

31999L0027

L 118/36

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

1999 5 6

## KOMISIJOS DIREKTYVA 1999/27/EB

1999 m. balandžio 20 d.

**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**

(tekstas svarbus EEE)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 70/373/EEB dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų valstybinei pašarų kontrolei, įvedimo <sup>(1)</sup> su paskutiniais pakeitimais, padarytais Austrijos, Suomijos ir Švedijos stojimo aktu, ypač į jos 2 straipsnį,

- (1) kadangi direktyvoje 70/373/EEB reikalaujama, kad tikrinant, kaip laikomasi įstatymų ir kitų teisės aktų dėl pašarų kokybės ir sudėties, oficiali pašarų kontrolė būtų atliekama taikant Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodus;
- (2) kadangi 1970 m. lapkričio 23 d. Tarybos Direktyvoje 70/524/EEB dėl pašarų priedų <sup>(2)</sup> su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos reglamentu (EB) Nr. 45/1999 <sup>(3)</sup> reikalaujama, kad amproliumo ir diklazurilo kiekis turi būti nurodytas etiketėje, jei cheminė medžiaga dedama į premiksus ir pašarus; kadangi leidimas naudoti karbadoksą kaip pašarų priedą buvo panaikintas 1998 m. gruodžio 22 d. Komisijos reglamentu (EB) Nr. 2788/98, iš dalies keičiančiu Tarybos direktyvą 70/524/EEB dėl pašarų priedų, panaikinant leidimą vartoti tam tikras augimą skatinančias medžiagas <sup>(4)</sup>, todėl yra būtina uždraustųjų cheminių medžiagų neteisėto naudojimo oficiali kontrolė;
- (3) kadangi šioms cheminėms medžiagoms tikrinti turi būti sukurti Bendrijos analizės metodai;
- (4) kadangi 1971 m. birželio 15 d. pirmojoje Komisijos direktyvoje 71/250/EEB, nustatančioje oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus <sup>(5)</sup>, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 98/54/EB <sup>(6)</sup>, pateikiami analizės metodai, *inter alia*, garsyčių aliejui ir teobrominui nustatyti; kadangi atsižvelgiant į mokslo bei, technikos žinių pažangą aprašytieji metodai jau nebeatitinka numatytos paskirties; kadangi dėl tos priežasties šiuos metodus tikslinga būtų išbraukti;

- (5) kadangi 1972 m. gruodžio 5 d. ketvirtojoje Komisijos direktyvoje 73/46/EEB nustatančioje oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus <sup>(7)</sup>, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 98/54/EB, pateikiami analizės metodai, *inter alia*, retinoliui (vitaminui A) nustatyti; kadangi atsižvelgiant į mokslo bei technikos žinių pažangą aprašytasis metodas jau nebeatitinka numatytos paskirties; kadangi dėl tos priežasties retinolio nustatymo metodą tikslinga būtų išbraukti;
- (6) kadangi 1974 m. kovo 25 d. penktojoje Komisijos direktyvoje 74/203/EEB, nustatančioje oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus <sup>(8)</sup>, su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 81/680/EEB <sup>(9)</sup>, pateikiami krakmolo ir krakmolo stambiamolekulinių skilimo produktų, esančių pašaruose, kuriuos sudaro runkelių drožlės, runkelių išspaudos, džiovinti runkelių stiebai arba lapai, bulvių tyrė, džiovintos mielės, daug inulino turintys produktai arba spirgučiai, amproliumo, etopabato, dinitolmido, nikarbazino ir menadiono (vitamino K3) nustatymo analizės metodai; kadangi atsižvelgiant į mokslo bei technikos žinių pažangą visi aprašytieji metodai jau nebeatitinka numatytos paskirties; kadangi dėl tos priežasties šią direktyvą tikslinga būtų panaikinti;
- (7) kadangi šioje direktyvoje numatytos priemonės atitinka Pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės užtikrina, kad, vykdant oficialią amproliumo, diklazurilo ir karbadokso kiekio pašaruose ir premiksuose kontrolę, analizė būtų daroma taikant šios direktyvos priede nurodytus metodus.

<sup>(1)</sup> OL L 170, 1970 8 3, p. 2.<sup>(2)</sup> OL L 270, 1970 12 14, p. 1.<sup>(3)</sup> OL L 6, 1999 1 12, p. 3.<sup>(4)</sup> OL L 347, 1998 12 23, p. 31.<sup>(5)</sup> OL L 155, 1971 7 12, p. 13.<sup>(6)</sup> OL L 208, 1998 7 24, p. 49.<sup>(7)</sup> OL L 83, 1973 3 30, p. 21.<sup>(8)</sup> OL L 108, 1974 4 22, p. 7.<sup>(9)</sup> OL L 246, 1981 8 29, p. 32.

*2 straipsnis*

Direktyva 71/250/EEB iš dalies keičiama taip:

- 1) 1 straipsnyje išbraukiami žodžiai „garstyčių aliejui“ ir „teobrominui“.
- 2) Išbraukiami priedo 8 ir 13 punktai.

*3 straipsnis*

Direktyva 73/46/EEB iš dalies keičiama taip:

- 1) Išbraukiamas 2 straipsnis.
- 2) Išbraukiamas II priedas.

