

I

(Aktai, priimti remiantis EB ir (arba) Euratomo steigimo sutartimis, kuriuos skelbti privaloma)

REGLAMENTAI

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)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 882/2004 dėl oficialios kontrolės, kuri atliekama siekiant užtikrinti, kad būtų įvertinama, ar laikomasi pašarus ir maistą reglamentuojančių teisės aktų, gyvūnų sveikatos ir gerovės taisyklių ⁽¹⁾, ypač į jo 11 straipsnio 4 dalies a, b ir c punktus,

kadangi:

(1) Šie aktai buvo priimti Direktyvai 70/373/EEB įgyvendinti ir vis dar galioja pagal Reglamento (EB) Nr. 882/2004 61 straipsnio 2 dalį:

- 1971 m. birželio 15 d. pirmoji Komisijos direktyva 71/250/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽²⁾;
- 1971 m. lapkričio 18 d. antroji Komisijos direktyva 71/393/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽³⁾;
- 1972 m. balandžio 27 d. trečioji Komisijos direktyva 72/199/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽⁴⁾;

— 1972 m. gruodžio 5 d. ketvirtoji Komisijos direktyva 73/46/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽⁵⁾;

— 1976 m. kovo 1 d. pirmoji Komisijos direktyva 76/371/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽⁶⁾;

— 1976 m. kovo 1 d. septintoji Komisijos direktyva 76/372/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽⁷⁾;

— 1978 m. birželio 15 d. aštuntoji Komisijos direktyva 78/633/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽⁸⁾;

— 1981 m. liepos 31 d. devintoji Komisijos direktyva 81/715/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽⁹⁾;

— 1984 m. liepos 25 d. dešimtoji Komisijos direktyva 84/425/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽¹⁰⁾;

— 1986 m. balandžio 9 d. Komisijos direktyva 86/174/EEB, nustatanti paukščių kombinuotųjų pašarų energetinės vertės apskaičiavimo metodus ⁽¹¹⁾;

⁽¹⁾ OL L 165, 2004 4 30, p. 1, pataisyta OL L 191, 2004 5 28, p. 1.

⁽²⁾ OL L 155, 1971 7 12, p. 13.

⁽³⁾ OL L 279, 1971 12 20, p. 7.

⁽⁴⁾ OL L 123, 1972 5 29, p. 6.

⁽⁵⁾ OL L 83, 1973 3 30, p. 21.

⁽⁶⁾ OL L 102, 1976 4 15, p. 1.

⁽⁷⁾ OL L 102, 1976 4 15, p. 8.

⁽⁸⁾ OL L 206, 1978 7 29, p. 43.

⁽⁹⁾ OL L 257, 1981 9 10, p. 38.

⁽¹⁰⁾ OL L 238, 1984 9 6, p. 34.

⁽¹¹⁾ OL L 130, 1986 5 16, p. 53.

- 1993 m. liepos 28 d. vienuoliktoji Komisijos direktyva 93/70/EEB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽¹⁾;
- 1993 m. gruodžio 17 d. dvyliktoji Komisijos direktyva 93/117/EB, nustatanti oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus ⁽²⁾;
- 1998 m. rugsėjo 3 d. Komisijos direktyva 98/64/EB, nustatanti Bendrijos analizės metodus pašaruose esančioms aminorūgštims, žaliems aliejams ir riebalams bei olakvindoksui nustatyti ir iš dalies pakeičianti Direktyvą 71/393/EEB ⁽³⁾;
- 1999 m. balandžio 20 d. Komisijos direktyva 1999/27/EB, nustatanti Bendrijos analizės metodus amproliumui, diklazurilui ir karbadoksui pašaruose nustatyti, iš dalies keičianti Direktyvas 71/250/EEB bei 73/46/EEB ir panaikinanti Direktyvą 74/203/EEB ⁽⁴⁾;
- 1999 m. liepos 23 d. Komisijos direktyva 1999/76/EB, nustatanti Bendrijos analizės metodą, kuriuo nustatoma lasalocido natrio druska pašaruose ⁽⁵⁾;
- 2000 m. liepos 6 d. Komisijos direktyva 2000/45/EB, nustatanti Bendrijos analizės metodus pašaruose esantiems A vitaminui, E vitaminui ir triptofanui nustatyti ⁽⁶⁾;
- 2002 m. liepos 26 d. Komisijos direktyva 2002/70/EB, nustatanti dioksinų ir dioksinų tipo PCB koncentracijos pašaruose nustatymo reikalavimus ⁽⁷⁾;
- 2003 m. gruodžio 23 d. Komisijos direktyva 2003/126/EB dėl gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių nustatymo analizės metodo, taikomo valstybinei pašarų kontrolei ⁽⁸⁾.
- (2) Kadangi Direktyva 70/373/EEB buvo pakeista Reglamentu (EB) Nr. 882/2004, reikėtų tos direktyvos įgyvendinimo aktus pakeisti vienu reglamentu. Tuo pačiu metu metodai turėtų būti suderinti su mokslo ir technikos žinių raida. Metodai, kurie nebeatitinka numatytos paskirties, turėtų būti panaikinti. Numatyta tinkamu metu atnaujinti ėminių ėmimo nuostatas, kad būtų galima atsižvelgti į naujausius pašarų gamybos, laikymo, vežimo ir pateikimo į rinką pasiekimus, tačiau tam tikrą laiką reikia palikti galiojančias ėminių ėmimo nuostatas.
- (3) Todėl 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 turėtų būti panaikintos.
- (4) Šiame reglamente numatytos priemonės atitinka Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatinio komiteto nuomonę,
- PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:
- 1 straipsnis
- Ėminių ėmimas oficialiai pašarų kontrolei, susijusiai su sudedamųjų dalių, priedų ir nepageidaujamų medžiagų nustatymu, išskyrus pesticidų likučius ir mikroorganizmus, atliekamas pagal I priede aprašytus metodus.
- 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.
- 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.

⁽¹⁾ OL L 234, 1993 9 17, p. 17.

⁽²⁾ OL L 329, 1993 12 30, p. 54.

⁽³⁾ OL L 257, 1998 9 19, p. 14.

⁽⁴⁾ OL L 118, 1999 5 6, p. 36.

⁽⁵⁾ OL L 207, 1999 8 6, p. 13.

⁽⁶⁾ OL L 174, 2000 7 13, p. 32.

⁽⁷⁾ OL L 209, 2002 8 6, p. 15.

⁽⁸⁾ OL L 339, 2003 12 24, p. 78.

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.

Priimta Briuselyje 2009 m. sausio 27 d.

Komisijos vardu

Androulla VASSILIOU

Komisijos narė

I PRIEDAS

ĖMINIŲ ĖMIMO METODAI

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Ėminiai, skirti oficialiai pašarų kontrolei, imami pagal toliau aprašytus metodus. Taip gauti ėminiai laikomi reprezentatyviaisiais partijos ėminiais.

2. ĖMINIUS IMANTYS PAREIGŪNAI

Ėminius ima pareigūnai, kuriuos tam įgalioja valstybės narės.

3. APIBRĖŽTYS

Partija: produkto kiekis, sudarantis tyrimo vienetą ir pasižymintis savybėmis, kurios laikomos tolygiomis.

Atskirasis ėminys: kiekis, paimtas iš vienos partijos vietos.

Jungtinis ėminys: jungtinių ėminių, paimtų iš vienos ėminio partijos, visuma.

Sumažintasis ėminys: jungtinio ėminio dalis, atspindinti jo visumą, gauta jį redukuojant.

Galutinis ėminys: sumažintojo arba homogenizuoto jungtinio ėminio dalis.

4. APARATAS

4.1 Ėminių ėmimo aparatas turi būti pagamintas iš medžiagų, negalinčių užteršti produktų, iš kurių imami ėminiai. Toks aparatas gali būti oficialiai patvirtintas valstybių narių.

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 ėminio tiriamosios dalies ypatybes (talpyklos gylį, maišo matmenis ir pan.) ir pašarų dalelių dydį.

4.2.2 *Ėminių ėmimas mechaniniu būdu*

Judančių pašarų ėminiams imti gali būti naudojamas patvirtintas mechaninis aparatas.

4.2.3 *Dalytuvas*

Aparatas, skirtas padalyti ėminį į maždaug vienodo dydžio dalis, gali būti naudojamas atskiriesiems ėminiams imti bei sumažintiems ir galutiniams ėminiams ruošti.

5. KIEKYBINIAI REIKALAVIMAI

5.A.	Tikrinant vienodai pašaruose pasiskirsčiusias medžiagas arba produktus
5.A.1.	Partija Partija turi būti tokia, kad iš jos būtų galima paimti kiekvienos jos sudedamosios dalies ėminį.

5.A.2.	<i>Atskirieji ėminiai</i>	
5.A.2.1.	Piltiniai pašarai:	Mažiausias atskirųjų ėminių skaičius:
5.A.2.1.1.	Partija ne didesnė kaip 2,5 metrinės tonos	septyni
5.A.2.1.2.	Partija didesnė kaip 2,5 metrinės tonos	kvadratinė šaknis iš 20 kartų partiją sudarančių metrinių tonų skaičiaus (*), bet ne daugiau kaip 40 atskirųjų ėminių
5.A.2.2.	Supakuoti pašarai:	Mažiausias pakuočių, iš kurių imami ėminiai, skaičius (**):
5.A.2.2.1.	Pakuotės, kurių masė didesnė kaip 1 kg:	
5.A.2.2.1.1.	Partiją sudaro nuo vienos iki keturių pakuočių	visos pakuotės
5.A.2.2.1.2.	Partiją sudaro nuo penkių iki 16 pakuočių	keturios pakuotės
5.A.2.2.1.3.	Partiją sudaro daugiau kaip 16 pakuočių	kvadratinė šaknis iš partiją sudarančių pakuočių skaičiaus (*), be ne daugiau kaip 20 pakuočių
5.A.2.2.2.	Pakuotės, kurių masė ne didesnė kaip 1 kg:	
5.A.2.3.	Skystieji arba pusiau skysti pašarai:	Mažiausias talpyklų, iš kurių imami ėminiai, skaičius (**):
5.A.2.3.1.	Talpyklų tūris didesnis kaip 1 l:	
5.A.2.3.1.1.	Partiją sudaro nuo vienos iki keturių talpyklų	visos talpyklos
5.A.2.3.1.2.	Partiją sudaro nuo penkių iki 16 talpyklų	keturios
5.A.2.3.1.3.	Partiją sudaro daugiau kaip 16 talpyklų	kvadratinė šaknis iš partiją sudarančių talpyklų skaičiaus (*), be ne daugiau kaip 20 talpyklų
5.A.2.3.2.	Talpyklų tūris ne didesnis kaip 1 l	
5.A.2.4.	Pašarų briketai ir mineralų laižalai	Mažiausias briketų arba laižalų, iš kurių imami ėminiai, skaičius (**): vienas pašarų briketas arba laižalas 25 vienetų partijai, bet ne daugiau kaip keturi briketai arba laižalai
5.A.3.	Jungtinis ėminys Reikia paruošti vieną jungtinį vienos tiriamosios ėminio dalies ėminį. Jungtinį ėminį sudarančių atskirųjų ėminių suminis kiekis turi būti ne mažesnis kaip:	
5.A.3.1.	Piltiniai pašarai:	4 kg
5.A.3.2.	Supakuoti pašarai:	
5.A.3.2.1.	pakuotės, kurių masė didesnė kaip 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	pakuotės, kurių masė ne didesnė kaip 1 kg	keturių pirminių pakuočių turinio masė
5.A.3.3.	Skystieji arba pusiau skysti pašarai:	
5.A.3.3.1.	talpyklų tūris didesnis kaip 1 l:	keturi litrai
5.A.3.3.2.	talpyklų tūris ne didesnis kaip 1 l:	keturių pirminių talpyklų turinio tūris
5.A.3.4.	Pašarų briketai arba laižalai:	
5.A.3.4.1.	kiekvieno masė didesnė kaip 1 kg	4 kg
5.A.3.4.2.	kiekvieno masė ne didesnė kaip 1 kg	keturių pirminių briketų arba laižalų masė

5.A.4.	Galutiniai ėminiai Prireikus iš jungtinio ėminio jį mažinant ruošiami 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
5.B.	Kontroliuojant nepageidaujamas medžiagas arba produktus, kurie gali netolygiai pasiskirstyti pašaruose, pvz., aflatoksinus, rugių skalsę, ricinžolę ir <i>crotalaria</i> (***)	
5.B.1.	Partija: žr. 5.A.1.	
5.B.2.	Atskirieji ėminiai	
5.B.2.1.	Piltiniai pašarai: žr. 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Supakuoti pašarai:	Mažiausias pakuočių, iš kurių imami ėminiai, skaičius:
5.B.2.2.1.	partiją sudaro nuo vienos iki keturių pakuočių	visos pakuotės
5.B.2.2.2.	partiją sudaro nuo penkių iki 16 pakuočių	keturios
5.B.2.2.3.	partiją sudaro daugiau kaip 16 pakuočių	kvadratinė šaknis iš partiją sudarančių pakuočių skaičiaus (*), be ne daugiau kaip 40 pakuočių
5.B.3.	Jungtiniai ėminiai Jungtinių ėminių skaičius skirsis atsižvelgiant į partijos dydį. Toliau nurodomas mažiausias iš vienos partijos paimtų jungtinių ėminių skaičius. Kiekvieną jungtinį ėminį sudarančių atskirųjų ėminių suminė masė turi būti ne mažesnė kaip 4 kg	
5.B.3.1.	Piltiniai pašarai	
	Partijos svoris metrinėmis tonomis:	Mažiausias partijos jungtinių ėminių skaičius:
	iki 1	1
	nuo daugiau kaip 1 iki 10	2
	nuo daugiau kaip 10 iki 40	3
	d daugiau kaip 40	4
5.B.3.2.	Supakuoti pašarai	
	Supakuotų pašarų partijos pakuočių skaičius	Mažiausias partijos jungtinių ėminių skaičius:
	nuo 1 iki 16	1
	nuo 17 iki 200	2
	nuo 201 iki 800	3
	d daugiau kaip 800	4
5.B.4.	Galutiniai ėminiai Iš jungtinio ėminio jį mažinant gaunami galutiniai ėminiai. Reikia atlikti bent vieno galutinio ėminio vienam jungtiniam ėminiui analizę. Analizei paimto galutinio ėminio masė negali būti mažesnė kaip 500 g.	

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

(**) Jei pakuotės arba talpyklos turinio masė ne didesnė kaip 1 kg arba tūris ne didesnis kaip 1 l ir pašarų briketų arba laizalų masė ne didesnė kaip 1 kg, atskirasis ėminys yra vienos pirminės pakuotės arba talpyklos, vieno briketo arba laizalo turinys.

(***) Metodai, numatyti 5.A, taikomi aflatoksinams, rugių skalsei, ricinžolei ir *crotalaria* kontroliuoti visaverčiuose pašaruose ir pašarų papilduose.

6. ĖMINIŲ ĖMIMO, RUOŠIMO IR PAKAVIMO INSTRUKCIJOS

6.1 Bendrosios nuostatos

Ėminiai turi būti imami ir ruošiami kiek įmanoma greičiau, turint omenyje atsargumo priemones, kurios yra būtinos siekiant užtikrinti, kad produktas nepakistų ir nebūtų užterštas. Įrankiai ėminiams imti ir talpyklų, kuriose jie laikomi, paviršiai turi būti švarūs ir sausi.

6.2 Atskirieji ėminiai

6.2.A Kontroliuojant vienodai pašaruose pasiskirsčiusias medžiagas arba produktus

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

6.2.A.1 Piltiniai pašarai

Partija vizualiai dalijama į tam tikrą skaičių maždaug vienodų dalių. Atsitiktinai pasirenkamas dalių skaičius, atitinkantis pagal 5.A.2 punktą reikalaujamą atskirųjų ėminių skaičių, ir iš kiekvienos dalies paimama bent po vieną ėminį.

