

Šis dokuments ir tikai informatīvs, un tam nav juridiska spēka. Eiropas Savienības iestādes neatbild par tā saturu. Attiecīgo tiesību aktu un to preambulu autentiskās versijas ir publicētas Eiropas Savienības “Oficiālajā Vēstnesī” un ir pieejamas datubāzē “Eur-Lex”. Šie oficiāli spēkā esošie dokumenti ir tieši pieejami, noklikšķinot uz šajā dokumentā iegultajām saitēm

► **B**

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 152/2009
(2009. gada 27. janvāris),
ar ko nosaka paraugu ņemšanas un analīzes metodes barības oficiālajai kontrolei
(Dokuments attiecas uz EEZ)
(OV L 54, 26.2.2009., 1. lpp.)

Grozīta ar:

		Oficiālais Vēstnesis		
		Nr.	Lappuse	Datums
► <u>M1</u>	Komisijas Regula (ES) Nr. 278/2012 (2012. gada 28. marts)	L 91	8	29.3.2012.
► <u>M2</u>	Komisijas Regula (ES) Nr. 51/2013 (2013. gada 16. janvāris)	L 20	33	23.1.2013.
► <u>M3</u>	Komisijas Regula (ES) Nr. 691/2013 (2013. gada 19. jūlijs)	L 197	1	20.7.2013.
► <u>M4</u>	Komisijas Regula (ES) Nr. 709/2014 (2014. gada 20. jūnijs)	L 188	1	27.6.2014.
► <u>M5</u>	Komisijas Regula (ES) 2017/645 (2017. gada 5. aprīlis)	L 92	35	6.4.2017.
► <u>M6</u>	Komisijas Regula (ES) 2017/771 (2017. gada 3. maijs)	L 115	22	4.5.2017.
► <u>M7</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2020/1560 (2020. gada 26. oktobris)	L 357	17	27.10.2020.
► <u>M8</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2022/893 (2022. gada 7. jūnijs)	L 155	24	8.6.2022.
► <u>M9</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2024/771 (2024. gada 29. februāris)	L 771	1	15.3.2024.

▼B**KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 152/2009****(2009. gada 27. janvāris),****ar ko nosaka paraugu ņemšanas un analīzes metodes barības
oficiālajai kontrolei****(Dokuments attiecas uz EEZ)****▼M3***1. pants***▼M9**

Paraugu ņemšanu barības oficiālajai kontrolei, īpaši saistībā ar sastāvdaļu noteikšanu, ieskaitot materiālu, kas satur ģenētiski modificētus organismus (ĢMO) vai sastāv no tādiem organismiem, vai ir no tiem ražots, barības piedevas, kas definētas Eiropas Parlamenta un Padomes Regulā (EK) Nr. 1831/2003 ⁽¹⁾, nevēlamas vielas, kas definētas Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvā 2002/32/EK ⁽²⁾, veic saskaņā ar I pielikumā aprakstītajām metodēm, izņemot paraugu ņemšanu mikrobioloģiskās kontaminācijas kontrolei.

▼M3

Paraugu ņemšanas metode, kas aprakstīta I pielikumā, ir piemērojama barības kontrolei saistībā ar pesticīdu atlieku noteikšanu, kas definēta Eiropas Parlamenta un Padomes Regulā (EK) Nr. 396/2005 ⁽³⁾, un pārbaudot atbilstību Regulai (ES) Nr. 619/2011.

▼B*2. pants*

Paraugus analīzei sagatavo un rezultātus izsaka saskaņā ar metodēm, kas izklāstītas II pielikumā.

3. pants

Analīzes barības oficiālajai kontrolei veic, izmantojot metodes, kas izklāstītas III pielikumā (Analīzes metodes, lai kontrolētu barības līdzekļu un barības maisījumu sastāvu), IV pielikumā (Analīzes metodes, lai kontrolētu atļauto piedevu koncentrāciju barībā), V pielikumā (Analīzes metodes, lai kontrolētu nevēlamas vielas barībā) un VI pielikumā (Analīzes metodes, lai noteiktu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas barības oficiālajai kontrolei).

4. pants

Mājputnu barības maisījumu enerģētisko vērtību aprēķina saskaņā ar VII pielikumu.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 1831/2003 (2003. gada 22. septembris) par dzīvnieku ēdināšanā lietotām piedevām (OV L 268, 18.10.2003., 29. lpp.).

⁽²⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīva 2002/32/EK (2002. gada 7. maijs) par nevēlamām vielām dzīvnieku barībā (OV L 140, 30.5.2002., 10. lpp.).

⁽³⁾ OV L 70, 16.3.2005., 1. lpp.

▼B*5. pants*

VIII pielikumā izklāstītās analīzes metodes, lai kontrolētu vairs neatļautu piedevu nelikumīgu atrašanos barībā, izmanto apstiprināšanas nolūkos.

6. pants

Direktīvu 71/250/EEK, 71/393/EEK, 72/199/EEK, 73/46/EEK, 76/371/EEK, 76/372/EEK, 78/633/EEK, 81/715/EEK, 84/425/EEK, 86/174/EEK, 93/70/EEK, 93/117/EK, 98/64/EK, 1999/27/EK, 1999/76/EK, 2000/45/EK, 2002/70/EK un 2003/126/EK atceļ.

Atsauces uz atceltajām direktīvām uzskata par atsaucēm uz šo regulu un lasa saskaņā ar atbilstības tabulām IX pielikumā.

7. pants

Šī regula stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

To piemēro no 2009. gada 26. augusta.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

▼ **M9***I PIELIKUMS***PARAUGU ŅEMŠANAS METODES****1. MĒRKIS UN TVĒRUMS**

Paraugus, kas paredzēti barības oficiālajai kontrolei, ņem saskaņā ar tālāk aprakstītajām metodēm. Tādā veidā iegūtus paraugus uzskata par reprezentatīviem attiecībā uz parauga ņemšanas vienību.

Reprezentatīvas paraugu ņemšanas mērķis ir iegūt mazu daļu no partijas tādā veidā, ka jebkura konkrēta šīs daļiņas raksturlieluma noteikšana atainotu visas partijas raksturlieluma vidējo vērtību. Paraugu no partijas iegūst, dažādās atsevišķās partijas vietās atkārtoti ņemot elementārparaugus. Šos elementārparaugus apvieno sajaucot un izveidojot kopparaugu, no kura, reprezentatīvi sadalot, sagatavo reprezentatīvus galīgos paraugus.

Ja, pēc vizuālas apskates vai pamatojoties uz citu attiecīgu informāciju, kādas pārbaudāmās barības daļas kvalitatīvi atšķiras no pārējās barības tajā pašā partijā, šādas daļas atdala no pārējās barības un apstrādā kā atsevišķu apakšpartiju. Ja barību nav iespējams sadalīt atsevišķās apakšpartijās, to pārbauda kā vienu partiju. Šādos gadījumos to norāda paraugu ņemšanas pierakstos.

Ja barība, no kuras paraugi ņemti saskaņā ar šīs regulas noteikumiem, ir atzīta par ES prasībām neatbilstošu un ir daļa no tās pašas kategorijas vai apraksta barības partijas, tad uzskata, ka šādi trūkumi piemīt visai barībai šajā partijā, izņemot gadījumu, ja pēc sīka izvērtējuma nav atrasti pierādījumi, ka pārējā partijas daļa neatbilst ES prasībām.

Paraugus var ņemt arī no barības, ko pārtikas aprītē iesaistīti uzņēmēji pārdod distancālās saziņas veidā saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulas (EK) Nr. 767/2009 ⁽¹⁾ 11. panta 3. punktu. Būtībā paraugu ņemšanai no barības, ko pārdod distancālās saziņas veidā, piemēro šajā pielikumā izklāstītos punktus. Konkrēti paraugu ņemšanas aspekti attiecībā uz distances pārdošanu ir aprakstīti 11. punktā.

2. DEFINĪCIJAS

— Partija: konkretizēts barības daudzums, kam ir kopīgi raksturlielumi, piemēram, izcelsme, veids, iesaiņojuma tips, fasētājs, izplatītājs vai marķējums, un – attiecībā uz ražošanas procesu – ražošanas vienība vienā un tajā pašā rūpnīcā, kas izmanto nemainīgus ražošanas parametrus, vai vairākas šādas vienības, ja tās tiek ražotas secīgi un uzglabātas kopā.

— Parauga ņemšanas vienība: partija vai konkretizēta partijas vai apakšpartijas daļa.

— Aizplombēts paraugs: paraugs, kas ir noslēgts tādā veidā, lai nepieļautu piekļuvi paraugam, nesalaužot vai nenonemot plombu.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 767/2009 (2009. gada 13. jūlijs), par barības laišanu tirgū un lietošanu un ar ko groza Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1831/2003, un atceļ Padomes Direktīvu 79/373/EEK, Komisijas Direktīvu 80/511/EEK, Padomes Direktīvas 82/471/EEK, 83/228/EEK, 93/74/EEK, 93/113/EK un 96/25/EK un Komisijas Lēmumu 2004/217/EK (OV L 229, 19.2009., 1. lpp.).

▼ **M9**

- Elementārparaugs: daudzums, kas paņemts vienā parauga ņemšanas vienības punktā.
- Kopparaugs: visu elementārparaugu kopums, kas ņemti no vienas parauga ņemšanas vienības.
- Samazinātais paraugs: kopparauga daļa, kas no tā iegūta reprezentatīva samazinājuma procesā.
- Galīgais paraugs: kopparauga (jaukta), samazinātā parauga vai homogenizētā kopparauga daļa atkarībā no kontroles veida (sk. 9.4. punktu).
- Laboratorijas paraugs: paraugs, kas paredzēts laboratorijai (kāds saņemts laboratorijā) un kas var būt galīgais paraugs, samazinātais paraugs vai kopparaugs.
- Distanciālās pārdošanas paraugs: tādas barības partijas vai sērijas paraugs, kas piedāvāta tirdzniecībai distanciālās saziņas veidā.

3. **VISPĀRĪGI NOTEIKUMI**

- Paraugus ņem darbinieki, kurus kompetentās iestādes ir norīkojušas šā darba veikšanai.
- Lai paņemtu distanciālās pārdošanas paraugu, kompetentā iestāde ar distances saziņas līdzekļiem noteiktu barības daudzumu pieprasa no pārtikas aprītē iesaistītā uzņēmēja.
- Paraugs jānoplombē tādā veidā, lai nepieļautu piekļuvi paraugam, nesalaužot vai nenoņemot plombu.

Plombas apzīmējumam jābūt skaidri atpazīstamam un skaidri redzamam.

- Parauga identifikācija: paraugs neizdzēšami jāmarķē un jāidentificē tā, lai radītu nepārprotamu saikni ar parauga ņemšanas pierakstiem.
- No katra kopparauga paņem vismaz divus galīgos paraugus: vismaz vienu kontrolei (prasību izpildei) un vienu pārtikas aprītē iesaistītā uzņēmēja vajadzībām (aizstāvībai). Vajadzības gadījumā vienu galīgo paraugu var paņemt atsaucei. Ja viss kopparaugs ir homogenizēts, galīgos paraugus ņem no homogenizētā kopparauga, ja vien šāda procedūra nav pretrunā dalībvalsts noteikumiem par pārtikas aprītē iesaistītā uzņēmēja tiesībām.
- Saskaņā ar Regulas (ES) 2017/625 15. panta 1. un 2. punktu, ja tas ir nepieciešams oficiālai paraugu ņemšanai, pārtikas aprītē iesaistīti uzņēmēji, ja to pieprasa kompetentās iestādes:
 - nodrošina kompetento iestāžu darbiniekiem piekļuvi aprīkojumam, ko tie kontrolē, tostarp vajadzības gadījumā nodrošinot atbilstošu paraugu ņemšanas aprīkojumu un individuālos aizsardzības līdzekļus,
 - palīdz kompetento iestāžu darbiniekiem un sadarbojas ar tiem, lai nodrošinātu paraugu ņemšanu, tostarp darot barību pieejamu kompetento iestāžu darbiniekiem.

▼ **M9**

4. IEKĀRTAS

4.1. Paraugu ņemšanas ierīcēm jābūt izgatavotām no materiāliem, kas nevar kontaminēt produktus, no kuriem ņem paraugus. Iekārtām, ko paredzēts izmantot vairākkārt, jābūt viegli tīrāmām, lai novērstu jebkādu šķērskontamināciju.

4.2. **Iekārtas, ko iesaka cietās barības paraugu ņemšanai**4.2.1. *Manuāla paraugu ņemšana*

4.2.1.1. Plakandibena lāpstiņa ar vertikālām malām.

4.2.1.2. Paraugu ņemšanas zonde ar garenisku izgriezumu vai nodalījumiem. Paraugu ņemšanas zondes izmēriem jāatbilst paraugu ņemšanas vienības raksturlielumiem (konteineru dziļumam, maisa izmēriem utt.) un barības daļiņu lielumam.

Ja paraugu ņemšanas zondei ir vairāki atveres, tām jābūt atdalītām ar starpsienām vai izvietotām pakāpienveidā, lai nodrošinātu, ka paraugu ņaņem dažādās vietās zondes garumā.

4.2.2. *Mehāniska paraugu ņemšana*

Piemērotu mehānisku ierīci var izmantot, lai ņaņemtu paraugus no barības, kuru tajā brīdī pārvieto. Piemērota ierīce nozīmē to, ka, izmantojot to, paraugs tiek ņemts vismaz no visa plūsmas šķērs griezumā.

Paraugu ņemšanu no barības, kuru tajā brīdī pārvieto (lielā kustības ātrumā), var veikt ar automātiskām paraugu ņemšanas ierīcēm.

4.2.3. *Parauga dalītājs*

Ja tas ir iespējams un lietderīgi, reprezentatīvai samazināto paraugu sagatavošanai izmanto ierīci, kas paredzēta paraugu sadalīšanai apmēram vienādās daļās.

5. KVANTITATĪVĀS PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ ELEMENTĀRPARAUGU SKAITU

— Kvantitatīvās prasības, kas noteiktas 5.1. un 5.2. punktā attiecībā uz elementārparaugu skaitu, ir piemērojamas parauga ņemšanas vienībām, kuras nepārsniedz 500 tonnu un no kurām iespējams ņaņemt paraugus reprezentatīvā veidā. Iepriekš aprakstītā paraugu ņemšanas procedūra ir vienlīdz derīga arī daudzumiem, kas ir lielāki par noteikto maksimālo parauga ņemšanas vienības lielumu, ja vien ņem vērā 5.1.1., 5.1.3. un 5.1.5. punktā dotajās tabulās noteikto maksimālo elementārparaugu skaitu, elementārparaugu skaitu nosakot pēc kvadrātsaknes formulas, kas norādīta attiecīgajā procedūras daļā (sk. 5.3. punktu), un proporcionāli palielinot minimālo kopparauga lielumu. Tas neliedz lielu partiju sadalīt mazākās apakšpartijās un no katras apakšpartijas ņemt paraugus saskaņā ar 5.1. un 5.2. punktā aprakstīto procedūru.

— Parauga ņemšanas vienības lielumam jābūt tādām, lai varētu ņaņemt paraugu no katras tās daļas.

— Ļoti lielām partijām vai apakšpartijām (> 500 tonnu) un partijām, kuras pārvieto vai glabā tādā veidā, ka paraugu ņemšana nav iespējama saskaņā ar šā punkta 5.1. un 5.2. punktā aprakstīto procedūru, jāpiemēro 5.3. punktā aprakstītā paraugu ņemšanas procedūra.

▼ **M9**

- Distanciālās pārdošanas paraugu gadījumā kompetentā iestāde parasti nezina tās partijas lielumu, no kuras paraugs tiek pieprasīts. Tāpēc 5.1. un 5.2. punktā minēto procedūru izmantot nevar. Šajā gadījumā piemēro 11. punktā aprakstīto procedūru.
- Ja normatīvie akti nosaka, ka pārtikas aprītē iesaistītam uzņēmējam šī regula jāievēro saistībā ar obligātu monitoringa sistēmu, pārtikas aprītē iesaistītais uzņēmējs pēc kompetentās iestādes atļaujas saņemšanas no šajā punktā paredzētajām kvantitatīvajām prasībām var atkāpties, lai ņemtu vērā darbības raksturlielumus, ja vien pārtikas aprītē iesaistītais uzņēmējs kompetentajai iestādei ir pierādījis paraugu ņemšanas procedūras atbilstību attiecībā uz reprezentativitāti.
- Izņēmuma gadījumos, ja aprakstīto paraugu ņemšanas metodi nav iespējams īstenot attiecībā uz kvantitatīvajām prasībām partijas nepieļaujamās komerciālas sabojāšanas dēļ (iesaiņojuma veida, transportēšanas veida, glabāšanas veida utt. dēļ), var izmantot paraugu ņemšanas alternatīvu metodi, ja vien tā ir pēc iespējas reprezentatīvāka un tiek pilnībā aprakstīta un dokumentēta.

5.1. **Kvantitatīvās prasības attiecībā uz elementārparaugiem saistībā ar tādu vielu vai produktu kontroli, kas vienmērīgi izkliedēti visā barībā**

5.1.1. *Neiesaiņota cietā barība*

Parauga ņemšanas vienības lielums	Elementārparaugu skaita minimums
≤ 2,5 tonnas	7
> 2,5 tonnas	√ (20 reiz tonnu skaits, kas veido parauga ņemšanas vienību) (*), maksimums 40 elementārparaugi

(*) Ja iegūtais skaitlis ir daļskaitlis, to noapaļo līdz tuvākajam veselajam skaitlim.

5.1.2. *Neiesaiņota šķidrā barība*

Parauga ņemšanas vienības lielums	Elementārparaugu skaita minimums
≤ 2,5 tonnas vai ≤ 2 500 litru	4 (*)
> 2,5 tonnas vai > 2 500 litru	7 (*)

(*) Ja nav iespējams šķidrumu padarīt homogēnu, elementārparaugu skaits jāpalielina.

5.1.3. *Iesaiņota barība*

Barība (cietā un šķidrā) var būt iesaiņota somās, maisos, burkā, mucās utt., kuras tabulā apzīmētas kā vienības. No lielām vienībām (≥ 500 kg vai litru) paraugi jāņem saskaņā ar neiesaiņotai barībai paredzētajiem noteikumiem (sk. 5.1.1. un 5.1.2. punktu).

Parauga ņemšanas vienības lielums	Vienību skaita minimums, no kura jāņem (vismaz) viens elementārparaugs (*)
no 1 līdz 20 vienībām	1 vienība (**)
no 21 līdz 150 vienībām	3 vienības (**)

▼ M9

Parauga ņemšanas vienības lielums	Vienību skaita minimums, no kura jāņem (vismaz) viens elementārparaugs (*)
no 151 līdz 400 vienībām	5 vienības (**)
> 400 vienībām	$\frac{1}{4}$ no $\sqrt{}$ (vienību skaits, kas veido parauga ņemšanas vienību) (***), maksimums 40 vienības

(*) Gadījumā, ja vienības atvēršana var ietekmēt analīzi (piemēram, ātrbojīgas mitras barības gadījumā), elementārparaugs ir neatvērtā vienība.

(**) Attiecībā uz vienībām, kuru saturs nepārsniedz 1 kg vai vienu litru, elementārparaugs ir vienas oriģinālās vienības saturs.

(***) Ja iegūtais skaitlis ir daļskaitlis, to noapaļo līdz tuvākajam veselajam skaitlim.

5.1.4. Barības bloki un minerālvietu briketes

Par paraugu jāņem vismaz viens bloks vai briķete no parauga ņemšanas vienības, kas sastāv no 25 vienībām, bet ne vairāk kā četri bloki.

Attiecībā uz blokiem vai briķetēm, kuru svars nepārsniedz 1 kg, elementārparaugs ir viena bloka vai briķetes saturs.

5.1.5. Rupja barība/lopbarība

Parauga ņemšanas vienības lielums	Elementārparaugu skaita minimums (*)
≤ 5 tonnas	5
> 5 tonnas	$\sqrt{}$ (5 reiz tonnu skaits, kas veido parauga ņemšanas vienību) (**), maksimums 40 elementārparaugi

(*) Ir atzīts, ka noteiktās situācijās (piemēram, attiecībā uz skābbarību) nav iespējams paņemt vajadzīgos elementārparaugus, neradot partijai nepieļaujamus bojājumus. Šādās situācijās var piemērot parauga ņemšanas alternatīvu metodi, un norādes parauga ņemšanai no šādām partijām ir izstrādātas un pieejamas vietnē https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.

(**) Ja iegūtais skaitlis ir daļskaitlis, to noapaļo līdz tuvākajam veselajam skaitlim.

5.2. Kvantitatīvās prasības attiecībā uz elementārparaugiem saistībā ar tādu sastāvdaļu vai vielu kontroli, kuras varētu būt nevienmērīgi izkliedētas barībā

Šīs kvantitatīvās prasības attiecībā uz elementārparaugiem izmantojamas šādās situācijās:

- aflatoksīnu, rudzu melno graudu, citu mikotoksīnu un kaitīgu botānisku piemaisījumu kontrole barības sastāvdaļās,
- kontrole attiecībā uz šķērskontamināciju ar kādu sastāvdaļu (ieskaitot ģenētiski modificētu materiālu) vai vielu, kura barībā varētu būt izkliedēta nevienmērīgi.

Ja kontroles iestādei ir nopietnas aizdomas, ka šāda nevienmērīga izkliede ir arī gadījumos, kad barības maisījumos ir šķērskontaminācija ar kādu sastāvdaļu vai vielu, var piemērot kvantitatīvās prasības, kas paredzētas tabulā.

▼ M9

Parauga ņemšanas vienības lielums	Elementārparaugu skaita minimums
< 80 tonnu	Skatīt kvantitatīvās prasības 5.1. punktā. Ņemamo elementārparaugu skaits jāreizina ar 2,5.
≥ 80 tonnu	100

5.3. **Kvantitatīvās prasības attiecībā uz elementārparaugiem ļoti lielu partiju gadījumā**

Attiecībā uz ļoti lielām parauga ņemšanas vienībām (parauga ņemšanas vienības > 500 tonnu), ņemamo elementārparaugu skaits = 40 elementārparaugu + $\sqrt{\text{tonnu skaita}}$ (attiecībā uz tādu vielu vai produktu kontroli, kas vienmērīgi izkliedētas visā barībā) vai 100 elementārparaugu + $\sqrt{\text{tonnu skaita}}$ (attiecībā uz tādu sastāvdaļu vai vielu kontroli, kas barībā varētu būt izkliedētas nevienmērīgi).

6. **KVANTITATĪVĀS PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ KOPPARAUGU**

Vajadzīgs viens kopparaugs uz katru parauga ņemšanas vienību

	Barības veids	Kopparauga minimālais lielums (*) (**)
6.1.	Neiesaiņota barība	4 kg
6.2.	Iesaiņota barība	4 kg (***)
6.3.	Šķidrā vai pusšķidrā barība	4 litri
6.4.	Barības bloki vai minerālvielu briķetes,	
6.4.1.	kas katrs sver vairāk nekā 1 kg	4 kg
6.4.2.	kas katrs sver ne vairāk nekā 1 kg	četrus oriģinālos blokus vai briķešu svārs
6.5.	Rupja barība/lopbarība	4 kg (****)

(*) Ja barība, no kuras ņem paraugus, ir vērtīga, var ņemt mazāku kopparauga daudzumu, ja vien to skaidri apraksta un dokumentē paraugu ņemšanas pierakstos.

(**) Saskaņā ar Komisijas Regulu (ES) Nr. 619/2011 (2011. gada 24. jūnijs), ar ko nosaka paraugu ņemšanas un analīzes metodes barības oficiālajai kontrolei attiecībā uz tāda ģenētiski modificēta materiāla klātbūtni, kura atļaujas piešķiršanas procedūra nav pabeigta vai kura atļaujas termiņš ir beidzies (OV L 166, 25.6.2011., 9. lpp.), kopparaugam ģenētiski modificēta materiāla klātbūtnes kontrolei jāsaturs vismaz 35 000 sēklu/graudu. Tas nozīmē, ka kukurūzai kopparauga lielumam jābūt vismaz 10,5 kg un sojas pupiņām – vismaz 7 kg. Citām sēklām un graudiem, piemēram, miežiem, prosai, auzām, rīsiem, rudziem, kviešiem un rapšiem, 4 kg kopparaugs atbilst vairāk nekā 35 000 sēklu/graudu.

(***) Iesaiņotas barības gadījumā var arī nebūt iespējams sasniegt kopparauga lielumu 4 kg atkarībā no atsevišķo vienību lieluma.

(****) Rupjas barības vai lopbarības ar zemu specifisko blīvumu (piemēram, sienu, salmiem) gadījumā kopparauga lielumam jābūt vismaz 1 kg.

▼ M9

7. KVANTITATĪVĀS PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ GALĪGAJIEM PARAUGIEM

Galīgie paraugi

Jāveic vismaz viena galīgā parauga analīze. Daudzums analīzei paredzētajā galīgajā paraugā nedrīkst būt mazāks par turpmāk norādīto.

Cieta barība	500 g (*) (**) (***) (****)
Šķidrā vai pusšķidrā barība	500 ml (*)

(*) Saskaņā ar Regulas (ES) Nr. 619/2011 noteikumiem galīgajam paraugam ģenētiski modificēta materiāla klātbūtnes kontrolei jāsaturs vismaz 10 000 sēklu/graudu. Tas nozīmē, ka attiecībā uz kukurūzu galīgajam parauga lielumam jābūt vismaz 3 000 g un sojas pupiņām – vismaz 2 000 g. Citām sēklām un graudiem, piemēram, miežiem, prosai, auzām, rīsiem, rudziem, kviešiem un rapšiem, 500 g galīgais paraugs atbilst vairāk nekā 10 000 sēklu/graudu.

(**) Ja kopparauga lielums ir ievērojami mazāks par 4 kg vai litriem (sk. 6. punkta zemsvītras piezīmes), var ņemt mazāku daudzumu arī galīgajā paraugā, ja vien to skaidri apraksta un dokumentē paraugu ņemšanas pierakstos.

(***) Ja paraugus ņem no pākšaugiem, graudaugiem un koku riekstiem pesticīdu atlieku noteikšanai, minimālais galīgā parauga lielums ir 1 kg saskaņā ar noteikumiem Komisijas Direktīvā Nr. 2002/63/EK (2002. gada 11. jūlijs), ar ko nosaka Kopienas paraugu ņemšanas metodes pesticīdu atlieku oficiālajai kontrolei augu un dzīvnieku izcelsmes produktos un uz to virsmas un ar ko atceļ Direktīvu 79/700/EEK (OV L 187, 16.7.2002., 30. lpp.).

(****) Gadījumos, kad pārbaudi veic, vizuāli apskatot vai ar mikroskopu, pārbaudāmais galīgā parauga daudzums ir 1 kg.

8. PARAUGU ŅEMŠANAS METODE ĻOTI LIELĀM PARTIJĀM VAI PARTIJĀM, KO GLABĀ VAI TRANSPORTĒ TĀDĀ VEIDĀ, KA PARAUGU ŅEMŠANA VISĀ PARTIJĀ NAV IESPĒJAMA

8.1. **Vispārīgi principi**

Ja partijas transportēšanas vai glabāšanas veids neļauj paņemt elementārraugus no visas partijas, paraugu ņemšana no šādām partijām pēc iespējas jāveic, kad partija ir kustībā.

Attiecībā uz lielām noliktavām, kas paredzētas barības glabāšanai, to operatori jānodrošina uzstādīt noliktavā iekārtas, kas ļauj (automātiski) paņemt paraugus no visas glabātās barības.

Ja piemēro šajā punktā paredzētās paraugu ņemšanas procedūras, pārtikas aprītē iesaistīto uzņēmēju vai tā pārstāvi informē par paraugu ņemšanas procedūru. Ja pārtikas aprītē iesaistītais uzņēmējs vai tā pārstāvis apšaubā šo paraugu ņemšanas procedūru, tad pārtikas aprītē iesaistītais uzņēmējs par saviem līdzekļiem nodrošina iespēju kompetentajai iestādei paņemt paraugus no visas partijas.