*4 straipsnis*

Direktyva 74/203/EEB panaikinama.

*5 straipsnis*

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję ne vėliau kaip iki 1999 m. spalio 31 d. įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

Jos taiko priemonės nuo 1999 m. lapkričio 1 d.

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

*6 straipsnis*

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

*7 straipsnis*

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1999 m. balandžio 20 d.

*Komisijos vardu*  
Franz FISCHLER  
*Komisijos narys*

## PRIEDAS

## A dalis

## AMPROLIUMO NUSTATYMAS

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metilpiridinio chlorido hidrochloridas

**1. Tikslas ir taikymo sritis**

Šis metodas taikomas amproliumui pašaruose ir premiksuose nustatyti. Aptikimo riba – 1 mg/kg, ribinė nustatymo vertė – 25 mg/kg.

**2. Metodo esmė**

Mėginys ekstrahuojamas metanolio ir vandens mišiniu. Ekstraktas skiedžiamas judančiojoje fazėje, filtruojamas per membranių filtrą ir amproliumo kiekis nustatomas katijonų mainų efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant UV detektorius.

**3. Reagentai****3.1. Metanolis.****3.2. Acetonitrilas, HPLC markės.****3.3. Vanduo, HPLC markės.****3.4. Natrio dihidrofosfato tirpalas,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$** 

Vandenyje (3.3) ištirpinama 13,80 g natrio dihidrofosfato monohidrato, 1000 ml matavimo kolboje praskiedžiama 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, 1000 ml matavimo kolboje praskiedžiama 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  $0,22 \mu\text{m}$  membranių filtrą (4.3) ir nudujinamas (pvz., ultragarso vonioje (4.4) bent 15 minučių).

**3.7. Etaloninė medžiaga: grynas amproliumas, 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metilpiridinio chlorido hidrochloridas, E 750 (žr. 9.2).****3.7.1. Pradinis etaloninis amproliumo tirpalas,  $500 \mu\text{g/ml}$** 

Į 100 ml matavimo kolbą  $0,1 \text{ mg}$  tikslumu pasveriami  $50 \text{ mg}$  amproliumo (3.7), ištirpinama  $80 \text{ ml}$  metanolio (3.1) ir  $10 \text{ min}$  įdedama kolba į ultragarso vonią (4.4). Po apdorojimo ultragarsu tirpalas atvėsina iki kambario temperatūros, vandeniu praskiedžiamas iki žymės ir sumaišomas. Esant  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

**3.7.2. Tarpinis etaloninis amproliumo tirpalas,  $50 \mu\text{g/ml}$** 

Į  $50 \text{ ml}$  matavimo kolbą pipete paimama  $5 \text{ ml}$  pradinio etaloninio tirpalo (3.7.1), praskiedžiama iki žymės ekstrahavimo tirpikliu (3.8) ir sumaišoma. Esant  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

**3.7.3. Kalibravimo tirpalai**

Į  $50 \text{ ml}$  matavimo kolbas įpilama  $0,5$ ,  $1$  ir  $2 \text{ ml}$  tarpinio etaloninio tirpalo (3.7.2). Praskiedžiama iki žymės judančiojoje fazėje (3.6) ir sumaišoma. Šie tirpalai atitinka  $0,5$ ,  $1$  ir  $2 \mu\text{g/ml}$  amproliumo. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

- 3.8. Ekstrahavimo tirpiklis
- Metanolio (3.1) ir vandens mišinys 2 + 1 (v + v).
4. **Įranga**
- 4.1. HPLC įranga su injekcijos sistema, tinkama 100 µl injekcijos tūriui.
- 4.1.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė 125 mm × 4 mm, katijonitas *Nucleosil 10 SA*, 10 µm dalelių įkrova, arba lygiavertė.
- 4.1.2. Reguliuojamo bangos ilgio UV detektorius arba diodų matricos detektorius.
- 4.2. Membraninis filtras, medžiaga – PTFE, 0,45 µm.
- 4.3. Membraninis filtras, 0,22 µm.
- 4.4. Ultragarso vonia.
- 4.5. Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.
5. **Darbo eiga**
- 5.1. *Bendrieji dalykai*
- 5.1.1. Pašaras be priedų
- Regeneravimo bandymui (5.1.2) skirtas pašaras be priedų turėtų būti analizuojamas, norint patikrinti, ar jame nėra amproliumo ir trukdančių cheminių medžiagų. Pašaro be priedų tipas turėtų atitikti mėginio pašaro tipą ir darant analizę neturėtų būti rasta amproliumo arba trukdančių medžiagų.
- 5.1.2. Regeneravimo testas
- Regeneravimo testas turėtų būti daromas analizuojant pašarą be priedų, į kurį pridedamas amproliumo kiekis, maždaug atitinkantis mėginio amproliumo kiekį. Norint pridėti 100 mg/kg, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 10 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.7.1) ir išgarinama iki maždaug 0,5 ml. Pridedama 50 g pašaro be priedų, gerai sumaišoma, paliekama 10 minučių ir prieš ekstrahavimo pakopą (5.2) dar kelis kartus sumaišoma.
- Jei nėra pašaro be priedų, kuris būtų panašus į mėginio pašarą (žr. 5.1.1), regeneravimo bandymą galima daryti kitu būdu, taikant etaloninės cheminės medžiagos pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą mėginį pridedamas amproliumo kiekis, maždaug atitinkantis amproliumo kiekį mėginyje. Šis mėginys analizuojamas kartu su mėginiais be pridėto amproliumo ir regeneravimo laipsnis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.
- 5.2. *Ekstrahavimas*
- 5.2.1. Premiksai (kiekis < 1 % amproliumo) ir pašarai
- Atsižvelgiant į amproliumo kiekį, į 500 ml kūginę kolbą 0,01 g tikslumu pasveriami 5–40 g mėginio ir įpilama 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.8). Kolba įdedama į ultragarso vonią (4.4) ir paliekama 15 minučių. Kolba išimama iš ultragarso vonios ir 1 valandą purtoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.5). Alikvotinė ekstrakto dalis praskiedžiama judančiaja faze (3.6), kad amproliumo koncentracija būtų 0,5–2 µg/ml, ir sumaišoma (žr. 9.3 pastabą). 5–10 ml šio praskiesto tirpalo filtruojama per membraninį filtrą (4.2). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).
- 5.2.2. Premiksai (kiekis 1 % amproliumo)
- Atsižvelgiant į amproliumo kiekį, į 500 ml kūginę kolbą 0,001 g tikslumu pasveriami 1–4 g mėginio ir įpilama 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.8). Kolba įdedama į ultragarso vonią (4.4) ir paliekama 15 minučių. Kolba išimama iš ultragarso vonios ir 1 valandą purtoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.5). Alikvotinė ekstrakto dalis praskiedžiama judančiaja faze (3.6), kad amproliumo koncentracija būtų 0,5–2 µg/ml, ir sumaišoma. 5–10 ml šio praskiesto tirpalo filtruojama per membraninį filtrą (4.2). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).
- 5.3. *Nustatymas HPLC metodu*