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

6.2.A.2 Supakuoti pašarai

Atrinkus reikiamą skaičių pakuočių ėminiams imti, kaip nurodyta 5.A.2. punkte, dalis kiekvienos pakuotės turinio paimama bertuve arba zonu. Prireikus ėminiai imami, atskirai ištuštinus pakuotes. Prireikus atskirai kiekvieno jungtinio ėminio gabalai turi būti sutrupinti juos atskiriant nuo ėminio ir grąžinti atgal.

6.2.A.3 Homogeniniai arba homogenizuojami skystieji arba pusiau skysti pašarai

Atrinkus reikiamą skaičių talpyklų ėminiams imti, kaip nurodyta 5.A.2. punkte, jų turinys prireikus homogenizuojamas ir iš kiekvienos talpyklos paimamas tam tikras kiekis.

Atskiruosius ėminius galima imti išpilant talpyklos turinį.

6.2.A.4 Nehomogenizuojami skystieji arba pusiau skysti pašarai

Atrinkus reikiamą skaičių talpyklų ėminiams imti, kaip nurodyta 5.A.2. punkte, ėminiai imami iš skirtingų lygių.

Be to, ėminius galima imti išpilant talpyklos turinį, tačiau pirmosios frakcijos turėtų būti išpiltos lauk.

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

6.2.A.5 Pašarų briketai ir mineralų laižalai

Atrinkus ėminiams imti reikalingą kiekį pašarų briketų arba laižalų, kaip nurodyta 5.A.2. punkte, imama kiekvieno briketo arba laižalo dalis.

6.2.B. Kontroliuojant nepageidaujamas medžiagas arba produktus, kurie gali netolygiai pasiskirstyti pašaruose, pvz., aflatoksinus, rugių skalsę, ricinžolę ir crotalaria

Partija vizualiai dalijama į tam tikrą skaičių maždaug vienodų dalių, atitinkančių 5.B.3 punkte numatytą jungtinių ėminių skaičių. Jeigu šis skaičius didesnis už 1,5.B.2 punkte numatytas suminis atskirųjų ėminių skaičius paskirstomas maždaug vienodai skirtingoms dalims. Tada imami maždaug tokie vienodo dydžio ėminiai ⁽¹⁾, kad suminis ėminių kiekis iš kiekvienos dalies būtų ne mažesnis kaip kiekvienam jungtiniam ėminiui gauti būtinas 4 kg kiekis. Iš skirtingų dalių paimti atskirieji ėminiai neturi būti sujungiami.

⁽¹⁾ Supakuotų pašarų, iš kurių imami ėminiai, pakuočių turinio dalis paimama zonu arba bertuve, prieš tai atskirai ištuštinus pakuotes, jei reikia.

6.3 Jungtinių ėminių ruošimas**6.3.A. Kontroliuojant vienodai pašaruose pasiskirsčiusias medžiagas arba produktus**

Atskirieji ėminiai sumaišomi, kad būtų gautas vienas jungtinis ėminys.

6.3.B. Kontroliuojant nepageidaujamas medžiagas arba produktus, kurie gali netolygiai pasiskirstyti pašaruose, pvz., aflatoksinus, rugių skalsę, ricinžolę ir crotalaria

Atskirieji ėminiai iš kiekvienos partijos dalies sumaišomi ir gaunamas 5.B.3 punkte nurodytas jungtinių ėminių skaičius, imantis priemonių užrašyti kiekvieno jungtinio ėminio kilmę.

6.4 Galutinių ėminių ruošimas

Kiekvieno jungtinio ėminio medžiaga gerai sumaišoma, kad būtų gautas homogenizuotas ėminys ⁽¹⁾ Prireikus jungtinis ėminys iš pradžių sumažinamas bent iki 2 kg arba dviejų litrų (sumažintas ėminys) mechaniniu arba automatinio dalytuvu arba taikant ketvirčiavimo metodą.

Tada ruošiami bent trys maždaug vienodo kiekio galutiniai ėminiai, atitinkantys 5.A.4 arba 5.B.4 punktų kiekybinius reikalavimus. Kiekvienas ėminys sudedamas į atitinkamą talpyklą. Imamasi visų reikalingų atsargumo priemonių, kad gabenant arba saugant negalėtų pasikeisti ėminio sudėtis, jis nebūtų užterštas arba sufalsifikuotas.

6.5 Galutinių ėminių pakavimas

Talpyklos arba pakuotės plombuojamos ir ženklinamos (visa etiketė turi būti po plomba) taip, kad jų nebūtų galima atidaryti, nepažeidus plombos.

7. ĮRAŠAI APIE ĖMINIUS

Turi būti daromi įrašai apie visus ėminius, kad vienareikšmiškai būtų galima nustatyti kiekvieną partiją.

8. ĖMINIŲ PASKIRTIES VIETA

Bent vienas kiekvieno jungtinio ėminio galutinis ėminys kuo skubiau siunčiamas į įgalioją kontrolės laboratoriją kartu su analizę atliekančiam asmeniui būtina informacija.

⁽¹⁾ Prireikus atskirai kiekvieno jungtinio ėminio visi gabalai turi būti sutrupinti juos atskiriant nuo ėminio ir grąžinti atgal.

II PRIEDAS

BENDROSIOS NUOSTATOS DĖL PAŠARŲ ANALIZĖS METODŲ

A. ĖMINIŲ RUOŠIMAS ANALIZEI

1. Tikslas

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

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

2. Taikytinos atsargumo priemonės

Ėminių ruošimo procedūra, kurios reikia laikytis, priklauso nuo taikomo analizės metodo. Todėl labai svarbu užtikrinti, kad ėminių ruošimo procedūra atitiktų taikomą analizės metodą.

Visi būtinosios operacijos turi būti atliktos taip, kad kiek įmanoma būtų išvengta ėminio užteršimo ir jo sudėties pokyčių.

Malama, maišoma ir sijojama kiek įmanoma greičiau, kad ėminį kuo mažiau veiktų oras ir šviesa. Nenaudojami malūnėliai ir smulkintuvai, kurie gali gerokai įkaintinti ėminį.

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

Jei ėminio paruošti neįmanoma gerokai nepakintant jo drėgmės kiekiui, jis nustatomas prieš ėminio ruošimą ir jį paruošus pagal III priedo A dalyje pateiktą metodą.

3. Procedūra

Ėminys dalijamas į analizei ir palyginimui skirtus atitinkamus poėminius, taikant reikiamus dalijimo būdus, pvz., pakaitinį perkasimą, stacionarųjį arba sukamąjį latakinį dalytuvą. Kūgio supylimo ir ketvirčiavimo metodas nerekomenduojamas, nes gali būti gauti poėminiai su didele dalijimo paklaida. Palyginamasis ėminys laikomas tinkamame švariame ir sausame, sandariai uždaromame inde, ir bent 100 g poėminiai ruošiami analizei kaip nurodyta toliau.

3.1 Pašarai, kuriuos galima malti be paruošimo

Jei analizės metuose nenurodyta kitaip, prireikus visas sumaltas ėminys sijojamas per sietą su kvadratinėmis 1 mm dydžio akutėmis (pagal ISO R565 rekomendaciją). Vengiama malti labai smulkiai.

Sijotas ėminys sumaišomas ir sudedamas į tinkamą švarų ir sausą, sandariai užkemšamą indą. Dar kartą sumaišoma prieš sveriant analizei reikiamą ėminio kiekį.

3.2 Pašarai, kurie prieš malant džiovinami

Jei analizės metuose nenurodyta kitaip, 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 skirsnyje.

3.3 Skystieji arba pusiau skysti pašarai

Ėminys supilamas į tinkamą švarų ir sausą, sandariai užkemšamą indą. Dar kartą sumaišoma prieš sveriant analizei reikiamą ėminio kiekį.

3.4 Kiti pašarai

Ėminiai, kurių neįmanoma paruošti pagal kurią nors pirmiau pateiktą procedūrą, apdorojami taikant bet kurią kitą procedūrą, kuri užtikrintų, kad analizei pasverti ėminiai būtų vienalyčiai ir atitiktų galutinius ėminius.

4. Ėminių laikymas

Ėminiai turi būti laikomi temperatūroje, kurioje nekistų jų sudėtis. Vitaminų analizei skirti ėminiai arba šviesai ypač jautrūs ėminiai laikomi rudo stiklo induose.

B. NUOSTATOS DĖL ANALIZĖS METODAMS NAUDOJAMŲ REAGENTŲ IR APARATŪROS

1. Jei analizės metuose nenurodyta kitaip, visi analiziniai reagentai turi būti analiziškai grynai (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, apie kurias kalbama analizės metuose, 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 metuose nurodomi tik specialios paskirties arba tam tikru būdu naudojami prietaisai ir aparatai. Jie turi būti švarūs, ypač kai reikia nustatyti mažus cheminių medžiagų kiekius.

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. Taikyto analizės metodo pateikimas ataskaitoje

Paprastai kiekvienai pašaruose esančiai cheminei medžiagai nustatyti pateikiamas vienas analizės metodas. Jei pateikiami keli metodai, kontrolės laboratorijos taikomas konkretus metodas turi būti nurodytas analizės ataskaitoje.

4. Nustatymų skaičius

Analizės ataskaitoje pateikiamas rezultatas turi būti tinkamo pakartojamumo vidutinė vertė, gauta atliekant mažiausiai du atskirų ėminio dalių nustatymus.

Tačiau, jei analizuojant nepageidaujamas medžiagas, pirmojo nustatymo rezultatas yra gerokai ($> 50\%$) mažesnis nei kontroliuojama specifikacijos vertė, papildomas nustatymas nebūtinai, jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros.

Jei atliekant nurodyto medžiagos arba sudedamosios dalies kiekio kontrolę, pirmojo nustatymo rezultatas patvirtina nurodytą kiekį, t. y. analizės rezultatas atitinka priimtina nurodyto kiekio kitimo intervalą, papildomas nustatymas nebūtinai, jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros.

Kai kuriais atvejais priimtinas kitimo intervalas yra apibrėžtas teisės aktuose, pvz., Tarybos direktyvoje 79/373/EEB ⁽¹⁾.

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 86, 1979 4 6, p. 30.

6. Matavimo neapibrėžtis ir išgavos dydis atliekant nepageidaujamų medžiagų analizę

Dėl nepageidaujamų medžiagų, kaip apibrėžta Direktyvoje 2002/32/EB, įskaitant dioksinus ir dioksinų tipo PCB, laikoma, kad gyvūnų pašarams skirtas produktas neatitinka nustatyto didžiausio kiekio, jei manoma, kad analizės rezultatas viršija didžiausią kiekį, įskaitant išplėstinę matavimo neapibrėžtį ir išgavos dydžio pataisą. Atitiktčiai 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 „ $x \pm U$ “, 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 su ta sąlyga, kad taikomos atitinkamos kokybės procedūros, o analizės tikslas yra tik patikrinti atitiktį teisinėms nuostatomis, analizės rezultatą būtų galima pateikti ataskaitoje be išgavos dydžio pataisos ir išgavos dydžio bei matavimo neapibrėžties tais atvejais galima nenurodyti.

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 nesugeriausių 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/cm² tankiu.

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

3.5 Reguluojama elektrinė vakuuminė džiovinimo spinta, turinti alyvos siurbį 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.

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 %.

⁽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. Ventilacija 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 %.

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

Maždaug 25 g ėminio pasveriamas 10 mg tikslumu, įdedamas reikiamas kiekis sauso smėlio, pasverto 10 mg tikslumu, ir maišoma tol, kol gaunamas vienyti 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 pasveriamas 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 pasveriamas 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 ankšty, hidrolizuotieji javų produktai, salyklas, džiovininti 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 pasveriamas 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 tokiaime 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 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 pasveriamas. 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) pasveriamas 50 g *nesusmulkinto* ėminio 10 mg tikslumu (prireikus presuotas 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 vėsinaamas 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) pasveriamas 50 g nesusmulkinto ėminio 10 mg tikslumu. 5–7 min džiovinama džiovinimo spintoje 130 °C temperatūroje. Ėminys išimamas iš džiovinimo spintos, neuždengtas dvi valandas vėsinaamas 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;
m₀ = 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,
m₁ = tiriamojo ėminio svoris po pradinio džiovinimo gramais,
m₂ = tiriamojo ėminio svoris po smulkinimo arba malimo gramais,
m₀ = išdžiovinto tiriamojo ėminio svoris gramais.

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 perskačiuoti 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 pasveriamą 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 pasveriamą. 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:

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

kurioje:

m = tiriamojo ėminio svoris gramais;

m₁ = indo su turiniu svoris prieš kaitinimą gramais;

m₂ = indo su 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 % absoliučiaja verte.

C. **ŽALIŲ BALTŲMŲ 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 išsiskyres 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 3.3 Cinko granulės
- 3.4 Sieros rūgštis, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$
- 3.5 Sieros rūgštis, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$
- 3.6 Sieros rūgštis, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$
- 3.7 Sieros rūgštis, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$
- 3.8 Indikatorius metilraudonasis: 300 mg metilraudonojo ištirpinama 100 ml etanolio, $\sigma = 95\text{--}96 \text{ \% (V/V)}$
- 3.9 Natrio hidroksido tirpalas (galima naudoti techninį hidroksidą) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/V: 40 \%)}$
- 3.10 Natrio hidroksidas, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$
- 3.11 Natrio hidroksidas, standartinis tūrinės titrimetrijos tirpalas, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$
- 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
- 3.17 Bromkrezolio žaliajo tirpalas: 100 mg bromkrezolio žaliajo 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 žaliajo indikatorių. Jei ruošiamas 1 litras boro rūgšties tirpalo, prieš skiedžiant iki žymės įpilama 7 ml metilraudonojo indikatoriaus tirpalo (3.16) ir 10 ml bromkrezolio žaliajo 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 $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$
- 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 pasveriamas 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, prirėkus įmetamos kelios pemzos granulės (3.12) ir sumaišoma.

Kolba iš pradžių šildoma, kartkartėmis ją sukiojant, ant nestiprios ugnies tol, kol masė suanglėja ir nelieta 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 neprilptų 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 ištirtų 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).

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 automatinio 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).

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:

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

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 acetanilido 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 sienoje.
- 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.

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 ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Šį reagentą galima laikyti ne ilgiau kaip dvi savaitės.
- 3.2 *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.3 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.4 Aktyvintosios anglis, 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 pasveriamas 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.

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 žaliajo 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 NH₃.
- 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 pasverama 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.

6. Rezultatų apskaičiavimas

1 ml 0,01 mol/l H₂SO₄ atitinka 0,34 mg amoniako.

Rezultatai išreiškiami ėminio masės procentais.