8.2. **Lielas partijas, ko pārvadā ar kuģi**8.2.1. *Dinamiska paraugu ņemšana no lielām partijām, ko pārvadā ar kuģi*

Paraugu ņemšanu no lielām partijām kuģos vēlams veikt, kamēr produkts ir kustībā (dinamiskā paraugu ņemšana).

Paraugu ņemšana jāveic no katra kausa (vienības, ko iespējams fiziski nodalīt). Kausus tomēr iztukšo daļēji citu pēc cita tā, ka pēc pārvietošanas uz glabāšanas telpām sākotnējais fiziskais dalījums vairs nepastāv. Paraugu ņemšanu tāpēc var veikt sākotnējās fiziskās nodalīšanas darbības laikā vai nodalīšanas laikā pēc pārvietošanas uz glabāšanas telpām.

▼ **M9**

Kuģa izkraušana var ilgt vairākas dienas. Parasti paraugu ņemšana jāveic regulāri visas izkraušanas laikā. Tomēr ne vienmēr ir iespējams vai ir piemēroti oficiālam inspektoram būt klāt paraugu ņemšanai visu izkraušanas darbību laiku. Tāpēc ir pieļaujams paraugus ņemt no veselās partijas daļas (parauga ņemšanas vienība). Elementārparaugu skaitu nosaka, ņemot vērā parauga ņemšanas vienības lielumu.

Ja paraugus ņem no daļas no tās pašas kategorijas vai apraksta barības partijas un konstatē, ka šī partijas daļa neatbilst ES prasībām, tad uzskata, ka šādi trūkumi piemīt visai barībai šajā partijā, izņemot gadījumu, ja pēc sīka izvērtējuma nav atrasti pierādījumi, ka pārējā partijas daļa neatbilst ES prasībām.

Pat ja oficiālos paraugus ņem automātiski, nepieciešama inspektora klātbūtne. Tomēr gadījumā, ja automātisko paraugu ņemšanu veic ar iepriekš iestatītiem parametriem, kurus paraugu ņemšanas laikā nevar mainīt, un elementārparaugus savāc aizzīmogatā tvertnē, novēršot jebkādu iespējamu krāpšanu, tad inspektora klātbūtne nepieciešama tikai paraugu ņemšanas sākumā, katru reizi, kad jāmaina paraugu tvertne, un paraugu ņemšanas beigās.

8.2.2. *Paraugu ņemšana no kuģī pārvadātām partijām ar statisko paraugu ņemšanu*

Ja paraugu ņemšanu veic statiski, jāpiemēro tāda pati procedūra, kāda paredzēta glabāšanas telpām (tvertnēm), kurām var piekļūt no augšas (sk. 8.4.1. punktu).

Paraugu ņemšana jāveic partijas/kausa pieejamajā daļā (no augšas). Elementārparaugu skaitu nosaka, ņemot vērā parauga ņemšanas vienības lielumu. Ja paraugus ņem no daļas no tās pašas kategorijas vai apraksta barības partijas un konstatē, ka šī partijas daļa neatbilst ES prasībām, tad uzskata, ka šādi trūkumi piemīt visai barībai šajā partijā, izņemot gadījumu, ja pēc sīka izvērtējuma nav atrasti pierādījumi, ka pārējā partijas daļa neatbilst ES prasībām.

8.3. **Paraugu ņemšana no lielām partijām, ko glabā noliktavās**

Paraugu ņemšana jāveic partijas pieejamajā daļā. Elementārparaugu skaitu nosaka, ņemot vērā parauga ņemšanas vienības lielumu. Ja paraugus ņem no daļas no tās pašas kategorijas vai apraksta barības partijas un konstatē, ka šī partijas daļa neatbilst ES prasībām, tad uzskata, ka šādi trūkumi piemīt visai barībai šajā partijā, izņemot gadījumu, ja pēc sīka izvērtējuma nav atrasti pierādījumi, ka pārējā partijas daļa neatbilst ES prasībām.

8.4. **Paraugu ņemšana no glabāšanas vietām (silosiem)**

8.4.1. *Paraugu ņemšana no silosiem, kuriem var (viegli) piekļūt no augšas*

Paraugu ņemšana jāveic partijas pieejamajā daļā. Elementārparaugu skaitu nosaka, ņemot vērā parauga ņemšanas vienības lielumu. Ja paraugus ņem no daļas no tās pašas kategorijas vai apraksta barības partijas un konstatē, ka šī partijas daļa neatbilst ES prasībām, tad uzskata, ka šādi trūkumi piemīt visai barībai šajā partijā, izņemot gadījumu, ja pēc sīka izvērtējuma nav atrasti pierādījumi, ka pārējā partijas daļa neatbilst ES prasībām.

▼ **M9**

8.4.2. *Paraugu ņemšana no silosiem, kuriem nevar piekļūt no augšas (slēgtiem silosiem)*

8.4.2.1. Silosi, kuriem nevar piekļūt no augšas (slēgti silosi) ar lielumu > 100 tonnām

No šādos silosos glabātas barības nav iespējams paņemt paraugus statiski. Tāpēc gadījumā, ja no barības šādā silosā jāņem paraugi un nav iespējas šo sūtījumu pārvietot, jāvienojas ar uzņēmēju, ka tam jāinformē inspektors par to, kad šis siloss tiks izkrauts, lai varētu veikt paraugu ņemšanu, kad barība būs kustībā.

8.4.2.2. Silosi, kuriem nevar piekļūt no augšas (slēgti silosi) ar lielumu < 100 tonnām

Paraugu ņemšana nozīmē to, ka kādā tvertnē ieber 50 līdz 100 kg barības un ņem paraugus no šā daudzuma. Šāds kopparauga lielums atbilst visai partijai, un elementārparaugu skaits attiecas uz daudzumu silosā, no kura barība iebērtā traukā paraugu ņemšanai. Ja paraugus ņem no daļas no tās pašas kategorijas vai apraksta barības partijas un konstatē, ka šī partijas daļa neatbilst ES prasībām, tad uzskata, ka šādi trūkumi piemīt visai barībai šajā partijā, izņemot gadījumu, ja pēc sīka izvērtējuma nav atrasti pierādījumi, ka pārējā partijas daļa neatbilst ES prasībām.

8.5. **Paraugu ņemšana no neiesaiņotās barības lielos, slēgtos traukos**

No šādām partijām paraugus bieži vien var paņemt tikai tad, kad tās izkrauj. Noteiktos gadījumos nav iespējams tās izkraut ieviešanas vai kontroles brīdī, tāpēc paraugu ņemšana jāveic tad, kad šādus konteinerus izkrauj.

9. INSTRUKCIJAS PARAUGU ŅEMŠANAI, SAGATAVOŠANAI UN IESAIŅOŠANAI

9.1. **Vispārīga informācija**

Paraugi jāņem un jāpagatavo bez liekas kavēšanās, ievērojot piesardzību, kas vajadzīga, lai nodrošinātu, ka produkts netiek nedz mainīts, nedz kontaminēts. Instrumentiem, tāpat arī virsmām un paraugiem paredzētajiem traukiem jābūt tīriem un sausiem.

9.2. **Elementārparaugi**

Elementārparaugi jāņem nejaušas izlases veidā, vienmērīgi izkliedi no visas parauga ņemšanas vienības, un tiem jābūt aptuveni vienāda lieluma.

Elementārparauga lielums ir vismaz 100 gramu vai 25 grami rupjai barībai vai lopbarībai ar zemu specifisko blīvumu.

Gadījumā, ja saskaņā ar noteikumiem par paraugu ņemšanas procedūru, kas paredzēti 8. punktā, jāņem mazāk nekā 40 elementārparaugu, elementārparaugu lielumu nosaka atkarībā no kopparauga vajadzīgā lieluma (skatīt 6. punktu).

Gadījumā, ja ņem paraugus no mazām iesaiņotās barības partijām, kur saskaņā ar kvantitatīvajām prasībām jāņem ierobežots elementārparaugu skaits, elementārparaugs ir vienas oriģinālās vienības saturs, kuras saturs nepārsniedz 1 kg vai vienu litru.

Ņemot paraugus no iesaiņotās barības, ko veido mazas vienības (piemēram, < 250 g), elementārparauga lielums ir atkarīgs no vienības lieluma.

▼ **M9**

Distanciālās pārdošanas paraugu gadījumā elementārparauga lielums ir atkarīgs no vienības lieluma un atsevišķos gadījumos var nepārsniegt 100 g vai 100 ml.

9.2.1. *Neiesaiņota barība*

Attiecīgā gadījumā paraugu var ņemt laikā, kad parauga ņemšanas vienību pārvieto (iekrauj vai izkrauj).

9.2.2. *Iesaiņota barība*

Pēc tam, kad atlasīts 5. punktā norādītais paraugu ņemšanai vajadzīgais vienību skaits, ar zondi vai lāpstiņu paņem daļu no katras vienības satura. Vajadzības gadījumā paraugus var ņemt pēc tam, kad katra vienība atsevišķi ir iztukšota.

9.2.3. *Homogēna vai homogenizējama šķidrā vai pusšķidrā barība*

Pēc tam, kad atlasīts 5. punktā norādītais paraugu ņemšanai vajadzīgais vienību skaits, to saturu vajadzības gadījumā homogenizē un paņem noteiktu daudzumu no katras vienības.

Elementārparaugus var ņemt laikā, kad saturu ņem laukā no traukiem.

9.2.4. *Nehomogenizējama šķidrā vai pusšķidrā barība*

Pēc tam, kad atlasīts 5. punktā norādītais paraugu ņemšanai vajadzīgais vienību skaits, paraugus paņem no dažādiem līmeņiem.

Paraugus var arī ņemt laikā, kad saturu ņem laukā no traukiem, bet pirmās frakcijas izmet.

Abos gadījumos kopējam paņemtajam tilpumam jābūt ne mazākam kā 10 litri.

9.2.5. *Barības bloki un minerālvielu briķetes*

Pēc tam, kad atlasīts 5. punktā norādītais paraugu ņemšanai vajadzīgais vienību skaits, paraugus ņem no katra bloka vai briķetes. Ja pastāv aizdomas, ka bloks vai briķete nav homogēna, par paraugu var ņemt visu bloku vai briķeti.

Attiecībā uz blokiem vai briķetēm, kuru svars nepārsniedz 1 kg, elementārparaugs ir viena bloka vai briķetes saturs.

9.3. **Kopparaugu sagatavošana**

Elementārparaugus samaisa, lai izveidotu vienu kopparaugu.

9.4. **Galīgo paraugu sagatavošana**

Materiālu katrā kopparaugā rūpīgi samaisa ⁽¹⁾.

Katrā paraugu ievieto piemērotā traukā vai tvertnē. Veic visus vajadzīgos piesardzības pasākumus, lai novērstu jebkādas paraugu satura izmaiņas, to kontamināciju vai atšķaidīšanu, kas varētu rasties pārvadāšanas vai uzglabāšanas laikā.

9.4.1. *Vienmērīgi izkliedētas vielas*

Visā barībā vienmērīgi izkliedētu sastāvdaļu vai vielu kontroles gadījumā kopparaugu var reprezentatīvi samazināt līdz vismaz 2,0 kg vai 2,0 litriem (samazinātais paraugs) ⁽²⁾, vēlams, izmantojot mehānisko vai automātisko paraugu dalītāju. Pesticīdu atlieku klātbūtnes kontrolei

⁽¹⁾ Visus gabalus sadala daļās (vajadzības gadījumā atdalot tos un pievienojot atpakaļ paraugam).

⁽²⁾ Izņemot rupjo barību vai lopbarību ar zemu specifisko blīvumu.

▼ **M9**

pākšaugos, graudaugos un koku riekstos samazinātā parauga lieluma minimums ir 3 kg. Ja barības veids nepieļauj paraugu dalītāja lietošanu vai ja dalītājs nav pieejams, paraugu var samazināt ar kvartēšanas metodi.

No kopparauga vai samazinātajiem paraugiem tad sagatavo aptuveni vienāda lieluma galīgos paraugus (kontrolei, aizstāvēbai un iespējamai atsaucei), kuri atbilst 7. punktā norādītajām kvantitatīvajām prasībām.

9.4.2. *Nevienmērīgi izkliedētas vielas*

Sastāvdaļu kontroles gadījumā, ieskaitot ģenētiski modificētu materiālu, vai tādu vielu kontroles gadījumā, kuras varētu būt nevienmērīgi izkliedētas barībā, ar kopparaugu rīkojas šādi:

- i) pilnīgi homogenizē. Pēc tam homogenizēto kopparaugu sadala aptuveni vienāda lieluma galīgajos paraugos (kontrolei, aizstāvēbai un iespējamai atsaucei), kuri atbilst 7. punktā norādītajām kvantitatīvajām prasībām; vai
- ii) samazina līdz vismaz 2 kg vai 2 litriem ⁽¹⁾, izmantojot mehānisko vai automātisko paraugu dalītāju. Tikai tādā gadījumā, ja barības veids nepieļauj paraugu dalītāja lietošanu, paraugu nepieciešamības gadījumā var samazināt ar kvartēšanas metodi. Ģenētiski modificēta materiāla klātbūtnes kontrolei atbilstīgi Regulas (ES) Nr. 619/2011 noteikumiem samazinātajam paraugam jā satur vismaz 35 000 sēklu/graudu, lai varētu iegūt galīgos paraugus prasību izpildei, aizstāvēbai un atsaucei vismaz 10 000 sēklu/graudu apjomā (skatīt zemsvītras piezīmi ^(**) 6. punktā un zemsvītras piezīmi ^(*) 7. punktā).

Pēc tam no samazinātā parauga sagatavo aptuveni vienāda lieluma galīgos paraugus, kuri atbilst 7. punktā norādītajām kvantitatīvajām prasībām.

9.5. **Paraugu iesaiņošana**

Traukus vai pakas aizplombē un uz tiem uzliek etiķetes tā, lai tos nevarētu atvērt, nesabojājot plombu. Visa etiķete jāiestrādā plombā. Vai arī paraugu var ievietot uztvērējā, kuru var aizvērt tā, lai to nevarētu atvērt, neatgriezeniski nesabojājot tvertni vai konteineru, izvairoties no tvertnes vai konteineru atkārtotas izmantošanas.

9.6. **Paraugu nosūtīšana uz laboratoriju**

Paraugu pēc iespējas drīzāk nosūta pilnvarotajai analīžu laboratorijai, līdzīgi nosūtot arī laborantam vajadzīgo informāciju.

10. **PARAUGU ŅEMŠANAS PIERAKSTI**

Par katru paraugu jāveic pieraksti, kas ļauj nepārprotami identificēt katru parauga ņemšanas vienību un tās lielumu.

Šajos pierakstos jānorāda arī jebkuras atkāpes no šajā regulā paredzētās paraugu ņemšanas procedūras.

Papildus šo pierakstu nodošanai oficiālajai kontroles laboratorijai, pierakstus nodod pārtikas aprītē iesaistītajam uzņēmējam un/vai pārtikas aprītē iesaistītā uzņēmēja norādītajai laboratorijai.

⁽¹⁾ Izņemot rupjo barību vai lopbarību ar zemu specifisko blīvumu.

▼ M9

11. DISTANCIĀLĀS PĀRDOŠANAS PARAUGS

- Lai paņemtu distanciālās pārdošanas paraugu, attiecīgo barību distanciālās saziņas veidā pieprasa no pārtikas aprītē iesaistītā uzņēmēja. Šādā gadījumā, pieprasot barību, kompetentajai iestādei nav pienākuma atklāt pārtikas aprītē iesaistītajam uzņēmējam savu oficiālo identitāti, un tā var izmantot citu identitāti.
- Distanciālās pārdošanas kopparaugu un galīgos paraugus sagatavo, tiklīdz sūtījumu ir saņēmušas šim nolūkam pilnvarotās personas. Lai sagatavotu kopparaugu, izlases veidā vienmērīgi no kopējā iegūtā daudzuma ņem atbilstošu elementārparaugu skaitu un rūpīgi jāsajauc/homogenizē, pēc iespējams ievērojot 5., 9.2. un 9.3. punktā noteiktos principus. Ja barība ir iesaņota atsevišķās vienībās, jāiegūst vismaz četras vienības, no kurām jāņem vismaz viens elementārparaugs. Ja katrā atsevišķā gadījumā tiek pierādīts, ka iegūtās vienības ir no dažādām partijām, vienību skaits, no kurām ņem paraugu, ir jāsamazina tiktāl, lai tās būtu no vienas partijas. Lai distanciālās pārdošanas paraugā analizētu sastāvdaļas vai vielas, kas barībā ir izkliedētas nevienmērīgi, elementārparaugu skaitam ir jābūt vismaz 2,5 reizes lielākam par to paraugu skaitu, kuros analizē barībā vienmērīgi izkliedētas vielas.

No kopparauga ņem atbilstošus galīgos paraugus (kontrolē, aizstāvībai un iespējamai atsaucei) saskaņā ar 9.4. punktā noteiktajiem principiem, ciktāl iespējams, un paraugu ņemšanas pierakstos norāda, ka paraugs ir distanciālās pārdošanas paraugs. Pēc tam kompetentā iestāde nekavējoties informē pārtikas aprītē iesaistīto uzņēmēju par paraugu ņemšanu. Pārtikas aprītē iesaistīto uzņēmēju informē arī par to, ka, ja iespējams, kompetentā iestāde vienu paraugu (aizstāvībai) patur savā rīcībā noteiktā vietā vai nosūta pārtikas aprītē iesaistītajam uzņēmējam vai laboratorijai, kuru izraudzījies pārtikas aprītē iesaistītais uzņēmējs saskaņā ar spēkā esošajiem valsts noteikumiem.

Ja paraugu nosūta tieši oficiālajai laboratorijai, galīgais paraugs jāsgatavo un jānoplombē laboratorijā šim nolūkam pilnvarotām personām vai šim nolūkam pilnvarotu personu klātbūtnē. Uzreiz pēc galīgo paraugu noformēšanas distanciālās pārdošanas paraugu ņemšanas pieraksti jānosūta kompetentajai iestādei, kas par paraugu ņemšanu informē pārtikas aprītē iesaistīto uzņēmēju.

Uzskata, ka daudzums, ko pārtikas aprītē iesaistītais uzņēmējs piegādā kompetentajai iestādei, ir daļa no vienai un tai pašai barības klasei vai aprakstam piederošas barības partijas. Saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulas (EK) Nr. 178/2002 ⁽¹⁾ 15. pantu, ja partijas daļu identificē kā neatbilstīgu ES prasībām, tad – arī distanciālās pārdošanas parauga gadījumā – pieņem, ka visa barība šajā partijā ir neatbilstīga, ja vien pēc rūpīga novērtējuma (kas attiecīgā gadījumā ir inspekcija uz vietas) nav pierādījumu, ka atlikusī partija atbilst ES prasībām.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 178/2002 (2002. gada 28. janvāris), ar ko paredz pārtikas aprites tiesību aktu vispārīgus principus un prasības, izveido Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestādi un paredz procedūras saistībā ar pārtikas nekaitīgumu (OV L 31, 1.2.2002., 1. lpp.).

▼ **M9***II PIELIKUMS***VISPĀRĪGI NOTEIKUMI PAR BARĪBAS ANALĪZES METODĒM****A. PARAUGU SAGATAVOŠANA ANALĪZEI****1. Mērķis**

Šajā pielikumā aprakstītā procedūra attiecas uz tādu paraugu sagatavošanu analīzei, kuri nosūtīti uz kontroles laboratoriju pēc paraugu ņemšanas saskaņā ar I pielikumā paredzētajiem noteikumiem.

Laboratorijas paraugi jāsgatavo tā, lai analīzes metodēs noteiktie iesvara daudzumi būtu homogēni un reprezentatīvi attiecībā uz galīgajiem paraugiem.

Papildus šajā pielikumā aprakstītajām procedūrām jāievēro EN ISO 6498 paredzētie norādījumi par paraugu sagatavošanu.

2. Piesardzības pasākumi, kas jāievēro

Paraugu sagatavošanas procedūra, kas jāievēro, ir atkarīga no tā, kādas analīzes metodes tiks izmantotas un kādas sastāvdaļas vai vielas tiks kontrolētas. Tāpēc ir ārkārtīgi svarīgi nodrošināt, lai ievērotā paraugu sagatavošanas procedūra būtu atbilstoša izmantotajai analīzes metodei un nosakāmajām sastāvdaļām vai vielām.

Visas vajadzīgās darbības jāveic tā, lai pēc iespējas izvairītos no parauga kontaminācijas un novērstu izmaiņas tā sastāvā.

Lai pēc iespējas samazinātu gaisa un gaismas iedarbību uz paraugiem, to samalšanu, samaisīšanu un sijāšanu veic nekavējoties. Neizmanto dzirnavas un dzirnaviņas, kurās paraugs var jūtami sakarst.

Barību, kas ir īpaši jutīga pret karstumu, ieteicams samalt manuāli. Veic arī visu iespējamo, lai nodrošinātu, ka pašas ierīces nav kontaminācijas avots.

Ir pierādīts, ka noteiktos gadījumos, ja paraugus homogenizē, pie lieliem maisītāja apgriezieniem pievienojot paraugam ūdeni, var iegūt viendabīgākus apakšparaugus, nekā veicot sauso homogenizēšanu/samalšanu, jo īpaši, ja ķīmiskās vielas ir izkliedētas heterogēni. Tomēr viendabīgus apakšparaugus var arī, ja homogenizēšanu veic ar pietiekamu sausu samalšanu.

Dažos gadījumos, piemēram, lai noteiktu rudzu melno graudu, kaitīgus botāniskus piemaisījumus utt., paraugu nevar homogenizēt ar malšanu, taču to var homogenizēt pietiekami sajaucot paraugu.

Ja paraugu nevar sagatavot, ievērojami nemainot mitruma saturu tajā, tad mitruma saturu nosaka pirms un pēc parauga sagatavošanas atbilstoši III pielikuma A daļā noteiktajai metodei.

3. Procedūra**3.1. *Vispārīgā procedūra***

Testa alikvotu ņem no homogenizēta galīgā parauga. Dalīšana konusā un kvartēšana nav ieteicama, jo tad testa alikvotās var būt augsta parauga dalīšanas kļūda.

▼M9**3.1.1. Barība, ko var samalt dabīgā stāvoklī**

- Galīgo paraugu samaisa un savāc piemērotā tīrā, sausā un hermētiski noslēdzamā traukā. Lai nodrošinātu pilnīgu homogenizāciju, paraugu vēlreiz samaisa tieši pirms iesvara (testa alikvotas) ņemšanas analīzēm.

3.1.2. Barība, ko var samalt pēc kaltēšanas

- Ja analīzes metodēs nav noteikts citādi, tad galīgo paraugu izkaltē atbilstoši sākotnējās kaltēšanas procedūrai, kas aprakstīta 4.3. punktā III pielikuma A daļā minētajā mitruma noteikšanas metodē, līdz tā mitruma saturs samazinās un sasniedz 8–12 %. Pēc tam rīkojas, kā noteikts 3.1.1. punktā.

3.1.3. Šķidrā vai pusšķidrā barība

- Galīgo paraugu savāc piemērotā tīrā, sausā un hermētiski noslēdzamā traukā. Lai nodrošinātu pilnīgu homogenizāciju, paraugu rūpīgi samaisa tieši pirms iesvara (testa alikvotas) ņemšanas analīzēm.

3.1.4. Cita barība

- Galīgos paraugus, kurus nevar sagatavot atbilstoši kādai no iepriekšminētajām procedūrām, apstrādā, izmantojot jebkuru citu procedūru, ar kuru var nodrošināt, ka analīzēm ņemtais iesvars (testa alikvota) ir homogēns un reprezentatīvs attiecībā uz galīgajiem paraugiem.

3.2. *Īpaša procedūra gadījumos, kad pārbaudi veic, vizuāli apskatot vai ar mikroskopu, vai gadījumos, kad viss kopparaugs ir homogenizēts*

- Ja pārbaudi veic, vizuāli apskatot (neizmantojot mikroskopu), pārbaudei izmanto visu kopparaugu vai galīgo paraugu.
- Ja pārbaudi veic ar mikroskopu, laboratorija var samazināt kopparaugu vai tālāk samazināt samazināto paraugu. Galīgos paraugus aizstāvības un attiecīgā gadījumā atsaucēs vajadzībām ņem, ievērojot procedūru, kas līdzvērtīga prasību izpildei izmantotā galīgā parauga ņemšanā izmantotajai procedūrai.
- Gadījumā, ja viss kopparaugs ir homogenizēts, galīgos paraugus ņem no homogenizētā kopparauga.
- Lai noteiktu rudzu melno graudu un kaitīgos botāniskus piemaisījumus, galīgais paraugs jāsadala divos apakšparaugos, kuru svars ir aptuveni 500 gramī. Pārbauda vienu apakšparaugu. Ja apakšparaugu rezultāts ir vienāds ar vai mazāks par 50 % (analītiskā robežvērtība) no maksimālā līmeņa, paraugs atbilst maksimālajam līmenim. Ja rezultāts pārsniedz 50 % no maksimālā līmeņa, ir jāpārbauda vēl viens apakšparaugs un, lai pārbaudītu atbilstību maksimālajam līmenim, izmanto divu apakšparaugu vidējo rezultātu.

4. Paraugu glabāšana

Paraugi jāuzglabā temperatūrā, kurā nemainās to sastāvs. Paraugus, kuros paredzēts analizēt vitamīnus vai vielas, kas ir īpaši jutīgas pret gaismu, uzglabā tādos apstākļos, lai paraugam nekaitētu gaisma.

▼ **M9****B. NOTEIKUMI ATTIECĪBĀ UZ REAGENTIEM UN IERĪCĒM, KO IZMANTO ANALĪZES METODĒS**

1. Ja vien analīzes metodēs nav noteikts citādi, tad visiem analītiskajiem reagentiem jābūt analītiski tīriem (a. t.). Nosakot mikroelementus, reagentu tīrība jāpārbauda ar tukšā parauga analīzi. Atkarībā no iegūtajiem rezultātiem var būt vajadzīga reagentu papildu attīrīšana.
2. Visās darbībās, kas ietver šķīdumu gatavošanu, atšķaidīšanu, skalošanu vai mazgāšanu un kas analīzes metodēs minētas, nenorādot izmantojamo šķīdinātāju vai atšķaidītāju, jālieto ūdens. Parasti izmanto demineralizētu vai destilētu ūdeni. Atsevišķos gadījumos, kas norādīti analīzes metodēs, ūdens attīrīšanai izmanto īpašas procedūras.
3. Ņemot vērā kontroles laboratoriju standarta aprīkojumu, analīzes metodēs norādīti tikai specifiski instrumenti un ierīces vai to īpašs izmantošanas veids. Tiem jābūt tīriem, īpaši gadījumos, kad jānosaka ļoti mazi vielu daudzumi.

C. ANALĪZES METOŽU PIEMĒROŠANA UN REZULTĀTU IZTEIKŠANA**1. Ekstrahēšanas procedūra**

Vairākas metodes nosaka specifisku ekstrahēšanas procedūru. Parasti var izmantot citu ekstrahēšanas procedūru, kas nav minēta konkrētajā metodē, ja ir pierādīts, ka izmantotajai ekstrahēšanas procedūrai ir tāda pati ekstrahēšanas efektivitāte kā metodē minētajai procedūrai.

2. Attīrīšanas procedūra

Vairākas metodes nosaka specifisku attīrīšanas procedūru. Parasti var izmantot citu attīrīšanas procedūru, kas nav minēta konkrētajā metodē, ja ir pierādīts, ka izmantotā attīrīšanas procedūra dod tādus pašus analītiskos rezultātus kā metodē minētā procedūra.

3. Noteikšanu skaits

Nevēlamu vielu analīzes gadījumā, ja pirmajā noteikšanā rezultāts ir ievērojami (> 50 %) zemāks nekā kontrolējamā specifikācija, nav vajadzīgs veikt papildu noteikšanu, ja vien tiek piemērotas atbilstošas kvalitātes procedūras. Citos gadījumos nepieciešama otrreizēja analīze (otra noteikšana), lai izslēgtu iekšējas šķērskontaminācijas iespēju vai paraugu nejaušu samainīšanu. Atbilstības pārbaudei izmanto divu noteikšanu vidējo aritmētisko.