## 5.3.1. Parametrai:

Rekomenduojamos šios sąlygos, tačiau galima naudoti kitas sąlygas, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.1.1):	125 mm × 4 mm, katijonitas <i>Nucleosil 10 SA</i> , 10 µm dalelių įkrova, arba lygiavertė.
Judančioji fazė (3.6):	acetoniirilo (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.
Matavimo bangos ilgis:	264 nm.
Injekcijos tūris:	100 µl.

Patikrinamas chromatografo sistemos stabilumas, kelis kartus padarant 1,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3) injekciją, kol bus pasiektas nekintamas smailės aukštis ir sulaikymo trukmė.

## 5.3.2. Kalibravimo kreivė

Kelis kartus padaroma kalibravimo tirpalo (3.7.3) injekcija ir nustatomas kiekvieną koncentraciją atitinkantys smailės aukščiai (plotai). Nubraižoma kalibravimo kreivė, ordinačių ašyje žymint kalibravimo tirpalų vidutines smailės aukščio (plot) vertes, absčių ašyje – atitinkamas koncentracijos vertes µg/ml.

## 5.3.3. Mėginio tirpalas

Kelis kartus padaroma mėginio ekstrakto (5.2) injekcija, naudojant tokį pat kaip kalibravimo tirpalų tūrį, ir nustatomas vidutinis amproliumo smailių aukštis (plotas).

## 6. Rezultatų apskaičiavimas

Pagal mėginio tirpalo amproliumo smailių vidutinį aukštį (plotą) kalibravimo kreivėje (5.3.2) randama mėginio tirpalo koncentracija µg/ml.

Amproliumo koncentracija mėginyje *w* mg/kg nustatoma pagal šią formulę:

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

Šioje formulėje:

*V* = ekstrahavimo tirpiklio (3.8) tūris ml pagal 5.2 (t. y. 200 ml);

*b* = amproliumo koncentracija mėginio ekstrakto (5.2) µg/ml;

*f* = praskiedimo koeficientas pagal 5.2;

*m* = mėginio masė g.

## 7. Rezultatų patvirtinimas

## 7.1. Tapatumas

Analitės tapatumą galima patvirtinti vykdant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorius, kuriuo palyginami mėginio ekstrakto (5.2) ir 2,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3) spektrai.

## 7.1.1. Kochromatografija

Mėginio ekstrakto (5.2) koncentracija padidinama pridendant atitinkamą kalibravimo tirpalo (3.7.3) kiekį. Pridedamo amproliumo kiekis turėtų atitikti mėginio ekstrakto rasto amproliumo kiekį.

Turėtų padidėti tik amproliumo smailės aukštis, įvertinus pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės pusaukščio plotis ± 10 % tikslumu turi atitikti pradinį amproliumo smailės, gautos nepadidintos koncentracijos mėginio ekstraktui, plotį.

## 7.1.2. Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai vertinami pagal šiuos kriterijus:

- a) Mėginio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, registruojamas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriumi tipiška vertė būtų  $\pm 2$  nm.
- b) 210–320 nm diapazone mėginio ir etalono spektrai, užrašyti apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir nei viename matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis kaip 15 % etaloninės analitės optinio tankio vertės.
- c) 210–320 nm diapazone mėginio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir žemyn besileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose ir visuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis kaip 15 % smailės viršūnę atitinkančio optinio tankio vertės.

