuščiajam) ėminiui su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

8. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai**

Buvo parengtas tarplaboratorinis tyrimas, kurį vykdant buvo analizuojamos trijų rūšių paukščių pašaras (1–3 ėminiai), vienas mineralinis pašaras (4 ėminys) ir vienas premiksas (5 ėminys). Rezultatai pateikiami šioje lentelėje:

	1 ėminys (tuščiasis)	2 ėminys	3 ėminys	4 ėminys	5 ėminys
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
vidurkis [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CVr [%]	—	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
vardinis kiekis [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = laboratorijų skaičius
n = atskirų verčių skaičius
s_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas
s_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas

▼B

9. **Pastabos**

9.1 Jei ėminyje yra tiamino, chromatogramoje prieš pat amproliumo smailę atsiranda tiamino smailė. Taikant šį metodą, amproliumas ir tiaminas turi būti atskirti. Jei amproliumas ir tiaminas neatsiskiria šiam metodui naudojamoje kolonėlėje (4.1.1), iki 50 % acetonitrilo, sudarančio judančiąją fazę (3.6), pakeičiama metanoliu.

9.2 Pagal Didžiosios Britanijos *Pharmacopoeia*, amproliumo tirpalo (c = 0,02 mol/l) vandenilio chlorido rūgštyje (c = 0,1 mol/l) spektras turi maksimumus, atitinkančius 246 nm ir 262 nm. Optinis tankis turi būti apie 0,84 esant 246 nm, ir 0,80 esant 262 nm.

9.3 Ekstraktas visuomet turi būti skiedžiamas judančiąja faze, nes kitaip amproliumo smailės sulaikymo trukmė gali stipriai pasikeisti dėl joninės jėgos pokyčio.

D. KARBADOKSO NUSTATYMAS

Metil 3-(2-chinoksalinilmetilen)karbazato N 1 ,N 4 -dioksidas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti karbadokso koncentraciją pašaruose, premiksuose ir preparatuose. Aptikimo riba – 1 mg/kg. Kiekybinio nustatymo riba – 5 mg/kg.

2. **Metodas**

Pasiekus ėminio ir vandens pusiausvyrą, ėminys ekstrahuojamas metanolio ir acetonitrilo mišiniu. Jei tai pašarai, alikvotinė filtruoto ekstrakto dalis gryninama aliuminio oksido kolonėlėje. Jei tai premiksai arba preparatai, alikvotinė filtruoto ekstrakto dalis skiedžiama vandens, metanolio ir acetonitrilo mišiniu iki atitinkamos koncentracijos. Karbadokso kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), naudojant ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1 Metanolis

3.2 Acetonitrilas, HPLC grynumo

3.3 Acto rūgštis, w = 100 %

3.4 Aliuminio oksidas, neutralusis, I laipsnio aktyvumo

3.5 Metanolio ir acetonitrilo mišinys 1 + 1 (V + V)

Sumaišoma 500 ml metanolio (3.1) ir 500 ml acetonitrilo (3.2).

3.6 Acto rūgštis, σ = 10 %

10 ml acto rūgšties (3.3) skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.7 Natrio acetatas

3.8 Vanduo, HPLC grynumo

3.9 Acetatinis buferinis tirpalas, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0

0,82 g natrio acetato (3.7) ištirpinama 700 ml vandens (3.8) ir acto rūgšties tirpalu (3.6) nustatoma pH vertė 6,0. Tirpalas supilamas į 1000 ml matavimo kolbą, skiedžiama vandeniu (3.8) iki žymės ir sumaišoma.

3.10 HPLC judančioji fazė

825 ml acetatinio buferinio tirpalo (3.9) sumaišoma su 175 ml acetonitrilo (3.2).

Tirpalas filtruojamas per 0,22 μm filtrą (4.5) ir degazuojamas (pvz., 10 min ultragarso vonioje).

▼B

3.11 Etaloninė medžiaga

Grynas karbadoksas: metil-3-(2-chinoksalinilmetilen)karbazato N^1,N^4-dioksidas, E 850

3.11.1 Karbadokso pradinis etaloninis tirpalas, 100 µg/ml (žr. skirsnio *Procedūra* 5 pastabą)

Į 250 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 25 mg karbadokso etaloninės medžiagos (3.11). Ištirpinama metanolio ir acetonitrilo mišinyje (3.5), naudojant ultragarso vonią (4.7). Po apdorojimo ultragarsu tirpalas atvėsinamas iki kambario temperatūros, skiedžiama vandenius iki žymės ir sumaišomas. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant ≤ 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.11.2 Kalibravimo tirpalai

Į keletą 100 ml matavimo kolbų įpilama 2,0, 5,0, 10,0, ir 20,0 ml ml pradinio etaloninio tirpalo (3.11.1). Įpilama 30 ml vandens, skiedžiama iki žymės metanolio ir acetonitrilo mišiniu (3.5) ir sumaišoma. Kolbos apvyniojamos aliuminio folija. Šių tirpalų koncentracija 2,0, 5,0, 10,0 ir 20,0 µg/ml karbadokso.