Barības piedevu minimālā un maksimālā līmeņa kontroles gadījumā, ja pirmajā noteikšanā rezultāts pārsniedz minimālo līmeni vai ir zemāks par maksimālo līmeni, nav vajadzīgs veikt papildu noteikšanu, ja vien tiek piemērotas atbilstošas kvalitātes procedūras. Citos gadījumos nepieciešama otrreizēja analīze (otra noteikšana), lai izslēgtu iekšējas šķērskontaminācijas iespēju vai paraugu nejaušu samainīšanu. Atbilstības pārbaudei izmanto divu noteikšanu vidējo aritmētisko.

Ja kontrolē vielas vai sastāvdaļas deklarēto saturu un pirmajā noteikšanā rezultāts apstiprina deklarēto saturu, t. i., analītiskais rezultāts atbilst pieņemamajam deklarētā satura variāciju diapazonam, tad nav vajadzīgs veikt papildu noteikšanu, ja piemēro atbilstošas kvalitātes procedūras. Citos gadījumos nepieciešama otrreizēja analīze (otra noteikšana), lai

▼ **M9**

izslēgtu iekšējas šķērskontaminācijas iespēju vai paraugu nejaušu samainīšanu. Atbilstības pārbaudei izmanto divu noteikšanu vidējo aritmētisko (vidējais analītiskais rezultāts ietilpst vai neietilpst pieļaujamā deklarētā satura variāciju diapazonā).

Dažos gadījumos minētais pieņemamais variāciju diapazons ir noteikts tiesību aktos, piemēram, Eiropas Parlamenta un Padomes Regulā (EK) Nr. 767/2009 un Regulā (ES) 2019/4 ⁽¹⁾.

4. Ziņošana par izmantoto analīzes metodi

Analīzes ziņojumā norāda izmantoto analīzes metodi.

5. Ziņošana par analītisko rezultātu

Analītisko rezultātu izsaka veidā, kas noteikts analīzes metodē, līdz attiecīgām būtisko skaitļu skaitam un vajadzības gadījumā koriģē līdz mitruma saturam, kas galīgajam paraugam bija pirms sagatavošanas.

Lielākā daļa regulatīvo līmeņu (piemēram, maksimālais līmenis, minimālais līmenis), kas noteikti ES tiesību aktos par dzīvnieku barību, ir noteikti attiecībā uz barību ar mitruma saturu 12 %. Tādēļ šajos gadījumos, lai novērtētu paraugā izmērīto analītisko rezultātu salīdzinājumā ar tiesību aktos noteikto līmeni, analītiskais rezultāts vispirms ir jādala ar parauga sausnas saturu (%), kas reizināts ar 88, kā norādīts nākamajā formulā:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

kur:

Mc: parauga mitruma saturs (%). Tādējādi $100 - Mc$ apzīmē parauga sausnas saturu (%).

R_{ana}: izmērītais parauga analītiskais rezultāts:

R_{12 %}: rezultāts barībai ar mitruma saturu 12 %; jānovērtē salīdzinājumā ar tiesību aktos noteikto līmeni.

Turklāt, ja ir izpildīti šādi nosacījumi:

— analīzes rezultāts ir ievērojami (> 50 %) zemāks vai augstāks nekā kontrolējamā marķējuma informācija/specifikācija (atkarībā no tā, vai marķējuma informācija/specifikācija ir maksimālais vai minimālais līmenis),

— ir zināms barības, no kuras ņem paraugu, mitruma saturs un var konstatēt, ka mitruma satura korekcija nemainīs novērtējumu,

tad ar nosacījumu, ka tiek piemērotas atbilstošas kvalitātes procedūras un analīzi veic tikai, lai pārbaudītu atbilstību tiesību normām, mitruma satura korekciju var neņemt vērā (piemēram, ja nav specifikācijas vai tiesību aktos noteikta līmeņa), ja vien tā nav nepieciešama interpretācijai.

Ja analītisko rezultātu koriģē atbilstoši mitruma saturam, tajā pašā procedūrā jākoriģē arī atbilstošā mērījuma nenoteiktība.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (ES) 2019/4 (2018. gada 11. decembris) par ārstnieciskās barības izgatavošanu, laišanu tirgū un lietošanu, ar ko groza Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 183/2005 un atceļ Padomes Direktīvu 90/167/EEK (OV L 4, 7.1.2019., 1. lpp.).

▼ M9

Lai noteiktu rudzu melno graudu vai kaitīgus botāniskus piemaisījumus, vizuāli apskatot vai izmantojot mikroskopu, mitruma satura korekcija nav nepieciešama.

6. Analītisko mērījumu nenoteiktība un atgūstamības procents nevēlamu vielu analīzes gadījumā

Attiecībā uz nevēlamām vielām Direktīvas 2002/32/EK nozīmē dzīvnieku barībai paredzētu produktu uzskata par neatbilstīgu noteiktajam šo vielu maksimālajam līmenim [maksimāli pieļaujamam saturam], ja secina, ka analītiskais rezultāts (izteikts kā divu neatkarīgu noteikšanu vidējais aritmētiskais) attiecībā uz barību ar mitruma saturu 12 % pārsniedz maksimāli pieļaujamo saturu, ņemot vērā analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību, izmantojot pārklāšanās koeficientu 2, kas nodrošina aptuveni 95 % ticamības pakāpi, un ņemot vērā atgūstamības korekciju. Tas nozīmē, ka, lai novērtētu atbilstību, izmanto analīzes rezultātā iegūto koncentrāciju, kas koriģēta atbilstoši atgūstamībai un samazināta atbilstoši paplašinātajai analītisko mērījumu nenoteiktībai. Šo procedūru piemēro tikai tad, ja saskaņā ar analīzes metodi ir iespējams aplēst analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību un atgūstamības korekciju. (piemēram, to neizmanto, vizuāli apskatot vai izmantojot mikroskopu).

Ja aizstāvības vajadzībām ņemtā parauga analītiskais rezultāts pārsniedz maksimālo saturu (neņemot vērā analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību), tas apstiprina konstatēto kontroles paraugam neatbilstību, ja šajā saistībā nav īpašu valsts noteikumu.

Analītisko rezultātu paziņo šādi (ciktāl izmantotā analīzes metode ļauj aplēst analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību):

- a) attiecīgos un atbilstīgos gadījumos ar atgūstamības korekciju, un, ja ir veikta korekcija, tā jānorāda. Jānorāda atgūstamības līmenis, ja vien iekšējā novirzes korekcija nav daļa no procedūras, kur novirze ir starpība starp izmērīto vērtību un atsauces koncentrāciju. Atgūstamības korekcija nav vajadzīga, ja atgūstamības procents ir 90–110 %;
- b) kā “x +/- U”, kur x ir analītiskais rezultāts un U – analītisko mērījumu paplašinātā nenoteiktība, izmantojot pārklāšanās koeficientu 2 ⁽¹⁾, kas nodrošina aptuveni 95 % ticamības pakāpi.

Tomēr, ja analīzes rezultāts ir ievērojami (> 50 %) zemāks nekā kontrolējamā specifikācija un ja piemēro atbilstošas kvalitātes procedūras un analīzes nolūks ir tikai pārbaudīt atbilstību tiesību normām, tad analīžu rezultātu var paziņot bez atgūstamības korekcijas un paplašinātās analītisko mērījumu nenoteiktības (piemēram, ja nav specifikācijas vai tiesību aktos noteikta līmeņa), ja vien mērījumu nenoteiktība nav nepieciešama interpretācijai.

7. Analītisko mērījumu nenoteiktība un atgūstamības procents barības piedevu satura analīzes gadījumā

Lai pārbaudītu atbilstību atļautajam minimālajam un maksimālajam barības piedevu saturam, barības piedevu daudzumu uzskata par neatbilstīgu noteiktajam minimālajam un maksimālajam saturam, ja pēc analītiskā rezultāta (kas izteikts kā divu neatkarīgu noteikšanu vidējais aritmētiskais) attiecībā uz barību ar mitruma saturu 12 % secina, ka:

- minēto piedevu maksimāli pieļaujamais saturs ir pārsniegts, ņemot vērā analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību un atgūstamības korekciju. Tas nozīmē, ka, lai novērtētu atbilstību, izmanto analīzes rezultātā

⁽¹⁾ 95 % ticamības pakāpi var sasniegt, izmantojot citu faktoru, piemēram, t faktoru.

▼ **M9**

iegūto koncentrāciju (t. i., divās noteikšanās iegūto vidējo aritmētisko), kas koriģēta atbilstoši atgūstamībai un samazināta atbilstoši paplašinātajai analītisko mērījumu nenoteiktībai,

- minēto piedevu saturs ir mazāks par minimāli pieļaujamo saturu, ņemot vērā analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību un atgūstamības korekciju. Tas nozīmē, ka, lai novērtētu atbilstību, izmanto analīzes rezultātā iegūto koncentrāciju (t. i., divās noteikšanās iegūto vidējo aritmētisko), kas koriģēta atbilstoši atgūstamībai un palielināta atbilstoši paplašinātajai analītisko mērījumu nenoteiktībai.

Ja aizstāvības vajadzībām ņemtā parauga analītiskais rezultāts pārsniedz maksimālo saturu (neņemot vērā analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību), tas apstiprina konstatēto kontroles paraugam neatbilstību, ja šajā saistībā nav īpašu valsts noteikumu.

Analītisko rezultātu paziņo šādi (ciktāl izmantotā analīzes metode ļauj aplēst analītisko mērījumu paplašināto nenoteiktību):

- a) attiecīgos un atbilstīgos gadījumos ar atgūstamības korekciju, un, ja ir veikta korekcija, tā jānorāda. Jānorāda atgūstamības līmenis, ja vien iekšējā novirzes korekcija nav daļa no procedūras, kur novirze ir starpība starp izmērīto vērtību un atsauces koncentrāciju. Atgūstamības korekcija nav vajadzīga, ja atgūstamības procents ir 90–110 %;
- b) kā “ $x \pm U$ ”, kur x ir analītiskais rezultāts (divu noteikšanu vidējais aritmētiskais) un U – paplašinātā analītisko mērījumu nenoteiktība, izmantojot pārklāšanās koeficientu 2⁽¹⁾, kas nodrošina aptuveni 95 % ticamības pakāpi.

⁽¹⁾ 95 % ticamības pakāpi var sasniegt, izmantojot citu faktoru, piemēram, t faktoru.

▼ **M9***III PIELIKUMS***ANALĪZES METODES, AR KO KONTROLĒ BARĪBAS SASTĀVDAĻU
UN BARĪBAS MAISIJUMU SASTĀVU****A. MITRUMA NOTEIKŠANA****1. Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt mitruma saturu barībā. Ja barība satur gaistošas vielas, piemēram, organiskās skābes, tad jāievēro, ka kopā ar mitruma saturu nosaka arī ievērojamu daudzumu gaistošo vielu.

Tā neaptver piena produktu kā barības sastāvdaļu analīzi, minerālvielu un galvenokārt no piena produktiem sastāvošu barības maisījumu analīzi, dzīvnieku un augu tauku un eļļu un eļļas augu sēklu un augļu analīzi.

Eļļas augu sēklu mitruma saturs jānosaka ar metodi, kas paredzēta standartā EN ISO 665 "Mitruma un gaistošo vielu satura noteikšana", saprotot, ka pirms mitruma satura noteikšanas sojas pupas ir jāsamaļ.

2. Princips

Paraugu žāvē norādītajos apstākļos, kas mainās atkarībā no barības īpašībām. Svara zudumu nosaka sverot. Ja analizē cietu barību, kurai ir augsts mitruma saturs, tad jāveic sākotnējā kaltēšana.

3. Iekārtas

- 3.1. Drupinātājs no materiāla, kas neabsorbē mitrumu un ir viegli tīrāms, ļauj ātri un vienmērīgi sasmalcināt produktu, būtiski to nesakarsējot, un, cik iespējams, novērš saskari ar apkārtējo gaisu, kā arī atbilst 4.1.1. un 4.1.2. punktā minētajām prasībām (piemēram, āmurdzirnaviņas vai āmurdzirnaviņas ar ūdens dzesēšanu, saliekamās konusveida dzirnaviņas, palēninātu apgriezību vai zobratu rupja maluma dzirnaviņas).
- 3.2. Analītiskie svāri ar precizitāti līdz 1 mg.
- 3.3. Sausi konteineri no nerūsējoša metāla vai stikla ar vākiem, kas nodrošina hermētisku noslēgšanu; darba virsma, kas ļauj izklāt testa paraugu aptuveni 0,3 g/cm² slānī.
- 3.4. Elektriskā izotermiskā krāsns (± 2 °C), kas tiek pienācīgi ventilēta un nodrošina iespēju ātri regulēt temperatūru ⁽¹⁾.
- 3.5. Regulējams elektriskais vakuumpumpas skapis, kas aprīkots ar eļļas sūkni un vai nu ar mehānismu karsta, sausa gaisa ievadīšanai, vai ar vielu, kas uzsūc mitrumu (piemēram, kalcija oksīdu).
- 3.6. Eksikators ar biezu, perforētu metāla vai porcelāna plāksni, kurā ir viela, kas efektīvi uzsūc mitrumu.

⁽¹⁾ Labības, miltu, putraimu un rupja maluma miltu kaltēšanai krāsns termiskajai jaudai jābūt tādai, lai, kad tā iestatīta uz 131 °C, tā atgrieztos minētajā temperatūrā mazāk nekā 45 minūtēs pēc tam, kad tajā vienlaikus kaltēšanai ir salikts maksimāli iespējamais testa paraugu skaits. Ventilēšanai jābūt tādai, lai tad, kad krāsnī divas un četras stundas ir kaltēts maksimāli iespējamais kviešu paraugu daudzums, abi rezultāti atšķirtos mazāk nekā par 0,15 %.

▼ **M9****4. Procedūra**

NB! Šajā iedaļā aprakstītās darbības jāveic tūlīt pēc paraugu iesaiņojumu atvēršanas. Analīzes jāatkārto vismaz divas reizes.

4.1. Sagatavošana**4.1.1. Barība, izņemot to, kas minēta 4.1.2. un 4.1.3. punktā**

Ņem vismaz 50 g parauga. Vajadzības gadījumā sasmalcina vai sadala tā, lai novērstu mitruma satura izmaiņas (skatīt 6. punktu).

4.1.2. Labība un putraimi

Ņem vismaz 50 g parauga. Samal daļiņās, no kurām vismaz 50 % izsijājas caur sietu ar 0,5 mm acīm, un atlikums sietā ar 1 mm apaļu acojumu nepārsniedz 10 %

4.1.3. Barība šķidrā vai pastas veidā un barība, kas galvenokārt sastāv no eļļām un taukiem

Ņem aptuveni 25 g parauga, nosver ar precizitāti līdz 10 mg, pievieno atbilstīgu daudzumu bezūdens smilts, kas nosvērta ar precizitāti līdz 10 mg, un maisa, līdz iegūst homogēnu produktu.

4.2. Kaltēšana

Kaltē konteinerā (3.3. punkts) ar vāku krāsnī, kas sakarsēta līdz 103 °C, 30 min +/- 1 min. Izņem no krāsns un ļauj eksikatorā (3.6. punkts) atdzist līdz apkārtējās vides temperatūrai.

4.2.1. Barība, izņemot to, kas minēta 4.2.2. un 4.2.3. punktā

Nosver konteineru ar vāku ar precizitāti līdz 1 mg. Nosvērtajā konteinerā ar precizitāti līdz 1 mg iesver aptuveni 5 g parauga un izlīdzina. Konteineru bez vāka ieliek krāsnī, kas iepriekš sakarsēta līdz 103 °C. Lai novērstu krāsns temperatūras pārmērīgu samazināšanos, konteineru ievieto pēc iespējas ātri. Atstāj kaltēties četras stundas, skaitot no brīža, kad krāsns temperatūra atkal sasniedz 103 °C. Krāsni atver, konteineram tūlīt atkal uzliek vāku, izņem konteineru no krāsns, 30 līdz 45 minūtes atdzesē eksikatorā (3.6. punkts) un nosver ar precizitāti līdz 1 mg.

Barību, kas galvenokārt (> 50 %) sastāv no dzīvnieku un augu valsts izcelsmes eļļām un taukiem, kaltē krāsnī vēl papildu 30 minūtes 103 °C temperatūrā. Abu svēršanas rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt 0,1 % mitruma.

4.2.2. Labība, milti, putraimi un rupja maluma milti

Nosver konteineru ar vāku ar precizitāti līdz 0,5 mg. Nosvērtajā konteinerā ar precizitāti līdz 1 mg iesver aptuveni 5 g sasmalcinātā parauga un izlīdzina. Konteineru bez vāka ieliek krāsnī, kas iepriekš sakarsēta līdz 130 °C. Lai novērstu krāsns temperatūras pārmērīgu samazināšanos, konteineru ievieto pēc iespējas ātri. Atstāj kaltēties divas stundas, skaitot no brīža, kad krāsns temperatūra atkal sasniedz 130 °C. Krāsni atver, konteineram tūlīt atkal uzliek vāku, izņem konteineru no krāsns, 30 līdz 45 minūtes atdzesē eksikatorā (3.6. punkts) un nosver ar precizitāti līdz 1 mg.

▼ **M9**

- 4.2.3. Barības maisījumi, kas satur vairāk nekā 4 % saharozes vai laktozes: barības sastāvdaļas, piemēram, ceratoniju augļi, hidrolizēti graudaugu produkti, iesala sēklas, kaltēti biešu grauzījumi, zivju un cukura šķīstošie produkti

Nosver konteineru ar vāku ar precizitāti līdz 0,5 mg. Nosvērtajā konteinerā ar precizitāti līdz 1 mg iesver aptuveni 5 g parauga un izlīdzina. Konteineru bez vāka ieliek vakuuma krāsnī (3.5. punkts), kas iepriekš sakarsēta 80 °C līdz 85 °C temperatūrā. Lai novērstu krāsns temperatūras pārmērīgu samazināšanos, konteineru ievieto pēc iespējas ātri.

Palielina spiedienu līdz 100 toriem un zem šāda spiediena kaltē četras stundas – vai nu karsta, sausa gaisa plūsmā, vai izmantojot vielu, kas uzsūc mitrumu (aptuveni 300 g uz 20 paraugiem). Pēdējā gadījumā pēc paredzētā spiediena sasniegšanas vakuumsūkni atvieno. Kaltēšanas laiku skaita no brīža, kad krāsns temperatūra atkal sasniedz 80 °C līdz 85 °C. Krāsnī uzmanīgi atjauno atmosfēras spiedienu. Krāsni atver, konteineram tūlīt atkal uzliek vāku, izņem konteineru no krāsns, 30 līdz 45 minūtes atdzesē eksikatorā (3.6. punkts) un nosver ar precizitāti līdz 1 mg. Vēl 30 minūtes kaltē vakuuma krāsnī 80 °C līdz 85 °C temperatūrā un vēlreiz nosver. Abu svēršanas rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt 0,1 % mitruma.

- 4.3. *Sākotnējā (daļējā) kaltēšana*

Lai veiktu stabilo vielu analīzi, pirms smalkās sasmalcināšanas “mitrā” barība, kuras sausnas masas daļa ir mazāka par 85 % (piemēram, lopbarība, kopējā jauktā barība, (ne-)šķidra barība), ir daļēji jāizkaltē; nestabilas vielas nav iespējams daļēji izkaltēt.

Daļēju kaltēšanu var veikt, izmantojot mehāniskas gaisa cirkulācijas krāsnī vai mikroviļņu krāsnī vai arī veicot kaltēšanu ar saldēšanas metodi. Izņemot daļēju kaltēšanu ar saldēšanas metodi, mērķis ir izkaltēt barību, saglabājot parauga temperatūru zem 60 °C, lai minimāli ietekmētu ķīmisko sastāvu. Ja kaltēšanas temperatūra pārsniedz 60 °C, barībā notiek ķīmiskas izmaiņas (piemēram, olbaltumvielu noārdīšanās). Izkaltēto barību līdzsvaro istabas temperatūrā apmēram 15 minūtes pirms daļēji sausā atlikuma mērīšanas, lai samazinātu iespējamās mitruma izmaiņas, kas var rasties malšanas un uzglabāšanas laikā. Ja kaltēšanas temperatūra ir zemāka par 60 °C, netiek likvidēts viss barībā esošais ūdens; tāpēc (sākotnējā) daļējā kaltēšana neatspoguļo kopējo sausnu barībā. Pēc kaltēšanas apakšparaugu samal un daļēji izkaltētajā paraugā (atlikušais mitrums 3 % līdz 15 %) analizē (galīgo) sausnu, kad nosaka citas ķīmiskās sastāvdaļas.

Tāpēc sausnas satura noteikšanai ir ieteicama divpakāpju procedūra. Vispirms nosaka daļēji sauso atlikumu (ja sausnas masas daļa ir mazāka par 85 %), pēc tam nosaka atlikušo sauso atlikumu sasmalcinātajā testa paraugā un reizina daļēji sauso atlikumu ar atlikušo sausnu, lai noteiktu kopējo sausnas saturu.

5. Rezultātu aprēķināšana

Mitruma saturu (X), izteiktu procentos no parauga, aprēķina, izmantojot šādas formulas:

▼ M95.1. *Kaltēšana bez sākotnējās kaltēšanas*

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

kur:

m = testa parauga sākotnējais svars gramos,

m₀ = izkaltētā testa parauga svars gramos.5.2. *Kaltēšana ar sākotnējo kaltēšanu ⁽¹⁾*

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

kur:

m = testa parauga sākotnējais svars gramos,

m₁ = testa parauga svars gramos pēc sākotnējās kaltēšanas,m₂ = testa parauga svars gramos pēc sasmalcināšanas vai samalšanas,m₀ = izkaltētā testa parauga svars gramos.5.3. *Atkārtojamība*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās paralēlās noteikšanās, kuras veiktas ar vienu paraugu, nepārsniedz 0,2 % mitruma absolūtās vērtības, izņemot mitras lolojumdzīvnieku barības un suņu košļājamo rotaļlietu gadījumā, kad starpība nepārsniedz 0,5 % mitruma absolūtās vērtības.

6. **Novērojums**

Ja sasmalcināšana ir vajadzīga un ja tās rezultātā mainās produkta mitruma saturs, tad barības sastāvdaļu analīzes rezultāti jākorrigē, pamatojoties uz parauga mitruma saturu tā sākotnējā stāvoklī.

B. MITRUMA NOTEIKŠANA DZĪVNIEKU UN AUGU TAUKOS UN EĻĻĀS

1. **Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt ūdens un gaistošo vielu saturu dzīvnieku un augu taukos un eļļās.

2. **Princips**

Paraugu žāvē līdz konstantam svaram (svara zudumam starp diviem secīgiem svērumiem jābūt mazākam par vai vienādam ar 1 mg) 103 °C temperatūrā. Svāra zudumu nosaka sverot.

3. **Iekārtas**

3.1. Plakandibena trauks, izgatavots no materiāla, kas izturīgs pret koroziju, apmēram 3 cm augsts un 8–9 cm diametrā.

3.2. Apmēram 10 cm garš termometrs ar pastiprinātu bumbiņu un izplešanās mēģeni augšgalā, kas graduēts apmēram no 80 °C līdz vismaz 110 °C.

3.3. Smilšu vanna vai elektriskā plītiņa.

⁽¹⁾ Sīkāku informāciju par aprēķinu skatīt EN ISO 6498 "Dzīvnieku barība. Paraugu sagatavošanas vadlīnijas".

▼ **M9**

3.4. Eksikators ar vielu, kas efektīvi uzsūc mitrumu.

3.5. Analītiskie svāri.

4. **Procedūra**

Sausā, nosvērtā traukā (3.1. punkts), kurā ir termometrs (3.2. punkts), ar precizitāti līdz tuvākajam mg iesver apmēram 20 g homogenizētā parauga. Pastāvīgi maisot ar termometru, smilšu vannā vai uz elektriskās plītiņas (3.3. punkts) silda tā, lai apmēram septiņās minūtēs temperatūra paaugstinātos līdz 90 °C.

Karstumu samazina, sekojot tam, cik bieži no trauka dibena paceļas burbuļi. Temperatūra nedrīkst pārsniegt 105 °C. Turpina maisīt, skrāpējot gar trauka dibenu, līdz pārstāj veidoties burbuļi.

Lai pilnībā izdalītos viss mitrums, vairākas reizes temperatūru paaugstina līdz 103 °C ± 2 °C, starplaikos starp karsēšanām atdzesējot līdz 93 °C. Pēc tam eksikatorā (3.4. punkts) ļauj atdzist līdz istabas temperatūrai un nosver. Minēto darbību atkārto tikmēr, kamēr svara zudums starp diviem secīgiem svērumiem vairs nepārsniedz 2 mg.

NB! Ja parauga svārs pēc atkārtotas karsēšanas palielinās, tas liecina par tauku oksidēšanos, un tādā gadījumā rezultātu aprēķina, ņemot vērā svērumu, kas izdarīts pirms tam, kad svārs sāka palielināties.

5. **Rezultātu aprēķināšana**

Mitruma saturu (X), izteiktu procentos no parauga, aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

m = testa parauga svārs gramos,

m_1 = trauka un tā satura kopējais svārs gramos pirms karsēšanas,

m_2 = trauka un tā satura kopējais svārs gramos pēc karsēšanas.

Ja rezultāts ir mazāks par 0,05 %, tad tas jāreģistrē kā “mazāks par 0,05 %”.

Atkārtotamība

Mitruma satura starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās paralēlās noteikšanās, kuras veiktas ar vienu paraugu, nedrīkst pārsniegt 0,1 % absolūtās vērtības.

C. SLĀPEKĻA SATURA NOTEIKŠANA UN JĒLPROTEĪNA SATURA APRĒĶINĀŠANA

1. **Mērķis un tvērums**

Ar šo metodi var noteikt jēlproteīna daudzumu barībā, pamatojoties uz slāpekļa saturu, ko nosaka saskaņā ar Kjeldāla metodi ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ N saturu var noteikt jebkurā barībā, taču pārrēķina koeficients 6,25 jēlproteīna satura aprēķināšanai var nebūt piemērojams kukaiņu barības sastāvdaļām (zemāks pārrēķina koeficients) un noteiktai lolojumdzīvnieku barībai un asins plazmas olbaltumvielām (augstāks pārrēķina koeficients).

▼ M9**2. Princips**

Paraugu šķeļ ar sērskābi katalizatora klātbūtnē. Skābes šķīdumu neitralizē un noregulē tā reakciju līdz bāziskai ar nātrija hidroksīda šķīdumu. Amonjaku destilē un uztver noteiktā sērskābes daudzumā, kuras pārpalikumu titrē ar nātrija hidroksīda standartšķīdumu.

Alternatīvi – atbrīvoto amonjaku destilē borskābes šķīduma pārpalikumā, pēc tam titrē ar sālsskābes vai sērskābes šķīdumu.

3. Reaģenti

- 3.1. Kālija sulfāts.
- 3.2. Katalizators: vara (II) oksīds (CuO) vai vara (II) sulfāta pentahidrāts (CuSO₄ · 5H₂O).
- 3.3. Granulētais cinks.
- 3.4. Sērskābe, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.5. Sērskābe, standarta volumetriskais šķīdums, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l.
- 3.6. Sērskābe, standarta volumetriskais šķīdums, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l.
- 3.7. Sērskābe, standarta volumetriskais šķīdums, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l.
- 3.8. Metilsarkanais indikators; izšķīdina 300 mg metilsarkanā 100 mililitros etanola, $\sigma = 95\text{--}96\%$ (v/v).
- 3.9. Nātrija hidroksīda šķīdums (var izmantot tehnisko) $\beta = 40$ g/100 ml (m/v: 40 %).
- 3.10. Nātrija hidroksīds, standarta volumetriskais šķīdums $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l.
- 3.11. Nātrija hidroksīds, standarta volumetriskais šķīdums $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l.
- 3.12. Sālsskābē mazgāti, izkarsēti pumeka gabaliņi.
- 3.13. Acetanilīds (kušanas temp. = 114 °C, N-saturs = 10,36 %).
- 3.14. Saharoze (nesatur slāpekli).
- 3.15. Borskābe (H₃BO₃).
- 3.16. Metilsarkanā indikatora šķīdums: izšķīdina 100 mg metilsarkanā 100 mililitros etanola vai metanola.
- 3.17. Bromkrezolzaļā šķīdums: izšķīdina 100 mg bromkrezolzaļā 100 mililitros etanola vai metanola.
- 3.18. Borskābes šķīdums (10 g/l līdz 40 g/l atkarībā no izmantotās ierīces).