Jei chromatogramos neatitinka kurio nors vieno iš šių kriterijų, analitės buvimas nepatvirtinamas.

## 7.2. Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties mėginio matavimo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis kaip:

- 15 % santykinės didesnės vertės, jei amproliumo kiekis 25 mg/kg – 500 mg/kg,
- 75 mg/kg, jei amproliumo kiekis 500 mg/kg – 1000 mg/kg,
- 7,5 % santykinės didesnės vertės, jei amproliumo kiekis didesnis kaip 1000 mg/kg.

## 7.3. Regeneravimas

Padidintos koncentracijos (pašaro be priedų) mėginio regeneravimo laipsnis turi būti bent 90 %.

## 8. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai

Buvo parengtas tarplaboratorinis tyrimas, kurį vykdant buvo analizuojamos trejos naminių paukščių pašaro rūšys (1–3 mėginiai), vienas mineralinis pašaras (4 mėginys) ir vienas premixas (5 mėginys). Rezultatai pateikiami šioje lentelėje:

	1 mėginys (pašaras be priedų)	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
vidutinė vertė [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
Vardinė koncentracija [mg/kg]	–	50	200	5 000	25 000

L: laboratorijų skaičius,

n: atskirų verčių skaičius,

$s_r$ : pakartojamumo standartinis nuokrypis,

$CV_r$ : pakartojamumo nuokrypio koeficientas,

$s_R$ : atkuriamumo standartinis nuokrypis,

$CV_R$ : atkuriamumo nuokrypio koeficientas.

**9. Pastabos**

- 9.1. Jei mėginyje yra tiamino, chromatogramoje prieš pat amproliumo smailę atsiranda tiamino smailė. Taikant šį metodą, amproliumas ir tiaminas turi būti atskirti. Jei amproliumas ir tiaminas neatsiskiria šiam metodui naudojamame kolonėlėje (4.1.1), iki 50 % acetonitrilo, sudarančio judančiąją fazę (3.6), pakeičiama metanolis.
- 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 sudaryti 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 sulaukymo trukmė gali stipriai pasikeisti dėl joninės jėgos pokyčio.

**B dalis****DIKLAZURILO NUSTATYMAS**

(+)-4-chlorfenil[2,6-dichlor-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetoneitrilas

**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. Metodo esmė**

Pridėjus vidinio etalono, mėginys ekstrahuojamas parūgštintu metanolis. 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 UV detektorius.

**3. Reagentai**

- 3.1. Vanduo, HPLC markės.
- 3.2. Amonio acetatas.
- 3.3. Tetrabutilamonio hidrosulfatas (TBHS).
- 3.4. Acetonitrilas, HPLC markės.
- 3.5. Metanolis, HPLC markės.
- 3.6. *N,N*-dimetilformamidas (DMF).
- 3.7. Vandenilio chlorido rūgštis,  $\rho_{20} = 1,19$  g/ml.
- 3.8. Etaloninė cheminė medžiaga: garantuoto grynumo diklazurilas II-24: (+)-4-chlorfenil[2,6-dichlor-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetoneitrilas, E 771.
  - 3.8.1. Pradinis etaloninis diklazurilo 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), praskiedžiama 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. Etaloninis diklazurilo tirpalas, 50 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą paimama 5,00 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.8.1.), praskiedžiama 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 cheminė medžiaga: 2,6 dichlor-*a*-(4-chlorfenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2(3H)-il)-*a*-metilbenzenacetoni-trilas.

3.9.1. Vidinio etalono pradinis tirpalas, 500 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamą 25 mg vidinio etalono cheminės medžiagos (3.9). Ištirpinama DMF (3.6), praskiedžiama 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 paimama 5,00 ml pradinio vidinio etalono tirpalo (3.9.1), praskiedžiama 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.

3.9.3. Premiksų vidinio etalono tirpalas, p/1000 mg/ml (p = diklazurilo vardinė koncentracija premikse, mg/kg).

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamą p/10 mg vidinio etalono cheminės medžiagos, ultragarso vonioje (4.6) ji ištirpinama DMF (3.6), praskiedžiama iki žymės DMF ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.10. Kalibravimo tirpalas, 2 µg/ml.

Į 50 ml matavimo kolbą pipete paimama 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), praskiedžiama 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 cm<sup>3</sup>, sorbento masė: 100 mg.

3.12. Ekstrahavimo tirpiklis: parūgštintas metanolis

Į 1000 ml metanolio (3.5) pipete įpilama 5,0 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.7) ir sumaišoma.

3.13. HPLC judančioji fazė

Eliuentas A: amonio acetato ir tetrabutilamonio hidrosulfato mišinio tirpalas.

3.13.1. 5 g amonio acetato (3.2) ir 3,4 g TBHS (3.3) ištirpinama 1000 ml vandens (3.1) ir sumaišoma.

3.13.2. Eliuentas B: acetoni-trilas (3.4).

3.13.3. Eliuentas C: metanolis (3.5).

## 4. Įranga

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 UV detektorius arba diodų matricos detektorius.