Pakartojamumas

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

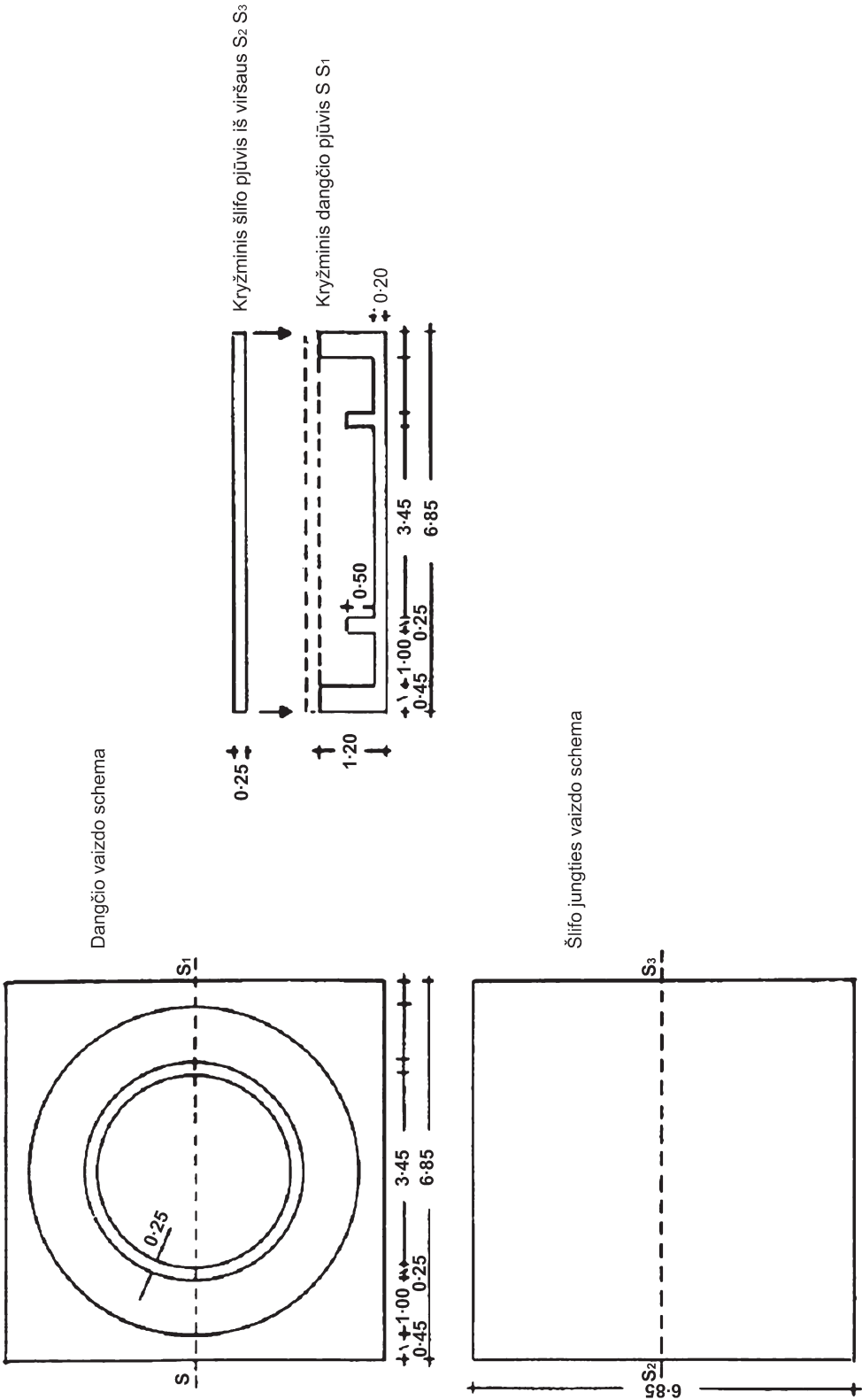
- 10 % santykinės vertės, kai amoniako kiekis mažesnis nei 1,0 %;
- 0,1 % absoliučiąja verte, kai amoniako kiekis 1,0 % arba didesnis.

7. Pastaba

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

CONWAY CELL

Scale 1/1



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 mažesniai nei 0,25 % amoniako kiekiui.

2. Metodas

Ėminys ekstrahuojamas vandeniu, tirpalas skaidrinamas ir filtruojamas. Lakiosios azoto bazės išstumiamos virimo temperatūroje, pridėdant 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., siloksanai).

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 suk./min.

4.2 Distiliavimo aparatas, Kjeldalio tipo.

5. Procedūra

10 g ėminio pasverama 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 suminių (peptidų ir laisvųjų) aminorūgščių kiekį pašaruose. Šis metodas tinka šioms aminorūgštims:

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 peroksiskrudžių 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 fotometrinio 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 Skrudžių 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 trinario 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.

3.14 Azoto dujos (< 10 ppm deguonies).

3.15 1-oktanolis.

- 3.16 Aminorūgštys.
- 3.16.1 1 skirsnyje išvardytų medžiagų etalonai. Gryniesi 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, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
300 g NaOH (3.5) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 litro.
- 3.18 Natrio hidroksido tirpalas, $c = 1 \text{ mol/l}$:
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, $c = 6 \text{ mol/l}$ 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, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ 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, $\beta = 6 \%$:
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).
Išpėjimas. Vengiama patekimo ant odos ir dėvimi apsauginiai drabužiai.
- 3.24 Citratinis buferinis tirpalas, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, 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.
- 3.27.1 Aminorūgščių pradiniai etaloniniai tirpalai (3.16.1).
 $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ kiekvienos rūgšties tirpalas vandenilio chlorido rūgštyje.
Galima naudoti esančius prekyboje.
- 3.27.2 Cistino rūgšties ir metionino sulfono pradinis etaloninis tirpalas, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
0,2115 g cistino rūgšties (3.16.2) ir 0,2265 g metionino sulfono (3.16.3) ištirpinama citratiname buferiniame tirpale (3.24) 1 litro matavimo kolboje, iki žymės skiedžiama citratinu buferiniu tirpalu. Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 12 mėnesių. Šis tirpalas nenaudojamas, jei pradiniam etaloniniame tirpale (3.27.1) yra cistino rūgšties ir metionino sulfono.

- 3.27.3 Pradinis vidinio etalono, pvz.: norleucino, tirpalas, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

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, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ cistino rūgšties ir metionino sulfono ir $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ 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 grįžtamuju kondensatoriumi.
- 4.2 100 ml borosilikatinio stiklo butelis su užsukamu kamščiu ir guminiu ar tefloniniu tarpikliu (pvz.: *Duran*, *Schott*), tinkamas naudoti krosnyje.
- 4.3 Ventiliuojama krosnis su temperatūros regulatoriumi, kurio tikslumas geresnis nei $\pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.4 pH-metras (trys skaičiai po kablelio).
- 4.5 Membraninis filtras ($0,22 \mu\text{m}$).
- 4.6 Centrifuga.
- 4.7 Sukamasis vakuuminis garintuvas.
- 4.8 Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.
- 4.9 Aminorūgščių analizatorius arba HPLC įranga su jonų mainų kolonėle, reakcijos su ninhidrinu įtaisu, darinių gavimo įtaisu ir fotometrinio 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 siurbiais, srauto stabilumas – $\pm 0,5\%$ kalibravimo tirpalo ir ėminio analizės metu.

Su kai kuriais aminorūgščių analizatoriais galima naudoti hidrolizės procedūras, kai hidrolizato natrio jonų koncentracija $c = 0,8 \text{ mol/l}$ 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 $0,5 \text{ mm}$ sieta. 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 citratinio buferiniu tirpalu (3.24) supilama į tinkamo tūrio matavimo kolbą ir citratinio 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 *Oksidavimas*

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

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

Pasvortoje 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 pasveriamas 0,1–1 g paruošto ėminio (5.1). Pasvortoje 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 grįžtamuju 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 sprogo, 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.

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 citratinio 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 $\pm 0,5$ % 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.

Paprastai kalibravimo dažnis priklauso nuo ninhidrino reagento stabilumo ir analizinės sistemos. Etalonas arba ėminys skiedžiamas citratinio 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 atsiskyrimas 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 ekstrakto smailės plotas

D = vidinio etalono, kalibravimo etaloninio tirpalo smailės plotas

M = nustatomos aminorūgšties molinė masė

c = etalono koncentracija $\mu\text{mol/ml}$

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 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, $M = 240,30 \text{ g/mol}$), naudojant $M = 120,15 \text{ g/mol}$ ($0,5 \times 240,30$).

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

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:

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

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.

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

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Premikšas	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
Premikšas	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
Premikšas	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = dalyvavusių laboratorijų skaičius.

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 citratinu 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 ekstrakto 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-metiltryptofanas (grynumas/kiekis ≥ 99 %), išdžiovintas vakuume virš fosforo pentoksido.
- 3.4 Bario hidroksido oktahidratas (siekiama išvengti BaCO₃ susidarymo, kuris galėtų trukdyti nustatymui, užtikrinama, kad Ba(OH)₂·8H₂O visiškai nesiliestų su oru) (žr. 9.3 pastabą).
- 3.5 Natrio hidroksidas.
- 3.6 Ortofosforo rūgštis, w = 85 %.
- 3.7 Vandenilio chlorido rūgštis, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8 Metanolis, HPLC grynumo.
- 3.9 Petroleteris, virimo temperatūros intervalas – 40–60 °C.
- 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, $c = 1 \text{ mol/l}$:
paimama 82 ml HCl (3.7) ir skiedžiama iki 1 l vandeniui.
- 3.13 Vandenilio chlorido rūgštis, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
paimama 8,2 ml HCl (3.7) ir skiedžiama iki 1 l vandeniui.
- 3.14 Orto fosforo rūgštis, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
paimama 34 ml ortofosforo rūgšties (3.6) ir skiedžiama iki 1 l vandeniui (3.1).
- 3.15 Koncentruotas triptofano tirpalas (3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
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 $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ne ilgiau kaip keturias savaites.
- 3.16 Koncentruotas vidinio etalono tirpalas, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
į 500 ml matavimo kolbą įdedama 0,2728 g α -metiltryptofano (3.3), ištirpinama vandenilio chlorido rūgštyje (3.13) ir skiedžiama iki žymės vandenilio chlorido rūgštimi (3.13). Laikoma $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 -metiltryptofano) tirpalo (3.16). Skiedžiama vandeniu (3.1) ir metanoliumi (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. Vandeniui (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.
- 4.5 Membraninis filtras, 0,45 μm .
- 4.6 Autoklavas, 110 (± 2) $^{\circ}\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) 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, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (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, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Natrio hidroksido tirpalu, $c = 1,0 \text{ mol/l}$, (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 chromatografinės analizės 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 pasveriamas 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 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ išsikristalizavimo, į šiltą mišinį įpilama 30 ml kambario temperatūros vandens. Švelniai purtoma arba maišoma. Įpilama 2,00 ml koncentruoto vidinio etalono (α -metiltryptofano) tirpalo (3.16). Indai 15 min aušinami ant vandens arba ledo vonios.

Tada įpilama 5 ml ortofosforo rūgšties, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Indą laikant ant aušinamosios vonios ir maišant, turinys neutralizuojama HCl, $c = 6 \text{ mol/l}$ (3.11), ir HCl, $c = 1 \text{ mol/l}$ (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 chromatografinės analizės reikiamo tūrio (pvz., 100 ml). Įpylus metanolio, nuosėdos nesusidaro.

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 ekstrakto (5.2) ar hidrolizate (5.3) smailės plotas

V₁ = 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)

V₂ = 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

V₃ = 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.

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, %

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 milte- liai (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, C₁₈, 5 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė

Kolonėlės temperatūra: 32 °C

Judančioji fazė: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/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. 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 ėminių 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 atvėsinaamas ir filtruojamas. Likutis plaunamas, džiovinamas ir ekstrahuojamas pagal A procedūrą.

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, $c = 3 \text{ mol/l}$

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 $75 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, arba spinta su oro cirkuliacija, nustatyta $100 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Procedūra

5.1 A procedūra (žr. 8.1 punktą)

5 g ėminio pasveriamas 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 pempzos gabaliukais ⁽¹⁾.

Tirpiklis distiliuojamas. Likutis džiovinamas kolbą laikant džiovinimo spintoje (4.3) pusantros valandos. Kolba atvėsinama eksikatoriuje ir pasveriamas. 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 pasveriamas 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 pempzos gabaliukai. Stiklinė uždengiama laikrodžio stiklu arba kūginė kolba sujungiama su grįžtamuoju kondensatoriumi. Mišinys atsargiai užverdama 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.

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

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

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 vienaščiui tiriamajam ėminiui paimti, daroma taip.

20 g ėminio pasverama 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 likučiu 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.
- 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 pririnkus 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 ląstelių kiekis tiriamajame ėminyje atitinka masės sumažėjimą po sudeginimo.

3. Reagentai

3.1 Sieros rūgštis, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.

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, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

3.7 Kalio hidroksido tirpalas, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

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 siurbį, gali būti suslėgto oro. Kiekvieną dieną prieš naudojimą blokas penkias minutes šildomas verdančiu vandeniu.

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

4.3 Ne mažesnės nei 270 ml talpos cilindras su grįžtamuju 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 pasveriami 1 g paruošto ėminio, ėminys dedamas į tigli (4.2) (žr. 8.1, 8.2 ir 8.3 pastabas) ir pridedama 1 g pagalbinės filtravimo priemonės.

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

Užvirinama per $5 \pm 2 \text{ min}$ ir stipriai virinama lygiai 30 min.

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

Išleidžiamasis čiapas užsukamas, į cilindro ir tiglio sąranką įpilama 150 ml verdančio kalio hidroksido tirpalo (3.7) ir įlašinami keli lašai priešpučio (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 tигlis 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 sausas.

Tiglis džiovinamas džiovinimo spintoje iki pastoviosios masės $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po kiekvieno džiovinimo tигlis atvėsinaamas eksikatoriuje ir greitai pasveriamas. Tигlis dedamas į mufelinę krosnį ir ne mažiau nei 30 min iškaitinamas $475\text{--}500\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki pastoviosios masės.

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

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

Žalios ląstelių 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 ląstelių kiekis mažesnis nei 10 %;

— 6 % didžiausiojo rezultato vertės, kai žalios ląstelių 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 tигlis (4.2) su jame esančia medžiaga prijungiamas prie šaltojo ekstrahavimo įrenginio (4.6) ir prijungus vakuumą likutis tris kartus plaunamas 30 ml petroleterio porcijomis (3.7), užtikrinant, kad likutis būtų sausas. Tигlis 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, tигlis 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, tiglio (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 etanolio; 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 fenolfaleiną.
- 3.2 *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.3 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. 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.
- 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 ($\text{Cu} - 0,05 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 1 \text{ mol/l}$), žr. 5.4. paskutinę pastraipą. Tirpalo pH yra apie 9,4.

- 3.8.1 Vario sulfato tirpalas: 25 g vario sulfato, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, neturinio 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 atvėsinaamas, 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-1-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. Etanolio (3.1) skiedžiama iki žymės, sumaišoma ir filtruojama. Įmama 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 atvėsinaamas, 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 (3.6), kolba nuleidžiama į stipriai verdančio vandens vonią, kurioje laikoma trisdešimt minučių. Tirpalas greitai atvėsinaamas 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 skylė, 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 atvėsinaama 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 pasveriami 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) etanolio.

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 suminių 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).
- 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 galutiniais 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

Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l tūris ml, dviejų minučių trukmės šildymas, dešimties minučių trukmės virimas

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Gliukozė, fruktozė, invertuoti sacharidai C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktozė C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltozė C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
	mg	skirtumas	mg	skirtumas	mg	skirtumas	
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

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(CH₃COO)₂·2H₂O ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.3 Carrez II tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), K₄Fe(CN)₆·3H₂O. 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; Na₂CO₃ – 1 mol/l). Tirpalo pH yra apie 9,4.

- 3.4.1 Vario sulfato tirpalas: 25 g vario sulfato, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, neturinio geležies, ištirpinama 100 ml vandens.
- 3.4.2 Citrinų rūgšties tirpalas: 50 g citrinų rūgšties, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 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 atvėšinamas, 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 pasverama 1 mg tikslumu ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Įpilama 25–30 ml vandens. Kolba 30 min laikoma verdančio vandens vonioje ir atvėšinama 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. Atvėšinama 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 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 skylė, 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 atvėšinama 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) indikatorius 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, išreikšiamą 0,1 mol/l natrio tiosulfato tirpalu 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

Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l tūris ml, dviejų minučių trukmės šildymas, dešimties minučių trukmės virimas

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Gliukozė, fruktozė, inver- tuoti sacharidai C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktozė C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltozė C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
	mg	skirtumas	mg	skirtumas	mg	skirtumas	
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

L. KRAKMOLO NUSTATYMAS

POLIARIMETRINIS METODAS**1. Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti krakmolo ir didelės molekulinės masės krakmolo skilimo produktų kieki pašaruose, siekiant patikrinti atitiktį nurodomai energinei vertei (VII priedo nuostatomis) 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 % etanolio. 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.

⁽¹⁾ OL L 125, 1996 5 23, p. 35.

- 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, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.4 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. 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 pasveriamas 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 kratoma, kad nesusidarytų aglomeratų. Vandens vonioje turi būti pakankamai daug, kad panardinus į ją matavimo kolbą, jis nenustotų viršes. 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, koku kampu tirpalas suka poliarizuotos šviesos plokštumą.