Ja izmanto kolorimetrisko galarezultāta noteikšanu, tad metilsarkanais un bromkrezolzaļais indikators jāpievieno borskābes šķīdumiem. Ja sagatavo vienu litru borskābes šķīduma, tad pirms tilpuma korekcijas pievieno 7 ml metilsarkanā indikatora šķīduma (3.16. punkts) un 10 ml bromkrezolzaļā šķīduma (3.17. punkts).

Atkarībā no izmantotā ūdens borskābes šķīduma pH līmenis dažādās partijās var būt atšķirīgs. Borskābes šķīduma pH ir jābūt no 4.3 līdz 4.7. Bieži vien, lai iegūtu pozitīvu tukšo analīzi, šķīdums jākorrigē, pievienojot nelielu sārna daudzumu.

▼ **M9**

Piezīme. Parasti var iegūt labus korekcijas rezultātus, ja vienam litram 10 g/l borskābes pievieno apmēram 3 ml līdz 4 ml NaOH (3.11. punkts). Šķīdumu uzglabā istabas temperatūrā un uzglabāšanas laikā sargā no gaismas un no amonjaka tvaiku avotiem.

- 3.19. Sālsskābes standarta volumetriskais šķīdums $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Piezīme. Var izmantot citas volumetrisko šķīdumu koncentrācijas (3.5., 3.6., 3.7., 3.10., 3.11. un 3.19. punkts), ja aprēķinos veic attiecīgas korekcijas. Koncentrāciju vienmēr izsaka līdz četriem cipariem aiz komata.

4. **Iekārtas**

Ierīces, kas piemērotas šķelšanai, destilēšanai un titrēšanai saskaņā ar Kjeldāla metodi.

5. **Procedūra**

5.1. *Šķelšana*

No parauga ar precizitāti līdz 0,001 g ņem 1 g lielu iesvaru, ko pārnes šķelšanas aparāta kolbā. Pievieno 15 g kālija sulfāta (3.1. punkts), atbilstošu daudzumu katalizatora (3.2. punkts) (0,3 līdz 0,4 g vara (II) oksīda vai 0,9 līdz 1,2 g vara (II) sulfāta pentahidrāta), 25 ml sērskābes (3.4. punkts) un, ja vajadzīgs, dažus pumeka gabaliņus (3.12. punkts) un kolbas saturu samaisa.

Kolbu sākumā karsē uzmanīgi, ja vajadzīgs, laiku pa laikam maisot, līdz masa ir karbonizēta un vairs neputo; tad karsēšanu pastiprina, līdz šķidrums sāk pastāvīgi vārīties. Pietiek karsēt, kad verdošā skābe kondensējas uz kolbas sienām. Nedrīkst pieļaut kolbas pārkaršanu un organisko vielu daļiņu pielipšanu pie tās sienām.

Kad šķīdums kļūst dzidrs un gaiši zaļš, to turpina vārīt vēl divas stundas, tad ļauj atdzist.

5.2. *Destilēšana*

Uzmanīgi pievieno vajadzīgo ūdens daudzumu, lai nodrošinātu, ka sulfāti pilnībā izšķīst. Ļauj atdzist, tad, ja vajadzīgs, pievieno dažas cinka granulas (3.3. punkts). Tad rīkojas, kā noteikts 5.2.1. vai 5.2.2. punktā.

5.2.1. *Destilēšana sērskābē*

Atkarībā no sagaidāmā slāpekļa satura destilācijas aparāta uztvērējkolbā precīzi iemēra 25 ml sērskābes (3.5. punkts vai 3.7. punkts). Pievieno dažus pilienus metilsarkanā indikatora (3.8. punkts).

Šķelšanas kolbu pievieno destilācijas aparāta kondensatoram un kondensatora galu iemērc šķīdumā, kas ir uztvērējkolbā, vismaz 1 cm dziļi (skatīt 8.3. Novērojumu punktu). Nepieļaujot amonjaka zudumus (skatīt 8.1. Novērojumu punktu), šķelšanas kolbā lēnām ielej 100 ml nātrija hidroksīda šķīduma (3.9. punkts). Kolbu karsē, līdz destilējas amonjaks.

5.2.2. *Destilēšana borskābē*

Ja destilāta amonjaka saturu titrē manuāli, tad izmanto tālāk minēto procedūru. Ja destilēšanas vienība ir pilnībā automatizēta un ietver arī destilāta amonjaka satura titrēšanu, tad jāievēro ražotāja norādījumi attiecībā uz destilēšanas vienības darbināšanu.

▼ **M9**

Savācējkolbu, kurā ir 25 ml līdz 30 ml borskābes šķīduma (3.18. punkts), novieto zem kondensatora izplūdes tā, lai padeves caurule atrastos zem borskābes šķīduma pārākuma virsmas. Destilācijas vienību koriģē, lai tā izdalītu 50 ml nātrija hidroksīda šķīduma (3.9. punkts). Destilācijas vienību darbina saskaņā ar ražotāja norādījumiem un atbrīvoto amonjaku destilē, pievienojot nātrija hidroksīda šķīdumu. Destilātu uztver borskābē, kura uzņem šķīdumu. Destilāta apjoms (destilācijas ar tvaiku laiks) ir atkarīgs no slāpekļa daudzuma paraugā. Ievēro ražotāja norādījumus.

Piezīme. Pusautomātiskajā destilēšanas vienībā nātrija hidroksīda pārpalikumu pievieno un tvaiku destilē automātiski.

5.3. *Titrēšana*

Rīkojas, kā noteikts 5.3.1. vai 5.3.2. punktā.

5.3.1. *Sērskābe*

Sērskābes pārpalikumu savācējkolbā titrē ar nātrija hidroksīda šķīdumu (3.10. vai 3.11. punkts) atkarībā no izmantotās sērskābes koncentrācijas, līdz tiek sasniegts galapunkts.

5.3.2. *Borskābe*

Savācējkolbas saturu titrē ar sālsskābes standarta volumetrisko šķīdumu (3.19. punkts) vai ar sērskābes standarta volumetrisko šķīdumu (3.6. punkts), izmantojot bireti, un nolasa izmantotā titranta daudzumu.

Ja piemēro kolorimetrisko galapunkta noteikšanu, tad galapunkts ir sasniegts, kad parādās pirmās sārtas krāsas zīmes. Provizoriski nosaka biretes rādījumu ar precizitāti līdz 0,05 ml. Izgaismots magnētiskā maisītāja trauks vai fotometrisks detektors var palīdzēt ieraudzīt galapunktu.

To var izdarīt automātiski, izmantojot tvaika destilētāju ar automātisko titrēšanu.

Jāievēro ražotāja norādījumi attiecībā uz konkrētā destilētāja vai destilētāja/titrētāja izmantošanu.

Piezīme. Ja izmanto automātisko titrēšanas sistēmu, tad titrēšana sākas tūlīt pēc destilācijas sākšanas un kad ir izmantots 1 % borskābes šķīdums (3.18. punkts).

Ja izmanto pilnībā automatizētu destilācijas vienību, tad amonjaka automātisko titrēšanu var veikt arī, ja galapunktu nosaka, izmantojot potenciometrisku pH sistēmu.

Tādā gadījumā izmanto automātisko titrētāju ar pH mērītāju. pH mērītājs ir attiecīgi kalibrēts pH 4 līdz pH 7 diapazonā, ievērojot parastās laboratorijas pH kalibrēšanas procedūras.

Titēšanas pH galapunktu sasniedz pie pH 4,6, kas ir stāvākais punkts titrēšanas līknē (pārlikuma punkts).

5.4. *Tukšā parauga analīze*

Lai apstiprinātu, ka reaģenti nesatur slāpekli, veic tukšā parauga analīzi (šķelšanu, destilēšanu un titrēšanu), parauga vietā izmantojot 1 g saharozes (3.14. punkts).

▼ M9**6. Rezultātu aprēķināšana**

Aprēķinus veic atbilstoši 6.1. vai 6.2. punktam.

6.1. *Titrešanas aprēķins atbilstoši 5.3.1. punktam*

Jēlproteīna saturu, kas izteikts procentos no svara, aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

V_0 = NaOH tilpums (ml) (3.10. vai 3.11. punkts), ko izmanto tukšā parauga analizē,

V_1 = NaOH tilpums (ml) (3.10. vai 3.11. punkts), ko izmanto parauga titrēšanā,

c = nātrija hidroksīda (3.10. vai 3.11. punkts) koncentrācija (mol/l),

m = parauga svars (g).

6.2. *Titrešanas aprēķins atbilstoši 5.3.2. punktam***6.2.1. *Titrešana ar sālsskābi***

Jēlproteīna saturu, kas izteikts procentos no svara, aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

m = analizējamā parauga svars (g),

c = sālsskābes (3.19. punkts) standarta volumetriskā šķīduma koncentrācija (mol/l),

V_0 = tukšā parauga analizē izmantotās sālsskābes tilpums (ml),

V_1 = analizējamam paraugam izmantotās sālsskābes tilpums (ml).

6.2.2. *Titrešana ar sērskābi*

Jēlproteīna saturu, kas izteikts procentos no svara, aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

m = analizējamā parauga svars (g),

c = sērskābes standarta volumetriskā šķīduma (3.6. punkts) koncentrācija (mol/l),

V_0 = tukšā parauga analīzei izmantotās sērskābes (3.6. punkts) tilpums (ml),

V_1 = analizējamam paraugam izmantotās sērskābes (3.6. punkts) tilpums (ml).

▼ M9**7. Metodes verifikācija****7.1. Atkārtojamība**

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

— 0,4 % absolūtajā vērtībā, ja jēlproteīna saturs ir mazāks par 20 %,

— 2,0 % no lielākās vērtības, ja jēlproteīna saturs ir no 20 % līdz 40 %,

— 0,8 % absolūtajā vērtībā, ja jēlproteīna saturs ir lielāks par 40 %.

7.2. Reproducējamība

Starpība starp rezultātiem, kurus divās noteikšanās iegūst ar vienu paraugu, bet dažādās laboratorijās, nedrīkst pārsniegt:

— 1,8 % absolūtajā vērtībā, ja jēlproteīna saturs ir mazāks par 20 %,

— 9,0 % no lielākās vērtības, ja jēlproteīna saturs ir no 20 % līdz 40 %,

— 3,6 % absolūtajā vērtībā, ja jēlproteīna saturs ir lielāks par 40 %.

7.3. Precizitāte

Analizē (veicot šķelšanu, destilēšanu un titrēšanu) piemērotā acetanilīda daudzumā (3.13. punkts) (piemēram, 0,2–0,3 g) 1 g saharozes (3.14. punkts) klātbūtnē; 1 g acetanilīda patērē 14,80 ml sērskābes (3.5. punkts). Atgūstamībai jābūt vismaz 99 %.

8. Novērojumi

8.1. Ierīce var būt manuāla, pusautomātiska vai automātiska. Ja paraugs pēc šķelšanas jāpārviesto destilēšanai, tad pārvešana jāveic bez zudumiem. Ja destilācijas aparāta kolba nav aprīkota ar pilināmo piltuvi, tad nātrija hidroksīdu, lēnām lejot gar kolbas sienu, pievieno tieši pirms tās savienošanas ar kondensatoru.

8.2. Ja šķelšanas produkts sacietē, tad noteikšanu atkārt, lietojot lielāku daudzumu sērskābes (3.4. punkts), nekā norādīts 5.1. punktā.

8.3. Analizējot produktus ar zemu slāpekļa saturu, vajadzības gadījumā sērskābes (3.7. punkts) tilpumu uztvērējkolbā var samazināt līdz 10 ml vai 15 ml un papildina līdz 25 ml ar ūdeni.

8.4. Regulārai analīzei, lai noteiktu jēlproteīnu, var izmantot alternatīvas analīzes metodes, bet šajā C daļā aprakstītā Kjeldāla metode ir standartmetode. Ar alternatīvo metodi (piemēram, *DUMAS*) iegūto rezultātu līdzvērtība salīdzinājumā ar standartmetodi jāpierāda attiecībā uz katru matrici atsevišķi. Tā kā ar alternatīvo metodi iegūtie rezultāti pat pēc līdzvērtības verifikācijas var nedaudz atšķirties no rezultātiem, kas iegūti ar standartmetodi, analīžu ziņojumā jāpiemin analīzes metode, kas izmantota jēlproteīna noteikšanai.

▼ **M9****D. URĪNVIELAS NOTEIKŠANA****1. Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt tādas urīnvielas daudzumu, ko izmanto kā barības piedevu atgremotāju barībā.

2. Princips

Paraugu kopā ar dzidrināšanas aģentu iejauc ūdenī. Suspensiju filtrē. Urīnvielas saturu filtrātā nosaka pēc 4-dimetilaminobenzaldehīda (4-DMAB) pievienošanas, mērot optisko blīvumu pie 420 nm viļņu garuma.

3. Reaģenti

3.1. 4-dimetilaminobenzaldehīda šķīdums: izšķīdina 1,6 g 4-DAMB 100 mililitros 96 % etanola un pievieno 10 ml sālskābes (ρ_{20} 1,19 g/ml). Šo reaģentu var glabāt ne ilgāk par divām nedēļām.

3.2. Karesa I šķīdums: ūdenī izšķīdina 21,9 g cinka acetāta, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, un 3 g ledus etiķskābes. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.

3.3. Karesa II šķīdums: ūdenī izšķīdina 10,6 g kālija ferocianīda, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.

3.4. Aktīvā ogle, kas neabsorbē urīnvielu (jāpārbauda).

3.5. Urīnviela, 0,1 % šķīdums (w/v).

4. Iekārtas

4.1. Rotācijas tipa maisītājs (tumblers): aptuveni 35 līdz 40 apgr./min.

4.2. Mēģenes: 160 × 16 mm ar pieslēpēta stikla aizbāžņiem.

4.3. Spektrofotometrs.

5. Procedūra**5.1. Parauga analīze**

Nosver 2 g parauga ar precizitāti līdz tuvākajam mg un kopā ar 1 g aktīvās ogles (3.4. punkts) pārnes 500 ml tilpuma mērkolbā. Pievieno 400 ml ūdens un 5 ml Karesa I šķīduma (3.2. punkts), maisa apmēram 30 sekundes un pievieno 5 ml Karesa II šķīduma (3.3. punkts). Trīsdesmit minūtes maisa tumblerā. Papildina ar ūdeni līdz tilpumam, sakrata un filtrē.

Noņem 5 ml caurspīdīgā, bezkrāsainā filtrāta, pārnes mēģenēs ar pieslēpēta stikla aizbāžņiem, pievieno 5 ml 4-DMAB šķīduma (3.1. punkts) un samaisa. Mēģenes ievieto ūdens vannā 20 °C (+/- 4 °C) temperatūrā. Pēc piecpadsmit minūtēm ar spektrofotometru pie 420 nm mēra parauga šķīduma optisko blīvumu. Salīdzina ar reaģentu tukšā parauga analīzes šķīdumu.

5.2. Kalibrēšanas līkne

Nem pa 1, 2, 4, 5 un 10 ml urīnvielas šķīduma (3.5. punkts), pārnes 100 ml tilpuma mērkolbās un papildina ar ūdeni līdz tilpumam. Ņem 5 ml no katra šķīduma, pievieno pa 5 ml 4-DMAB šķīduma (3.1. punkts), homogenizē un iepriekš aprakstītajā veidā mēra optisko blīvumu pret kontrolšķīdumu, kas sastāv no 5 ml 4-DMAB un 5 ml ūdens, kurš nesatur urīnvielu. Konstruē kalibrēšanas līkni.

▼ M9**6. Rezultātu aprēķināšana**

Urīnvielas daudzumu paraugā nosaka, izmantojot kalibrēšanas līkni.

Rezultātu izsaka procentos no parauga masas.

7. Metodes novērtējums**7.1. Atkārtojamība**

Starpība starp rezultātiem, kurus iegūst divās noteikšanās, ko ar vienu paraugu vienā un tajā pašā laboratorijā veic tas pats operators, nedrīkst pārsniegt:

— pie 420 nm

— 50 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir no 3 000 mg/kg līdz 5 000 mg/kg,

— 25 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir no 5 000 mg/kg līdz 7 000 mg/kg,

— 20 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir vismaz 7 000 mg/kg;

— pie 435 nm

— 40 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir no 3 000 mg/kg līdz 5 000 mg/kg,

— 25 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir no 5 000 mg/kg līdz 9 000 mg/kg,

— 5 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir vismaz 9 000 mg/kg.

7.2. Reproducējamība

Starpība starp rezultātiem, kurus iegūst divās noteikšanās, ko veic ar vienu paraugu, bet dažādās laboratorijās un/vai dažādi operatori, nedrīkst pārsniegt:

— pie 420 nm

— 3 000 mg/kg absolūtajā vērtībā, ja urīnvielas saturs ir no 3 000 mg/kg līdz 12 000 mg/kg,

— 4 500 mg/kg absolūtajā vērtībā, ja urīnvielas saturs ir vismaz 12 000 mg/kg;

— pie 435 nm

— 50 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir no 3 000 mg/kg līdz 8 000 mg/kg,

— 25 % no lielākās noteiktās vērtības, ja urīnvielas saturs ir vismaz 8 000 mg/kg.

8. Salīdzinošā pētījuma rezultāti

Tika organizēts ES starplaboratoriju salīdzinājums, kurā piedalījās 18 laboratorijas. Tika analizēti (viena analīze) pieci pozitīvi atgremotāju barības paraugi (1. un 2. tabulā apzīmēti "MAT") aklās dubultanalīzēs, bet viens tukšais atgremotāju barības paraugs tika analizēts vienā analīzē.

Atkārtojamības (r) un reproducējamības (R) robežvērtību aprēķini, kā noteikts starptautiskajās vadlīnijās, tika veikti pēc galējo punktu likvidēšanas, izmantojot derīgo vērtību dispersijas analīzi.

▼ **M9**

Aprēķinātie metodes snieguma rādītāji (atkārtojamība, reproducējamība) ir redzami nākamajās tabulās. Nevienā testētajā paraugā, tostarp tukšajā materiālā, netika konstatēti viltus pozitīvi vai viltus negatīvi rezultāti.

1. tabula

Metodes snieguma raksturlielumi attiecībā uz urīnvielu, ko mēra pie $\lambda = 420$ nm visās barības sastāvdaļās

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Aitas	Govis	Aitas	Aitas	Govis
Mērķa masas daļa (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Vidējā masas daļa (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Reproducējamības standartnovirze s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Atkārtojamības standartnovirze s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Reproducējamības relatīvā standartnovirze RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Atkārtojamības relatīvā standartnovirze RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Reproducējamības robeža, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Atkārtojamības robeža, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

2. tabula

Metodes snieguma raksturlielumi attiecībā uz urīnvielu, ko mēra pie $\lambda = 435$ nm visās barības sastāvdaļās

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Aitas	Govis	Aitas	Aitas	Govis
Mērķa masas daļa (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Vidējā masas daļa (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Reproducējamības standartnovirze s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Atkārtojamības standartnovirze s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Reproducējamības relatīvā standartnovirze RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Atkārtojamības relatīvā standartnovirze RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Reproducējamības robeža, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Atkārtojamības robeža, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ **M9****9. Novērojumi**

- 9.1. Ja urīnvielas saturs pārsniedz 3 %, tad paraugu samazina līdz 1 g vai sākotnēji pagatavoto šķīdumu atšķaida tā, lai 500 mililitros nebūtu vairāk par 50 mg urīnvielas.
- 9.2. Ja urīnvielas saturs ir zems, tad parauga iesvara masu palielina, ievērojot nosacījumu, ka no tā iegūtais filtrāts paliek caurspīdīgs un bezkrāsains.
- 9.3. Ja paraugs satur tādus vienkāršus slāpekļa savienojumus kā aminoskābes, tad optisko blīvumu mēra pie 420 nm vai 435 nm.

E. AMINOSKĀBJU (IZŅEMOT TRIPTOFĀNU) NOTEIKŠANA

Analīzes metodes aminoskābju (izņemot triptofānu) noteikšanai ir šādas:

- EN ISO 13903 “Dzīvnieku barība. Aminoskābju satura noteikšana”,
- EN ISO 17180 “Dzīvnieku barība. Lizīna, metionīna un treonīna noteikšana komerciālos aminoskābju produktos un premiksos”⁽¹⁾,
- analīzes metode, kā aprakstīts turpmāk 1.–10. punktā.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt brīvās (sintētiskās un dabīgās) un kopējās (ar peptīdsaitēm saistītās un brīvās) aminoskābes barībā, barības maisījumos un premiksos, kas satur mazāk nekā 10 %⁽²⁾ katras aminoskābes, izmantojot aminoskābju analizētāju. To izmanto, lai noteiktu šādas aminoskābes: cist(e)īns, metionīns, lizīns, treonīns, alanīns, arginīns, aspartāmskābe, glutamīnskābe, glicīns, histidīns, izoleicīns, leicīns, fenilalanīns, prolīns, serīns, tirozīns un valīns.

Šīs metode nešķir dažādus aminoskābju sāļus un nediferencē aminoskābju D un L formas. To nevar izmantot, lai noteiktu triptofāna un aminoskābju hidroksianalogus.

2. Princips**2.1. Brīvās aminoskābes**

Brīvās aminoskābes ekstrahē ar atšķaidītu sāļsskābi. Līdzekstrahētās slāpekļa makromolekulas izgulsnē ar sulfosalicilskābi un atdala filtrējot. Filtrēto šķīdumu koriģē līdz pH 2,20. Aminoskābes sadala ar jonu apmaiņas hromatogrāfiju un pēc reakcijas ar ninhidrīnu nosaka fotometriski pie 570 nm.

2.2. Kopējās aminoskābes

Procedūru izvēlas atkarībā no nosakāmajām aminoskābēm. Pirms hidrolīzes cist(e)īns un metionīns jāoksidē attiecīgi līdz cisteīnskābei un metionīna sulfonam. Tirozīns jānosaka neoksidētu paraugu hidrolizātos. Visas pārējās 1. punktā (Mērķis un tvērums) minētās aminoskābes var noteikt oksidētā vai neoksidētā paraugā.

⁽¹⁾ EN 17180 paredzētā analīzes metode ir alternatīva metode, kas izmantojama, lai, veicot oficiālu kontroli, noteiktu aminoskābes barībā, kas satur vairāk nekā 10 % aminoskābju.

⁽²⁾ Šī metode nav validēta kopīgā izmēģinājumā attiecībā uz premiksiem, kas satur vairāk nekā 10 % barības sastāvdaļu. Tomēr tā ir izmantojama arī šīm matricām ar atbilstošām nelielām modifikācijām, ja metode pēc tam tiek validēta uzņēmumā. Plašāku informāciju skatīt vietnē <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

Oksidēšanu veic 0 °C temperatūrā ar peroksiskudrskābes/fenola maisījumu. Oksidēšanas reaģenta pārpalikumu sadala ar nātrija disulfītu. Oksidēto vai neoksidēto paraugu 23 stundas hidrolizē ar sālsskābi (3.20. punkts). Hidrolizātu koriģē līdz pH 2,20. Aminorskābes sadala ar jonu apmaiņas hromatogrāfiju un pēc reakcijas ar ninhidrīnu nosaka fotometriski pie 570 nm (440 nm prolīnam).

3. **Reaģenti**

Jāizmanto ūdens bidestilāts vai līdzvērtīgas kvalitātes ūdens (vadītspēja < 10 µS).

- 3.1. Ūdeņraža peroksīds, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Skudrskābe, w (w/w) = 98-100 %.
- 3.3. Fenols.
- 3.4. Nātrija disulfīts.
- 3.5. Nātrija hidroksīds.
- 3.6. 5-sulfosalicilskābes dihidrāts.
- 3.7. Sālsskābe, blīvums apmēram 1,18 g/ml.
- 3.8. Trinātrija citrāta dihidrāts.
- 3.9. 2,2'-tiodietanols (tiodiglikols).
- 3.10. Nātrija hlorīds.
- 3.11. Ninhidrīns.
- 3.12. Petrolēteris, viršanas diapazons 40–60 °C.
- 3.13. Norleicīns vai cits savienojums, kas piemērots izmantošanai par iekšējo standartu.
- 3.14. Slāpekļa gāze (< 10 ppm skābekļa).
- 3.15. 1-oktanols.
- 3.16. Aminorskābes.
- 3.16.1. Standartvielas, kas minētas 1. punktā (Mērķis un tvērums). Tīri savienojumi, kuri nesatur kristalizācijas ūdeni. Žāvē vakuumā virs P₂O₅ vai H₂SO₄ vienu nedēļu pirms izmantošanas.
- 3.16.2. Cisteīnskābe.
- 3.16.3. Metionīnsulfons.
- 3.17. Nātrija hidroksīda šķīdums, c = 7,5 mol/l:

ūdenī atšķaida 300 g NaOH (3.5. punkts) un papildina līdz vienam litram.
- 3.18. Nātrija hidroksīda šķīdums, c = 1 mol/l:

ūdenī atšķaida 40 g NaOH (3.5. punkts) un papildina līdz vienam litram.
- 3.19. Skudrskābes–fenola šķīdums:

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

▼ **M9**

- 3.20. Hidrolīzes maisījums, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, kas satur 1 g fenola/l :

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

- 3.21. Ekstrakcijas maisījums, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, kas satur 2% tiodiglikola: $8,2 \text{ ml HCl}$ (3.7. punkts) atšķaida apmēram ar 900 ml ūdens , pievieno $20 \text{ ml tiodiglikola}$ (3.9. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni (3.7. un 3.9. punktā minētās vielas tieši nejaukt).

- 3.22. 5-sulfosalicilskābe, $\beta = 6 \%$:

izšķīdina $60 \text{ g 5-sulfosalicilskābes}$ (3.6. punkts) ūdenī un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.

- 3.23. Oksidēšanas maisījums (peroksiskudrskābe–fenols):

nelielā vārglāzē samaisa $0,5 \text{ ml ūdeņraža peroksīda}$ (3.1. punkts) ar $4,5 \text{ ml skudrskābes un fenola šķīduma}$ (3.19. punkts). Iztur $20\text{--}30^\circ\text{C}$ temperatūrā vienu stundu, lai izveidojas peroksiskudrskābe, tad atdzesē ledusvannā (15 min), pirms pievieno paraugam.

Uzmanību: izvairīties no saskares ar ādu un valkāt aizsargapģērbu!

- 3.24. Citrāta buferšķīdums, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:

izšķīdina $19,61 \text{ g nātrija citrāta}$ (3.8. punkts), $5 \text{ ml tiodiglikola}$ (3.9. punkts), 1 g fenola (3.3. punkts) un $16,50 \text{ ml HCl}$ (3.7. punkts) apmēram $800 \text{ mililitros ūdens}$. Koriģē pH līmeni līdz 2,20. Papildina ar ūdeni līdz vienam litram.

- 3.25. Eluācijas buferšķīdumi, sagatavoti atbilstoši izmantotā analizētāja (4.9. punkts) apstākļiem.

- 3.26. Ninhidrīna reaģents, sagatavots atbilstoši izmantotā analizētāja apstākļiem (4.9. punkts).

- 3.27. Aminoskābju standarta šķīdumi. Minētos šķīdumus uzglabā temperatūrā zem 5°C .

- 3.27.1. Aminoskābju rezerves standartšķīdums (3.16.1. punkts).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ no katra sāļsskābē.