4.3. Vakuuminis sukamasis garintuvas.

4.4. Membraninis filtras, 0,45 µm.



4.5. Vakuonavimo sistema.

4.6. Ultragarso vonia.

## 5. Darbo eiga

5.1. Bendrieji dalykai

5.1.1. Pašaras be priedų

Turėtų būti analizuojamas pašaras be priedų siekiant patikrinti, ar jame nėra diklazurilo ir trukdančių cheminių medžiagų. Pašaro be priedų tipas turėtų atitikti mėginio pašaro tipą ir darant analizę neturėtų būti rasta diklazurilo arba trukdančių medžiagų.

5.1.2. Regeneravimo testas

Regeneravimo testas turėtų būti daromas analizuojant pašarą be priedų, į kurį pridedamas diklazurilo kiekis, maždaug atitinkantis mėginio diklazurilo kiekį. Norint pridėti 1 mg/kg, į 50 g pašaro be priedų įpilama 0,1 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.8.1), gerai sumaišoma, paliekama 10 minučių ir prieš vykdant kitą pakopą (5.2) dar kelis kartus sumaišoma.

Jei nėra pašaro be priedų, kuris būtų panašus į mėginio pašarą (žr. 5.1.1), regeneravimo bandymą galima daryti kitu būdu, taikant etaloninės cheminės medžiagos pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuoti skirtą mėginį pridedamas diklazurilo kiekis, maždaug atitinkantis diklazurilo kiekį mėginyje. Šis mėginys analizuojamas kartu su mėginiu be pridėto diklazurilo ir regeneravimo laipsnis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2. Ekstrahavimas

5.2.1. Pašarai

Maždaug 50 g mėginio pasverama 0,01 g tikslumu. Supilama 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 purtomas ant purtyklės (4.1) per naktį. Paliekama 10 minučių nusistovėti. Tirpalo virš nuosėdų alikvotinė 20 ml dalis paimama į tinkamą stiklinį indą ir praskiedžiama 20 ml vandens. Šis tirpalas supilamas į ekstrahavimo tūtą (3.11) ir filtruojamas, prijungus vakuumą (4.5). Tūta plaunama 25 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12) ir vandens mišiniu, 65 + 35 (V + V). Surinktos frakcijos išpilamos ir junginiai išplaunami 25 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12) ir vandens mišiniu, 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 membraniinį filtrą (4.4). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3).

5.2.2. Premiksai

Maždaug 1 g mėginio pasverama 0,001 g tikslumu. Supilama 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 purtomas ant purtyklės (4.1) per naktį. Paliekama 10 minučių nusistovėti. Alikvotinė tirpalo virš nuosėdų dalis 10 000/p ml (p = vardinė diklazurilo koncentracija premikse, mg/kg) paimama į tinkamo dydžio apvaliadugnę kolbą. Garinama beveik iki sauso likučio sukamajame garintuve (4.3) esant 60 °C ir 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. Nustatymas HPLC metodu

5.3.1. Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos, tačiau galima naudoti kitas sąlygas, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

— Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, <i>Hypersil ODS</i> , 3 μm dalelių įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
— 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 minučių 30 minučių trukmės gradientinis eliuavimas kol:  $A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v)$
- 10 minučių plovimas eliuentu B
- Srautas: 1,5–2 ml/min
- Injekcijos tūris: 20  $\mu$ l
- Matavimo bangos ilgis: 280 nm

Patikrinamas chromatografo sistemos stabilumas, kelis kartus padarant 2,0  $\mu$ g/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.10) injekciją, kol pasiekiamas nekintamas smailės aukštis ir sulaukymo trukmė.

### 5.3.2. Kalibravimo tirpalas

Kelis kartus padaroma 20  $\mu$ l kalibravimo tirpalo (3.10) injekcija ir nustatomas diklazurilo bei vidinio etalono smailių vidutinis smailės aukštis (plotas).

### 5.3.3. Mėginio tirpalas

Kelis kartus padaroma 20  $\mu$ l mėginio tirpalo (5.2.1. arba 5.2.2.) injekcija ir nustatomas diklazurilo bei vidinio etalono smailių vidutinis smailės aukštis (plotas).

## 6. Rezultatų apskaičiavimas

### 6.1. Pašarai

Diklazurilo koncentracija  $w$  (mg/kg) mėginyje nustatoma pagal šią formulę:

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

kur:

$h_{d,s}$  = mėginio tirpalo (5.2.1) diklazurilo smailės aukštis (plotas);

$h_{i,s}$  = mėginio 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);

$\beta_{d,c}$  = diklazurilo koncentracija kalibravimo tirpale  $\mu$ g/ml (3.10);

$m$  = mėginio masė g;

$V$  = mėginio ekstrakto tūris pagal 5.2.1 (t. y. 2,5 ml).

### 6.2. Premiksai

Diklazurilo koncentracija  $w$  (mg/kg) mėginyje randama pagal šią formulę:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \cdot \beta_{d,c} \cdot 0,02 Vp}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} \cdot m} [\text{mg/kg}]$$

kur:

$h_{d,c}$  = kalibravimo tirpalo (3.10) diklazurilo smailės aukštis (plotas);

$h_{i,c}$  = kalibravimo tirpalo (3.10) vidinio etalono smailės aukštis (plotas);

$h_{d,s}$  = mėginio tirpalo (5.2.2) diklazurilo smailės aukštis (plotas);

$h_{i,s}$  = mėginio tirpalo (5.2.2) vidinio etalono smailės aukštis (plotas);

$\beta_{d,c}$  = diklazurilo koncentracija kalibravimo tirpale (3.10);

$m$  = mėginio masė g

$V$  = mėginio ekstrakto tūris pagal 5.2.2 (t. y. 25 ml);

$p$  = vardinė diklazurilo koncentracija premikse mg/kg.