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

1 mg tikslumu pasveriamas 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 etanolio. Skiedžiama iki žymės etanolio (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

Kraskmolo kiekis (%) ėminyje apskaičiuojamas taip:

6.1 Matavimas poliarimetru

$$\text{Kraskmolo kiekis (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, laipsniais;

- P' = 40 % etanolyje tirpių medžiagų tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, laipsniais;
- $[\alpha]_D^{20}$ = 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

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

- 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° sacharimetro laipsnių
- 16,29 g prancūziškų sacharimetų
 - 26,00 g vokiškų sacharimetų
 - 20,00 g kitų sacharimetų
- $[\alpha]_D^{20}$ 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 ėminių 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 °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.

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, porcelanianiai 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 linę išsipūsti produktai) pasveriami 1 mg tikslumu ir supilama į ėminiui sudeginti skirtą tigli, 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, atvėsunami ir į juos įlašinami keli lašai 20 % amonio nitrato tirpalo arba vandens (lašinama atsargiai, kad pelenai neišsisklaidytų arba nesusoktų 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 bepelelių filtrą. Filtras su turiniu sudeginamas prieš tai naudotame tiglyje. Į atvėsintą tigli supilamas filtratas, tirpalas išgarinamas iki sauso likučio, likutis iškaitinamas ir pasveriamas.

- 7.3 Analizuojant *aliejus 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.

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 sveriamas.
- 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 rūgšties reakcijos. Filtras su likučiu džiovinamas ir pasvertame tiglyje sudeginamas ne žemesnėje nei 550 °C, bet ne aukštesnėje nei 700 °C temperatūroje. Tiglius atvėsinaamas eksikatoriuje ir pasveriamas.

5.2 *B metodas*

5 g ėminio pasveriamas 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 krakmolai,

kurio galėjo būti ėminyje. Šiltas tirpalas filtruojamas per bepelenį filtrą, likutis plaunamas 50 ml šilto vandens (žr. 7 pastabą). Filtras su likučiu dedamas į tįglį ėminiui sudeginti, 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 skintis.

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).

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 = CO₂ tūris, kuris susidaro iš ėminio, ml;

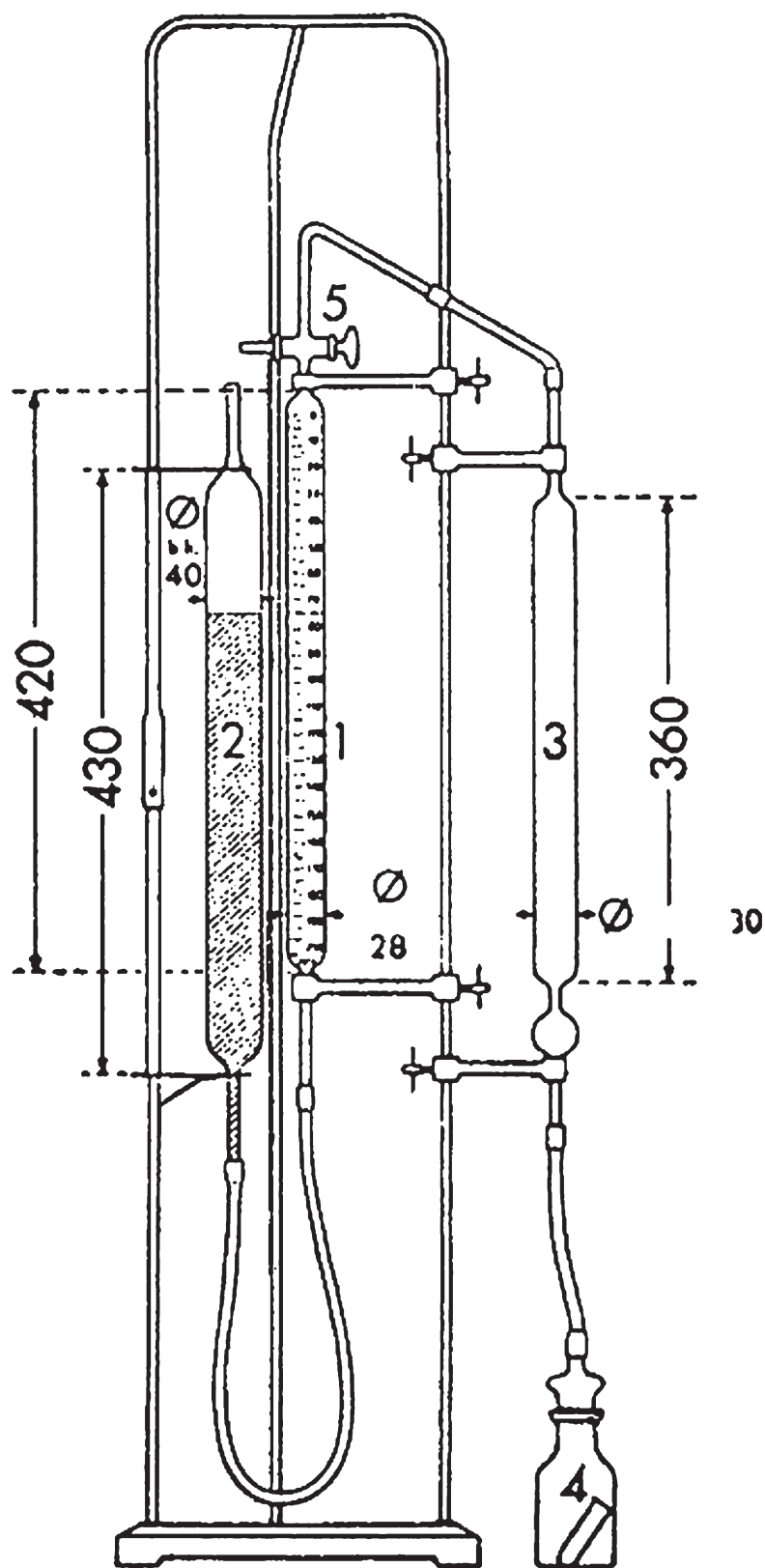
V₁ = CO₂ tūris, kuris susidaro iš 0,5 g CaCO₃, ml;

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 kitoki tūrį, nei *Scheibler-Dietrich* aparato tūris, sveriamo ėminio masė ir kontrolinio ėminio masė bei rezultatų apskaičiavimas turi būti atitinkamai pakeisti.

SCHEIBLER-DIETRICH APARATAS CO₂ NUSTATYMU

(matuojama mm)

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, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (maždaug 6 mol/l)

3.3 Azoto rūgštis, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml

3.4 Azoto rūgštis, $\rho_{20} = 1,38\text{--}1,42$ g/ml

3.5 Sieros rūgštis, $\rho_{20} = 1,84$ 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 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$. 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

Pasverama 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 neprilptų ant kolbos sienelių, pakaitinama iki virimo ir virinama 10 min. Kolba paliekama 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 pasverama 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.

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 $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 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, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.8 *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.9 Aktyviosios anglis, 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 pasveriami 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 pasveriami ne daugiau nei 5 g ėminio, kuris kartu su 1 g aktyviųjų 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.

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 krakmolos)

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 koaguluotų. 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.
-

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, $\sigma = 96\%$.

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

3.3 Metanolis.

3.4 Kalio hidroksido tirpalas, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$.

3.5 Natrio askorbato tirpalas, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (žr. 7.7 pastabas).

3.6 Natrio sulfidas, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).

3.6.1 Natrio sulfido tirpalas glicerolyje, $c = 0,5\text{ mol/l}$, $\beta = 120\text{ g/l}$ (kai $x = 9$) (žr. 7.8 pastabas).

3.7 Fenoltaleino tirpalas etanolyje (3.1), $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$.

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., $2,80 \times 10^6\text{ IU/g}$

3.11.1 Visos *trans*-vitamino A acetato pradinis tirpalas: į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamas 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., $1,80 \times 10^6\text{ IU/g}$

3.12.1 Visos *trans*-vitamino A palmitato pradinis tirpalas: į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamas 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, C₁₈, 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 spinduliutei 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.

5.2 Muilinimas

Atsižvelgiant į A vitamino kiekį, 1 mg tikslumu pasveriami 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 įmerkama į vandens vonią su magnetine maišykle (4.7). Šildoma iki virimo ir verdama 5 min su grįžtamuju kondensatoriumi. Tuomet per kondensatorių (4.3) įpilama 25 ml kalio hidroksido tirpalo (3.4) ir dar 25 min. verdama su grįžtamuju 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 sukančiant piltuvą (kad nesusidarytų emulsija), purtant piltuvą ekstraktai toliau plaunami 100 ml vandens porcijomis tol, kol vandeninis sluoksnis lieka bespalvis, kai įpilama fenoltaleino 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 piltuvai 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 °C. Įleidžiant azoto (3.10), 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) (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 250 mm × 4 mm, C_{18} , 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė (4.5.1):

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 metanolio (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 metanolio (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).

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:

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

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

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:

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

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

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:

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

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

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

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

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

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 didesnę 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 % didžiausio rezultato vertės.

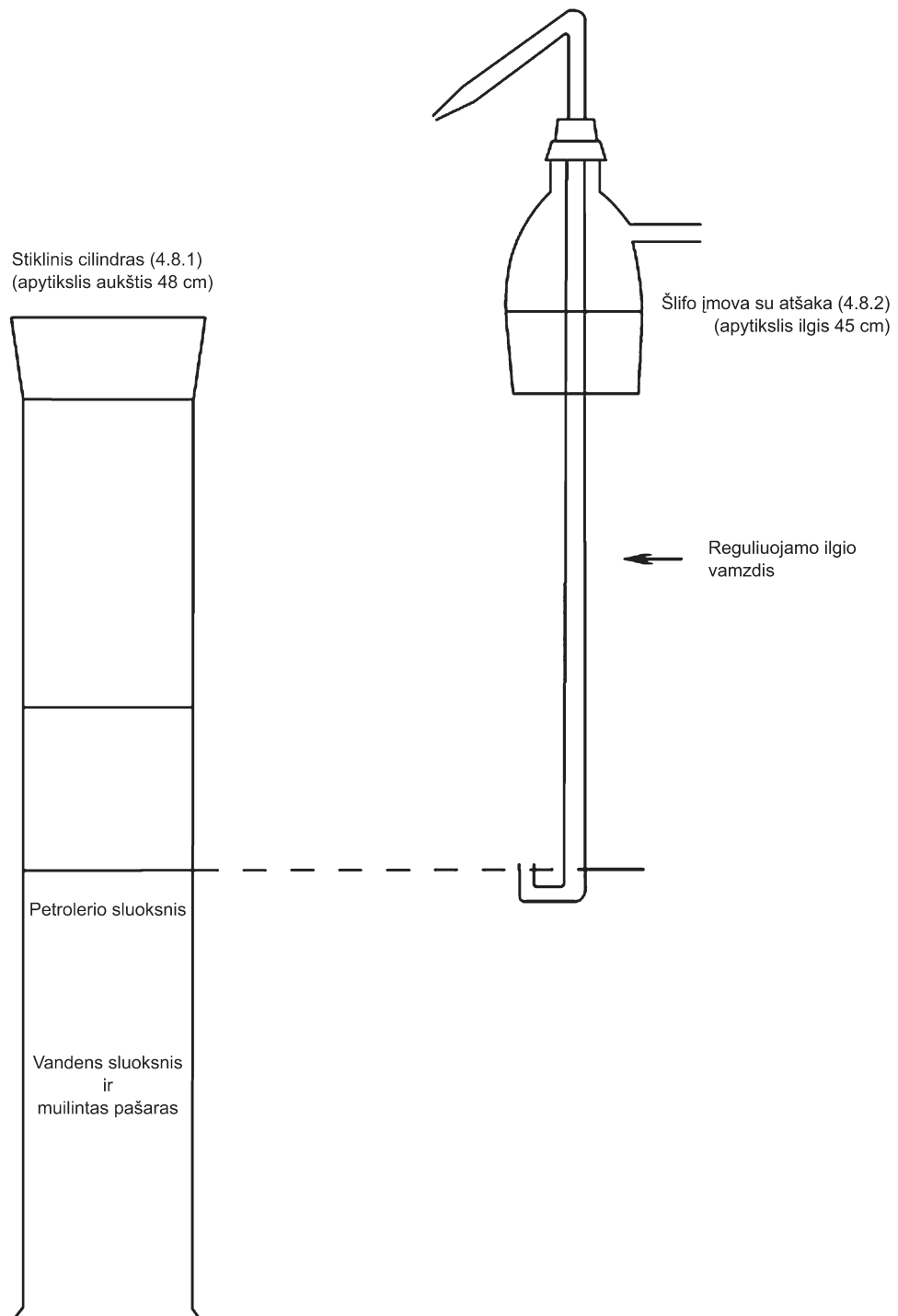
9. **Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai ⁽¹⁾**

	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).

1 paveikslas Ekstrahavimo aparatas (4.8)



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, $\sigma = 96 \%$
- 3.2 Petroleteris, virimo temperatūros intervalas 40 °C–60 °C
- 3.3 Metanolis
- 3.4 Kalio hidroksido tirpalas, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5 Natrio askorbato tirpalas, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (žr. 7.7 pastabas)
- 3.6 Natrio sulfidas, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7\text{--}9$)
- 3.6.1 Natrio sulfido tirpalas glicerolyje, $c = 0,5 \text{ mol/l}$, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (kai $x = 9$) (žr. 7.8 pastabas)
- 3.7 Fenoltaleino tirpalas etanolyje (3.1), $c = 2 \text{ g/100 ml}$
- 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) pasveriamas 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) pasveriamas 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
- 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, C₁₈, 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 sluoksnius galėtų būti supiltas į dalijamąjį piltuvą.

5. Procedūra

Pastaba E vitaminas yra jautrus ultravioletinei spinduliavimui 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 pasveriamas 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 įmerkiamą į vandens vonią su magnetine maišykle (4.7). Šildoma iki virimo ir verdama 5 min su grįžtamuju kondensatoriumi. Tuomet per kondensatorių (4.3) įpilama 25 ml kalio hidroksido tirpalo (3.4) ir dar 25 min. verdama su grįžtamuju 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 sluoksnius 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 sukančiant piltuvą (kad nesusidarytų emulsija), purtant piltuvą ekstraktai toliau plaunami 100 ml vandens porcijomis tol, kol vandeninis sluoksnis lieka bespalvis, kai įpilama fenolfaleino 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 atsaką 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 μ g/ml–30 μ g/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).

Alikvotinė metanolinio tirpalo, gauto pagal 5.4 dalį, dalis (pvz., 20 μ l) 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 lygiavertė rezultatai.

Skysčių chromatografijos 250 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , 5 arba 10 μ m įkrova, arba lygiavertė kolonėlė (4.5.1):

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 μ g DL- α -tokoferolio viename ml, tai atitinka 50 μ g 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 metanolio (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) etanolio 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:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ esant } 284 \text{ nm etanolyje}$$

Esant šiam praskiedimui, gauta ekstinkcijos koeficiento vertė turi būti 0,84–0,88.