Var iegūt komerciāli.

- 3.27.2. Cisteīnskābes un metionīna sulfona rezerves standartšķīdums, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Izšķīdina $0,2115 \text{ g cisteīnskābes}$ (3.16.2. punkts) un $0,2265 \text{ g metionīna sulfona}$ (3.16.3. punkts) citrāta buferšķīdumā (3.24. punkts) viena litra mērkolbā un papildina līdz zīmei ar citrāta buferšķīdumu. Uzglabā temperatūrā, kas zemāka par 5°C , ne ilgāk kā 12 mēnešus . Minēto šķīdumu neizmanto, ja rezerves standartšķīdums (3.27.1. punkts) satur cisteīnskābi un metionīna sulfonu.

- 3.27.3. Iekšējā standarta rezerves standartšķīdums, piemēram, norleicīns, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Izšķīdina $0,6560 \text{ g norleicīna}$ (3.13. punkts) citrāta buferšķīdumā (3.24. punkts) mērkolbā un papildina līdz 250 ml ar citrāta buferšķīdumu. Uzglabā temperatūrā, kas zemāka par 5°C , ne ilgāk kā sešus mēnešus.

▼ **M9**

- 3.27.4. Standarta aminoskābju kalibrēšanas šķīdums izmantošanai ar hidrolizātiem, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ cisteīnskābes un metionīnsulfona un $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ pārējo aminoskābju. Izšķīdina 2,2 g nātrija hlorīda (3.10. punkts) 100 ml tilpuma vārglāzē ar 30 ml citrāta buferšķīduma (3.24. punkts). Pievieno 4,00 ml aminoskābju rezerves standartšķīduma (3.27.1. punkts), 4,00 ml cisteīnskābes un metionīnsulfona rezerves standartšķīduma (3.27.2. punkts) un 0,50 ml iekšējā standarta rezerves standartšķīduma (3.27.3. punkts), ja to izmanto. Koriģē pH līmeni līdz 2,20, izmantojot nātrija hidroksīdu (3.18. punkts).

Kvantitatīvi pārnes 50 ml mērkolbā un papildina līdz zīmei ar citrāta buferšķīdumu (3.24. punkts), un samaisa.

Uzglabā temperatūrā, kas zemāka par 5°C , ne ilgāk kā 3 mēnešus.

Skatīt arī 9.1. Novērojumu punktu.

- 3.27.5. Standarta aminoskābju kalibrēšanas šķīdums izmantošanai ar hidrolizātiem, kas sagatavoti atbilstoši 5.3.3.1. punktam, un izmantošanai ar ekstraktiem (5.2. punkts). Kalibrēšanas šķīdumu sagatavo saskaņā ar 3.27.4. punktu, tikai nepievieno nātrija hlorīdu.

Uzglabā temperatūrā, kas zemāka par 5°C , ne ilgāk kā 3 mēnešus.

4. **Iekārtas**

- 4.1. 100 vai 250 ml apaļkolba ar atteces kondensatoru.
- 4.2. 100 ml borsilikāta stikla pudele ar skrūvējamu korķi ar gumijas/teflona drīvējumu (piemēram, *Duran*, *Schott*) izmantošanai krāsnī.
- 4.3. Krāsns ar mehānisko ventilāciju un temperatūras regulatoru, kura precizitāte ir augstāka par $\pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.4. pH mērītājs (trīs skaitļi aiz komata).
- 4.5. Membrānfiltrs (0,22 μm).
- 4.6. Centrifūga.
- 4.7. Rotācijas vakuumiztvaicētājs.
- 4.8. Mehāniskais kratītājs vai magnētiskais maisītājs.
- 4.9. Aminoskābju analizētājs vai *HPLC* iekārta ar jonu apmaiņas kolonnu, ierīce ninhidrīnam, pēckolonnas derivatizācija un fotometrs.

Kolonnu piepilda ar sulfonētiem polistirola sveķiem, kas spēj atdalīt aminoskābes citu no citas un no pārējiem ninhidrīnpozitīviem materiāliem. Plūsmu bufera un ninhidrīna līnijā nodrošina sūkņi, kuru plūsmas stabilitāte ir $\pm 0,5\%$ periodā, kas ietver gan standarta kalibrēšanas norisi, gan parauga analīzi.

Ar dažiem aminoskābju analizētājiem var izmantot hidrolīzes procedūras, kurās hidrolizātā nātrija koncentrācija ir $c = 0,8 \text{ mol/l}$ un hidrolizāts satur visu atlikušo skudrskābi no oksidācijas posma. Pārējās pietiekami labi neatdala dažas aminoskābes, ja hidrolizāts satur skudrskābes pārpalikumu un/vai augstu nātrija jonu koncentrāciju. Tādā gadījumā skābes tilpumu samazina, pēc hidrolīzes un pirms pH līmeņa korekcijas iztvaicējot apmēram līdz 5 ml. Iztvaicēšanu veic vakuumā augstākais 40°C temperatūrā.

▼ **M9****5. Procedūra****5.1. Parauga sagatavošana**

Paraugu samal, lai tas izsijātos caur sietu ar 0,5 mm acojumu. Paraugi, kuros ir liels mitruma saturs, pirms malšanas vai nu jāizkaltē temperatūrā, kas nepārsniedz 50 °C, vai jāizžāvē ar izsaldēšanu. Paraugus, kuros ir liels tauku saturs, pirms malšanas ekstrahē ar petrolēteri (3.12. punkts).

5.2. Brīvo aminoskābju noteikšana barībā un premiksos

Attiecīgu daudzumu (1–5 g) sagatavotā parauga (5.1. punkts) ar precizitāti līdz 0,2 mg iesver koniskā kolbā un pievieno 100,0 ml ekstrakcijas maisījuma (3.21. punkts). Maisījumu 60 minūtes krata, izmantojot mehānisko kratītāju vai magnētisko maisītāju (4.8. punkts). Ļauj nogulsnēm nogulsnēties un 10,0 ml šķīduma augšējā slāņa ar pipeti iepilina 100 ml vārglāzē.

Pievieno 5,0 ml sulfosalicilskābes šķīduma (3.22. punkts), vienlaikus maisot, un turpina maisīt ar magnētisko maisītāju piecas minūtes. Šķīduma augšējo slāni filtrē vai centrifugē, lai atdalītu visas nogulsnes. Ievieto 10,0 ml iegūtā šķīduma 100 ml vārglāzē un koriģē pH līmeni līdz 2,20, izmantojot nātrija hidroksīda šķīdumu (3.18. punkts), pārnes uz attiecīga tilpuma mērkolbu, izmantojot citrāta buferšķīdumu (3.24. punkts), un papildina līdz zīmei ar buferšķīdumu (3.24. punkts).

Ja izmanto iekšējo standartu, tad pievieno 1,00 ml iekšējā standarta (3.27.3. punkts) uz katriem 100 ml galīgā šķīduma un papildina līdz zīmei ar buferšķīdumu (3.24. punkts).

Veic nākamo hromatogrāfijas posmu atbilstoši 5.4. punktam.

Ja ekstraktus nepārbauda tajā pašā dienā, tad tie jāuzglabā temperatūrā, kas zemāka par 5 °C.

5.3. Kopējo aminoskābju noteikšana**5.3.1. Oksidācija**

No 0,1 līdz 1 g sagatavotā parauga (5.1. punkts) ar precizitāti līdz 0,2 mg iesver:

- 100 ml apaļkolbā (4.1. punkts) vaļējai hidrolīzei (5.3.2.3. punkts) vai
- 250 ml apaļkolbā (4.1. punkts), ja ir prasīta zema nātrija koncentrācija (5.3.3.1. punkts), vai
- 100 ml pudelē ar skrūvējamu korķi (4.2. punkts) slēgtai hidrolīzei (5.3.2.4. punkts).

Nosvērtajā apjomā, no kura ņem paraugu, slāpekļa saturam jābūt apmēram 10 mg un mitruma saturam – ne vairāk par 100 mg.

Kolbu/pudeli ievieto ledusvannā un atdzesē līdz 0 °C, pievieno 5 ml oksidēšanas maisījuma (3.23. punkts) un samaisa, izmantojot stikla lāpstiņu ar liektu galu. Kolbu/pudeli, kurā ir lāpstiņa, cieši noslēdz ar hermētisku plēvi, ievieto ledusvannā ar noslēgto trauku ledusskapī 0 °C temperatūrā un atstāj uz 16 stundām. Pēc 16 stundām izņem no ledusskapja un sadala oksidēšanas reaģenta pārpalikumu, pievienojot 0,84 g nātrija disulfīta (3.4. punkts).

Rīkojas, kā noteikts 5.3.2.1. punktā.

▼ **M9**

5.3.2. Hidrolīze

5.3.2.1. Oksidēto paraugu hidrolīze

Oksidētajam paraugam, kas sagatavots atbilstoši 5.3.1. punktam, pievieno 25 ml hidrolīzes maisījuma (3.20. punkts), raugoties, lai tiktu noskalotas visas parauga atliekas, kas pielīpušas trauka malām un lāpstiņai.

Atkarībā no izmantotās hidrolīzes procedūras rīkojas, kā noteikts 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktā.

5.3.2.2. Neoksidēto paraugu hidrolīze

100 ml vai 250 ml apaļkolbā (4.1. punkts) vai 100 ml pudelē, kas aprīkota ar skrūvējamu vāciņu (4.2. punkts), ar precizitāti līdz 0,2 mg iesver no 0,1 līdz 1 g sagatavotā parauga (5.1. punkts). Slāpekļa saturam iesvērtajā analizējamā paraugā jābūt apmēram 10 mg. Uzmanīgi pievieno 25 ml hidrolīzes maisījuma (3.20. punkts) un samaisa ar paraugu. Rīkojas, kā noteikts 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktā.

5.3.2.3. Atvērtā hidrolīze

Maisījumam kolbā (kas sagatavots atbilstoši 5.3.2.1. vai 5.3.2.2. punktam) pievieno trīs stikla lodītes un vāra, maisījumam attecē nepārtraukti burbuļojot 23 stundas. Pēc hidrolīzes pabeigšanas kondensatoru noskalo ar 5 ml citrāta buferšķīduma (3.24. punkts). Kolbu atvieno un atdzesē ledusvannā.

Rīkojas, kā noteikts 5.3.3. punktā.

5.3.2.4. Slēgtā hidrolīze

Pudeli ar maisījumu, kas sagatavots saskaņā ar 5.3.2.1. vai 5.3.2.2. punktu, ievieto krāsnī (4.3. punkts) 110 °C temperatūrā. Pirmajā stundā, lai novērstu spiediena uzkrāšanos (kas notiek gāzveida vielu veidošanās dēļ) un lai novērstu sprādzienu, uz trauka augšas uzliek skrūvējamu vāciņu. Trauku neaizver ar vāciņu. Pēc vienas stundas trauku aizver ar vāciņu un atstāj krāsnī (4.3. punkts) 23 stundas. Pēc hidrolīzes pabeigšanas pudeli izņem no krāsns, uzmanīgi atver pudeles vāciņu un pudeli ieliek ledusvannā. Atstāj atdzist.

Atkarībā no procedūras, kādu izmanto pH līmeņa korekcijai (5.3.3. punkts), kvantitatīvi pārnes pudeles saturu 250 ml vārglāzē vai 250 ml apaļkolbā, izmantojot citrāta buferšķīdumu (3.24. punkts).

Rīkojas, kā noteikts 5.3.3. punktā.

5.3.3. pH līmeņa korekcija

Lai koriģētu pH līmeni, atkarībā no aminoskābes analizētāja (4.9. punkts) nātrija tolerances rīkojas atbilstoši 5.3.3.1. vai 5.3.3.2. punktam.

5.3.3.1. Hromatogrāfijas sistēmām (4.9. punkts), kurām nepieciešama zema nātrija koncentrācija

Ja izmanto aminoskābju analizētājus, kuriem nepieciešama zema nātrija koncentrācija (kad skābes tilpums jāsamazina), ieteicams izmantot iekšējās rezerves standartšķīdumu (3.27.3. punkts).

Tādā gadījumā hidrolizātam pirms iztvaicēšanas pievieno 2,00 ml iekšējās rezerves standartšķīduma (3.27.3. punkts).

Pievieno divus pilienus 1-oktānola (3.15. punkts) hidrolizātam, kas iegūts saskaņā ar 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktu.

▼ **M9**

Izmantojot rotācijas iztvaicētāju (4.7. punkts), vakuumā un 40 °C grādu temperatūrā samazina tilpumu līdz 5–10 ml. Ja tilpumu nejauši samazina līdz mazāk nekā 5 ml, tad hidrolizāts jāizmet un analīze jāsāk no jauna.

Ar nātrija hidroksīda šķīdumu (3.18. punkts) koriģē pH līmeni līdz 2,20 un rīkojas, kā noteikts 5.3.4. punktā.

5.3.3.2. Visiem pārējiem aminoskābju analizētājiem (4.9. punkts)

Hidrolizātus, kas iegūti saskaņā ar 5.3.2.3. vai 5.3.2.4. punktu, daļēji neitralizē un, uzmanīgi maisot, pievieno 17 ml nātrija hidroksīda šķīduma (3.17. punkts), un nodrošina, lai temperatūra būtu zem 40 °C.

Koriģē pH līmeni līdz 2,20 istabas temperatūrā, izmantojot nātrija hidroksīda šķīdumu (3.17. punkts) un visbeidzot – nātrija hidroksīda šķīdumu (3.18. punkts). Pāriet pie 5.3.4. punkta.

5.3.4. Parauga šķīdums hromatogrāfijai

Kvantitatīvi pārnes pH koriģēto hidrolizātu (5.3.3.1. vai 5.3.3.2. punkts) ar citrāta buferšķīdumu (3.24. punkts) 200 ml tilpuma mērkolbā un papildina līdz zīmei ar buferšķīdumu (3.24. punkts).

Ja iekšējais standarts nav jau izmantots, tad pievieno 2,00 ml iekšējā standarta (3.27.3. punkts) un papildina līdz zīmei ar citrāta buferšķīdumu (3.24. punkts). Rūpīgi samaisa.

Pāriet pie hromatogrāfijas posma (5.4. punkts).

Ja parauga šķīdumus nepārbauda tajā pašā dienā, tad tie jāuzglabā temperatūrā, kas zemāka par 5 °C.

5.4. *Hromatogrāfija*

Pirms hromatogrāfijas ekstraktu (5.2. punkts) vai hidrolizātu (5.3.4. punkts) sasilda līdz istabas temperatūrai. Maisījumu sakrata un piemērotu daudzumu izfiltrē caur 0,22 µm membrānfiltru (4.5. punkts). Iegūto dzidro šķīdumu pakļauj jonu apmaiņas hromatogrāfijai, izmantojot aminoskābju analizētāju (4.9. punkts).

Injekciju var veikt manuāli vai automātiski. Ir svarīgi, lai kolonnā standartu un paraugu analīzei tiktu pievienots vienāds šķīduma daudzums $\pm 0,5 \%$, izņemot gadījumus, kad izmanto iekšējo standartu, un lai nātrija/aminoskābes proporcijas standarta un parauga šķīdumos būtu pēc iespējas līdzīgākas.

Parasti kalibrēšanas posmu biežums ir atkarīgs no ninhidrīna reaģenta stabilitātes un analīžu sistēmas. Standartu vai paraugu atšķaida ar citrāta buferšķīdumu (3.24. punkts), lai uzrādītu standarta smailes laukumu 30–200 % apmērā no parauga aminoskābes smailes laukuma.

Aminoskābju hromatogrāfija nedaudz atšķirsies atkarībā no izmantotā analizētāja tipa un sveķiem. Izvēlētajai sistēmai jāspēj atdalīt aminoskābes citu no citas un no ninhidrīnpozitīviem materiāliem. Darbības diapazonā hromatogrāfiskajai sistēmai jāsniedz lineāra atbilde uz pārmaiņām to aminoskābju daudzumos, ko pievieno kolonnā.

Kad analizē (nosakāmo aminoskābju) ekvimolāru šķīdumu, tad hromatogrāfijas posma laikā piemēro tālāk minētās minimuma un maksimuma attiecības. Tādam ekvimolāram šķīdumam jāsaturs vismaz 30 % no katras aminoskābes maksimālās slodzes, ko var precīzi izmērīt, izmantojot aminoskābju analizētāja sistēmu (4.9. punkts).

▼ M9

Lai atdalītu treonīnu-serīnu, minimuma un maksimuma attiecība zemākajai no divām aminoskābēm, kuras pārklājas hromatogrammā, nedrīkst pārsniegt 2:10 (ja nosaka tikai cist(e)īnu, metionīnu, treonīnu un lizīnu, tad nepietiekama atdalīšana no blakusesošajām smailēm negatīvi ietekmēs noteikšanu). Visām pārējām aminoskābēm atdalījumam jābūt precīzākam par 1:10.

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

6. Rezultātu aprēķināšana

Parauga un standarta smaiļu laukumu mēra katrai atsevišķai aminoskābei un aprēķina aminoskābes (X) daudzumu gramos uz kilogramu parauga.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000}$$

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

A = smaiļes laukums, hidrolizāts vai ekstrakts,

B = smaiļes laukums, kalibrēšanas standartšķīdums,

C = smaiļes laukums, iekšējais standarts hidrolizātā vai ekstraktā,

D = smaiļes laukums, iekšējais standarts, kalibrēšanas standartšķīdums,

M = nosakāmās aminoskābes molmasa,

c = standarta koncentrācija $\mu\text{mol/ml}$,

m = parauga svars (g) (koriģēts līdz sākotnējam svaram, ja kaltēts vai attaukots),

V = ml kopējā hidrolizāta (5.3.4. punkts) vai ml ekstrakta aprēķinātā kopējā atšķaidījuma tilpuma (6.1. punkts).

Cistīnu un cisteīnu nosaka kā cisteīnskābi oksidētā parauga hidrolizātos, bet aprēķina kā cistīnu ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240, g/mol), izmantojot M 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Metionīnu nosaka kā metionīna sulfonu oksidētā parauga hidrolizātos, bet aprēķina kā metionīnu, izmantojot metionīna M: 149,21 g/mol.

Pievienoto brīvo metionīnu nosaka pēc tam, kad tas ekstrahēts kā metionīns, aprēķinam izmanto to pašu M.

- 6.1. Ekstraktu kopējo atšķaidījuma tilpumu (F), lai noteiktu brīvās aminoskābes (5.2. punkts), aprēķina šādi:

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

V = galīgā ekstrakta tilpums.

7. Metodes novērtējums

Minēto metodi pārbaudīja starptautiskā līmenī 1990. gadā, salīdzinot rezultātus starp laboratorijām, izmantojot četras dažādas barības (barības maisījumu cūkām, barības maisījumu broileriem, proteīnu koncentrātu un premiksu).

▼ **M9**

Piezīme. Metode ir pārbaudīta otrā starptautiskā pētījumā 2003. gadā, salīdzinot rezultātus starp laboratorijām, izmantojot broileru nobarošanas beigu posma barības, broileru nobarošanas sākuma posma barības, kukurūzas, zivju miltu un māju putnu miltu neatpazīstamu paraugu pārus. Sīkāku informāciju skatīt EN ISO 13903.

1990. gadā veiktās salīdzināšanas vidējo un standartnoviržu rezultāti, kas iegūti pēc galējo punktu likvidēšanas, ir norādīti tabulās šajā punktā.

Vidējie lielumi g/kg

Standart-materiāls	Aminoskābe			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Barības maisījums cūkām	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Barības maisījums broileriem	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteīnu koncentrāts	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premikss	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = iesaistīto laboratoriju skaits.

7.1. *Atkārtojamība*

Iepriekš minētā savstarpējā salīdzinājuma atkārtojamība, kas izteikta kā “laboratorijas standartnovirze”, ir norādīta tālāk tabulā.

Variācijas koeficients (%) atkārtojamībai (CV_r)

Standart- materiāls	Aminoskābe			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Barības maisījums cūkām	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Barības maisījums broileriem	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteīnu koncentrāts	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premikss	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = iesaistīto laboratoriju skaits.

7.2. *Reproducējamība*

Starplaboratoriju standartnoviržu rezultāti, kas iegūti iepriekš minētajā savstarpējā salīdzinājumā, ir norādīti tālāk tabulā.

▼ **M9****Variācijas koeficients (%) reproducējamībai (CV_R)**

Standart- materiāls	Aminoskābe			
	Treonīns	Cist(e)īns	Metionīns	Lizīns
Barības maisījums cūkām	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Barības maisījums broileriem	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteīnu koncentrāts	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premikss	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = iesaistīto laboratoriju skaits.

8. Standartmateriālu izmantošana

Metodes pareizu piemērošanu verificē, atkārtoti mērot sertificētus standartmateriālus, kad tie ir pieejami. Ir ieteicama kalibrēšana ar sertificētu aminoskābes kalibrēšanas šķīdumu.

9. Novērojumi

- 9.1. Tā kā starp aminoskābju analizētājiem ir atšķirības, tad par pamatnostādni ņem standarta aminoskābju (skatīt 3.27.4. un 3.27.5. punktu) un hidrolizāta (skatīt 5.3.4. punktu) kalibrēšanas šķīdumu galīgās koncentrācijas.

Aparāta lineārās reakcijas diapazons jāpārbauda attiecībā uz visām aminoskābēm.

Standartšķīdumu atšķaida ar citrāta buferšķīdumu, lai uzrādītu smailes laukumus diapazona vidū.

- 9.2. Ja izmanto augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas aprīkojumu, lai analizētu hidrolizātus, tad eksperimenta apstākļi jāoptimizē saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

- 9.3. Saskaņā ar šo metodi analizējot barību, kas satur vairāk par 1 % hlorīda (koncentrātu, minerālbarību, papildbarību), var iegūt pazeminātus rezultātus attiecībā uz metionīnu, un tāpēc tā jāapstrādā īpaši.

10. Izpildījuma kritēriji

Apkopojot rezultātus (izņemot tirozīnu), kas iegūti divos salīdzinošajos pētījumos (1990. gadā, par kuru ziņots iepriekš 7. punktā, un 2005. gadā, par kuru ziņots EN/ISO 13903), ir iegūti šādi atkārtojamības un reproducējamības kritēriji. Vērtības, kas iegūtas šajos divos starplaboratoriju testos, var nebūt piemērojamas nenorādītiem koncentrācijas diapazoniem un matricām.

10.1. Atkārtojamība

Starpība starp rezultātiem, kurus iegūst divās noteikšanās, ko ar vienu paraugu vienā un tai pašā laboratorijā veic tas pats operators, nedrīkst pārsniegt:

— attiecībā uz glicīnu, analīnu, lizīnu, prolīnu, glutamīnskābi, izoleicīnu un histidīnu – 6 % no lielākās kopējo aminoskābju vērtības,

— attiecībā uz treonīnu, fenilalanīnu, metionīnu, aspartāmskābi un leicīnu – 8 % no lielākās kopējo aminoskābju vērtības,

▼ M9

- attiecībā uz arginīnu un valīnu – 10 % no lielākās kopējo aminoskābju vērtības,
- 12 % no lielākās kopējās serīna aminoskābes vērtības,
- 15 % no lielākās kopējās cist(e)īna aminoskābes vērtības.

10.2. Reproducējamība

Starpība starp rezultātiem, kurus iegūst divās noteikšanās, ko veic ar vienu paraugu, bet dažādās laboratorijās un/vai dažādi operatori, nedrīkst pārsniegt:

- attiecībā uz glicīnu, analīnu un treonīnu – 15 % no lielākās kopējo aminoskābju vērtības,
- attiecībā uz lizīnu, prolīnu, fenilalanīnu, metionīnu un aspartāmskābi – 20 % no lielākās kopējo aminoskābju vērtības,
- attiecībā uz glutamīnskābi un leicīnu – 22 % no lielākās kopējo aminoskābju vērtības,
- 27 % no lielākās kopējās arginīna aminoskābes vērtības,
- 32 % no lielākās kopējās izoleicīna aminoskābes vērtības,
- attiecībā uz valīnu un serīnu – 35 % no lielākās kopējo aminoskābju vērtības,
- 40 % no lielākās kopējās histidīna aminoskābes vērtības,
- 50 % no lielākās kopējās cist(e)īna aminoskābes vērtības.

F. TRIPTOFĀNA NOTEIKŠANA

Analīzes metodes triptofāna noteikšanai ir šādas:

- EN ISO 13904 “Dzīvnieku barība. Triptofāna satura noteikšana”,
- analīzes metode, kā aprakstīts turpmāk 1.–9. punktā.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt kopējo un brīvo triptofānu barībā. Tajā neizšķir D un L formu.

2. Princips

Lai noteiktu kopējo triptofānu, paraugu hidrolizē sārmajos apstākļos ar piesātinātu bārija hidroksīda šķīdumu un 20 stundas karsē līdz 110 °C temperatūrai. Pēc hidrolīzes pievieno iekšējo standartu.

Lai noteiktu brīvo triptofānu, paraugu ekstrahē nelielā daudzumā skābā vidē iekšējā standarta klātbūtnē.

Triptofānu un iekšējo standartu hidrolizātā vai ekstraktā nosaka, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (HPLC) ar fluorescences noteikšanu.

3. Reāģenti

- 3.1. Jāizmanto ūdens bidestilāts vai līdzvērtīgas kvalitātes ūdens (vadītspēja < 10 μS/cm).

▼ **M9**

- 3.2. Standartviela: triptofāns (tīrība/saturs $\geq 99\%$), kas izžāvēts vakuumā virs fosfora pentoksīda.
- 3.3. Iekšējā standartviela: α -metil-triptofāns (tīrība/saturs $\geq 99\%$), kas izžāvēts vakuumā virs fosfora pentoksīda.
- 3.4. Bārija hidroksīda oktahidrāts (jārūpējas, lai $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ pārmērīgi nepakļautu gaisa iedarbībai, lai izvairītos no BaCO_3 veidošanās, kas varētu traucēt noteikšanu) (skatīt 9.3. Novērojumu punktu).
- 3.5. Nātrija hidroksīds.
- 3.6. Ortofosforskābe, $w(w/w) = 85\%$.
- 3.7. Sālsskābe, $\rho_{20} 1,19 \text{ g/ml}$.
- 3.8. Metanols, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei.
- 3.9. Petrolēteris, viršanas diapazons $40\text{--}60^\circ\text{C}$.
- 3.10. Nātrija hidroksīda šķīdums, $c = 1 \text{ mol/l}$

Ūdenī atšķaida $40,0 \text{ g NaOH}$ (3.5. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni (3.1. punkts).

- 3.11. Sālsskābe, $c = 6 \text{ mol/l}$.
492 ml HCl (3.7. punkts) papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.12. Sālsskābe, $c = 1 \text{ mol/l}$.
82 ml HCl (3.7. punkts) papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.13. Sālsskābe, $c = 0,1 \text{ mol/l}$.
8,2 ml HCl (3.7. punkts) papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.14. Ortofosforskābe, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
Paņem 34 ml ortofosforskābes (3.6. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni (3.1. punkts).
- 3.15. Koncentrēts triptofāna šķīdums (3.2. punkts), $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$.
 500 ml tilpuma mērkolbā izšķīdina $0,2553 \text{ g}$ triptofāna (3.2. punkts) sālsskābē (3.13. punkts) un papildina līdz zīmei ar sālsskābi (3.13. punkts). Uzglabā -18°C temperatūrā ne ilgāk kā četras nedēļas.
- 3.16. Koncentrēts iekšējais standartšķīdums, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$.
 500 ml tilpuma mērkolbā sālsskābē (3.13. punkts) izšķīdina $0,2728 \text{ g}$ α -metil-triptofāna (3.3. punkts) un papildina līdz zīmei ar sālsskābi (3.13. punkts). Uzglabā -18°C temperatūrā ne ilgāk kā četras nedēļas.
- 3.17. Triptofāna kalibrēšanas standartšķīdums un iekšējais standarts.