## 7. Rezultatų patvirtinimas

### 7.1. Tapatumas

Analitės tapatumą galima patvirtinti vykdant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo palyginami mėginio ekstrakto (5.2.1 arba 5.2.2) ir kalibravimo tirpalo (3.10) spektrai.

#### 7.1.1. Kochromatografija

Mėginio ekstrakto (5.2.1 arba 5.2.2) koncentracija padidinama pridendant atitinkamą kalibravimo tirpalo (3.10) kiekį. Pridedamo diklazurilo kiekis turėtų atitikti mėginio ekstrakto rasto diklazurilo kiekį.

Turėtų padidėti tik diklazurilo ir vidinio etalono smailių aukštis, įvertinus pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailių pusaukščio plotis  $\pm 10\%$  tikslumu turi atitikti pradinį diklazurilo arba vidinio etalono smailių, gautų nepadidintos koncentracijos mėginio ekstraktui, plotį.

#### 7.1.2. Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai vertinami pagal šiuos kriterijus:

- Mėginio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, registruojamas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriumi tipiška vertė būtų  $\pm 2$  nm.
- 230–320 nm diapazone mėginio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir nei viename matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis kaip 15 % etaloniškos analitės optinio tankio vertės.
- 230–320 nm diapazone mėginio ekstraktui gautos smailės pakilimo, viršūnės ir nusileidimo spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinės absorbcijos 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 chromatogramos neatitinka kurio nors vieno iš šių kriterijų, analitės buvimas nepatvirtinamas.

### 7.2. Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties mėginio matavimo rezultatų skirtumas neturi būti didesnis kaip:

- 30 % santykinės 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 % santykinės didesnės vertės, jei diklazurilo kiekis didesnis kaip 5 mg/kg.

### 7.3. Regeneravimas

Padidintos koncentracijos (pašaro be priedų) mėginio regeneravimo laipsnis turi būti bent 80 %.

## 8. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai

Buvo parengtas tarplaboratorinis tyrimas, kurį vykdant 11 laboratorijų analizavo penkių tipų mėginius. Šiuos mėginius 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 mėginį analizuoti vieną arba du kartus. (Išsamesnė informacija apie šį tarplaboratorinį tyrimą yra pateikta *Journal of AOAC International*, Volume 77, Nr. 6, 1994, p.1359–1361). Rezultatai pateikti šioje lentelėje:

	1 mėginys A 100	2 mėginys O 100	3 mėginys L1	4 mėginys Z1	5 mėginys K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Vidutinė vertė	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
Sr (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CVr (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
SR (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CVR (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Vardinė koncentracija (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: laboratorijų skaičius,  
n: atskirų verčių skaičius,  
sr: pakartojamumo standartinis nuokrypis,  
CVr: pakartojamumo nuokrypio koeficientas,  
SR: atkuriamumo standartinis nuokrypis,  
CVR: atkuriamumo nuokrypio koeficientas.

#### 9. Pastabos

Turi būti iš anksto parodyta, kad diklazurilo atsakas matuojamų koncentracijos verčių diapazone yra tiesinis.

### C dalis

#### KARBADOKSO NUSTATYMAS

Metil-3-(2-chinoksalinilmetilen)karbazat- $N^1, N^4$ -dioksidas

#### 1. Tikslas ir taikymo sritis

Šis metodas taikomas karbadoksui pašaruose, premiksuose ir preparatuose nustatyti. Aptikimo riba – 1 mg/kg. Ribinė nustatymo vertė – 10 mg/kg.

#### 2. Metodo esmė

Pasiekus mėginio ir vandens pusiausvyrą, mėginys ekstrahuojamas metanolio ir acetonitrilo mišiniu. Jei tai pašarai, alikvotinė filtruoto ekstrakto dalis gryninama aliuminio oksido kolonėlėje. Jei tai premiksai arba preparatai, alikvotinė filtruoto ekstrakto dalis praskiedžiama vandens, metanolio ir acetonitrilo mišiniu iki atitinkamos koncentracijos. Karbadokso kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), naudojant UV detektorius.

#### 3. Reagentai

3.1. Metanolis.

3.2. Acetonitrilas, HPLC markės.

3.3. Acto rūgštis,  $w = 100\%$ .

3.4. Aliuminio oksidas: neutralusis, aktyvumo laipsnis I.

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) praskiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.7. Natrio acetatas,  $CH_3COONa$ .