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 metanolio 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 metanolio (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) etanolio 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:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ esant } 292 \text{ nm, etanolyje}$$

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

V₁ = ėminio tirpalo (5.4) tūris ml

V₂ = 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).
- 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 hidrolizuoja 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 pre- miksais	Mineralų kon- centratas	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

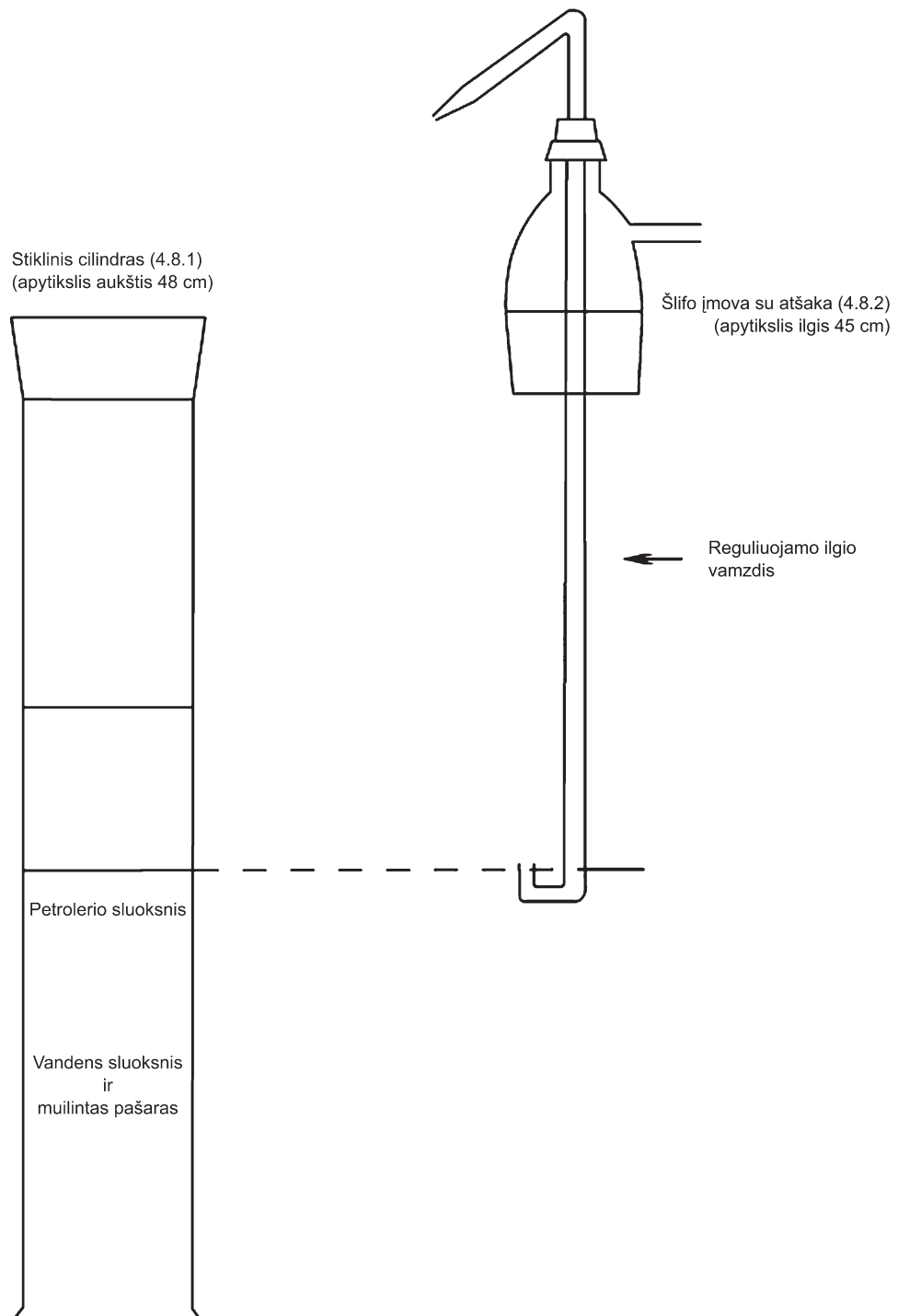
R = atkuriamumas

CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas

CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas

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

1 paveikslas Ekstrahavimo aparatas (4.8)



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***Išvardinės 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 grynai. 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 fluorida 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.
- 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 tiglą (4.3) (žr. (b) pastabą), džiovinama 105 °C temperatūroje džiovintame 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 atvėsti (žr. d) pastabą).

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 CO₂ susidarymo gali vykti audringa reakcija). Vandenilio chlorido rūgštis (3.1) į stiklinę lašinama maišant tirpalą tol, kol nustoja skintis dujų burbuliukai. Išgarinama iki sauso likučio, retkarčiais maišant stikline lazdele.

⁽¹⁾ Galima taikyti kitus skaidymo būdus, jei būtų įrodyta, kad gaunami panašūs rezultatai (pvz., skaidymas autoklave aukšto dažnio spinduliuote).

⁽²⁾ Žaliuose pašaruose (šviežuose 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 tiglą. Filtras deginamas mufelinėje krosnyje (4.1) žemesnėje kaip 550 °C temperatūroje tol, kol visiškai išnyksta anglinė medžiaga. Paliekama atvėsti, įlašinami keli lašai vandens, 10–15 ml vandenilio fluorida rūgšties (3.4) ir garinama iki sauso likučio maždaug 150 °C temperatūroje. Jei likutėje dar lieka kažkiek silicio dioksido, likutis pakartotinai tirpinamas keliuose mililitruose vandenilio fluorida rūgšties (3.4) ir išgarinamas iki sauso likučio. Įlašinami penki lašai sieros rūgšties (3.5) ir kaitinama tol, kol nustoja skintis 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.

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 apytikrą 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 ruošiami 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.

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-acetilenų oksiduojančiąją liepsną, esant šiems bangų ilgiams:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

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)acetoni]-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.

3.6 Halofuginono etaloninė medžiaga (DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]-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 pasveriamas 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 HCl (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 tirpalu (3.18) ir 1 200 ml vandens (3.14). Acto rūgštimi (3.5) nustatoma pH 4,3. Tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m filtrą (4.8) ir degazuojamas (pvz., 10 min ultragarsu). Šis tirpalas stabilus vieną mėnesį, jei laikomas uždareme inde ir tamsoje.
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 $\times$ 4 mm, C₁₈, 10 μ m įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.
- 4.5 Stiklinė kolonėlė (300 mm $\times$ 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 pasverama 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.

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 metanolio (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. Niekomet neleidžiama skysčiui visiškai ištekti 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. Eliavimo 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 tęsimas esant ne didesniai 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 judančiąją fazę (3.21), likutis kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Skiedžiama judančiąją fazę iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė dalis filtruojama per membranınį 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.

Išpurškiamas tūris: 40 µl–100 µl.

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus išpurškiant 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) išpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių (arba plotų) vidurkiai, o abscisų ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.4.3 Ėminio tirpalas

Kelias kartus išpurškiamas 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 detektorius, 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 ekstrakto 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:

- 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;
- 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;
- 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.

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.

⁽¹⁾ The Analyst, 108, 1983, p. 1 252–1 256.

2. Metodus

Ėminys ekstrahuojamas parūgštintu metanolio. Ekstraktas džiovinamas, alikvotinė ekstrakto dalis gryninama, naudojant kolonėlę su aliuminio oksidu. Robenidinas iš kolonėlės plaunamas metanolio, koncentruojamas ir judančiojoje 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 ($p_{20} = 1,18$ g/ml) įpilama į 500 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės metanolio (3.1) ir sumaišoma. Tirpalas turi būti ruošiamas prieš naudojimą.

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 μ m akytumo filtrą (4.6), tirpalas degazuojamas (pvz., 10 min veikiant ultragarsu).

3.9 Etaloninė medžiaga

Grynas robenidinas: 1,3-bis[(4-chlorbenziliden)amino]guanidino hidrochloridas.

3.9.1 Robenidino pradinis etaloninis tirpalas: 300 μ g/ml

0,1 mg tikslumu pasveriamas 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 judančioje fazėje (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 judančioje fazėje (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

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, C₁₈ 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 pasveriami 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. Pasveriamas 11,0 g paruošto aliuminio oksido (3.5) ir supilama į kolonėlę. Siekiama, kad pilant sąlytis su oru būtų kiek įmanoma mažesnis. Švelniai tapšnoojama per užpildomos kolonėlės apačią, kad aliuminio oksidas suslūgtų.

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 abscisų 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.

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 ekstrakto 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:

- 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;
- 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;
- 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 didesniai 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:

	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-tetrahydro-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 metanolio. Jei tai pašarai, ekstrakto alikvotinė dalis gryninama C₁₈ 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, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8 Etaloninė medžiaga: garantuoto grynumo diklazurilas II-24: (+)-4-chlorfenil[2,6-dichlor-4-(2,3,4,5-tetrahydro-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 pasverama 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.

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 -metil-benzenacetonitrilas

3.9.1 Vidinio etalono pradinis tirpalas, 500 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasverama 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/1 000 mg/ml

(p – diklazurilo vardinė koncentracija premikse, mg/kg)

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasverama 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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$ 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 C₁₈ kietosios fazės ekstrahavimo tūta, pvz., *Bond Elut*, dydis: 1 cm³, 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).

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 pasverama 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 membranineį filtrą (4.4). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).

5.2.2 Premiksai

Maždaug 1 g ėminio pasverama 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 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, <i>Hypersil</i> 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:

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

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:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

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 ekstrakto 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 $\pm 10\%$ tikslumu.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

- 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;
- 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 jokiam 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, analizės 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 analizės 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
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 metanolio ir jos kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skystųjų 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 Vandens 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_2PO_4 (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 vandens chlorido rūgšties (3.6), iki žymos skiedžiama metanolio (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, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (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 pasveriamą 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.

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 metanolio (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 metanolio (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, C₁₈, 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 pasverama 5–10 g ėminio. Įpilama 100 ml parūgštinto metanolio (3.8). Kolba užkemšama ir 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. 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 pasverama 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 metanolio (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 metanolio (3.8), kad natrio lasalocido koncentracija galutiniam 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 125 mm × 4 mm, atvirkštinių fazių, C₁₈, 5 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė (4.3.1):

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 abscisų 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 įpurškto ėminio tirpalo (5.3.3) smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę.

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 $\pm 10\%$ 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 analizės priedu, turėtų būti ne mažesnis kaip 80 %. Išgavos dydis, gautas premiksams su analizės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

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 Granuliuo- tas lesalas kalakutams	4 ėminys Trupininis lesalas viš- čiukams	5 ėminys Lesalas kalakutams	6 ėminys Lesalas paukš- čiams 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.

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 giminingų 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 giminingų 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.
- 4.2 Spektrofotometras.

5. Procedūra

5.1 Tiriamasis ėminys

Tiriamąjį ėminį 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 piltuvus 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 tirpalo.

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 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 propan-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:

$$\text{laisvojo gosipolio: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 625$$

$$\text{suminio gosipolio: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 600$$

Laisvojo ar suminio gosipolio kiekis ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{gosipolio kiekis (\%)} = \frac{E \times 1\,250}{E \frac{1\%}{1\text{cm}} \times p \times a}$$

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 skiedžiamas iki žymės propan-2-olio ir heksano mišiniu (3.1) (palyginamasis rinkinys).

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 tirpiklio 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 atvėsinaamos 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.

B. DIOKsinų (PCDD/PCDF) IR DIOKsinų TIPO PCB KIEKIO NUSTATYMAS

I ĖMINIŲ ĖMIMO METODAI IR ANALIZĖS REZULTATŲ AIŠKINIMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Ėminiai, skirti dioksinų (polichlorinuotų dibenzo-*p*-dioksinų (PCDD) ir polichlorintų dibenzofuranų (PCDF)) ir dioksinų tipo polichlorintų bifenilų (PCB) ⁽¹⁾ kiekio pašaruose oficialiai kontrolei, turi būti imami pagal I priedo nuostatas. Pašaruose tolygiai pasiskirsčiusių medžiagų arba produktų kontrolei turi būti taikomi kiekybiniai reikalavimai, kaip numatyta I priedo 5.A punkte. Laikoma, kad tokiais metodais paimti jungtiniai ėminiai yra reprezentatyvieji pašarų partijų arba jų dalių, iš kurių jie paimti, ėminiai. Atitiktis didžiausiems kiekiams, pateiktiems Europos Parlamento ir Tarybos Direktyvoje 2002/32/EB ⁽²⁾, turi būti nustatyta pagal laboratoriniuose ėminiuose gautus kiekius.

2. Partijos arba partijos dalies atitiktis specifikacijai

Partija priimama, jei atskiros analizės rezultatas yra ne didesnis už atitinkamą didžiausią kiekį, nustatytą Direktyvoje 2002/32/EB, atsižvelgiant į matavimo neapibrėžtį.

Partija neatitinka Direktyvoje 2002/32/EB nustatyto didžiausio kiekio, jei viršutinės ribos ⁽³⁾ analizės rezultatas, įskaitant matavimo neapibrėžtį, patvirtintas atliekant kartotinę analizę ⁽⁴⁾, be jokios pagrįstos abejonės yra didesnis už didžiausią kiekį.

⁽¹⁾ Dioksinų, furanų ir dioksinų tipo PCB TEF (toksinio ekvivalentiškumo faktorių) lentelė

Struktūrinis analogas	TEF vertė	Struktūrinis analogas	TEF vertė
Dibenzo-<i>p</i>-dioksinai (PCDD)		Dioksinų tipo 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	0,0001
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	0,01
OCDD	0,0001	Mono-orto-PCB	
		PCB 105	0,0001
Dibenzofuranai (PCDF)		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Vartojamos santrumpos: T – tetra; Pe – penta; Hx – hekso; Hp – hepta; O – okta; CDD – chlordinbenzo-*p*-dioksinas; CDF – chlordinbenzofuranas; CB – chlorbifenilas.

⁽²⁾ OL L 140, 2002 5 30, p. 10.

⁽³⁾ Sąvoka „viršutinė riba“ taikoma, kai vertinant kiekvieno kiekybiškai nenustatyto struktūrinio analogo indėlį į suminių TEF naudojama jo kiekybinio nustatymo riba.

Sąvoka „apatinė riba“ taikoma, kai kiekvieno kiekybiškai nenustatyto struktūrinio analogo indėlis į suminių TEF įvertinamas nuliui.

Sąvoka „vidurinė riba“ taikoma, kai vertinant kiekvieno kiekybiškai nenustatyto struktūrinio analogo indėlį į suminių TEF naudojama pusė kiekybinio nustatymo ribos vertės.

⁽⁴⁾ Kartotinė analizė yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinio tarpusavio užteršimo arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Pirmosios analizės rezultatas, atsižvelgus į matavimo neapibrėžtį, yra naudojamas atitiktčiai patikrinti.

Jei analizė atliekama užteršimo dioksinais incidentui tirti, patvirtinimas atliekant kartotinę analizę nebūtinai, jei analizei atrinkti ėminiai sieties keliu yra susieti su užteršimo dioksinais incidentu.

I matavimo neapibrėžtį galima atsižvelgti vienu iš šių būdų:

- apskaičiuojant išplėstinę neapibrėžtį, taikant aprėpties faktorių 2, kuris užtikrina maždaug 95 % patikimumo lygį. Partija neatitinka, jei atėmus U išmatuota vertė yra didesnė už didžiausią kiekį. Jei dioksinai ir dioksinų tipo PCB nustatomi atskirai, dioksinų ir dioksinų tipo PCB sumai turi būti naudojama dioksinų ir dioksinų tipo PCB atskirų analizės rezultatų išplėstinės neapibrėžties suma,
- nustatant sprendimo ribą (CCα) pagal Komisijos sprendimą 2002/657/EB ⁽¹⁾ (priedo 3.1.2.5 punktas, medžiagų su nustatytu leidžiamuoju kiekiu atvejis). Partija neatitinka, jei išmatuota vertė yra lygi arba didesnė kaip CCα.

Šios aiškinimo taisyklės taikomos analizės rezultatui, kuris gaunamas oficialiai kontrolei skirtam ėminiui. Jos neatima valstybėms narėms teisės taikyti gynybos ir arbitražo tikslams nacionalines taisykles.

II ĖMINIŲ RUOŠIMAS IR REIKALAVIMAI, KELIAM I ANALIZĖS METODAMS, KURIE TAIKOMI DIOKSIŲ (PCDD/PCDF) IR DIOKSIŲ TIPO PCB KIEKIAMS OFICIALIAI KONTROLIUOTI

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šie reikalavimai taikomi, kai pašarų žaliavos ir pašarai analizuojami dioksinams (polichlorintiems dibenz-p-dioksinams (PCDD) ir polichlorintiems dibenzfuranams (PCDF)) ir dioksinų tipo polichlorbifenilams (PCB) nustatyti.