Nem $2,00 \text{ ml}$ koncentrēta triptofāna (3.15. punkts) šķīduma un $2,00 \text{ ml}$ koncentrēta iekšējā standarta (α -metil-triptofāna) šķīduma (3.16. punkts). Atšķaida ar ūdeni (3.1. punkts) un metanolu (3.8. punkts) aptuveni līdz tādām pašām tilpumam un aptuveni tādai pašai metanola koncentrācijai ($10\text{--}30\%$) kā gatavajam hidrolizātam.

Minētais šķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

Sagatavošanas laikā jāuzmana, lai nepieļūst tieša saules gaisma.

▼ M9

- 3.18. Etiķskābe.
- 3.19. 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanols.
- 3.20. Etanolamīns w (w/w) > 98 %.
- 3.21. 1 g 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanola (3.19. punkts) šķīdums 100 mililitros metanola (3.8. punkts).
- 3.22. Kustīgā fāze priekš *HPLC*: 3,00 g etiķskābes (3.18. punkts) + 900 ml ūdens (3.1. punkts) + 50,0 ml 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanola (3.19. punkts) šķīduma (3.21. punkts) metanolā (3.8. punkts) (1 g/100 ml). pH līmeni koriģē līdz 5,00 (3.20. punkts). Papildina ar ūdeni līdz 1 000 ml (3.1. punkts).

4. Iekārtas

- 4.1. *HPLC* iekārta ar spektrofotometra detektoru.
- 4.2. Šķidrums hromatogrāfa kolonna, 125 × 4 mm, C₁₈, 3 μm iesaiņojums, vai līdzvērtīga.
- 4.3. pH mērītājs.
- 4.4. Polipropilēna kolba, 125 ml tilpums, ar platu kaklu un skrūvējamu korķi.
- 4.5. Membrānfiltres, 0,45 μm.
- 4.6. Autoklāvs, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bāri.
- 4.7. Mehāniskais kratītājs vai magnētiskais maisītājs.
- 4.8. Virpuļmikseris.

5. Procedūra**5.1. Paraugu sagatavošana**

Paraugu samal, lai tas izsijātos caur sietu ar 0,5 mm acojumu. Paraugi, kuros ir liels mitruma saturs, pirms malšanas vai nu jāizkaltē temperatūrā, kas nepārsniedz 50 °C, vai jāizžāvē ar izsaldēšanu. Paraugus, kuros ir liels tauku saturs, pirms malšanas ekstrahē ar petrolēteri (3.9. punkts).

5.2. Brīvā triptofāna noteikšana (ekstrakts)

Attiecīgu apjomu (1–5 g) sagatavotā parauga (5.1. punkts) ar precizitāti līdz 1 mg iesver koniskā kolbā. Pievieno 100,0 ml sālsskābes (3.13. punkts) un 5,00 ml koncentrēta iekšējā standartšķīduma (3.16. punkts). Krata vai maisa 60 minūtes, izmantojot mehānisko kratītāju vai magnētisko maisītāju (4.7. punkts). Ļauj nogulsnēm nogulsnēties un 10,0 ml šķīduma augšējā slāņa ar pipeti iepilina vārglāzē. Pievieno 5 ml ortofosforskābes (3.14. punkts). Koriģē pH līmeni līdz 3, izmantojot nātrija hidroksīdu (3.10. punkts). Pievieno pietiekami daudz metanola (3.8. punkts), lai galīgajā tilpumā metanola koncentrācija būtu no 10% līdz 30 %. Pārnes attiecīga tilpuma kolbā un atšķaida ar ūdeni līdz tilpumam, kas vajadzīgs hromatogrāfijai (aptuveni tikpat, cik ir kalibrēšanas standartšķīdums (3.17. punkts)).

Izfiltrē dažus ml šķīduma caur 0,45 μm membrānfiltu (4.5. punkts), pirms šķīdumu injicē *HPLC* kolonnā. Veic nākamo hromatogrāfijas posmu atbilstoši 5.4. punktam.

Standartšķīdums un ekstrakti jāargā no tiešas saules gaismas. Ja ekstraktus nav iespējams analizēt tajā pašā dienā, tad tos var uzglabāt 5 °C temperatūrā ne ilgāk kā trīs dienas.

▼ **M9**5.3. *Kopējā triptofāna (hidrolizāta) noteikšana*

No 0,1 līdz 1 g sagatavotā parauga (5.1. punkts) ar precizitāti līdz 0,2 mg iesver polipropilēna kolbā (4.4. punkts). Slāpekļa saturs iesvērtajā analizējamā paraugā ir apmēram 10 mg. Pievieno 8,4 g bārija hidroksīda oktahidrāta (3.4. punkts) un 10 ml ūdens. Samaisa virpuļmikserī (4.8. punkts) vai ar magnētisko maisītāju (4.7. punkts). Atstāj maisījumā ar teflonu pārklātu magnētu. Trauka sienas noskalo ar 4 ml ūdens. Uzliek skrūvējamu korķi un vaļīgi aiztaisa kolbu. Pārvieto uz autoklāvu (4.6. punkts) ar verdošu ūdeni un tvaicē 30–60 minūtes. Aizver autoklāvu un tur karsē $110 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ temperatūrā 20 stundas.

Pirms autoklāva atvēršanas temperatūru samazina, lai tā būtu nedaudz zem $100 ^\circ\text{C}$. Lai novērstu $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ kristalizāciju, siltajam maisījumam pievieno 30 ml istabas temperatūras ūdens. Viegli sakrata vai samaisa. Pievieno 2,00 ml koncentrēta iekšējā standarta (α -metil-triptofāna) šķīduma (3.16. punkts). Atdzesē traukus ūdenī/ledus vannā 15 minūtes.

Tad pievieno 5 ml ortofosforskābes (3.14. punkts). Trauku tur dzesēšanas vannā un neitralizē ar HCl (3.11. punkts), vienlaikus maisot, un pH līmeni koriģē līdz 3,0, izmantojot HCl (3.12. punkts). Pievieno pietiekami daudz metanola, lai galīgajā tilpumā metanola koncentrācija būtu no 10% līdz 30 %. Pārnes atbilstoša tilpuma kolbā un atšķaida ar ūdeni līdz tilpumam, kas noteikts hromatogrāfijas vajadzībām (piemēram, 100 ml). Pievienojot metanolu, neveidojas nogulsnes.

Pirms šķīdumu injicē HPLC kolonnā, izfiltrē dažus ml šķīduma caur $0,45 \mu\text{m}$ membrānfiltru (4.5. punkts). Veic nākamo hromatogrāfijas posmu atbilstoši 5.4. punktam.

Standartšķīdums un hidrolizāti jāsargā no tiešas saules gaismas. Ja hidrolizātus nav iespējams izanalizēt tajā pašā dienā, tad tos var uzglabāt $5 ^\circ\text{C}$ temperatūrā ne ilgāk kā trīs dienas.

5.4. *HPLC noteikšana*

Orientējoši izokrātiskajai eluācijai piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus (skatīt arī 9.1. un 9.2. Novērojumu punktu).

HPLC kolonna (4.2. punkts): $125 \times 4 \text{ mm}$, C_{18} , $3 \mu\text{m}$ iesaiņojums, vai līdzvērtīga

Kolonnas temperatūra: istabas temperatūra

Kustīgā fāze (3.22. punkts): 3,00 g etiķskābes (3.18. punkts) + 900 ml ūdens (3.1. punkts) + 50,0 ml 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanola (3.19. punkts) šķīdums (3.21. punkts) metanolā (3.8. punkts) 1 g/100 ml). pH līmeni koriģē līdz 5,00, izmantojot etanolamīnu (3.20. punkts). Papildina ar ūdeni līdz 1 000 ml (3.1. punkts)

Plūsmas ātrums: 1 ml/min

Kopējais norises laiks: apmēram 34 min

Noteikšanas viļņa garums: ierosa 280 nm, emisija 356 nm

Injekcijas tilpums: 20 μl

▼ **M9****6. Rezultātu aprēķināšana**

Aprēķina triptofāna (X) daudzumu gramos uz 100 g parauga.

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

A = iekšējā standarta smailes laukums, kalibrēšanas standartšķīdums (3.17. punkts),

B = triptofāna smailes laukums, ekstrakts (5.2. punkts) vai hidrolizāts (5.3. punkts),

V₁ = koncentrētā triptofāna šķīduma (3.15. punkts) tilpums mililitros (2 ml), ko pievieno kalibrēšanas šķīdumam (3.17. punkts),

c = koncentrētā triptofāna šķīduma (3.15. punkts) koncentrācija μmol/ml (= 2,50), ko pievieno kalibrēšanas šķīdumam (3.17. punkts),

V₂ = koncentrētā iekšējā standartšķīduma (3.16. punkts) tilpums mililitros, ko pievieno ekstrahēšanas laikā (5.2. punkts) (= 5,00 ml) vai hidrolizātam (5.3. punkts) (= 2,00 ml),

C = iekšējā standarta smailes laukums, ekstrakts (5.2. punkts) vai hidrolizāts (5.3. punkts),

D = triptofāna smailes laukums, kalibrēšanas standartšķīdums (3.17. punkts),

V₃ = koncentrētā iekšējā standartšķīduma (3.16. punkts) tilpums mililitros (= 2,00 ml), ko pievieno kalibrēšanas standartšķīdumam (3.17. punkts),

m = parauga svars gramos (koriģēts līdz sākotnējam svaram, ja kaltēts un/vai attaukots),

M = triptofāna molmasa (= 204,23 g/mol).

7. Atkārtojamība

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās paralēlās noteikšanās, kuras veiktas ar vienu paraugu, nedrīkst pārsniegt 10 % attiecībā pret lielāko rezultātu.

8. Salīdzinošā pētījuma rezultāti

Tika organizēts ES salīdzinošais pētījums (ceturtais salīdzinājums starp laboratorijām), kurā līdz 12 laboratorijām analizēja trīs paraugus, lai sertificētu hidrolīzes metodi. Ar katru paraugu tika veiktas atkārtotas (5) analīzes. Rezultāti ir norādīti šajā tabulā.

	1. paraugs Barība cūkām	2. paraugs Barība cūkām, papildināta ar L- triptofānu	3. paraugs Barības koncen- trāts cūkām
L	12	12	12
n	50	55	50
Vidējais [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

▼ M9

	1. paraugs Barība cūkām	2. paraugs Barība cūkām, papildināta ar L- triptofānu	3. paraugs Barības koncen- trāts cūkām
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = to laboratoriju skaits, kas iesniedza rezultātus,
 n = atsevišķo rezultātu skaits, kas iegūts pēc galējo punktu likvidēšanas (iden-
 tificē ar Kohrana, Diksona galējo punktu testu),
 s_r = atkārtojamības standartnovirze,
 S_R = reproducējamības standartnovirze,
 r = atkārtojamība,
 R = reproducējamība,
 CV_r = atkārtojamības variācijas koeficients (%),
 CV_R = reproducējamības variācijas koeficients (%).

Tika noorganizēts cits ES salīdzinošais pētījums (trešais salīdzinājums starp laboratorijām), kurā līdz 13 laboratorijām analizēja divus paraugus, lai sertificētu brīvā triptofāna ekstrahēšanas metodi. Ar katru paraugu tika veiktas atkārtotas (5) analīzes. Rezultāti ir norādīti šajā tabulā.

	4. paraugs Kviešu un sojas maisījums	5. paraugs Kviešu un sojas maisījums (= 4. paraugs), kam pievie- nots triptofāns (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Vidējais [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 = to laboratoriju skaits, kas iesniedza rezultātus,
 n = atsevišķo rezultātu skaits, kas iegūts pēc galējo punktu likvidēšanas (iden-
 tificē ar Kohrana, Diksona galējo punktu testu),
 s_r = atkārtojamības standartnovirze,
 S_R = reproducējamības standartnovirze,
 r = atkārtojamība,
 R = reproducējamība,
 CV_r = atkārtojamības variācijas koeficients (%),
 CV_R = reproducējamības variācijas koeficients (%).

Tika organizēts cits ES starplaboratoriju pētījums starp laboratorijām, kurā līdz septiņām laboratorijām analizēja četrus paraugus, lai sertificētu triptofānu hidrolīzei. Rezultāti ir norādīti tālāk. Ar katru paraugu tika veiktas atkārtotas (5) analīzes.

▼ **M9**

	1. paraugs Barības maisījums cūkām (CRM 117)	2. paraugs Zivju milti ar zemu tauku saturu (CRM 118)	3. paraugs Sojas milti (CRM 119)	4. paraugs Sausais vājpiens (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Vidējais [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 = to laboratoriju skaits, kas iesniedza rezultātus,
 n = atsevišķo rezultātu skaits, kas iegūts pēc galējo punktu likvidēšanas (identificē ar Kohrana, Diksona galējo punktu testu),
 s_r = atkārtotamības standartnovirze,
 S_R = reproducējamības standartnovirze,
 r = atkārtotamība,
 R = reproducējamība,
 CV_r = atkārtotamības variācijas koeficients (%),
 CV_R = reproducējamības variācijas koeficients (%).

9. **Novērojumi**

- 9.1. Ievērojot šādus īpašus hromatogrāfijas apstākļus, var labāk atdalīt triptofānu un α -metil-triptofānu.

Izokrātiskā eluācija, pēc kuras notiek gradienta kolonnas tīrīšana:

HPLC kolonna: 125 × 4 mm, C₁₈, 5 μm iesaiņojums, vai līdzvērtīga

Kolonnas temperatūra: 32 °C

Kustīgā fāze: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/metanols, 95 + 5 (V + V)

B: metanols

Gradienta programma: 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

Plūsmas ātrums: 1,2 ml/min

Kopējais norises laiks: apmēram 33 min

- 9.2. Hromatogrāfijas rezultāti atšķiras atkarībā no *HPLC* veida un izmantotā kolonnas iesaiņojuma materiāla. Izvēlētajai sistēmai jānodrošina triptofāna un iekšējā standarta bāzes līnijas atdalīšanās. Turklāt ir ļoti svarīgi

▼ **M9**

noārdīšanās produktus atdalīt no triptofāna un iekšējā standarta. Lai pārbaudītu, vai iekšējais standarts nesatur piemaisījumus, izmanto hidrolizātus bez iekšējā standarta. Norises ilgumam jābūt pietiekamam, lai eluētu visus noārdīšanās produktus, citādi pēdējās smailes, kas eluējas, var traucēt turpmāko hromatogrāfijas norisi.

Darbības diapazonā hromatogrāfijas sistēma uzrāda lineāru reakciju. Lineāro reakciju mēra nemainīgā (normālā) iekšējā standarta koncentrācijā un mainīgās triptofāna koncentrācijās. Svarīgi, lai gan triptofāna, gan iekšējā standarta smailes būtu *HPLC*/fluorescences sistēmas lineārajā intervālā. Ja triptofāna un/vai iekšējā standarta smaile(-es) ir pārāk maza(-as) vai liela(-as), analīzi atkārtoti ar cita lieluma paraugu un/vai citu galīgo tilpumu.

9.3. *Bārija hidroksīds*

Laika gaitā bārija hidroksīda šķīdība samazinās. Līdz ar to *HPLC* noteiktais šķīdums ir neskaidrs un var uzrādīt zemu triptofāna saturu.

G. JĒLEĻĻU UN JĒLTAUKU NOTEIKŠANA

1. **Mērķis un tvērums**

Ar šo metodi nosaka jēleļļas un jēltaukus barībā.

Abu turpmāk aprakstīto procedūru izmantošana ir atkarīga no barības īpašībām un sastāva, kā arī no iemesla, kādēļ tiek veikta analīze.

Lai noteiktu jēleļļas un jēltaukus eļļas augu sēklās un augļos, kā arī barībā, kurā jēleļļas/jēltauku saturs ir lielāks par 15 %, ekstrakcija jāveic saskaņā ar A procedūru, bet atkārtota ekstrakcija saskaņā ar B procedūru (5.3. punkts).

1.1. A procedūra. Tieši ekstrahējamās jēleļļas un jēltauki

Šo metodi piemēro augu izcelsmes barības sastāvdaļām, izņemot tās, kas iekļautas B procedūras tvērumā.

1.2. B procedūra. Jēleļļas un jēltauki kopā

Šo metodi piemēro dzīvnieku izcelsmes barības sastāvdaļām un visiem barības maisījumiem. Tā jāizmanto visām barības sastāvdaļām, no kurām bez iepriekšējas hidrolīzes nevar pilnībā ekstrahēt eļļas un taukus (piemēram, kviešu lipeklim, raugam, kartupeļu proteīniem un produktiem, kas pārstrādāti ar ekstrūzijas paņēmieni pārslojot vai karsējot).

1.3. *Rezultātu interpretēšana*

Visos gadījumos, kad, izmantojot B procedūru, iegūst augstāku rezultātu, nekā izmantojot A procedūru, par patieso vērtību uzskata B procedūrā iegūto rezultātu.

2. **Princips**2.1. *A procedūra*

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

2.2. *B procedūra*

Paraugu apstrādā ar sālsskābi karsējot. Maisījumu atdzesē un filtrē. Atlikumu skalo, žāvē un veic noteikšanu saskaņā ar A procedūru.

▼ **M9****3. Reaģenti**

- 3.1. Petrolēteris, viršanas diapazons 40–60 °C. Broma vērtībai jābūt mazākai par 1, un negaistošajam atlikumam – mazākam par 2 mg/100 ml.
- 3.2. Bezūdens nātrija sulfāts.
- 3.3. Sālsskābe, $c = 3 \text{ mol/l}$.
- 3.4. Filtrēšanas palīgmateriāls, piemēram, kīzelgūrs, *Hyflo-supercel*.

4. Iekārtas

- 4.1. Ekstrakcijas aparāts. Ekstraktoros ar sifonu (Soksleta aparātos) attecē ātrums ir tāds, lai tas nodrošinātu apmēram 10 ciklus stundā; ekstraktoros bez sifona attecē ātrums ir apmēram 10 ml minūtē.
- 4.2. Ekstrakcijas kapsulas, kuras nesatur petrolēterī šķīstošas vielas un kuru porozitāte atbilst 4.1. punkta prasībām.
- 4.3. Uz $75 \pm 3 \text{ °C}$ ieregulēts vakuuma žāvēšanas skapis vai uz $100 \pm 3 \text{ °C}$ ieregulēts parastais žāvēšanas skapis.

5. Procedūra**5.1. A procedūra (skatīt 8.1. punktu)**

Ar precizitāti līdz 1 mg iesver 5 g parauga, pārnes to uz ekstrakcijas kapsulu (4.2. punkts) un nosedz ar attaukotas kokvilnas vates tamponu.

Kapsulu ieliek ekstraktorā (4.1. punkts) un ekstrahē sešas stundas ar petrolēteri (3.1. punkts). Petrolētera ekstraktu savāc sausā, nosvērtā kolbā, kurā atrodas pumeka gabaliņi ⁽¹⁾.

Atdestilē šķīdinātāju. Atlikumu izžāvē, turot kolbu pusotras stundas žāvēšanas skapī (4.3. punkts). Atstāj atdzist eksikatorā un nosver. Atkārtoti žāvē 30 minūtes, lai nodrošinātu, ka eļļu un tauku svārs nemainās (divos secīgi veiktos svērumos svārs zudumam jābūt mazākam par vai vienādam ar 1 mg).

5.2. B procedūra

Nosver 2,5 g parauga ar precizitāti līdz 1 mg (skatīt 8.2. punktu), ievieto 400 ml vārglāzē vai 300 ml koniskā kolbā un pievieno 100 ml sālsskābes (3.3. punkts) un pumeka gabaliņus. Vārglāzi nosedz ar pulksteņstiklu vai koniskajai kolbai pievieno attecē kondensatoru. Maisījumu uzkarsē līdz viršanas temperatūrai un vienu stundu lēni vāra uz nelielas gāzes degļa liesmas vai elektriskās plītiņas. Neļauj produktam pielipt pie konteinera sienām.

Atdzesē un pievieno tādu filtrēšanas palīgmateriāla (3.4. punkts) daudzumu, kas ir pietiekams, lai novērstu eļļas un tauku zudumus filtrēšanas laikā. Izfiltrē caur samitrinātu, attaukotu, dubultu filtrpapīru. Atlikumu mazgā aukstā ūdenī līdz filtrāta neitrālai reakcijai. Pārbauda, vai filtrātā nav eļļu vai tauku. To klātbūtne liecina, ka paraugs pirms hidrolīzes jāekstrahē ar petrolēteri, izmantojot A procedūru.

Dubulto filtrpapīru ar atlikumu novieto uz pulksteņstikla un žāvē pusotras stundas žāvēšanas skapī (4.3. punkts) $100 \pm 3 \text{ °C}$ temperatūrā.

⁽¹⁾ Ja eļļai vai taukiem jāveic turpmākas kvalitātes kontroles, tad pumeka gabaliņus aizstāj ar stikla lodītēm.

▼ **M9**

Dubulto filtrpapīru ar sauso atlikumu ievieto ekstrakcijas kapsulā (4.2. punkts) un nosedz ar attaukotas kokvilnas vates tamponu. Kapsulu ievieto ekstraktorā (4.1. punkts) un rīkojas, kā norādīts 5.1. punkta otrajā un trešajā daļā.

5.3. *A procedūra un atkārtota attīrīšana saskaņā ar B procedūru.*

Lai noteiktu jēleļļas un jēltaukus eļļas augu sēklās un augļos, kā arī barībā, kurā jēleļļas/jēltauku saturs ir lielāks par 15 %, ekstrakcija jāveic saskaņā ar A procedūru, bet atkārtota ekstrakcija saskaņā ar B procedūru.

Tas nozīmē, ka pēc ekstrakcijas ar petrolēteri (A procedūra) atlikumu vai atlikuma daļu atkārtoti ekstrahē ar sālsskābi (B procedūra). Jēlnafts un jēltauku saturs ir A un B procedūras rezultātu summa.

6. **Rezultāta izteikšana**

Atlikuma svaru izsaka procentos no parauga.

7. **Atkārtojamība**

Viena laboranta divās paralēlās noteikšanās no viena parauga iegūtu rezultātu starpība nepārsniedz:

- 0,2 % no absolūtās vērtības, ja jēleļļu un jēltauku saturs ir mazāks par 5 %,
- 4,0 % no lielākā rezultāta skaitliskās vērtības, ja saturs ir no 5 līdz 10 %,
- 0,4 % no absolūtās vērtības, ja saturs pārsniedz 10 %.

8. **Novērojumi**

8.1. Attiecībā uz produktiem ar augstu eļļu un tauku saturu, ko ir grūti sasmalcināt vai no kā nevar sagatavot homogēnu samazinātu testa paraugu, rīkojas šādi.

Ar precizitāti līdz 1 mg nosver 20 g parauga un samaisa ar 10 g vai vairāk gramam bezūdens nātrija sulfāta (3.2. punkts). Ekstrahē ar petrolēteri (3.1. punkts), kā norādīts 5.1. punktā. Iegūto ekstraktu papildina līdz 500 ml ar petrolēteri (3.1. punkts) un samaisa. No šķīduma paņem 50 ml un ielej mazā, sausā, nosvērtā kolbā, kurā atrodas pumeka gabaliņi. Atdestilē šķīdinātāju, izžāvē un rīkojas, kā norādīts 5.1. punkta pēdējā daļā.

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

Eļļu un tauku saturu aprēķina procentos no parauga, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

m_1 = atlikuma svars gramos pēc pirmās ekstrakcijas (ekstrakta alikvotā daļa),

m_2 = atlikuma svars gramos pēc otrās ekstrakcijas.

▼ **M9**

- 8.2. Noteiktiem produktiem (tādiem ar zemu eļļu un tauku saturu) testa paraugu drīkst palielināt.
- 8.3. Barība loļojumdzīvniekiem ar augstu ūdens saturu pirms hidrolīzes un ekstrakcijas var būt jāsamaisa ar bezūdens nātrija sulfātu, kā noteikts B procedūrā.
- 8.4. 5.2. punktā minētajā gadījumā var būt lietderīgāk atlikumu pēc filtrēšanas mazgāt ar karstu, nevis aukstu ūdeni.
- 8.5. Dažiem barības veidiem, iespējams, jāpagarina 1½ stundas žāvēšanas laiks. Nedrīkst pārkalēt, jo tādējādi var iegūt pazeminātus rezultātus. Žāvēšanai var izmantot arī mikroviļņu krāsni.

H. JĒLŠĶIEDRAS NOTEIKŠANA**1. Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt barībā tādas skābēs un sārmos nešķīstošas organiskās vielas, kas nesatur taukus un ko parasti sauc par jēlšķiedru.

Metode nav piemērojama lignocelulozes un augu oglekļa gadījumā (daļiņas ir pārāk smalkas).

2. Princips

Paraugu, ko attiecīgā gadījumā attauko, secīgi apstrādā ar noteiktas koncentrācijas verdošiem sērskābes un kālija hidroksīda šķīdumiem. Atlikumu ar filtrāciju atdala uz keramiskā stikla filtra, mazgā, izžāvē, nosver un pārņemno temperatūras diapazonā no 475 līdz 500 °C. Svara zudums pārņemnot atbilst testa parauga jēlšķiedras saturam.

3. Reāģenti

- 3.1. Sērskābe, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Pretputošanas viela (piemēram, n-oktanolis).
- 3.3. Filtrēšanas palīgmateriāls (celīts 545 vai līdzvērtīgs), ko četras stundas karsē 500 °C temperatūrā (8.6. punkts).
- 3.4. Acetons.
- 3.5. Petrolēteris, viršanas diapazons no 40 līdz 60 °C.
- 3.6. Sālsskābe, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Kālija hidroksīda šķīdums, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Iekārtas

- 4.1. Karsēšanas vienība šķelšanai ar sērskābi un kālija hidroksīda šķīdumu, kas aprīkota ar pamatni filtrtīģelim (4.2. punkts) un ar izplūdes cauruli ar krānu šķidrums izplūdei un vakuumsūkni, var būt ar saspiegtu gaisu. Pirms izmantošanas katru dienu vienību iepriekš sakarsē ar verdošu ūdeni piecas minūtes.
- 4.2. Stikla filtrtīģelis ar kausētu keramiskā stikla filtra šķīvi, kura poru lielums ir 40–90 µm. Pirms pirmās izmantošanas dažas minūtes sakarsē līdz 500 °C un atdzesē (8.6. punkts).
- 4.3. Vismaz 270 ml cilindrs ar atceses kondensatoru, kas piemērots vārīšanai.
- 4.4. Žāvēšanas skapis ar termostatu.
- 4.5. Mufelkrāsns ar termostatu.
- 4.6. Ekstrakcijas vienība ar pamatni filtrtīģelim (4.2. punkts) un izplūdes cauruli ar vakuuma un šķidrums izplūdes krānu.

▼ M9

- 4.7. Savienotājgredzeni, lai samontētu karsēšanas vienību (4.1. punkts), tīģeli (4.2. punkts) un cilindru (4.3. punkts) un savienotu auksto ekstrakcijas vienību (4.6. punkts) un tīģeli.

5. **Procedūra**

Ar precizitāti līdz 1 mg iesver 1 g sagatavotā parauga un ievieto to tīģelī (4.2. punkts) (skatīt 9.1., 9.2. un 9.3. Novērojumu punktu), un pievieno 1 g filtrēšanas palīgmateriāla (3.3. punkts).

Samontē karsēšanas vienību (4.1. punkts) un filtrtīģeli (4.2. punkts), tad tīģeli savieno ar cilindru (4.3. punkts). Ielej 150 ml verdošas sērskābes (3.1. punkts) samontētajā cilindrā un tīģelī un vajadzības gadījumā pievieno dažus pilienus pretputošanas vielas (3.2. punkts).

5 ± 2 minūtēs šķidrumu uzvāra un ļauj enerģiski vārīties precīzi 30 minūtes.

Atver izplūdes caurules (4.1. punkts) krānu un vakuumā filtrē sērskābi caur filtrtīģeli, un mazgā atlikumu ar trīs secīgām 30 ml verdoša ūdens devām, nodrošinot, lai atlikums uz filtra pēc katras mazgāšanas tiktu izžāvēts sauss.