- 3.8. Vanduo, HPLC markės.
- 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 6,0. Tirpalas supilamas į 1000 ml matavimo kolbą, praskiedžiama vandeniu (3.8) iki žymės ir sumaišoma.
- 3.10. HPLC judančioji fazė
- 825 ml acetatinio buferinio tirpalo (3.9) sumaišoma su 175 ml acetanitrilo (3.2). Tirpalas filtruojamas per 0,22  $\mu\text{m}$  filtrą (4.5) ir nudujinamas (pvz., 10 minučių ultragarso vonioje).
- 3.11. Etaloninė cheminė medžiaga
- Grynas karbadoksas: metil-3-(2-chinoksalinilmetilen)karbazat- $\text{N}^1, \text{N}^4$ -dioksidas, E 850.
- 3.11.1. Pradinis etaloninis karbadokso tirpalas, 100  $\mu\text{g/ml}$  (žr. skirsnio Darbo eiga 5 punktą)
- Į 250 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamą 25 mg karbadokso etaloninės cheminės medžiagos (3.11). Ištirpinama metanolio-acetonitrilo mišinyje (3.5), naudojant ultragarso vonią (4.7). Po apdoravimo ultragarsu tirpalas atvėšinamas iki kambario temperatūros, vandeniu praskiedžiamas iki žymės ir sumaišomas. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama rudo stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant 4 °C temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.
- 3.11.2. Kalibravimo tirpalai
- Į 100 ml matavimo kolbas įpilama 2,0, 5,0, 10,0, ir 20,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.11.1). Įpilama 30 ml vandens, praskiedžiama iki žymės metanolio-acetonitrilo mišiniu (3.5) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija. Šie tirpalai atitinka 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 karbadokšą pašaruose, kuriuose jo koncentracija mažesnė kaip 10 mg/kg, turi būti paruošti mažesnės kaip 2,0  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos kalibravimo tirpalai.
- 3.12. Vandens bei [metanolio ir acetanitrilo] (3.5) mišinys, 300 + 700 (v + v).
- Sumaišoma 300 ml vandens bei 700 ml metanolio ir acetanitrilo mišinio (3.5).
- 4. Įranga**
- 4.1. Laboratorinė purtyklė arba magnetinė maišyklė.
- 4.2. Filtravimo popierius iš stiklo pluošto (*Whatman* GF/A arba lygiavertis).
- 4.3. Stiklinė kolonėlė (ilgis 300–400 mm, vidinis skersmuo maždaug 10 mm) su pertvara iš sukepinto stiklo ir išleidžiamuoju vožtuvu.
- Pastaba* Galima naudoti stiklinę kolonėlę su uždarmuoju 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 injekcijos sistema, tinkama 20  $\mu\text{l}$  injekcijos tūriui.
- 4.4.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė: 300 mm × 4 mm, C18, 10  $\mu\text{m}$  dalelių įkrova, arba lygiavertė.
- 4.4.2. Reguliuojamo bangos ilgio UV detektorius arba diodų matricos detektorius, veikiantis 225–400 nm diapazone.
- 4.5. Membraninis filtras, 0,22  $\mu\text{m}$ .
- 4.6. Membraninis filtras, 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 4.7. Ultragarso vonia.
- 5. Darbo eiga**
- Pastaba* Karbadoksas yra jautrus šviesai. Visus veiksmus darykite esant susilpnintai šviesai arba naudokite rudo stiklo arba į aliuminio foliją įvyniotus stiklinius indus.
- 5.1. Bendrieji dalykai

### 5.1.1. Pašaras be priedų

Regeneravimo testui (5.1.2) daryti, turėtų būti analizuojamas pašaras be priedų siekiant patikrinti, ar jame nėra karbadokso ir trukdančių cheminių medžiagų. Pašaro be priedų tipas turėtų atitikti mėginio pašaro tipą ir darant analizę neturėtų būti rasta karbadokso arba trukdančių medžiagų.

### 5.1.2. Regeneravimo testas

Regeneravimo testas turėtų būti daromas analizuojant pašarą be priedų (5.1.1), į kurį pridedamas karbadokso kiekis, maždaug atitinkantis mėginio karbadokso kiekį. Norint pridėti 50 mg/kg, į 200 ml kūginę kolbą įpilama 5,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.11.1). Azoto srovėje išgarinama iki maždaug 0,5 ml. Pridedama 10 g pašaro be priedų, gerai sumaišoma ir 10 minučių palaukiama prieš pradant ekstrahavimo pakopą (5.2).

Jei nėra pašaro be priedų, kuris būtų panašus į mėginio pašarą (žr. 5.1.1), regeneravimo bandymą galima daryti taikant etaloninės cheminės medžiagos pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuoti skirtą mėginį pridedamas karbadokso kiekis, maždaug atitinkantis jo kiekį mėginyje. Šis mėginys analizuojamas kartu su mėginiu be pridėto karbadokso ir regeneravimo laipsnis gali būti apskaičiuotas atimant.

## 5.2. Ekstrahavimas

### 5.2.1. Pašarai

Maždaug 10 g mėginio pasveriami 0,01 g tikslumu ir supilama į 200 ml kūginę kolbą. Įpilama 15,0 ml vandens, sumaišoma ir paliekama 5 minutėms pusiausvyrai pasiekti. Įpilama 35,0 ml metanolio ir acetonitrilo mišinio (3.5), užkemšama ir 30 minučių purtoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.1). Tirpalas filtruojamas per filtro popierių iš stiklo pluošto (4.2). Tirpalas saugomas gryninimo pakopai (5.3).