Dioksinų buvimas pašaruose gali būti kontroliuojamas atrankos metodu, kad būtų galima atrinkti ėminius, kuriuose dioksinų ir dioksinų tipo PCB kiekiai būtų 25 % mažesni arba didesni nei nagrinėjamas kiekis. Ėminiuose su dideliais dioksinų (PCDD/PCDF) ir PCB kiekiais jų koncentracijos turi būti nustatomos (patvirtinamos) patvirtinamuoju metodu.

Atrankos metodai – tai metodai, taikomi aptikti dioksinus ir dioksinų tipo PCB, kurių kiekis atitinka nagrinėjamą kiekį. Ėminių analizės šiais metodais našumas yra didelis ir jie taikomi dideliame skaičiui ėminių atsižįti nustatant galimai teigiamus ėminius. Jie yra specialiai sukurti klaidingiems neigiamiems rezultatams išvengti.

Patvirtinamieji metodai – tai metodai, suteikiantys visą arba papildomą informaciją, kuri leidžia vienareikšmiškai identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti dioksinus ir dioksinų tipo PCB, kurių kiekis atitinka nagrinėjamą kiekį.

2. Pagrindimas

Kadangi aplinkos ir biologiniuose ėminiuose (įskaitant pašarų žaliavų arba pašarų ėminius) paprastai yra sudėtingų įvairių dioksinų struktūrinių analogų mišinių, rizikos įvertinimui palengvinti buvo sukurta toksinio ekvivalentiškumo faktorių (TEF) koncepcija. Šios TEF vertės yra nustatytos norint į 2,3,7,8-padėtį pakeistų PCDD bei PCDF mišinių ir dioksinų tipo aktyvumą turinčių kai kurių ne į orto-padėtį ir į orto-padėtį monochlorintų PCB koncentraciją išreikšti 2,3,7,8-TCDD toksiškumo ekvivalentais (TE). Atskirų cheminių medžiagų koncentracija tam tikrame ėminyje dauginama iš jų atitinkamo TEF ir sandaugos sudedamos, kad būtų gauta TE išreikšta suminė dioksinų tipo junginių koncentracija.

Tik šiame reglamente laikoma, kad priimta atskiros struktūrinio analogo tam tikra kiekybinio nustatymo riba yra ėminio ekstrakto analitės koncentracija, kuriai esant gaunamas prietaiso atsakas dviem skirtingiems kontroliuojamiems jonams, kai mažesnio jautrumo signalo S/N (signalas ir triukšmas) santykis yra 3:1 ir vykdomi pagrindiniai reikalavimai, pvz., sulaukymo trukmės ir izotopų santykio, pagal nustatymo procedūrą, aprašytą EPA 1613 metodo B versijoje.

3. Kokybės užtikrinimo reikalavimai, kurių būtina laikytis ruošiant ėminius

Taikomos II priede pateiktos pagrindinės analizuojamų ėminių ruošimo nuostatos.

Papildomai būtina atitikti šiuos reikalavimus:

- ėminiai turi būti laikomi ir vežami talpyklose, pagamintose iš stiklo, aliuminio, polipropileno ar polietileno. Iš ėminių talpyklų turi būti pašalinti popieriaus dulkių pėdsakai. Stikliniai indai plaunami tirpikliais, kurie prieš tai patikrinti dėl dioksinų buvimą,

⁽¹⁾ OL L 221, 2002 8 17, p. 8.

- analizuojamas tuščiasis ėminys, atliekant visą analizės procedūrą be ėminio,
- ekstrakcijai paimto ėminio masės turi pakakti tam, kad būtų įvykdyti metodo jautrio reikalavimai.

4. Reikalavimai laboratorijoms

- Laboratorijos įrodo metodo tinkamumą nagrinėjamų koncentracijos verčių intervale, pvz., 0,5, 1 ir 2 kartus didesnių už nagrinėjamą koncentraciją, esant priimtinajam kartotinės analizės variacijos koeficientui. Priimtimumo kriterijų detalės pateikto 5 punkte.
- Patvirtinamojo metodo kiekybinio nustatymo riba neturėtų būti didesnė kaip viena penktoji nagrinėjamų koncentracijos vertės, kad nagrinėjamų koncentracijos intervale būtų galima užtikrinti priimtinas variacijos koeficientus.
- Kaip vidinės kokybės kontrolės priemonės reguliariai turi būti atliekama tuščiųjų ėminių kontrolė ir analitės pridėjimo bandymai arba kontrolinių ėminių analizė (jei įmanoma, sertifikuotosios pamatinės medžiagos).
- Geriausias būdas įrodyti kompetenciją atlikti specifines analizes būtų sėkmingas dalyvavimas laboratorijos kvalifikaciją įvertinančiuose tarplaboratoriniuose tyrimuose. Tačiau sėkmingas dalyvavimas tarplaboratoriniuose, pvz., dirvožemio arba nuotekų ėminių, tyrimuose nebūtinai patvirtina kompetenciją analizuoti maisto produktų arba pašarų ėminius, kurie yra mažiau užteršti. Todėl privalomas nuolatinis dalyvavimas tarplaboratoriniuose tyrimuose nustatant dioksinų ir dioksinų tipo PCB koncentraciją atitinkamų pašarų (maisto produktų) matricose.
- Laboratorijas turi akredituoti patvirtinta institucija, veikianti pagal ISO *Guide* 58, siekiant užtikrinti, kad laboratorijos taikytų analizės kokybės garantiją. Laboratorijos akredituotos pagal ISO/IEB/17025:1999 standartą.

5. Reikalavimai dioksinų ir dioksinų tipo PCB analizės procedūroms

Pagrindiniai analizės procedūrų priimtimumo reikalavimai

- **Didelis jautris ir mažos aptikimo ribos.** Aptinkami PCDD ir PCDF kiekiai turi būti pikogramo TE (10^{-12} g) eilės dėl labai didelio kai kurių iš šių junginių toksiškumo. Žinoma, kad PCB kiekiai būna didesni nei PCDD ir PCDF junginių. Daugeliui PCB struktūrinių analogų pakanka nanogramo (10^{-9} g) eilės jautrio. Tačiau nustatant labiau toksiškus dioksinų tipo PCB struktūrinius analogus (ypač ne į orto-padėtį pakeistus struktūrinius analogus), turi būti pasiektas jautris, atitinkantis PCDD ir PCDF junginių nustatymo jautrį.
- **Didelis atrankumas (specifiškumas).** Reikia atskirti PCDD, PCDF ir dioksinų tipo PCB nuo didelio skaičiaus kitų kartu ekstrahuojamų ir galbūt analizei trukdančių junginių, kurių koncentracija gali būti keliomis eilėmis didesnė nei nagrinėjamų analizių. Taikant dujų chromatografijos/masės spektrometrijos (GC/MS) metodus būtina atskirti įvairius struktūrinius analogus, pvz., toksinius (pvz., septyniolika į 2,3,7,8-padėtį pakeistų PCDD bei PCDF junginių ir dioksinų tipo PCB) ir kitus struktūrinius analogus. Biologiniais tyrimais taip pat turi būti įmanoma atrankiai nustatyti TE vertes kaip PCDD, PCDF ir dioksinų tipo PCB sumą.
- **Didelis tikslumas (teisingumas ir glaudumas).** Atliekant nustatymą gaunamas patikimas tikrosios koncentracijos ėminyje įvertis. Didelis tikslumas (matavimo tikslumas: matavimo rezultato ir tikrosios arba priskirtosios matavimo vertės atitikimo artumas) yra būtinas siekiant išvengti ėminio analizės rezultato atmetimo dėl mažo TE įverčio patikimumo. Tikslumas išreiškiamas kaip teisingumas (išmatuotos vidutinės analitės koncentracijos sertifikuotoje medžiagoje vertės ir analitės koncentracijos sertifikuotos vertės skirtumas, išreikštas šios vertės procentais) ir kaip glaudumas (variacijos koeficientas, kitaip santykinis standartinis nuokrypis, apskaičiuotas pagal atkuriamumo sąlygomis gautus rezultatus).

Atrankos metodus gali sudaryti biologiniai tyrimai ir GC/MS metodai; patvirtinamuosius metodus – didelės skiriamosios gebos dujų chromatografijos/ didelės skiriamosios gebos masės spektrometrijos (HRGC/HRMS) metodai.

Suminė TE vertė turi atitikti šiuos kriterijus:

	Atrankos metodai	Patvirtinamieji metodai
Klaidingai neigiamų rezultatų dalis	< 1 %	
Teisingumas		nuo – 20 % iki + 20 %
Glaudumas, variacijos koeficientas	< 30 %	< 15 %

6. Specifiniai reikalavimai gc/ms metodams, kuriuos būtina atitikti atliekant atranką arba patvirtinimą

- Siekiant patvirtinti analizės procedūros tinkamumą, prieš pat analizės pradžią arba ją tik pradėjus, pvz., prieš ekstrahavimą, turi būti pridedama į 2,3,7,8-padėtis chlorintų PCDD/F vidinių etalonų su žymėtaisiais ^{13}C atomais ir dioksinų tipo PCB vidinių etalonų su žymėtaisiais ^{13}C atomais. Turi būti pridedama bent vieno struktūrinio analogo kiekvienai nuo tetra- iki oktachlorintų PCDD/F homologų grupei ir bent vieno struktūrinio analogo kiekvienai dioksinų tipo PCB homologų grupei (kita vertus, pridedama bent vieno struktūrinio analogo kiekvienai masės spektrometrijai, taikomai kontroliuoti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB, pasirinkto jono registravimo funkcijai). Būtų aiškiai geriau, ypač taikant patvirtinimo metodus, naudoti visus 17 į 2,3,7,8-padėtį pakeistų PCDD/F vidinius etalonus su žymėtaisiais ^{13}C atomais ir visus 12 dioksinų tipo PCB vidinius etalonus su žymėtaisiais ^{13}C atomais.
- Be to, naudojant atitinkamus kalibravimo tirpalus nustatomi struktūrinių analogų, kurių analogo su žymėtaisiais ^{13}C atomais nededama, santykiniai atsako faktoriai.
- Jei augalinės ir gyvūninės kilmės pašarai turi mažiau kaip 10 % riebalų, vidinius etalonus būtina pridėti prieš ekstrahavimą. Jei gyvūninės kilmės pašarai turi daugiau kaip 10 % riebalų, vidinius etalonus galima pridėti arba prieš ekstrahavimą arba po riebalų ekstrahavimo. Ekstrahavimo veiksmingumas patvirtinamas pagal tai, kurioje stadijoje pridedama vidinio etalono, ir atsižvelgiant į tai, ar rezultatai pateikiami pagal produkto ar riebalų kiekį.
- Prieš GC/MS analizę turi būti pridedamas 1 arba 2 atgavimo (pakeitimo) etalonas (-ai).
- Būtina išgavos kontrolė. Taikant patvirtinamuosius metodus atskirų vidinių etalonų išgavos dydis turi būti 60 %–120 % intervale. Priimtinos didesnės arba mažesnės atskirų struktūrinių analogų išgavos dydžio vertės, ypač kai kurių hepta- ir oktachlorintų dibenzdioksinų ir dibenzfuranų, jei jų indėlis į TE vertę yra ne didesnis kaip 10 % suminės TE vertės (pagrįstos PCDD/F ir dioksinų tipo PCB suma). Atrankos metodų atveju išgavos dydis turi būti 30 %–140 % intervale.
- Dioksinų ir trukdančių chlorintų junginių, pvz., ne dioksinų tipo PCB ir chlorintų difenileterių, atskyrimas atliekamas taikant tinkamus chromatografijos metodus (pageidautina naudoti florisilo, aliuminio oksido ir (arba) aktyvintųjų anglių kolonėlę).
- Dujų chromatografijos pakanka izomerams atskirti (< 25 % tarp 1,2,3,4,7,8-HxCDF ir 1,2,3,6,7,8-HxCDF smailių).
- Nustatymas atliekamas pagal EPA 1613 metodo B versija *Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution* HRGC/HRMS arba kitą lygiavertę taikymo charakteristikas turintį metodą.
- Jei pašarų užteršimas dioksinais (PCDD/PCDF) turi būti lygus arba didesnis kaip didžiausias leidžiamas kiekis, skirtumas tarp viršutinės ir apatinės ribų neturi būti didesnis kaip 20 %. Jei pašarų užteršimas daug mažesnis nei didžiausias leidžiamas kiekis, skirtumas gali būti 25 %– 40 % intervale.

7. Atrankai taikomi analizės metodai

7.1 Įvadas

Taikant atrankos metodą, analizė gali būti atliekama skirtingais būdais: vien tik atranka ir kiekybinis būdas.

Atrankos būdas

Ėminių atsakas lyginamas su nagrinėjamos koncentracijos etaloninio ėminio atsaku. Ėminiai, kurių atsakas mažesnis kaip etaloninio ėminio, laikomi neigiamais, ėminiai, kurių atsakas yra didesnis, laikomi teigiamais. Reikalavimai:

- į kiekvieną bandymų seriją turi būti įtrauktas tuščiasis ir etaloninis (-iai) ėminys (-iai), kurie ekstrahuojami ir analizuojami tuo pat metu ir tomis pačiomis sąlygomis. Etaloninio ėminio atsakas turi būti aiškiai didesnis nei tuščiojo ėminio atsakas,
- įtraukiami papildomi etaloniniai ėminiai, kurių koncentracija būtų 0,5 ir 2 kartus didesnė nei nagrinėjama koncentracija, siekiant parodyti bandymo tinkamas charakteristikas koncentracijos intervale, atitinkančiame kontroliuojamą koncentraciją,
- turi būti įrodytas etaloninio (-ų) ėminio (-ių) tinkamumas bandant kitas matricas, pirmiausia įtraukiant tuos ėminius, kurių HRGC/HRMS analizė parodė, kad jų TE koncentracija yra artima etaloninio ėminio koncentracijai arba, jei jo nėra, iki tokios koncentracijos padidintai tuščiojo ėminio koncentracijai,
- kadangi atliekant biologinius tyrimus negalima naudoti vidinių etalonų, labai svarbūs pakartojamumo bandymai norint turėti informaciją apie tos pačios bandymų serijos standartinį nuokrypį. Variacijos koeficientas turi būti mažesnis nei 30 %,
- atliekant biologinius tyrimus, apibrėžiami tiksliniai junginiai, galimi trukdžiai ir didžiausios leidžiamos tuščiojo ėminio koncentracijos vertės.

Kiekybinis būdas

Taikant kiekybinį metodą būtina naudoti etalonų skiedimo seriją, dvigubą arba trigubą gryninimą ir matavimą, taip pat tuštieji ir išgavos kontroliniai bandymai. Rezultatas gali būti išreikštas kaip TE, tuo darant prielaidą, kad signalą duoda junginiai, kurie atitinka TE principą. Tai galima atlikti naudojant TCDD (arba dioksinų/furanų) tipo PCB etaloninių mišinių kalibravimo kreivei gauti, pagal kurią apskaičiuojama TE koncentracija ekstrakto, taigi ir ėminyje. Vėliau daroma šios koncentracijos pataisa, atsižvelgiant į TE koncentraciją tuščiajame ėminyje (norint įvertinti naudotuose tirpikliuose ir cheminėse medžiagose esančias priemaišas), ir į išgavos dydį (apskaičiuotą pagal TE koncentraciją kokybės kontrolės ėminyje, artimą nagrinėjamai ribinei koncentracijai). Būtina pažymėti, kad tariamo išgavos dydžio sumažėjimo priežastimi iš dalies gali būti matricos veiksniai ir TEF verčių atliekant biologinius tyrimus bei PSO nustatytų oficialiųjų TEF verčių skirtumas.