Aizver izplūdes krānu un ielej 150 ml verdoša kālija hidroksīda šķīduma (3.7. punkts) samontētajā cilindrā un tīģelī, pievienojot dažus pilienus pretputošanas vielas (3.2. punkts). 5 ± 2 minūtēs šķidrumu uzvāra un ļauj enerģiski vārīties precīzi 30 minūtes. Filtrē un atkārti mazgāšanas procedūru, kas izmantota sērskābes posmam.

Pēc pēdējās mazgāšanas un žāvēšanas atvieno tīģeli un tā saturu un atkal savieno to ar auksto ekstrakcijas vienību (4.6. punkts). Atlikumu tīģelī mazgā vakuumā ar trīs secīgām 25 ml acetona (3.4. punkts) devām, nodrošinot, lai atlikums uz filtra pēc katras mazgāšanas tiktu izžāvēts sauss.

Tīģeli žāvē krāsnī 130 °C temperatūrā līdz konstantam svaram. Pēc katras žāvēšanas atdzesē eksikatorā un ātri nosver. Tīģeli ievieto mufelkrāsnī un vismaz 30 minūtes 475–500 °C temperatūrā pārpelno līdz konstantam svaram (divu secīgu svērumu svara zuduma starpībai jābūt mazākai par vai vienāgai ar 2 mg).

Pēc katras karsēšanas un pirms svēršanas vispirms atdzesē krāsnī un tad – eksikatorā.

Veic tukšo analīzi bez parauga. Svara zudums pārpelnošanas rezultātā nedrīkst pārsniegt 4 mg.

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Jēlšķiedras saturu, izteiktu procentos no parauga, aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

m = parauga svars gramos,

m₀ = svara zudums gramos pēc pārpelnošanas noteikšanas laikā,

m₁ = svara zudums gramos pēc pārpelnošanas tukšā parauga analīzes laikā.

▼ M9**7. Atkārtojamība**

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

- 0,6 % no absolūtās vērtības jēlšķiedru saturam, kas mazāks par 10 %,
- 6 % no augstākā rezultāta, ja jēlšķiedras saturs ir vienāds ar vai lielāks par 10 %.

8. Reproducējamība

Starpība starp rezultātiem, kurus divās noteikšanās iegūst ar vienu paraugu, bet dažādās laboratorijās, nedrīkst pārsniegt:

- 1,0 % no absolūtās vērtības jēlšķiedru saturam, kas mazāks par 10 %,
- 10 % no augstākā rezultāta, ja jēlšķiedras saturs ir vienāds ar vai lielāks par 10 %.

9. Novērojumi

- 9.1. Barība, kas satur vairāk par 10 % jēltauku, pirms analīzes jāattauko ar petrolēteri (3.5. punkts). Filtrtīģeli (4.2. punkts) un tā saturu savieno ar auksto ekstrakcijas vienību (4.6. punkts), un atlikumu mazgā vakuumā ar trīs secīgām 30 ml petrolētera devām, nodrošinot, lai atlikums tiktu izžāvēts sauss. Tīģeli un tā saturu savieno ar karsēšanas vienību (4.1. punkts) un rīkojas, kā aprakstīts 5. punktā.
- 9.2. Barība, kas satur taukus, kurus nevar ekstrahēt tieši ar petrolēteri (3.5. punkts), jāattauko, kā norādīts 8.1. punktā, un vēlreiz jāattauko pēc vārīšanas ar skābi. Pēc vārīšanas ar skābi un turpmākas mazgāšanas tīģeli un tā saturu savieno ar auksto ekstrakcijas vienību (4.6. punkts) un trīs reizes mazgā ar 30 ml acetona, un tad trīs reizes mazgā ar 30 ml petrolētera devām. Filtrē vakuumā, līdz paraugs ir sauss, un turpina analīzi, kā aprakstīts 5. punktā, vispirms apstrādājot ar kālija hidroksīdu.
- 9.3. Ja barība satur vairāk par 5 % karbonātu, kas izteikti kā kalcija karbonāts, tad tīģeli (4.2. punkts) ar iesvērto paraugu savieno ar karsēšanas vienību (4.1. punkts). Paraugu trīs reizes mazgā ar 30 ml sāļsskābes (3.6. punkts). Pēc katras pievienošanas paraugam ļauj vienu minūti pastāvēt, pirms to filtrē. Mazgā vienu reizi ar 30 ml ūdens, tad rīkojas, kā aprakstīts 5. punktā.
- 9.4. Ja izmanto stendveida aparātu (vairāki tīģeļi savienoti ar vienu un to pašu karsēšanas vienību), tad vienā seansā nedrīkst veikt divas individuālas noteikšanas ar vienu analīzes paraugu.
- 9.5. Ja pēc vārīšanas ir grūti filtrēt skābos un sārmajos šķīdumus, tad caur karsēšanas vienības izplūdes cauruli izpūš saspiestu gaisu un tad turpina filtrēšanu.
- 9.6. Lai pagarinātu stikla filtrtīģeļu kalpošanas laiku, pārpelnošanas temperatūra nepārsniedz 500 °C. Karsēšanas un dzesēšanas ciklos nedrīkst pieļaut pārmērīgas termiskās svārstības.

▼ **M9****I. CUKURU NOTEIKŠANA****1. Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt reducējošo cukuru daudzumu un, izdarot inversiju, kopējo cukuru daudzumu, ko izsaka glikozē vai attiecīgā gadījumā saharozē, pārveidojot ar koeficientu 0,95. To piemēro barības maisījumiem. Pārējās barības analīzēm ir paredzētas īpašas metodes. Vajadzības gadījumā laktozi mēra atsevišķi un ņem vērā rezultātu aprēķinos.

Šī metode ir jāizmanto cukuru satura noteikšanai, lai aprēķinātu barības enerģētisko vērtību.

Ja cukuru saturs ir jānosaka citiem mērķiem, var izmantot citas analīzes metodes.

2. Princips

Cukurus ekstrahē atšķaidītā etanolā; šķīdumu dzidrina ar Karesa I šķīdumu un Karesa II šķīdumu. Pēc etanola atdalīšanas ar Lufa-Šorla metodi nosaka cukuru daudzumu pirms un pēc inversijas.

3. Reāģenti

3.1. Etanola šķīdums 40 % (v/v), blīvums 0,948 g/ml 20 °C temperatūrā, neitralizēts līdz fenolftaleīnam.

3.2. Karesa I šķīdums: ūdenī izšķīdina 21,9 g cinka acetāta $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, un 3 g ledus etiķskābes. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.

3.3. Karesa II šķīdums: ūdenī izšķīdina 10,6 g kālija ferociānīda $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.

3.4. Metiloranžais, 0,1 % šķīdums (w/v).

3.5. Sālsskābe 4 mol/l.

3.6. Sālsskābe 0,1 mol/l.

3.7. Nātrija hidroksīda šķīdums 0,1 mol/l.

3.8. Lufa-Šorla reāģents.

Uzmanīgi maisot, citronskābes šķīdumu (3.8.2. punkts) ielej nātrija karbonāta šķīdumā (3.8.3. punkts). Pievieno vara sulfāta šķīdumu (3.8.1. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni. Pa nakti atstāj nogulsnēties un filtrē.

Pārbauda tādējādi iegūtā reāģenta koncentrāciju (Cu 0,05 mol/litrā; Na_2CO_3 1 mol/litrā), skatīt 5.4. punkta pēdējo daļu. Šķīduma pH līmenis ir apmēram 9,4.

3.8.1. Vara sulfāta šķīdums: izšķīdina 25 g vara sulfāta, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, bez dzelzs 100 mililitros ūdens.

3.8.2. Citronskābes šķīdums: izšķīdina 50 g citronskābes, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mililitros ūdens.

3.8.3. Nātrija karbonāta šķīdums: izšķīdina 143,8 g bezūdens nātrija karbonāta apmēram 300 mililitros silta ūdens. Atstāj atdzist.

3.9. Nātrija tiosulfāta šķīdums 0,1 mol/l.

3.10. Cietes šķīdums: 5 g šķīdināmas cietes, kas iemaisīta 30 mililitros ūdens, pievieno vienam litram verdoša ūdens. Vāra trīs minūtes, atstāj atdzist un vajadzības gadījumā pievieno kā konservantu 10 mg dzīvsudraba jodīdu.

▼ **M9**

- 3.11. Sērskābe 3 mol/l.
- 3.12. Kālija jodīds, 30 % šķīdums (w/v).
- 3.13. Pumeka gabaliņi, vārīti sālsskābē, nomazgāti ūdenī un izžāvēti.
- 3.14. 3-metilbutān-1-ols.

4. Iekārtas

Rotācijas tipa maisītājs (tumblers): aptuveni 35 līdz 40 apgr./min.

5. Procedūra**5.1. Parauga ekstrahēšana**

2,5 g parauga ar precizitāti līdz mg iesver 250 ml tilpuma mērkolbā. Pievieno 200 ml etanola (3.1. punkts) un maisa tumblerā vienu stundu. Pievieno 5 ml Karesa I šķīduma (3.2. punkts) un maisa apmēram 30 sekundes. Pievieno 5 ml Karesa II šķīduma (3.3. punkts) un maisa vēl vienu minūti. Papildina ar etanolu (3.1. punkts) līdz vajadzīgajam tilpumam, homogenizē un filtrē. Lai likvidētu lielāko daļu etanola, atdala 200 ml filtrāta un tvaicē, līdz paliek apmēram puse tilpuma. Izmantojot siltu ūdeni, iztvaicēšanas atlikumu kvantitatīvi pārnes 200 ml tilpuma mērkolbā, atdzesē, uzpilda līdz vajadzīgajam tilpumam ar ūdeni, homogenizē un vajadzības gadījumā filtrē. Šo šķīdumu izmantos, lai noteiktu reducējošo cukuru daudzumu un pēc inversijas veikšanas – kopējo cukuru daudzumu.

5.2. Reducējošo cukuru noteikšana

Ar pipeti ņem ne vairāk kā 25 ml šķīduma, kurā, izsakot glikozē, ir ne vairāk kā 60 mg reducējošo cukuru. Vajadzības gadījumā papildina līdz 25 ml ar destilētu ūdeni un nosaka reducējošo cukuru saturu, izmantojot Lufa-Šorla metodi. Rezultātu izsaka kā glikozes procentuālo saturu paraugā.

5.3. Kopējo cukuru noteikšana pēc inversijas

Ar pipeti ņem 50 ml šķīduma un pārnes 100 ml tilpuma mērkolbā. Pievieno dažus pilienus metiloranžā šķīduma (3.4. punkts), tad, nepātraukti maisot, uzmanīgi pievieno sālsskābi (3.5. punkts), līdz šķidrums kļūst izeļteni sarkans. Pievieno 15 ml sālsskābes (3.6. punkts), uz trīsdesmit minūtēm iegremdē kolbu vannā ar ūdeni, kas strauji vārās. Strauji atdzesē apmēram līdz 20 °C temperatūrai un pievieno 15 ml nātrija hidroksīda šķīduma (3.7. punkts). Papildina ar ūdeni līdz 100 ml un homogenizē. Atdala daudzumu, kas nepārsniedz 25 ml un satur mazāk nekā 60 mg reducējošo cukuru, izteiktu kā glikoze. Vajadzības gadījumā papildina līdz 25 ml ar destilētu ūdeni un nosaka reducējošo cukuru saturu, izmantojot Lufa-Šorla metodi. Rezultātu izsaka glikozes vai attiecīgā gadījumā saharozes procentos, reizinot ar koeficientu 0,95.

5.4. Titrēšana, izmantojot Lufa-Šorla metodi

Ar pipeti ņem 25 ml Lufa-Šorla reaģenta (3.8. punkts) un pārnes 300 ml Erlenmeijera kolbā; pievieno precīzi 25 ml dzidrinātā cukura šķīduma. Pievieno divus gabaliņus pumeka (3.13. punkts), ar roku maisot, uz vidēja augstuma vaļējas liesmas šķīdumu apmēram divās minūtēs uzkarš līdz vārīšanās temperatūrai. Erlenmeijera kolbu nekaļējoties novieto uz metāla sieta, kas pārklāts ar azbestu un kam ir apmēram 6 cm liels caurums, zem kura iedegta liesma. Liesmu noregulē tā, lai Erlenmeijera kolba tiktu karstā tikai no apakšas. Erlenmeijera kolbai pievieno atceces kondensatoru. Vāra precīzi desmit minūtes. Tūlīt atdzesē aukstā ūdenī un apmēram pēc piecām minūtēm titrē šādi.

▼ **M9**

Pievieno 10 ml kālija jodīda šķīduma (3.12. punkts) un tūlīt pēc tam (uzmanīgi, jo iespējama ievērojama putu veidošanās) pievieno 25 ml sērskābes (3.11. punkts). Titrē ar nātrija tiosulfāta šķīdumu (3.9. punkts), līdz parādās blāvi dzeltens krāsojums, pievieno cietes indikatoru (3.10. punkts) un pabeidz titrēšanu.

Bez vārīšanas tādā pašā veidā titrē 25 ml precīzi mērīta Lufa-Šorla reaģenta (3.8. punkts) un 25 ml ūdens maisījumu, kam pievienoti 10 ml kālija jodīda šķīduma (3.12. punkts) un 25 ml sērskābes (3.11. punkts).

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Pēc tabulas nosaka glikozes daudzumu miligramos, kas atbilst abu titrēšanu vērtību starpībai un ko izsaka ml nātrija tiosulfāta 0,1 mol/l. Rezultātu izsaka procentos no parauga.

7. **Īpašas procedūras**

- 7.1. Ja analizē barību, kurā ir daudz melases, kā arī citu barību, kas nav īpaši homogēna, tad iesver 20 g un ievieto viena litra mērkolbā kopā ar 500 ml ūdens. Vienu stundu maisa tumblerā. Dzidrina, izmantojot reaģentus – Karesa I šķīdumu (3.2. punkts) un Karesa II šķīdumu (3.3. punkts), kā aprakstīts 5.1. punktā, katru reaģentu ņemot četrcārtīgā daudzumā. Uzpilda līdz vajadzīgajam tilpumam ar 80 % etanolu (v/v).

Homogenizē un filtrē. Atdala etanolu, kā aprakstīts 5.1. punktā. Ja nav dekstrinētas cietes, tad uzpilda līdz tilpumam ar destilētu ūdeni.

- 7.2. Analizējot melasi un barības sastāvdaļas, kas satur daudz cukura un kurās gandrīz nemaz nav cietes (ceratonijas, žāvēti biešu graizījumi u. c.), iesver 5 g un ievieto 250 ml tilpuma mērkolbā, pievieno 200 ml destilēta ūdens un maisa tumblerā vienu stundu vai, ja vajadzīgs, ilgāk. Dzidrina, izmantojot reaģentus – Karesa I šķīdumu (3.2. punkts) un Karesa II šķīdumu (3.3. punkts), kā aprakstīts 5.1. punktā. Uzpilda līdz tilpumam ar aukstu ūdeni, homogenizē un filtrē. Lai noteiktu kopējo cukuru daudzumu, rīkojas, kā aprakstīts 5.3. punktā.

8. **Novērojumi**

- 8.1. Lai novērstu putu veidošanos, pirms vārīšanas ar Lufa-Šorla reaģentu ieteicams pievienot (neatkarīgi no tilpuma) apmēram 1 ml 3-metil-butān-1-ola (3.14. punkts).
- 8.2. Starpība starp kopējo cukuru saturu pēc inversijas, kas izteikts kā glikoze, un reducējošo cukuru saturu, kas izteikts kā glikoze, un kas reizināta ar koeficientu 0,95, norāda saharozes satura procentuālo daudzumu.
- 8.3. Lai noteiktu reducējošo cukuru saturu, izņemot laktozi, var izmantot divas metodes.
- 8.3.1. Lai veiktu aptuvenu aprēķinu, laktozes saturu reizina ar 0,675, kas noteikts ar citu analīzes metodi, un iegūto rezultātu atņem no reducējošo cukuru satura.
- 8.3.2. Lai precīzi aprēķinātu reducējošos cukurus, izņemot laktozi, abās galīgās noteikšanās jāizmanto tas pats paraugs. Vienai analīzei ņem daļu šķīduma, kas iegūts saskaņā ar 5.1. punktā doto aprakstu, bet otrai analīzei – daļu šķīduma, ko iegūst laktozes noteikšanā, izmantojot šim nolūkam paredzēto metodi (pēc citu cukuru fermentācijas un dzidrināšanas).

▼ **M9**

Abos gadījumos klātesošā cukura daudzumu nosaka, izmantojot Lufa-Šorla metodi, un aprēķina glikozes miligramos. Vienu vērtību atņem no otras un starpību izsaka procentos no parauga.

Piemērs

Abi katrā noteikšanā ņemtie šķīdumu tilpumi atbilst 250 mg paraugam.

Pirmajā gadījumā patērē 17 ml nātrija tiosulfāta šķīduma 0,1 mol/l, kas atbilst 44,2 mg glikozes; otrā gadījumā – 11 ml, kas atbilst 27,6 mg glikozes.

Starpība ir 16,6 mg glikozes.

Līdz ar to reducējošo cukuru saturs (izņemot laktozi), kas aprēķināts kā glikoze, ir šāds:

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

25 ml Lufa-Šorla reaģenta vērtību tabula

Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l mililitri, karsē divas minūtes, vāra desmit minūtes

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glikoze, fruktoze, invertcukuri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoze C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	starpība	mg	starpība	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. LAKTOZES NOTEIKŠANA

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt laktozes daudzumu barībā, kas satur vairāk par 0,5 % laktozes.

2. Princips

Cukurus izšķīdina ūdenī. Šķīdumu fermentē ar *Saccharomyces cerevisiae* raugu, kas laktozi atstāj neskartu. Pēc dzidrināšanas un filtrēšanas laktozes saturu filtrātā nosaka, izmantojot Lufa-Šorla metodi.

▼ **M9****3. Reāģenti**

- 3.1. *Saccharomyces cerevisiae* suspensija: 25 g svaiga rauga iemaisa 100 mililitros ūdens. Suspensiju var uzglabāt ledusskapī ne ilgāk kā vienu nedēļu.
- 3.2. Karesa I šķīdums: ūdenī izšķīdina 21,9 g cinka acetāta $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, un 3 g ledus etiķskābes. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.
- 3.3. Karesa II šķīdums: ūdenī izšķīdina 10,6 g kālija ferocianīda $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.
- 3.4. Lufa-Šorla reāģents.

Uzmanīgi maisot, citronskābes šķīdumu (3.4.2. punkts) ielej nātrija karbonāta šķīdumā (3.4.3. punkts). Pievieno vara sulfāta šķīdumu (3.4.1. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni. Pa nakti atstāj nogulsnēties un filtrē. Pārbauda tādējādi iegūtā reāģenta koncentrāciju (Cu 0,05 mol/litrā; Na_2CO_3 1 mol/litrā). Šķīduma pH līmenis ir apmēram 9,4.

- 3.4.1. Vara sulfāta šķīdums: izšķīdina 25 g vara sulfāta, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, bez dzelzs 100 mililitros ūdens.
- 3.4.2. Citronskābes šķīdums: izšķīdina 50 g citronskābes, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mililitros ūdens.
- 3.4.3. Nātrija karbonāta šķīdums: izšķīdina 143,8 g bezūdens nātrija karbonāta apmēram 300 mililitros silta ūdens. Atstāj atdzist.
- 3.5. Pumeka gabaliņi, vārīti sālsskābē, nomazgāti ūdenī un izžāvēti.
- 3.6. Kālija jodīds, 30 % šķīdums (w/v).
- 3.7. Sērskābe 3 mol/l.
- 3.8. Nātrija tiosulfāta šķīdums 0,1 mol/l.
- 3.9. Cietes šķīdums: 5 g šķīdināmas cietes, kas iemaisīta 30 mililitros ūdens, pievieno vienam litram verdoša ūdens. Vāra trīs minūtes, atstāj atdzist, un vajadzības gadījumā pievieno kā konservantu 10 mg dzīvsudraba jodīdu.

4. Iekārtas

Ūdens vanna ar termostatu, kas iestatīts uz 38–40 °C.

5. Procedūra

Iesver 1 g parauga ar precizitāti līdz mg un ievieto šo parauga daļu 100 ml tilpuma mērkolbā. Pievieno 25–30 ml ūdens. Uz trīsdesmit minūtēm ievieto kolbu verdoša ūdens vannā, tad atdzesē līdz apmēram 35 °C. Pievieno 5 ml rauga suspensijas (3.1. punkts) un homogenizē. Atstāj kolbu uz divām stundām ūdens vannā 38–40 °C temperatūrā. Atdzesē līdz aptuveni 20 °C.

Pievieno 2,5 ml Karesa I šķīduma (3.2. punkts) un maisa trīsdesmit sekundes, tad pievieno 2,5 ml Karesa II šķīduma (3.3. punkts) un maisa vēl trīsdesmit sekundes. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml, samaisa un filtrē. Ar pipeti atdala ne vairāk kā 25 ml filtrāta, kas, ja iespējams, satur 40–80 mg laktozes, un pārnes to 300 ml Erlenmeijera kolbā. Vajadzības gadījumā papildina līdz 25 ml ar ūdeni.

▼ **M9**

Tādā pašā veidā veic tukšā parauga analīzi ar 5 ml rauga suspensijas (3.1. punkts). Šādi nosaka laktozes saturu atbilstoši Lufa-Šorla metodei: pievieno precīzi 25 ml Lufa-Šorla reaģenta (3.4. punkts) un divus pumeka gabaliņus (3.5. punkts). Ar roku maisot, uz vidēja augstuma vaļējas liesmas šķidumu apmēram divās minūtēs uzkaršē līdz vārīšanās temperatūrai. Erlenmeijera kolbu nekavējoties novieto uz metāla sieta, kas pārklāts ar azbestu un kam ir apmēram 6 cm liels caurums, zem kura iedegta liesma. Liesmu noregulē tā, lai Erlenmeijera kolba tiktu karsēta tikai no apakšas. Erlenmeijera kolbai pievieno atceces kondensatoru. Vāra precīzi desmit minūtes. Tūlīt atdzesē aukstā ūdenī un apmēram pēc piecām minūtēm titrē šādi.

Pievieno 10 ml kālija jodīda šķīduma (3.6. punkts) un tūlīt pēc tam (uzmanīgi jo iespējama ievērojama putu veidošanās) pievieno 25 ml sērskābes (3.7. punkts). Titrē ar nātrija tiosulfāta šķīdumu (3.8. punkts), līdz parādās blāvi dzeltens krāsojums, pievieno cietes indikatoru (3.9. punkts) un pabeidz titrēšanu.

Bez vārīšanas tādā pašā veidā titrē 25 ml precīzi mērīta Lufa-Šorla reaģenta (3.4. punkts) un 25 ml ūdens maisījumu, kam pievienoti 10 ml kālija jodīda šķīduma (3.6. punkts) un 25 ml sērskābes (3.7. punkts).

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Izmantojot pievienoto tabulu, nosaka laktozes daudzumu miligramos, kas atbilst abu titrēšanu rezultātu starpībai un ko izsaka ml nātrija tiosulfāta 0,1 mol/l.

Rezultātu izsaka bezūdens laktozē kā parauga procentuālo daļu.

7. **Novērojums**

1. Produktiem, kuri satur vairāk nekā 40 % fermentējama cukura, izmanto vairāk nekā 5 ml rauga suspensijas (3.1. punkts).
2. Barībā "ar samazinātu laktozes daudzumu" (piemēram, kaķu pienā) laktoze tiek pārveidota par fruktozi, kas netiek pilnībā raudzēta 2 stundas, kas izraisa augstākus vai kļūdaini pozitīvus rezultātus (jo ekstraktā paliek fruktozes atliekas).

25 ml Lufa-Šorla reaģenta vērtību tabula

Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l mililitri, karsē divas minūtes, vāra desmit minūtes

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glikoze, fruktoze, invertcukuri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoze C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	starpība	mg	starpība	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14

▼ **M9**

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glikoze, fruktoze, invertcukuri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoze C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	starpība	mg	starpība	ml
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. CIETES NOTEIKŠANA**POLARIMETRISKĀ METODE****1. Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt cietes un lielmolekulāra svara cietes noārdīšanās produktu daudzumus barībā, lai pārbaudītu atbilstību deklarētajai enerģētiskajai vērtībai (VII pielikuma noteikumi) un Regulai (EK) Nr. 767/2009.

Šī metode ir jāizmanto cietes satura noteikšanai, lai aprēķinātu barības enerģētisko vērtību.

Ja cietes saturs ir jānosaka citiem mērķiem, var izmantot citas analīzes metodes.

2. Princips

Šī metode ietver divas noteikšanas. Pirmajā paraugu apstrādā ar atšķaidītu sālsskābi. Pēc dzidrināšanas un filtrēšanas šķīduma optisko rotāciju mēra, izmantojot polarimetriju.

Otrajā paraugu ekstrahē ar 40 % etanolu. Pēc tam, kad filtrāts ir paskābināts ar sālsskābi, dzidrināts un filtrēts, optisko rotāciju mēra tāpat kā pirmajā noteikšanā.

No abu mērījumu starpības, reizinot ar zināmu koeficientu, iegūst parauga cietes saturu.

3. Reaģenti

3.1. Sālsskābe, 25 % šķīdums (w/v); blīvums 1,126 g/ml.

3.2. Sālsskābe, 1,13 % šķīdums (w/v).

Koncentrācija jāpārbauda, titrējot ar 0,1 mol/l nātrija hidroksīda šķīdumu 0,1 % (w/v) metilsarkanā klātbūtnē 94 % (v/v) etanolā. Lai neitralizētu 10 ml, vajag 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Karesa I šķīdums: ūdenī izšķīdina 21,9 g cinka acetāta, Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O, un 3 g ledus etiķskābes. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.

▼ **M9**

3.4. Karesa II šķīdums: ūdenī izšķīdina 10,6 g kālija ferocianīda, $K_4 Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.

3.5. Etanola šķīdums 40 % (v/v), blīvums 0,948 g/ml 20 °C temperatūrā.

4. **Iekārtas**

4.1. 250 ml Erlenmeijera kolba ar standarta pieslēpētu stikla savienojumu un ar atteces kondensatoru.

4.2. Polarimetrs vai saharimetrs.

5. **Procedūra**

5.1. *Parauga sagatavošana*

Paraugu sasmalcina, līdz tas ir pietiekami smalks, lai izsijātos caur sietu ar 0,5 mm apaļu acojumu.

5.2. Kopējās optiskās rotācijas (P vai S) noteikšana (skatīt 7.1. Novērojumu punktu)

2,5 g sasmalcinātā parauga ar precizitāti līdz mg iesver 100 ml mērkolbā. Pievieno 25 ml sālsskābes (3.2. punkts), krata, lai panāktu vienmērīgu izkliedi testa paraugā, un pievieno vēl 25 ml sālsskābes (3.2. punkts). Iegremdē kolbu verdoša ūdens vannā, pirmās trīs minūtes enerģiski un nepārtraukti kratot, lai novērstu aglomerātu veidošanos. Ūdens daudzumam ūdens vannā jābūt pietiekamam, lai vanna turpinātu vārīties, kad tajā ieliek kolbu. Kolbu no vannas nedrīkst izņemt, kad tā tiek kratīta. Precīzi pēc 15 minūtēm kolbu izņem no vannas, pievieno 30 ml auksta ūdens un tūlīt atdzesē līdz 20 °C.

Pievieno 5 ml Karesa I šķīduma (3.3. punkts) un krata apmēram 30 sekundes. Tad pievieno 5 ml Karesa II šķīduma (3.4. punkts) un atkal krata apmēram 30 sekundes. Papildina ar ūdeni līdz tilpumam, samaisa un filtrē. Ja filtrāts nav pilnīgi dzidrs (kas notiek reti), tad atkārtoti noteikšanu, izmantojot lielāku daudzumu Karesa I un II šķīduma, piemēram, 10 ml.

Ar polarimetru vai saharimetru izmēra šķīduma optisko rotāciju 200 mm mēģenē.