### 5.2.2. Premiksai (0,1–2,0 %)

Maždaug 1 g nesusmulkinto mėginio pasveriami 0,01 g tikslumu ir supilama į 200 ml kūginę kolbą. Įpilama 15,0 ml vandens, sumaišoma ir paliekama 5 minutėms pusiausvyrai pasiekti. Įpilama 35,0 ml metanolio ir acetonitrilo mišinio (3.5), užkemšama ir 30 minučių purtoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.1). Tirpalas filtruojamas per filtro popierių iš stiklo pluošto (4.2). Alikvotinė filtrato dalis paimama pipete į 50 ml matavimo kolbą. Įpilama 15,0 ml vandens, praskiedžiama iki žymės metanolio ir acetonitrilo mišiniu (3.5) ir sumaišoma. Galutiniam tirpale karbadokso koncentracija turėtų būti apytikriai lygi 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 %)

Maždaug 0,2 g nesusmulkinto mėginio pasveriami 0,001 g tikslumu ir supilama į 250 ml kūginę kolbą. Įpilama 45,0 ml vandens, sumaišoma ir paliekama 5 minutėms pusiausvyrai pasiekti. Įpilama 105,0 ml metanolio ir acetonitrilo mišinio (3.5), užkemšama ir homogenizuojama. 15 minučių mėginys apdorojamas ultragarsu (4.7), vėliau 15 minučių purtomas arba maišomas (4.1). Tirpalas filtruojamas per filtro popierių iš stiklo pluošto (4.2). Alikvotinė filtrato dalis praskiedžiama vandens bei metanolio ir acetonitrilo mišiniu (3.12), kad galutinė karbadokso koncentracija būtų 10–15 µg/ml (10 % preparatams praskiedimo koeficientas 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

Pasveriami 4 g aliuminio oksido (3.4) ir supilama į stiklinę kolonėlę (4.3).

### 5.3.2. Mėginio gryninimas

Į aliuminio oksido kolonėlę supilama 15 ml filtruoto ekstrakto (5.2.1) ir pirmieji 2 ml eliuato nupilami. Surenkamas kitas 5 ml tūris ir alikvotinė dalis filtruojama per 0,45 µm filtrą (4.6). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.4).

## 5.4. Nustatymas HPLC metodu

## 5.4.1. Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos, tačiau galima naudoti kitas sąlygas, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.1.1): 300 mm × 4,0 mm, C18, 10 µm dalelių įkrova, arba lygiavertė.

Judančioji fazė (3.10): acetatinio buferinio tirpalo (3.9) ir acetonitrilo (3.2) mišinys, 825 + 175 (v + v).

Srautas: 1,5–2 ml/min.

Matavimo bangos ilgis: 365 nm.

Injekcijos tūris: 20 µl.

Patikrinamas chromatografo sistemos stabilumas, kelis kartus padarant 5,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.11.2) injekciją, kol pasiekiamas nekintamas smailės aukštis ir sulaikymo trukmė.

## 5.4.2. Kalibravimo kreivė

Kelis kartus išvirkščijama kiekvieno kalibravimo tirpalo (3.11.2) ir nustatomi kiekvieną koncentraciją atitinkantys smailės aukščiai (plotai). Nubraižoma kalibravimo kreivė, ordinačių ašyje pažymint kalibravimo tirpalų vidutines smailės aukščio (ploto) vertes, abscisių ašyje – atitinkamas koncentracijos vertes µg/ml.

## 5.4.3. Mėginio tirpalas

Kelis kartus išvirkščijama pašarų (5.3.2), premiksų (5.2.2) ir preparatų (5.2.3) mėginio ekstrakto ir nustatomas vidutinis karbadokso smailių aukštis (plotas).

## 6. Rezultatų apskaičiavimas

Pagal mėginio tirpalo karbadokso smailių vidutinį aukštį (plotą) kalibravimo kreivėje (5.4.2) randama mėginio tirpalo koncentracija µg/ml.

## 6.1. Pašarai

Karbadokso koncentracija mėginyje  $w$  (mg/kg) apskaičiuojama pagal šią formulę:

$$w = \frac{b \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

kur:

$b$  = karbadokso koncentracija mėginio ekstrakto (5.3.2) µg/ml;

$V_1$  = ekstrahavimo tūris ml (t. y. 50);

$m$  = mėginio masė g.

## 6.2. Premiksai ir preparatai

Karbadokso koncentracija mėginyje  $w$  (mg/kg) apskaičiuojama pagal šią formulę:

$$w = \frac{b \times V_1 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

kur:

$b$  = karbadokso koncentracija mėginio ekstrakto (5.2.2 arba 5.2.3) µg/ml;

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

$f$  = praskiedimo koeficientas pagal 5.2.2 (premiksai) arba 5.2.3 (preparatai);

$m$  = mėginio masė g.





2 lentelė. Tarplaboratorinio premiksų ir preparatų tyrimo rezultatai

	Premiksai				Preparatai		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Vidutinė vertė (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV <sub>r</sub> (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
SR (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CVR (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Vardinė koncentracija (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: laboratorijų skaičius,  
n: atskirų verčių skaičius,  
sr: pakartojamumo standartinis nuokrypis,  
CV<sub>r</sub>: pakartojamumo nuokrypio koeficientas,  
SR: atkuriamumo standartinis nuokrypis,  
CVR: atkuriamumo nuokrypio koeficientas.