Kalibravimo tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

Pastaba Norint nustatyti karbadoksą pašaruose, kuriuose jo koncentracija mažesnė nei 10 mg/kg, turi būti paruošti mažesnės nei 2,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalai.

3.12 Vandens bei [metanolio ir acetonitrilo] (3.5) mišinys, 300 + 700 (V + V)

Sumaišoma 300 ml vandens bei 700 ml metanolio ir acetonitrilo mišinio (3.5).

4. **Aparatūra**

4.1 Laboratorinė purtyklė arba magnetinė maišyklė

4.2 Stiklo pluošto filtravimo popierius (*Whatman* GF/A arba lygiavertis)

4.3 Stiklinė kolonėlė (ilgis 300–400 mm, vidinis skersmuo maždaug 10 mm) su pertvara iš sukepinto stiklo ir išleidžiamuoju čiaupu.

Pastaba Galima naudoti stiklinę kolonėlę su čiaupu arba stiklinę kolonėlę su kūginiu galu; tokiu atveju į apatinį galą įdedamas nedidelis stiklo vatos kamštis ir stikline lazdele nustumiamas žemyn.

4.4 HPLC įranga su įpurškimo sistema, tinkama įpurkšti 20 µl tūrį

4.4.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė: 300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

4.4.2 Kintamo bangos ilgio ultravioletinis detektorius arba diodinės matricos detektorius, veikiantis 225–400 nm bangų ilgio intervale

4.5 Membraninis filtras, 0,22 µm

4.6 Membraninis filtras, 0,45 µm

4.7 Ultragarso vonia

▼B

5. **Procedūra**

Pastaba Karbadoksas yra jautrus šviesai. Visi veiksmai atliekami esant susilpnintai šviesai arba naudojami rudo stiklo arba aliuminio foliją apvyniotus stiklinius indus.

5.1 *Bendrosios nuostatos*

5.1.1 Pašaro tuščiasis ėminys

Norint nustatyti išgavos dydį (5.1.2) atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė, siekiant patikrinti, ar nėra karbadokso arba trukdančiųjų medžiagų. Pašaro tuščiasis ėminys turėtų atitinka ėminio tipą ir jame neturi būti aptikta karbadokso arba trukdančių medžiagų.

5.1.2 Išgavos dydžio nustatymo bandymas

Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį (5.1.1), į jį pridedant karbadokso, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. 50 mg/kg koncentracijai gauti, į 200 ml kūginę kolbą įpilama 5,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.11.1). Tirpalas garinamas azoto srovėje iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 10 g pašaro tuščiojo ėminio, gerai sumaišoma ir prieš ekstrahavimą (5.2) palaukiama 10 min.

Jei nėra pašaro tuščiojo ėminio, kuris būtų panašus į ėminio pašarą (žr. 5.1.1), išgavos dydį galima nustatyti, taikant etalono pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą ėminį pridedamas karbadokso kiekis, maždaug atitinkantis karbadokso kiekį ėminyje. Šis ėminys analizuojamas kartu su ėminiu be pridėto karbadokso ir išgavos dydis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2 *Ekstrahavimas*

5.2.1 Pašarai

10 g ėminio pasveriama 0,01 g tikslumu ir supilama į 200 ml kūginę kolbą. Įpilama 15,0 ml vandens, sumaišoma ir paliekama 5 min pusiausvyrai pasiekti. Įpilama 35,0 ml metanolio ir acetonitrilo mišinio (3.5), kolba užkemšama ir 30 min kratoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.1). Tirpalas filtruojamas per stiklo pluošto filtravimo popierių (4.2). Toliau atliekamas gryninimas (5.3).

5.2.2 Premiksai (0,1–2,0 %)

1 g nesusmulkinto ėminio pasveriama 0,001 g tikslumu ir supilama į 200 ml kūginę kolbą. Įpilama 15,0 ml vandens, sumaišoma ir paliekama 5 min pusiausvyrai pasiekti. Įpilama 35,0 ml metanolio ir acetonitrilo mišinio (3.5), kolba užkemšama ir 30 min kratoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.1). Tirpalas filtruojamas per stiklo pluošto filtravimo popierių (4.2).

Alikvotinė filtrato dalis paimama pipete į 50 ml matavimo kolbą. Įpilama 15,0 ml vandens, skiedžiama iki žymės metanolio ir acetonitrilo mišiniu (3.5) ir sumaišoma. Galutiniame tirpale karbadokso koncentracija yra maždaug 10 µg/ml. Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per 0,45 µm filtrą (4.6).