7.2 Reikalavimai atrankai taikomiems analizės metodams

- Atrankai gali būti taikomi GC/MS analizės metodai ir biologiniai tyrimai. GC/MS metodams taikomi 6 punkte nustatyti reikalavimai. Specifiniai reikalavimai ląstelių biologiniams tyrimams nustatyti 7.3 punkte, rinkinius naudojančioms biologiniams tyrimams – 7.4 punkte.
- Būtina turėti klaidingai teigiamų ir klaidingai neigiamų rezultatų skaičiaus duomenis, gautus dideliame ėminių, kurių koncentracija būtų mažesnė ir didesnė už didžiausią leidžiamą arba veiksmų reikalaujančią koncentracijos vertę, rinkiniui, rezultatus lyginant su TE koncentracija, gauta patvirtinamuoju analizės metodu. Faktinė klaidingai neigiamų ėminių dalis turi būti mažesnė nei 1 %. Klaidingai teigiamų ėminių dalis yra pakankamai maža, kad atrankos priemonių taikymas būtų naudingas.
- Teigiamus rezultatus visuomet būtina patvirtinti taikant patvirtinamąjį analizės metodą (HRGC/HRMS). Be to, plataus TE intervalo ėminiai patvirtinami HRGC/HRMS (maždaug 2 %–10 % neigiamų ėminių). Pateikiama informacija apie biologinio tyrimo ir HRGC/HRMS rezultatų atitiktį.

7.3 Specifiniai reikalavimai ląstelių biologiniams tyrimams

- Atliekant biologinį tyrimą kiekvienam bandymui reikalinga etaloninių TCDD arba dioksinų/furanų mišinio koncentracijos verčių serija (visa koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivė, kai $R^2 > 0,95$). Tačiau analizuojant mažos koncentracijos ėminius atrankai galima naudoti didesnio mastelio mažų koncentracijos verčių kreivės dalį.
- Pastovios trukmės biologinio tyrimo rezultatams kokybės kontrolės lentelėje naudojama TCDD etaloninė koncentracija (apie 3 kartus didesnė nei kiekybinio nustatymo riba). Taip pat būtų galima naudoti etaloninio ėminio santykinį atsaką, lyginamą su TCDD kalibravimo kreive, nes ląstelių atsakas gali priklausyti nuo didelio skaičiaus veiksmų.
- Užrašomos ir tikrinamos kiekvieno tipo pamatinės medžiagos kokybės kontrolės (KK) schemos siekiant užtikrinti, kad rezultatas atitiktų nustatytas rekomendacijas.

- Naudojamo ėminio skiedimo indukcija turi būti tiesiojoje atsako kreivės dalyje, ypač atliekant kiekybinius apskaičiavimus. Ėminiai, kurių atsakas yra aukščiau atsako kreivės tiesiosios dalies, turi būti praskiesti ir bandymas pakartotas. Todėl vienu metu rekomenduojama tirti bent trijų koncentracijos verčių praskiestus tirpalus arba daugiau.
- Kiekvieno ėminio to paties praskiedimo tris kartus kartojamo nustatymo standartinis nuokrypis yra ne didesnis nei 15 %, o atliekant tris nepriklausomus bandymus – ne didesnis nei 30 %.
- Aptikimo riba gali būti nustatyta kaip tirpiklio tuščiojo ėminio arba fono atsako standartinis nuokrypis, padaugintas iš 3. Kitas būdas – taikyti atsaką, kuris yra didesnis už fono atsaką (indukcijos faktorius 5 kartus didesnis nei tirpiklio tuščiojo ėminio), apskaičiuotą pagal tos dienos kalibravimo kreivę. Kiekybinio nustatymo riba gali būti nustatyta kaip tirpiklio tuščiojo ėminio arba fono atsako standartinis nuokrypis, padaugintas iš 5–6, arba taikyti atsaką, kuris yra aiškiai didesnis už fono atsaką (indukcijos faktorius 10 kartų didesnis už tirpiklio tuščiojo ėminio), apskaičiuotą pagal tos dienos kalibravimo kreivę.

7.4 Specifiniai reikalavimai biologiniams tyrimams, kuriuose naudojami rinkiniai

- Būtina užtikrinti, kad biologinių tyrimų, kuriuose naudojami rinkiniai, jautrio ir patikimumo pakaktų, kad tyrimus būtų galima taikyti pašarams.
- Turi būti laikomasi gamintojo nurodytų ėminių ruošimo ir analizės instrukcijų.
- Bandymų rinkiniai nenaudojami pasibaigus jų naudojimo laikui.
- Nenaudojamos medžiagos arba komponentai, skirti naudoti su kitais rinkiniais.
- Bandymų rinkiniai laikomi esant temperatūrai, atitinkančiai nurodytą laikymo temperatūros intervalą, ir naudojami esant nurodytai darbinei temperatūrai.
- Imunologinių bandymų aptikimo riba yra nustatoma kaip vidurkio ir iš 3 padauginto standartinio nuokrypio, gauto 10 kartų kartojant tuščiojo ėminio analizę, suma, padalyta iš tiesinės regresijos lygties krypties koeficiento vertės.
- Laboratorijoje naudojami palyginamieji etalonai, kad būtų galima patikrinti, ar atsakas į etaloną atitinka priimtą intervalą.

8. Rezultatų pateikimas

Jei įmanoma pagal taikomą analizės metodiką, analizės rezultatuose nurodomi atskirų PCDD/F ir PCB struktūrinių analogų kiekiai, pateikti kaip apatinis ribinis įvertis, viršutinis ribinis įvertis ir vidurinis ribinis įvertis, kad rezultatų ataskaitoje būtų kuo daugiau informacijos ir todėl juos būtų galima aiškinti pagal specifinius reikalavimus.

Ataskaitoje taip pat nurodomas ėminio lipidų kiekis, taip pat jų ekstrahavimo metodas.

Turi būti pateikti atskirų vidinių etalonų atgavimo duomenys, jei atgavimo vertės neatitinka 6 punkte nurodyto intervalo ribų, jei viršijamas didžiausias kiekis ir paprašius visais kitais atvejais.

Kadangi būtina atsižvelgti į matavimo neapibrėžtį, kai sprendžiama dėl ėminio atitikties, šis parametras taip pat nurodomas. Todėl analizės rezultatai ataskaitoje pateikiami kaip $x \pm U$, čia x – analizės rezultatas, U – išplėstinė matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties faktorių 2, kuris užtikrina maždaug 95 % patikimumo lygį. Jei dioksinai ir dioksinų tipo PCB nustatomi atskirai, dioksinų ir dioksinų tipo PCB sumai turi būti naudojama dioksinų ir dioksinų tipo PCB atskirų analizės rezultatų išplėstinės neapibrėžties suma.

Jei į matavimo neapibrėžtį atsižvelgiama taikant CCa (kaip aprašyta šios B dalies I skyriaus 2 skirsnyje) šis parametras pateikiamas ataskaitoje.

VI PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI GYVŪNINĖS KILMĖS SUDEDAMOSIOMS DALIMS NUSTATYTI ATLIEKANT OFICIALIAJĄ PAŠARŲ KONTROLĘ**Pašarų sudedamųjų gyvūninės kilmės dalių mikroskopinio aptikimo, identifikavimo ar įvertinimo sąlygos****1. Tikslas ir taikymo sritis**

Šios sąlygos turi būti taikomos, kai gyvūninės kilmės sudedamosios dalys (apibrėžtos kaip produktai, gauti perdirbant žinduolių, naminių paukščių ir žuvų kūnus ir kūnų dalis) nustatomos pašaruose, atliekant mikroskopinį tyrimą pagal suderintą patikrinimo programą gyvūnų mitybos srityje, laikantis Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 882/2004 ⁽¹⁾ nuostatų. Jei šiame priede pateikti metodai taikomi visuose oficialiuose tyrimuose, gali būti atliekamas antrasis tyrimas taikant šių metodų variantus arba alternatyviusius metodus, siekiant pagerinti tam tikrų gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių nustatymą ar papildomai tikslinti gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių kilmę. Be to, nustatant tam tikras specifines gyvūninės kilmės sudedamąsias dalis, pvz., plazmą ar kaulus lajuje (žr. dar 9 punktą), galima naudoti kito tipo protokolą, jei šios analizės papildoma analizė, numatyta pagal suderintą patikrinimo programą.

2. Jautris

Atsižvelgiant į gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių prigimtį, pašaruose galima nustatyti labai mažus (< 0,1 %) kiekius.

3. Metodas

Identifikavimui naudojamas tinkamai paruoštas reprezentatyvusis ėminys, paimtas pagal I priede pateiktas nuostatas. Šis protokolą tinka mažai drėgmės turintiems pašarams. Daugiau kaip 14 % drėgmės turintys pašarai prieš apdorojimą džiovinami (tirštinami). Tam tikri pašarai ar pašaruose naudojamos medžiagos (pvz., riebalai, aliejai) turi būti specialiai apdorojami (žr. 9 punktą). Gyvūninės kilmės sudedamosios dalys identifikuojamos pagal tipines mikroskopu nustatomas savybes (t. y. raumenų skaidulas ir kitas mėsos daleles, kremzles, kaulus, ragus, plaukus, šerius, kraują, plunksnas, kiaušinių lukštus, žuvų kaulus, žvynus). Būtina identifikuoti ėminio sieto frakciją (6.1) ir koncentruotas nuosėdas (6.2).

4. Reagentai**4.1 Įliejimo medžiaga**

4.1.1 Chloralio hidratas (vandeninis, 60 % m/V)

4.1.2 Šarmo tirpalas (NaOH 2,5 % m/V arba KOH 2,5 % m/V) sieto frakcijoms

4.1.3 Parafininė alyva arba glicerolis (klampa: 68–81) nuosėdų mikroskopiniam stebėjimui

4.2 Plovikliai

4.2.1 Alkoholis, 96 %

4.2.2 Acetonas

4.3 Koncentravimo medžiagos

4.3.1 Tetrachloretilenas (tankis 1,62)

⁽¹⁾ OL L 165, 2004 4 30, p. 1.

4.4 Dažymo reagentai

4.4.1 Jodo ir kalio jodido tirpalas (2 g kalio jodido ištirpinama 100 ml vandens ir dažnai purtant pridedama 1 g jodo)

4.4.2 Alizarino raudonasis (2,5 ml 1 mol/l vandenilio chlorido rūgšties skiedžiama 100 ml vandens ir į šį tirpalą įdedama 200 mg alizarino raudonojo)

4.4.3 Cistino reagentas (2 g švino acetato, 10 g NaOH/100 ml H₂O)

4.4.4 Jodo ir kalio jodido tirpalas (tirpalas 70 % etanolyje)

4.5 Balinimo reagentas

4.5.1 Komercinis natrio hipochlorito tirpalas (9,6 % veikliojo chloro)

5 Įranga ir priedai

5.1 Analizinės svarstyklės (tikslumas 0,01 g, išskyrus koncentruotoms nuosėdoms: 0,001 g)

5.2 Malimo priemonės (malūnas arba grūstuvė, ypač pašarų, analizuojant turinčių > 15 % riebalų)

5.3 Sietas su kvadratinėmis akutėmis, kurių didžiausias plotis 0,50 mm

5.4 Dalijamasis piltuvus arba nusodinimo stiklinė kūginiu dugnu

5.5 Stereomikroskopas (didinimas ne mažiau kaip 40^x)

5.6 Sudėtinis mikroskopas (didinimas ne mažiau kaip 400^x), praeinamosios šviesos arba poliarizuotosios šviesos

5.7 Tipiniai laboratoriniai stikliniai indai

Visa įranga turi būti kruopščiai išvalyta. Dalijamuosius piltuvus ir stiklinius indus reikia plauti plovimo mašinoje. Sietus reikia valyti kietų šerių šepečiu.

6. Procedūra

Granuliuotus pašarus galima pirma išsijoti, jei abi frakcijos analizuojamos kaip atskiri ėminiai.

Apdorojama ne mažiau kaip 50 g ėminio (jei reikia, ėminys atsargiai sumalamas, naudojant tinkamą malimo įrangą (5.2), kad būtų gauta tinkama struktūra). Paimamos dvi reprezentatyviosios ėminio dalys. Viena – sieto frakcijai (6.1) (ne mažiau kaip 5 g), kita – koncentruotoms nuosėdoms (6.2.) (ne mažiau kaip 5 g). Galima papildomai identifikuoti naudojant dažymo reagentus (6.3).

Siekiant nustatyti gyvūninių baltymų prigimtį ir dalelių kilmę, galima naudoti sprendimų patvirtinimo sistemą, pvz., ARIES, o etaloniniai ėminiai gali būti patvirtinami dokumentais.

6.1 Gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių identifikavimas sieto frakcijose

Ne mažiau kaip 5 g ėminio sijojama per sietą (5.3) į dvi frakcijas.

Sieto frakcija (-os) (arba frakcijos reprezentatyvioji dalis), kurią (-as) sudaro didelės dalelės, plonu sluoksniu paskleidžiama (-os) ant tinkamo pagrindo ir gyvūninės kilmės sudedamosios dalys sistemingai atrenkamos po stereomikroskopu (5.5), esant įvairiam didinimui.

Sieto frakcija (-os), kurią (-as) sudaro mažos dalelės dedamos ant objektinio stiklelio ir gyvūninės kilmės sudedamosios dalys sistemingai atrenkamos po sudėtinu mikroskopu (5.6), esant įvairiam didinimui.

6.2 Gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių identifikavimas koncentruotose nuosėdose

Ne mažiau kaip 5 g (0,01 tikslumu) ėminio dedama į dalijamąjį piltuvą arba nusodinimo stiklinę ir apdorojama bent 50 ml tetrachloretileno (4.3.1). Mišinys kelis kartus purtomas arba maišomas.

— Jei naudojamas uždaromas dalijamasis piltuvas, jis paliekamas pakankamai ilgai stovėti, kad nusėstų nuosėdos (mažiausiai 3 min). Pakartotinai purtoma ir vėl mažiausiai tris minutes laukiama nuosėdų susidarymo. Nuosėdos vėl turi atsiskirti.

— Jei naudojama atvira stiklinė, ji paliekama stovėti bent 5 min, kad nuosėdos galėtų atsiskirti.

Visos nuosėdos išdžiovinamos ir vėliau sveriamos (0,001 g tikslumu). Sverti būtina tik jei reikia apskaičiuoti kiekį. Jei nuosėdose yra daug didelių dalelių, jos gali būti sijojamos per sietą (5.3) į dvi frakcijas. Išdžiovintos nuosėdos tiriamos ieškant kaulų sudedamųjų dalių po stereomikroskopu (5.5) ir sudėtiniu mikroskopu (5.6)

6.3 Įliejimo medžiagų ir dažymo reagentų naudojimas

Gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių identifikavimą galima palengvinti naudojant specialias įliejimo medžiagas ir dažymo reagentus.

Chloralio hidratas (4.1.1). Atsargiai šildant, ląstelių sandarą galima matyti aiškiau, nes krakmolo grūdėliai virsta geliu ir pašalinamas nereikalingas ląstelių turinys.

Šarmo tirpalas (4.1.2). Natrio ar kalio hidroksidas nuvalo pašaro medžiagą, padėdamas aptikti raumenų skaidulas, plaukus ir kitas keratino struktūras.

Parafininė alyva ir glicerolis (4.1.3). Šioje įliejimo medžiagoje galima gerai identifiкуoti kaulų sudedamąsias dalis, nes didesnė įdubų dalis lieka užpildyta oru ir jos atrodo kaip juodos maždaug 5–15 µm skylės.

Jodo ir kalio jodido tirpalas (4.4.1). Naudojamas krakmolui (mėlynai violetinė spalva) ir baltymams (geltonai oranžinė spalva) aptikti. Prireikus tirpalus galima skiesti.