Toliau analizuojama HPLC metodu (5.4).

5.2.3 Preparatai (> 2 %)

0,2 g nesusmulkinto ėminio pasveriama 0,001 g tikslumu ir supilama į 250 ml kūginę kolbą. Įpilama 45,0 ml vandens, sumaišoma ir paliekama 5 min pusiausvyrai pasiekti. Įpilama 105,0 ml metanolio ir

▼B

acetonitrilo mišinio (3.5), kolba užkemšama ir turinys homogenizuojamas. 15 min ėminys apdorojamas ultragarsu (4.7), vėliau 15 min kratomas arba maišomas (4.1). Tirpalas filtruojamas per stiklo pluošto filtravimo popierių (4.2).

Alikvotinė filtrato dalis skiedžiama vandens bei metanolio ir acetonitrilo mišiniu (3.12), kad galutinė karbadokso koncentracija būtų 10–15 µg/ml (10 % preparatų praskiedimo faktorius lygus 10). Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per 0,45 µm filtrą (4.6).

Toliau analizuojama HPLC metodu (5.4).

5.3 *Gryninimas*

5.3.1 Aliuminio oksido kolonėlės ruošimas

Pasveriama 4 g aliuminio oksido (3.4) ir supilama į stiklinę kolonėlę (4.3).

5.3.2 Ėminio gryninimas

Į aliuminio oksido kolonėlę supilama 15 ml filtruoto ekstrakto (5.2.1) ir pirmieji 2 ml eliuato išpilami. Surenkamas kitas 5 ml tūris ir alikvotinė dalis filtruojama 0,45 µm filtrą (4.6).

Toliau analizuojama HPLC metodu (5.4).

5.4 *HPLC nustatymas*

5.4.1 Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos, gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai:

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
Judančioji fazė (3.10):	acetatinio buferinio tirpalo (3.9) ir acetonitrilo (3.2) mišinys, 825 + 175 (v + v)
Srautas:	1,5–2 ml/min.
Detektoriaus bangos ilgis:	365 nm
Įpurškiamas tūris:	20 µl

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 5,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.11.2) tol, kol nustoja keistis smailės aukščio (ploto) ir sulaikymo trukmės vertės.

5.4.2 Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.11.2) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių arba plotų vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.4.3 Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiama [(5.3.2) pašarų, (5.2.2) premiksų ir (5.2.3) preparatų] ėminio ekstrakto ir nustatomas karbadokso smailių vidutinis aukštis (plotas).

▼B

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Ėminio tirpalo karbadokso koncentracija µg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo karbadokso smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.4.2).

6.1 *Pašarai*

Karbadokso kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kurioje:

c = karbadokso koncentracija ėminio ekstrakte (5.3.2) µg/ml,
V_1 = ekstrahuojamas tūris ml (t. y. 50)
m = tiriamosios dalies svoris g

6.2 *Premiksai ir preparatai*

Karbadokso kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kurioje:

c = karbadokso koncentracija ėminio ekstrakte (5.2.2 arba 5.2.3) µg/ml,
V_2 = ekstrahuojamas tūris ml (t. y. 50 premiksų; 150 preparatų)
f = praskiedimo faktorius pagal 5.2.2 (premiksų) arba 5.2.3 (preparatų)
m = tiriamosios dalies svoris g

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1 *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto ir 10,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.11.2) spektrai.

7.1.1 Kochromatografija

Ėminio ekstrakto koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.11.2) tūrį. Pridėto karbadokso kiekis turi atitikti ėminio ekstrakte nustatytą karbadokso kiekį.

Padidinamas tik karbadokso smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje maždaug 10 % tikslumu turi atitikti smailės pradinį plotį.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;

▼B

b) nuo 225 nm iki 400 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis nei 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;

c) nuo 225 nm iki 400 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis nei 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2 *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 15 % didesnės vertės, jei koncentracija 10 mg/kg ir didesnė.

7.3 *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas (tuščiajam) ėminiui su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

8. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai**

Buvo parengtas tarplaboratorinis tyrimas, kurį vykdant aštuonios laboratorijos analizavo šešių tipų pašarus, keturių tipų premiksus ir trijų tipų preparatus. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas du kartus. (Išsamesnė informacija apie šį tarplaboratorinį tyrimą yra pateikta *Journal of AOAC International*, *Volume* 71, 1988, p. 484–490). Rezultatai (išskyrus riktus) pateikti toliau:

1 lentelė

Tarplaboratorinio pašarų tyrimo rezultatai

	1 ėminys	2 ėminys	3 ėminys	4 ėminys	5 ėminys	6 ėminys
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Vidurkis (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
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
Vardinis kiekis (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