Alizarino raudonojo tirpalas (4.4.2). Kaulus, žuvų kaulus ir žvynus nudažo raudona ir rožine spalva. Prieš džiovinant nuosėdas (žr. 6.2 skirsnį), visos nuosėdos supilamos į stiklinį mėgintuvėlį ir du kartus plaunamos maždaug 5 ml alkoholio (4.2.1) (kiekvieną kartą naudojama sūkurinė maišyklė, tirpalui leidžiama nusistovėti maždaug vieną minutę ir išpilamas). Prieš dažant šiuo reagentu, nuosėdos balinamos, įpilant bent 1 ml kalio hipochlorito tirpalo (4.5.1). Reakcija turi vykti 10 min. Į mėgintuvėlį įpilama vandens, nuosėdoms leidžiama nusistovėti 2–3 min, tada vanduo ir suspenduotos dalelės išpilamos. Nuosėdos plaunamos dar du kartus maždaug 10 ml vandens (kiekvieną kartą naudojama sūkurinė maišyklė, leidžiama nusistovėti ir vanduo išpilamas). Įlašinama nuo dviejų iki dešimt arba daugiau (atsižvelgiant į nuosėdų kiekį) alizarino raudonojo tirpalo lašų. Mišinys purtomas ir reakcijai leidžiama vykti kelias sekundes. Nusidažiusios nuosėdos du kartus plaunamos maždaug 5 ml alkoholio (4.2.1) ir vieną kartą acetonu (4.2.2) (kiekvieną kartą naudojama sūkurinė maišyklė, tirpalas paliekamas nusistovėti apie vieną minutę ir išpilamas). Nuosėdos paruoštos džiovinimui.

Cistino reagentas (4.4.3). Atsargiai šildant, cistino turinčių sudedamųjų dalių (plaukų, plunksnų ir pan.) spalva tampa juodai ruda.

6.4 Pašarų, kurie gali turėti žuvų miltų, tyrimas

Bent po vieną objekcinį stiklėlį su sieto ir su nuosėdų smulkiosiomis frakcijomis tiriama po sudėtiniu mikroskopu (žr. 6.1 ir 6.2 skirsnius).

Kai etiketėje nurodyta, kad yra žuvų miltų sudėtinių dalių, arba įtariama, kad jų yra, arba jų buvo rasta pradinio tyrimo metu, tiriami bent du papildomi objekciniai stikleliai su pradinio ėminio smulkiaja sieto frakcija ir visa nuosėdų frakcija.

7. Apskaičiavimas ir įvertinimas

Valstybės narės užtikrina, kad, atliekant oficialų tyrimą gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių kiekiui įvertinti (ne tik buvimui nustatyti), yra laikomasi šiame skyriuje nurodytų procedūrų.

Apskaičiuoti galima tik tokiu atveju, jei gyvūninės kilmės sudedamosios dalys turi kaulų dalelių.

Sausumos šiltakraujų rūšių (t. y. žinduolių ir naminių paukščių) kaulų dalelės ir įvairių tipų žuvų kaulai ant mikroskopo objekcinio stiklelio gali būti atskirti pagal tipines įdubas. Gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių dalis ėminio medžiagoje įvertinama atsižvelgiant į:

- įvertintą kaulų dalelių dalį (% masės) koncentruotose nuosėdose ir
- kaulų dalelių dalį (% masės) gyvūninės kilmės sudedamosiose dalyse.

Įvertis turi būti pagrįstas bent trimis (jei įmanoma) objektiniais stikleliais ir bent penkiais laukais viename stiklyje. Dažniausiai, kombinuotųjų pašarų koncentruotose nuosėdose yra ne tik sausumos gyvūnų ir žuvų kaulų dalelių, bet ir kitų didelio tankio dalelių, pvz., mineralų, smėlio, sumedėjusių augalų dalių ir panašių dalelių.

7.1 Apskaičiuotoji kaulų dalelių procentinės dalies vertė

sausumos gyvūnų kaulų dalelių % = $(S \times c)/W$

žuvų kaulų ir žvynų dalelių % = $(S \times d)/W$

(S – nuosėdų masė (mg), c – nuosėdose esančių sausumos gyvūnų kaulų dalelių apskaičiuotosios dalies pataisos faktorius (%), d – nuosėdose esančių žuvų kaulų ir žvynų dalelių apskaičiuotosios dalies pataisos faktorius (%), W – nuosėdoms gauti paimto ėminio medžiagos masė (mg)).

7.2 Apskaičiuotoji gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių vertė

Kaulų dalis gyvūniniuose produktuose gali būti labai skirtinga. (Kaulų dalelių dalis kaulų miltuose yra 50–60 %, o mėsos miltuose – 20–30 %; žuvų miltuose kaulų ir žvynų kiekis skiriasi atsižvelgiant į žuvies miltų rūšį ir kilmę, ir paprastai lygus 10–20 %).

Jei yra žinomas ėminyje esančių gyvūninių miltų tipas, galima įvertinti kiekį.

Sausumos gyvūnų produktų sudedamųjų dalių apskaičiuotas kiekis (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Žuvų produktų sudedamųjų dalių apskaičiuotas kiekis (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

(S – nuosėdų masė (mg), c – nuosėdose esančių sausumos gyvūnų kaulų sudedamųjų dalių apskaičiuotosios dalies pataisos faktorius (%), d – nuosėdose esančių žuvų kaulų ir žvynų dalelių apskaičiuotosios dalies pataisos faktorius (%), f – kaulų dalies tirtu ėminio gyvūninės kilmės sudedamosiose dalyse pataisos faktorius, W – nuosėdoms gauti paimto ėminio medžiagos masė (mg)).

8. Tyrinio rezultato išraiška

Ataskaitoje pateikiama bent jau informacija apie sudedamąsias dalis, gautas iš sausumos gyvūnų ir žuvies miltų. Apie skirtingus atvejus galėtų būti pateikta taip:

8.1 Apie sausumos gyvūnų kilmės sudedamąsias dalis:

- kiek buvo įmanoma įžiūrėti mikroskopu, sausumos gyvūnų kilmės sudedamųjų dalių pateiktame ėminyje nebuvo rasta,
- arba
- kiek buvo įmanoma įžiūrėti mikroskopu, pateiktame ėminyje buvo rastos sausumos gyvūnų kilmės sudedamosios dalys.

8.2 Apie žuvų miltų kilmės sudedamąsias dalis:

- kiek buvo įmanoma įžiūrėti mikroskopu, žuvų miltų kilmės sudedamųjų dalių pateiktame ėminyje nebuvo rasta,
- arba
- kiek buvo įmanoma įžiūrėti mikroskopu, pateiktame ėminyje buvo rastos žuvų miltų kilmės sudedamosios dalys.

Jei buvo rasta žuvų arba sausumos gyvūnų kilmės sudedamųjų dalių, tyrimo rezultatų ataskaitoje, jei reikia, gali būti nurodomas nustatytų sudedamųjų dalių apskaičiuotas kiekis ($x\%$, $< 0,1\%$, $0,1\text{--}0,5\%$, $0,5\text{--}5\%$ arba $> 5\%$), papildomai nurodomas, jei įmanoma, sausumos gyvūnų tipas ir nustatytos gyvūninės kilmės sudedamosios dalys (raumenų skaidulos, kremzlės, kaulai, ragai, plaukai, šeriai, plunksnos, kraujas, kiaušinių lukštai, žuvų kaulai, žvynai).

Tai atvejais, kai apskaičiuojamas gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių kiekis, turi būti nurodytas pataisos faktorius f .

Tais atvejais, kai nustatoma, kad yra sausumos gyvūnų kaulų dalelių, ataskaitoje turi būti papildomas sakiny:

„Negalima atmesti galimybių, kad pirmiau nurodytos sudedamosios dalys yra gautos iš žinduolių.“

Šis papildomas sakiny nebūtinai taikomas tais atvejais, kai nustatoma, kad sausumos gyvūnų kaulų dalelės yra naminių paukščių arba žinduolių kaulų dalelės.

9. Neprivalomas riebalų ar aliejų analizės protokolai

Riebalams arba aliejui analizuoti gali būti naudojamas šis protokolai:

- kieti riebalai šildomi, pvz., mikrobangų krosnyje tol, kol suskystėja,
- 40 ml riebalų iš ėminio indo dugno pipete paimama į centrifugavimo mėgintuvėlį,
- centrifuguojama 10 min $4\,000\text{ min}^{-1}$ dažniu,
- jei po centrifugavimo riebalai yra kieti, jie dar kartą šildomi mikrobangų krosnyje tol, kol suskystėja. Dar kartą centrifuguojama 5 min $4\,000\text{ min}^{-1}$ dažniu,
- šaukšteliu ar mentele pusė nuo skysčio atskirtų nuosėdų dedama į mažą Petri lėkštelę arba ant objektyvio stiklėlio, kad mikroskopu būtų nustatytas galimas gyvūninės kilmės sudedamųjų dalių turinys (mėsos skaidulos, plunksnos, kaulų dalelės, ...). Kaip įliejimo medžiagą atliekant mikroskopinį tyrimą rekomenduojama naudoti parafininę alyvą arba glicerolį,
- likusios nuosėdos naudojamos nusodinimui, kaip aprašyta 6.2 skirsnyje.

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:

$$\text{ME MJ/kg} = 0,1551 \times \% \text{ žalių baltymų kiekio} + 0,3431 \times \% \text{ žalių riebalų} + 0,1669 \times \% \text{ krakmolo} + 0,1301 \times \% \text{ sacharidų kiekio (išreikšto sacharoze)}.$$

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.

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. Rūgštis 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)
- 3.7.1 Metilbenzokvato pradinis etaloninis tirpalas, 500 µg/ml
- 0,1 mg tikslumu pasveriamą 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 metanolio (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, C₁₈, 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 pasveriamą maždaug 20 g paruošto ėminio ir supilama į 250 ml kūginę kolbą. Įpilama 100 ml metansulfonrūgšties tirpalo (3.4) ir kolba 30 min mechanškai 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 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. Rūgštis 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. Metanolis 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.

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 abscisų 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 $\mu\text{g/ml}$,

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 ekstrakto.

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:

- 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;
- 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 jokiam matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis kaip 15 % etalono analitės optinio tankio vertės;
- 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

	Tuščiasis ėminys	Miltai 1	Granulės 1	Miltai 2	Granulės 2
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-N¹,N⁴-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.

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-N¹,N⁴-dioksidas, E 851

3.5.1 Olakvindokso pradinis etaloninis tirpalas, 250 µg/ml

Į 200 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamas 50 mg olakvindokso (3.5) ir įpilama apie 190 ml vandens. Kolba 20 min dedama į ultragarso vonią (4.1). Po apdorojimo ultragarsu tirpalas atvėsinaamas 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, C₁₈, 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
- 4.4 Membraniniai filtrai, 0,45 µm

5. **Procedūra**

Pastaba Olakvindokso 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. 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 pasveriamas 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 lygiavertė 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 abscisų 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 $\mu\text{g/ml}$ nustatoma pagal ėminio tirpalo olakvindokso smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.3.2).

Olakvindokso kiekis w (mg/kg) ėminyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

kurioje:

c = olakvindokso koncentracija ėminio ekstrakto (5.2) $\mu\text{g/ml}$

m = tiriamosios dalies svoris g (5.2)

7. Rezultatų patvirtinimas

7.1 Tapatumas

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorius, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto (5.2) ir 5,0 $\mu\text{g/ml}$ 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 ekstrakto nustatytą olakvindokso kiekį.

Padidinamas tik olakvindokso smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje $\pm 10\%$ tikslumu turi atitikti olakvindokso ekstrakto smailės pradinį plotį.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

- 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 $\pm 2\text{ nm}$;
- 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;
- 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 %.

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 olavindokso 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 membranineį 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, $c = 1,6 \text{ mol/l}$
- Vandenyje (3.3) ištirpinama 224,74 g natrio perchlorato, 1 000 ml matavimo kolboje skiedžiama iki žymės vandeniu (3.3) ir sumaišoma.
- 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 $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ membraninį filtrą (4.3) ir bent 15 min degazuojamas (pvz., ultragarso vonioje (4.4)).
- 3.7 Etaloninė cheminė medžiaga: grynas amproliumas, 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metilpiridinio chlorido hidrochloridas, E 750 (žr. 9.2).
- 3.7.1 Amproliumo pradinis etaloninis tirpalas, $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$
- Į 100 ml matavimo kolbą $0,1 \text{ mg}$ tikslumu pasveriamas 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 atvėsinaamas iki kambario temperatūros, skiedžiama vandeniu iki žymės ir sumaišomas. Esant $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.
- 3.7.2 Amproliumo tarpinis etaloninis tirpalas, $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$
- 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 $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 judančiojoje fazėje (3.6) ir sumaišoma. Šie tirpalai atitinka $0,5$, 1 ir $2 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 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 $100 \text{ }\mu\text{l}$ tūrį
- 4.1.1 Skysčių chromatografijos kolonėlė $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, katjonitas Nucleosil 10 SA, 5 arba $10 \text{ }\mu\text{m}$ įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
- 4.1.2 Kintamo bangos ilgio ultravioletinis detektorius arba diodų matricos detektorius
- 4.2 Membraninis filtras, medžiaga – PTFE, $0,45 \text{ }\mu\text{m}$
- 4.3 Membraninis filtras, $0,22 \text{ }\mu\text{m}$
- 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 trukdančiųjų medžiagų.

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 pasveriamas 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 membranine 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 pasveriamas 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 membranine 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 <i>Nucleosil</i> 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

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 abscisų 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 ekstrakto (5.2) $\mu\text{g/ml}$

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 ekstrakto nustatytą amproliumo kiekį.

Padidintas tik amproliumo smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje $\pm 10\%$ tikslumu turi atitikti nepadidintos koncentracijos amproliumo ekstrakto smailės pradinį plotį.

7.1.2 Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

- 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 $\pm 2\text{ nm}$;
- 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;
- 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
CV_r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
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

9. **Pastabos**

- 9.1 Jei ėminyje yra ti amino, chromatogramoje prieš pat amproliumo smailę atsiranda ti amino smailė. Taikant šį metodą, amproliumas ir ti aminas turi būti atskirti. Jei amproliumas ir ti aminas neatsiskiria šiam metodui naudojamoje kolonėlėje (4.1.1), iki 50 % acetonitrilo, sudarančio judančiąją fazę (3.6), pakeičiama metanolio.
- 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 N1,N4-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 pašaras, 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, $\sigma = 10 \%$
- 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, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$
- 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).
- 3.11 Etaloninė medžiaga
- Grynas karbadokso: metil-3-(2-chinoksalinilmetilen)karbazato N^1, N^4 -dioksidas, E 850
- 3.11.1 Karbadokso pradinis etaloninis tirpalas, 100 $\mu\text{g/ml}$ (žr. skirsnio *Procedūra* 5 pastabą)
- Į 250 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamas 25 mg karbadokso etaloninės medžiagos (3.11). Ištirpinama metanolio ir acetonitrilo mišinyje (3.5), naudojant ultragarso vonią (4.7). Po apdorojimo ultragarsu tirpalas atvėsintas iki kambario temperatūros, skiedžiama vandeniu iki žymės ir sumaišomas. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant $\leq 4^\circ\text{C}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ karbadokso.
- Kalibravimo tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.
- Pastaba* Norint nustatyti karbadokso pašaruose, kuriuose jo koncentracija mažesnė nei 10 mg/kg, turi būti paruošti mažesnės nei 2,0 $\mu\text{g/ml}$ 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 sukepto 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, C₁₈, 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

5. Procedūra

Pastaba Karbadokso 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 trukdančių medžiagų. Pašaro tuščiasis ėminys turėtų atitikti 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 pasverama 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 acetoneitrilo mišinio (3.5), kolba užkemsama 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 pasverama 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 acetoneitrilo mišinio (3.5), kolba užkemsama 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 pasverama 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 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

Pasverama 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, C₁₈, 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 absčių 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).

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 ekstrakto (5.3.2) $\mu\text{g/ml}$,

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 ekstrakto (5.2.2 arba 5.2.3) $\mu\text{g/ml}$,

V_2 = ekstrahuojamas tūris ml (t. y. 50 premiksų; 150 preparatų)

f = praskiedimo faktorius pagal 5.2.2 (premikų) 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 ekstrakto 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:

- 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;
- 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;
- 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
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
S_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis
CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas
S_R = atkuriamumo standartinis nuokrypis
CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas

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

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

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

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