2 lentelė

Tarplaboratorinio premiksų ir preparatų tyrimo rezultatai

	Premiksai				Preparatai		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Vidurkis (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

▼B

	Premiksai				Preparatai		
	A	B	C	D	A	B	C
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Vardinis kiekis (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = laboratorijų skaičius
n = atskirų verčių skaičius
Sr = pakartojamumo standartinis nuokrypis
CVr = pakartojamumo variacijos koeficientas
SR = atkuriamumo standartinis nuokrypis
CVR = atkuriamumo variacijos koeficientas

▼B

IX PRIEDAS

6 STRAIPSNYJE NURODYTOS ATITIKMENŲ LENTELĖS

1. **Direktyva 71/250/EEB**

Direktyva 71/250/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnio pirmoji pastraipa	3 straipsnis
1 straipsnio antroji pastraipa	2 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedo 1 dalis	II priedas
Priedo 2 dalis	—
Priedo 3 dalis	—
Priedo 4 dalis	III priedo O dalis
Priedo 5 dalis	III priedo M dalis
Priedo 6 dalis	III priedo N dalis
Priedo 7 dalis	III priedo Q dalis
Priedo 9 dalis	III priedo K dalis
Priedo 10 dalis	—
Priedo 11 dalis	—
Priedo 12 dalis	III priedo J dalis
Priedo 14 dalis	III priedo D dalis
Priedo 16 dalis	—

2. **Direktyva 71/393/EEB**

Direktyva 71/393/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedo I dalis	III priedo A dalis
Priedo II dalis	III priedo E dalis
Priedo III dalis	III priedo P dalis
Priedo IV dalis	III priedo H dalis

3. **Direktyva 72/199/EEB**

Direktyva 72/199/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
I priedo 1 dalis	III priedo L dalis
I priedo 2 dalis	III priedo C dalis
I priedo 3 dalis	—
I priedo 4 dalis	—
I priedo 5 dalis	V priedo A dalis
II priedas	—

4. **Direktyva 73/46/EEB**

Direktyva 73/46/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
I priedo 1 dalis	III priedo B dalis
I priedo 2 dalis	—
I priedo 3 dalis	III priedo I dalis

▼B

5. **Direktyva 76/371/EEB**

Direktyva 76/371/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	1 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedas	I priedas

6. **Direktyva 76/372/EEB**

Direktyva 76/372/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	—
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedas	—

7. **Direktyva 78/633/EEB**

Direktyva 78/633/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedo 1 dalis	—
Priedo 2 dalis	—
Priedo 3 dalis	IV priedo C dalis

8. **Direktyva 81/715/EEB**

Direktyva 81/715/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	—
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedas	—

9. **Direktyva 84/425/EEB**

Direktyva 84/425/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	—
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedas	—

10. **Direktyva 86/174/EEB**

Direktyva 86/174/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	4 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedas	VII priedas

11. **Direktyva 93/70/EEB**

Direktyva 93/70/EEB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedas	IV priedo D dalis

▼B

12. **Direktyva 93/117/EB**

Direktyva 93/117/EB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 ir 5 straipsniai
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
Priedo 1 dalis	IV priedo E dalis
Priedo 2 dalis	VIII priedo A dalis

13. **Direktyva 98/64/EB**

Direktyva 98/64/EB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 ir 5 straipsniai
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
Priedo A dalis	III priedo F dalis
Priedo C dalis	VIII priedo B dalis

14. **Direktyva 1999/27/EB**

Direktyva 1999/27/EB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 ir 5 straipsniai
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
5 straipsnis	—
6 straipsnis	—
7 straipsnis	—
Priedo A dalis	VIII priedo C dalis
Priedo B dalis	IV priedo F dalis
Priedo C dalis	VIII priedo D dalis

15. **Direktyva 1999/76/EB**

Direktyva 1999/76/EB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
Priedas	IV priedo G dalis

16. **Direktyva 2000/45/EB**

Direktyva 2000/45/EB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
Priedo A dalis	IV priedo A dalis
Priedo B dalis	IV priedo B dalis
Priedo C dalis	III priedo G dalis

▼B

17. **Direktyva 2002/70/EB**

Direktyva 2002/70/EB	Šis reglamentas
1 straipsnis	1 straipsnis
2 straipsnis	2 ir 3 straipsniai
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
5 straipsnis	—
I priedas	I priedas ir V priedo B (I) dalis
II priedas	II priedas ir V priedo B (II) dalis

18. **Direktyva 2003/126/EB**

Direktyva 2003/126/EB	Šis reglamentas
1 straipsnis	3 straipsnis
2 straipsnis	—
3 straipsnis	—
4 straipsnis	—
5 straipsnis	—
6 straipsnis	—
Priedas	VI priedas