5.3. *Optiskās rotācijas (P' vai S') noteikšana vielām, kuras šķīst 40 % etanolā*

Ar precizitāti līdz mg iesver 5 g parauga, ievieto 100 ml mērkolbā un pievieno apmēram 80 ml etanola (3.5. punkts) (skatīt 7.2. Novērojumu punktu). Atstāj kolbu vienu stundu istabas temperatūrā; šajā laikā sešas reizes kārtīgi sakrata tā, lai testa paraugs labi sajauktos ar etanolu. Papildina līdz tilpumam ar etanolu (3.5. punkts), samaisa un filtrē.

Ar pipeti 50 ml filtrāta (kas atbilst 2,5 g parauga) iepilina 250 ml Erlenmeijera kolbā, pievieno 2,1 ml sālsskābes (3.1. punkts) un kārtīgi sakrata. Erlenmeijera kolbai pievieno atteces kondensatoru un kolbu iegremdē verdoša ūdens vannā. Tieši pēc 15 minūtēm izņem Erlenmeijera kolbu no vannas, saturu pārnes 100 ml mērkolbā, skalojot ar nelielu daudzumu auksta ūdens, un atdzesē līdz 20 °C.

▼ M9

Dzidrina, izmantojot Karesa I šķīdumu (3.3. punkts) un II šķīdumu (3.4. punkts), papildina līdz tilpumam ar ūdeni, samaisa, filtrē un izmēra optisko rotāciju, kā norādīts 5.2. punkta otrajā un trešajā daļā.

6. Rezultātu aprēķināšana

Cietes saturu (%) aprēķina šādi.

6.1. Mērīšana ar polarimetru

$$\text{Cietes saturs (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = kopējā optiskā rotācija leņķa grādos,

P' = 40 % (V/V) etanolā šķīstošu vielu optiskā rotācija leņķa grādos,

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = tīras cietes specifiskā optiskā rotācija. Vispārīgi pieņemtās skaitliskās vērtības šim koeficientam ir šādas:

+ 185,9°: rīsu ciete

+ 185,7°: kartupeļu ciete

+ 184,6°: kukurūzas ciete

+ 182,7°: kviešu ciete

+ 181,5°: miežu ciete

+ 181,3°: auzu ciete

+ 184,0°: pārējie cietes un cietes maisījumu veidi barības maisījumos

6.2. Mērīšana ar saharimetru

$$\text{Cietes saturs (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

S = kopējā optiskā rotācija saharimetra grādos,

S' = 40 % (v/v) etanolā šķīstošu vielu optiskā rotācija saharimetra grādos,

N = saharozes svars (g) 100 mililitros ūdens, kas, izmērot ar 200 mm mēģeni, dod 100 saharimetra grādu optisko rotāciju

16,29 g Francijas saharimetriem,

26,00 g Vācijas saharimetriem,

20,00 g jauktajiem saharimetriem.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = tīras cietes specifiskā optiskā rotācija (skatīt 6.1. punktu).

▼ **M9**6.3. *Atkārtojamība*

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās paralēlās noteikšanās, kuras veiktas ar vienu paraugu, nedrīkst pārsniegt 0,4 no absolūtā lieluma, ja cietes saturs ir mazāks par 40 %, un 1 % no relatīvā lieluma, ja cietes saturs ir vienāds ar vai lielāks par 40 %.

7. **Novērojumi**

7.1. Ja paraugs satur vairāk nekā 6 % karbonātu, rēķinot kalcija karbonāta izteiksmē, tad tie pirms kopējās optiskās rotācijas noteikšanas ir jāiznīcina, apstrādājot ar precīzi atbilstīgu atšķaidītas sērskābes daudzumu.

7.2. Ja produktos ir liels laktozes saturs, piemēram, piena seruma pulverī vai sausajā vājpienā, tad pievieno 80 ml etanola (3.5. punkts) un rīkojas šādi. Kolbai pievieno atceces kondensatoru un kolbu uz 30 minūtēm iegremdē ūdens vannā 50 °C temperatūrā. Atstāj atdzist un turpina analīzi, kā norādīts 5.3. punktā.

7.3. Ir zināms, ka šādas barības sastāvdaļas, ja tās barībā ir ievērojamā daudzumā, rada traucējumus, nosakot cietes saturu ar polarimetrisko metodi, un līdz ar to var iegūt nepareizus rezultātus:

— tādi (cukur)biešu produkti kā (cukur)biešu mīkstums, (cukur)biešu melase, melasi saturošs (cukur)biešu mīkstums, (cukur)biešu vināze, (biešu) cukurs,

— citrusaugļu mīkstums,

— linsēklas, linsēklu rauši, linsēklu izvilkums,

— rapšu sēklas, rapšu sēklu rauši, rapšu sēklu izvilkums, rapšu sēklu čaulas,

— saulespuķu sēklas, saulespuķu sēklu izvilkums, daļēji lobītas, ekstrahētas saulespuķu sēklas,

— koproas rauši, koproas izvilkums,

— kartupeļu mīkstums,

— sausais raugs,

— ar inulīnu bagāti produkti (piemēram, topinambūru čipsi un milti),

— grības,

— sojas pupiņu produkti.

Šādos gadījumos var piemērot Komisijas Regulā (EK) Nr. 121/2008 ⁽¹⁾ paredzēto analīzes metodi. Šo metodi var izmantot arī attiecībā uz barību, kas satur mazāk par 1 % cietes.

⁽¹⁾ Komisijas Regula (EK) Nr. 121/2008 (2008. gada 11. februāris), ar kuru nosaka analīzes metodi cietes satura noteikšanai izstrādājumos, kas izmantojami dzīvnieku barībā (KN kods 2309) (OV L 37, 12.2.2008., 3. lpp.).

▼ **M9****L. JĒLPELNU NOTEIKŠANA****1. Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt jēlpelnu saturu barībā.

2. Princips

Paraugu pārpelno 550 °C temperatūrā; atlikumu nosver.

3. Reaģenti

Amonija nitrāts, 20 % šķīdums (w/v).

4. Iekārtas

4.1. Elektriskā plītiņa.

4.2. Elektriskā mufelkrāsns ar termostatu.

4.3. Pārpelnošanai paredzēti kvarca, porcelāna vai platīna tīģeļi, kas ir vai nu taisnstūrveida (apmēram 60 × 40 × 25 mm), vai apaļi (diametrs 60 līdz 75 mm, augstums 20 līdz 40 mm).

5. Procedūra

Ar precizitāti līdz mg iesver apmēram 5 g parauga (2,5 g produktiem, kam ir tendence uzbriest) un ievieto pārpelnošanai tīģelī, kas iepriekš uzkaršēts līdz 550 °C, atdzesēts un nosvērts. Novieto tīģeli uz elektriskās plītiņas un pakāpeniski karsē, līdz viela pārogļojas. Pārpelno atbilstoši 5.1. vai 5.2. punktam.

5.1. Tīģeli ievieto kalibrētā mufelkrāsnī, kas iestatīta uz 550 °C. Iztur šajā temperatūrā, līdz iegūst baltus, gaišpelēkus vai sarkanīgas nokrāsas pelnus, kuros nav acīm redzamu ogles daļiņu. Tīģeli ievieto eksikatorā, atdzesē un tūlīt nosver.

5.2. Tīģeli ievieto kalibrētajā mufelkrāsnī, kas iestatīta uz 550 °C. Pārpelno trīs stundas. Tīģeli ievieto eksikatorā, atdzesē un tūlīt nosver. Atkārtoti pārpelno 30 minūtes, lai nodrošinātu, ka pelnu svars nemainās (divos secīgi veiktos svērumos svara zudumam jābūt mazākam par vai vienādam ar 1 mg).

6. Rezultātu aprēķināšana

Aprēķina atlikuma masu, atņemot taras masu.

Rezultātu izsaka procentos no parauga.

7. Novērojumi

7.1. *Grūti pārpelnojamām vielām* jāveic vismaz trīs stundas ilga sākotnējā pārpelnošana, pēc kuras paraugu atdzesē, tam pievieno dažus pilienus 20 % amonija nitrāta šķīduma vai ūdens (uzmanīgi, lai pelni nedisperģētos vai nesāpētu gabalos). Pēc izžāvēšanas krāsnī kalcinēšanu turpina. Vajadzības gadījumā darbību atkārti, līdz pārpelnošana ir pabeigta.

7.2. *Vielām, ko nevar apstrādāt*, kā aprakstīts 7.1. punktā, rīkojas šādi: pēc trīs stundu pārpelnošanas pelnus ievieto siltā ūdenī un filtrē caur nelielu bezpelnu filtru. Tajā pašā tīģelī pārpelno filtru kopā ar tā saturu. Filtrātu ievieto atdzesētajā tīģelī, iztvaicē, līdz tas ir sauss, pārpelno un nosver.

7.3. Analizējot *eļļas un taukus*, precīzi iesver 25 g parauga piemērota izmēra tīģelī. Pārogļo, vielu aizdedzinot ar bezpelnu filtrpapīra strēmeli. Pēc sadedzināšanas samitrina ar iespējami mazu ūdens daudzumu. Izžāvē un pārpelno, kā aprakstīts 5. punktā.

▼ **M9****M. SĀLSSKĀBĒ NEŠĶĪSTOŠU PELNU NOTEIKŠANA****1. Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt tādu minerālvielu daudzumu barībā, kuras nešķīst sālsskābē. Atkarībā no parauga īpašībām var izmantot divas metodes.

1.1. *A metode:* piemērojama organiskām barības sastāvdaļām un lielākajai daļai barības maisījumu.

1.2. *B metode:* piemērojama tādiem minerālu savienojumiem un maisījumiem un barības maisījumiem, kuros sālsskābē nešķīstošo vielu saturs, kā noteikts ar A metodi, pārsniedz 1 %.

2. Principi

2.1. *A metode:* paraugu pārpelno, pelnus uzvāra sālsskābē un nešķīstošo atlikumu filtrē un nosver.

2.2. *B metode:* paraugu apstrādā ar sālsskābi. Šķīdumu filtrē, atlikumu pārpelno un tādējādi iegūtos pelnus apstrādā saskaņā ar A metodi.

3. Reaģenti

3.1. Sālsskābe 3 mol/l.

3.2. Trihloretiķskābe, 20 % šķīdums (w/v).

3.3. Trihloretiķskābe, 1 % šķīdums (w/v).

4. Iekārtas

4.1. Elektriskā plītiņa.

4.2. Elektriskā mufelkrāsns ar termostatu.

4.3. Pārpelnošanai paredzēti kvarca, porcelāna vai platīna tīģeļi, kas ir vai nu taisnstūrveida (apmēram 60 × 40 × 25 mm), vai apaļi (diametrs 60 līdz 75 mm, augstums 20 līdz 40 mm).

4.4. Filtri bez pelniem.

5. Procedūra**5.1. A metode**

Paraugu pārpelno, izmantojot metodi, kas aprakstīta jēlpelnu noteikšanai. Var izmantot arī pelnus, kas iegūti no minētās analīzes.

Pelnus ievieto 250–400 ml vārglāzē, izmantojot 75 ml sālsskābes (3.1. punkts). Lēni uzvāra un piecpadsmit minūtes lēni vāra. Silto šķīdumu izfiltrē caur bezpelnu filtrpapīru un atlikumu mazgā ar siltu ūdeni, līdz skābes reakcija vairs nav redzama. Filtru ar atlikumu izžāvē un pārpelno nosvērtajā tīģelī temperatūrā, kas nav zemāka par 550 °C un nav augstāka par 700 °C. Atdzesē eksikatorā un nosver.

5.2. B metode

5 g parauga ar precizitāti līdz mg iesver 250–400 ml vārglāzē. Secīgi pievieno 25 ml ūdens un 25 ml sālsskābes (3.1. punkts), samaisa un gaida, līdz pārstāj izdalīties burbuļi. Pievieno vēl 50 ml sālsskābes (3.1. punkts). Pagaida, līdz gāze pārstāj izdalīties, tad ievieto vārglāzi verdoša ūdens vannā un tur atstāj trīsdesmit minūtes vai ilgāk, ja vajadzīgs, lai rūpīgi hidrolizētu jebkuru tur iespējami klātesošu cieti. Siltu izfiltrē caur bezpelnu filtru un filtru izmazgā 50 ml silta ūdens

▼ **M9**

(skatīt 7. punktu "Novērojums"). Filtru ar atlikumu ievieto tīgelī pārpalnošanai, izžāvē un pārpalno temperatūrā, kas nav zemāka par 550 °C un nav augstāka par 700 °C. Pelnus ievieto 250–400 ml vārglāzē, izmantojot 75 ml sālsskābes (3.1. punkts); turpina, kā aprakstīts 5.1. punkta otrajā daļā.

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Aprēķina atlikuma masu, atņemot taras masu. Rezultātu izsaka procentos no parauga.

7. **Novērojums**

Ja atlikums filtrējas slikti, tad analīzi sāk vēlreiz, 50 ml sālsskābes (3.1. punkts) vietā ņemot 50 ml 20 % trihloretikskābes šķīdumu (3.2. punkts) un filtru mazgājot ar siltu 1 % trihloretikskābes šķīdumu (3.3. punkts).

N. KOPĒJĀ FOSFORA DAUDZUMA NOTEIKŠANA

Kopējais fosfora daudzums jānosaka saskaņā ar:

— analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 15510 "Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Kalcija, nātrija, fosfora, magnija, kālija, dzelzs, cinka, vara, mangāna, kobalta, molibdēna un svina noteikšana, izmantojot *ICP-AES* metodi", vai

— analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 15621 "Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Kalcija, nātrija, fosfora, magnija, kālija, sēra, dzelzs, cinka, vara, mangāna un kobalta noteikšana pēc spiediena sadalīšanas, izmantojot *ICP-AES* metodi", vai

— fotometrisku metodi, kā aprakstīts turpmāk.

FOTOMETRISKĀ METODE

1. **Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt kopējo fosfora saturu barībā. Tā ir īpaši piemērota tādu produktu analīzei, kuros ir mazs fosfora daudzums. Dažos gadījumos (ja produktā ir daudz fosfora) var izmantot gravimetrijas metodi.

2. **Principis**

Paraugu mineralizē, izmantojot vai nu sauso dedzināšanu (organiskās barības gadījumā), vai skābes šķelšanu (kombinēto minerālu un šķidrās barības gadījumā), un ievieto skābes šķīdumā. Šķīdumu apstrādā ar molibdovanadāta reaģentu. Tādējādi iegūtā dzeltenā šķīduma optisko blīvumu mēra spektrofotometrā pie 430 nm.

3. **Reaģenti**

3.1. Kalcija karbonāts.

3.2. Sālsskābe, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (apmēram 6 mol/l).

3.3. Slāpekļskābe, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.

3.4. Slāpekļskābe, $\rho_{20} = 1,38$ iesniedz 1,42 g/ml.

3.5. Sērskābe, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

3.6. Molibdovanadāta reaģents: 200 ml amonija heptamolibdāta šķīduma (3.6.1. punkts), 200 ml amonija monovanadāta šķīduma (3.6.2. punkts) un 134 ml slāpekļskābes (3.4. punkts) samaisa viena litra mērkolbā. Papildina līdz vajadzīgajam tilpumam ar ūdeni.

▼ **M9**

- 3.6.1. Amonija heptamolibdāta šķīdums: izšķīdina karstā ūdenī 100 g amonija heptamolibdāta (NH_4) $6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Pievieno 10 ml amonjaka (blīvums 0,91 g/ml) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.6.2. Amonija monovanadāta šķīdums: 2,35 g amonija monovanadāta NH_4VO_3 izšķīdina 400 mililitros karsta ūdens. Pastāvīgi maisot, lēni pievieno 20 ml atšķaidītas slāpekļskābes (7 ml HNO_3 (3.4. punkts) + 13 ml H_2O) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.7. 1 mg fosfora uz ml standartšķīdums: ūdenī izšķīdina 4,387 g kālija dihidrogēnfosfāta KH_2PO_4 . Papildina ar ūdeni līdz vienam litram.

4. Iekārtas

- 4.1. Kvarca, porcelāna vai platīna tīģeļi pārpelnošanai.
- 4.2. Elektriskā mufelkrāsns ar termostatu, kas iestatīts uz 550 °C.
- 4.3. 250 ml Kjeldāla kolba.
- 4.4. Mērkolbas un precīzijas pipetes.
- 4.5. Spektrofotometrs.
- 4.6. Apmēram 16 mm diametra mēģenes ar aizbāžņiem un iedaļām līdz 14,5 mm; tilpums: tilpums 25 līdz 30 ml.

5. Procedūra5.1. *Šķīduma sagatavošana*

Atkarībā no parauga īpašībām sagatavo šķīdumu, kā norādīts 5.1.1. vai 5.1.2. punktā.

5.1.1. *Parastā procedūra*

Ar precizitāti līdz 1 mg nosver 1 g vai vairāk parauga. Testa paraugu ievieto Kjeldāla kolbā, pievieno 20 ml sērskābes (3.5. punkts), sakrata, lai vielu pilnībā piesūcinātu ar skābi un neļautu tai pielipt pie kolbas sienām, uzkaršē un uztur viršanas temperatūru 10 minūtes. Nedaudz atdzesē, pievieno 2 ml slāpekļskābes (3.4. punkts), lēnām uzkaršē, nedaudz atdzesē, pievieno vēl nedaudz slāpekļskābes (3.4. punkts) un atjauno viršanas temperatūru. Procedūru atkārto, līdz iegūst bezkrāsainu šķīdumu. Atdzesē, pievieno mazliet ūdens, dekantē šķīdumu 500 ml mērkolbā, izskalojot Kjeldāla kolbu ar karstu ūdeni. Ļauj atdzist, papildina līdz vajadzīgajam tilpumam ar ūdeni, homogenizē un filtrē.

5.1.2. *Paraugi, kuros ir organiskas vielas un nav kalcija un magnija dihidrogēnfosfātu*

Apmēram 2,5 g parauga ar precizitāti līdz 1 mg iesver tīģeļi pārpelnošanai. Maisa testa paraugu, līdz tas pilnībā sajaucies ar 1 g kalcija karbonāta (3.1. punkts). Pārpelno krāsnī 550 °C temperatūrā, līdz iegūst baltus vai pelēkus pelnus (var būt arī nedaudz ogļu). Pelnus pārnēs 250 ml vārglāzē. Pievieno 20 ml ūdens un sālsskābes (3.2. punkts), līdz pārstāj veidoties burbuļi. Pievieno vēl 10 ml sālsskābes (3.2. punkts). Vārglāzi novieto smilšu vannā un tvaicē, līdz tā ir sausa, lai kvarcu padarītu nešķīstošu. Atlikumu atkārtoti šķīdina 10 mililitros slāpekļskābes (3.3. punkts) un piecas minūtes vāra smilšu vannā vai uz elektriskās plītnes netvaicējot, līdz tas ir sauss. Šķīdumu dekantē 500 ml mērkolbā, vairākas reizes izskalojot vārglāzi ar karstu ūdeni. Ļauj atdzist, papildina līdz vajadzīgajam tilpumam ar ūdeni, homogenizē un filtrē.

▼ M9**5.2. *Krāsojuma attīstība un optiskā blīvuma mērījums***

Saskaņā ar 5.1.1. vai 5.1.2. punktu iegūtā filtrāta alikvoto daļu atšķaida, lai iegūtu fosfora koncentrāciju, kas nepārsniedz 40 µg/ml. 10 ml šā šķīduma ielej mēģenē (4.6. punkts) un pievieno 10 ml molibdovanadāta reaģenta (3.6. punkts). Homogenizē un atstāj 20 °C temperatūrā vismaz 10 minūtes. Spektrofotometrā pie 430 nm izmēra optisko blīvumu pret šķīdumu, ko iegūst, pievienojot 10 mililitrus molibdovanadāta reaģenta (3.6. punkts) 10 mililitriem ūdens.

5.3. *Kalibrēšanas līkne*

No standartšķīduma (3.7. punkts) sagatavo šķīdumus, kas satur attiecīgi 5, 10, 20, 30 un 40 µg fosfora uz 1 ml. Ņem 10 ml no katra minētā šķīduma un pievieno 10 ml molibdovanadāta reaģenta (3.6. punkts). Homogenizē un atstāj 20 °C temperatūrā vismaz 10 minūtes. Optisko blīvumu mēra tā, kā norādīts 5.2. punktā. Veido kalibrēšanas līkni, atzīmējot optiskos blīvumus un atbilstīgos fosfora daudzumus. Ja koncentrācija ir no 0 līdz 40 µg/ml, tad līkne būs lineāra.

6. *Rezultātu aprēķināšana*

Fosfora daudzumu testa paraugā nosaka, izmantojot kalibrēšanas līkni.

Rezultātu izsaka procentos no parauga.

Atkārtojamība

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

— 3 % no lielākā rezultāta skaitliskās vērtības, ja fosfora saturs ir līdz 5 %,

— 0,15 % absolūtajā vērtībā, ja fosfora saturs pārsniedz 5 %.

O. HLORĪDU HLORA NOTEIKŠANA**1. *Mērķis un tvērums***

Šī metode ļauj noteikt hlora saturu ūdenī šķīstošos hlorīdos, ko parasti izsaka kā nātrija hlorīdu. To piemēro visai barībai.

2. *Princips*

Hlorīdus izšķīdina ūdenī. Ja produkts satur organisku vielu, tad to dzidrīna. Šķīdumu nedaudz paskābina ar slāpekļskābi un hlorīdus ar sudraba nitrāta šķīdumu izgulsnē sudraba hlorīda veidā. Sudraba nitrāta pārpalikumu attitrē ar amonija tiocianāta šķīdumu, izmantojot Volharda metodi.

3. *Reaģenti*

3.1. Amonija tiocianāta šķīdums 0,1 mol/l.

3.2. Sudraba nitrāta šķīdums 0,1 mol/l.

3.3. Piesātināts amonija dzelzs sulfāta šķīdums, (NH₄)Fe(SO₄)₂.

3.4. Slāpekļskābe, blīvums 1,38 g/ml.

▼ **M9**

- 3.5. Dietilēteris.
- 3.6. Acetons.
- 3.7. Karesa I šķīdums: ūdenī izšķīdina 21,9 g cinka acetāta, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, un 3 g ledus etiķskābes. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.
- 3.8. Karesa II šķīdums: ūdenī izšķīdina 10,6 g kālija ferocianīda $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Papildina ar ūdeni līdz 100 ml.
- 3.9. Aktīvā ogle, kurā nav hlorīdu un kura tos neabsorbē.

4. **Iekārtas**

Rotācijas tipa maisītājs (tumblers): aptuveni 35 līdz 40 apgr./min.

5. **Procedūra**5.1. *Šķīduma sagatavošana*

Atkarībā no parauga īpašībām sagatavo šķīdumu, kā norādīts 5.1.1., 5.1.2. vai 5.1.3. punktā.

Vienlaikus veic *tukšā parauga analīzi*, neizmantojot analizējamo paraugu.

5.1.1. Paraugi, kuros nav organisku vielu

Ar precizitāti līdz mg iesver ne vairāk kā 10 g parauga, kurā ir ne vairāk par 3 g hlora hlorīdu veidā. Kopā ar 400 ml ūdens iepilda 500 ml tilpuma kolbā apmēram 20 °C temperatūrā. Trīsdesmit minūtes maisa tumblerā, papildina līdz vajadzīgajam tilpumam, homogenizē un filtrē.

5.1.2. Paraugi, kuros ir organiskas vielas, izņemot 5.1.3. punktā minētos produktus

Ar precizitāti līdz mg iesver apmēram 5 g parauga, ko kopā ar 1 g aktīvās ogles ievieto 500 ml tilpuma kolbā. Pievieno 400 ml apmēram 20 °C ūdens un 5 ml Karesa I šķīduma (3.7. punkts), maisa 30 sekundes, tad pievieno 5 ml Karesa II šķīduma (3.8. punkts). Trīsdesmit minūtes maisa tumblerā, papildina līdz vajadzīgajam tilpumam, homogenizē un filtrē.

5.1.3. Termiski apstrādāta barība, linu rauši un milti, produkti, kuros ir daudz linu miltu, un citi produkti, kuros ir daudz gļotvielu vai koloīdu vielu (piemēram, dekstrinēta ciete)

Sagatavo šķīdumu, kā aprakstīts 5.1.2. punktā, bet nefiltrē. Dekantē (vajadzības gadījumā centrifugē), atdala 100 ml no šķīduma augšējā slāņa un pārnes 200 ml mērkolbā. Samaisa ar acetonu (3.6. punkts) un ar šo šķīdinātāju papildina līdz vajadzīgajam tilpumam, homogenizē un filtrē.

5.2. *Titrēšana*

Ar pipeti Erlenmeijera kolbā pārnes 25 ml līdz 100 ml filtrāta (atkarībā no sagaidāmā hlorīdu satura), ko iegūst pēc apraksta 5.1.1., 5.1.2. vai 5.1.3. punktā. Alikvotā daļa nedrīkst saturēt vairāk par 150 mg hlora (Cl). Vajadzības gadījumā atšķaida līdz vismaz 50 ml tilpumam ar ūdeni, pievieno 5 ml slāpekļskābes (3.4. punkts), 2 ml piesātināta amonija dzelzs sulfāta šķīduma (3.3. punkts) un divus pilienus amonija tiocianāta šķīduma (3.1. punkts), ko ņem ar bireti, kas uzpildīta līdz nulles atzīmei. Ar bireti pārnes sudraba nitrāta šķīdumu (3.2. punkts) tā, lai tas būtu 5 ml pārākumā. Pievieno 5 ml dietilētera (3.5. punkts) un stipri sakrata, lai koagulētu nogulsnes. Sudraba nitrāta pārākumu titrē ar amonija tiocianāta šķīdumu (3.1. punkts), līdz veidojas sarkanbrūns krāsojums, kas saglabājas vienu minūti.

▼ M9**6. Rezultātu aprēķināšana**

Hlora daudzumu (X), izteiktu % no nātrija hlorīda, aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

V_1 = pievienotā 0,1 mol/l sudraba nitrāta šķīduma tilpums ml,

V_2 = titrēšanai izmantotais 0,1 mol/l amonija tiocianāta šķīduma tilpums ml,

m = parauga svars gramos alikvotā.

Ja tukšā parauga analīze norāda, ka ir patērēts 0,1 mol/l sudraba nitrāta šķīdums, tad minēto lielumu atskaita no tilpuma ($V_1 - V_2$).

7. Novērojumi

- 7.1. Titrēšanu var veikt, arī izmantojot potenciometriju.
- 7.2. Analizējot produktus ar ļoti lielu eļļu un tauku saturu, tos vispirms attauko ar dietilēteri vai petrolēteri.
- 7.3. Zivju miltus var titrēt, izmantojot Mora metodi.

▼ **M9***IV PIELIKUMS***ANALĪZES METODES, AR KO KONTROLĒ ATĻAUTO PIEDEVU
DAUDZUMU BARĪBĀ****A. A VITAMĪNA NOTEIKŠANA**

A vitamīns jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17547 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – A, E un D vitamīna satura noteikšana ⁽¹⁾ – Metode, kurā izmanto cietās fāzes ekstrakciju (*SPE*) un attīrīšanu, kā arī augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (*HPLC*)”, vai
- saskaņā ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas metodi (*RP-HPLC*) ar UV vai fluorescences detektoru, kā aprakstīts turpmāk no 1. līdz 9. punktam.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt A vitamīna (retinola) daudzumu barībā. Ar A vitamīnu saprot *all-trans*-retinilspirtu un tā *cis*-izomērus, ko nosaka ar šo metodi. A vitamīna saturu izsaka starptautiskajās vienībās (SV) uz kg. Viena SV atbilst 0,300 µg *all-trans*-A vitamīna spirta vai 0,344 µg *all-trans*-A vitamīna acetāta, vai 0,550 µg *all-trans*-A vitamīna palmitāta aktivitātei.

Kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 2 000 SV A vitamīna/kg.

2. Princips

Paraugu hidrolizē kālija hidroksīda šķīdumā etanolā, un A vitamīnu ekstrahē petrolēterī. Šķīdinātāju atdala iztvaicējot, atlikumu izšķīdina metanolā un vajadzības gadījumā atšķaida līdz nepieciešamajai koncentrācijai. A vitamīna saturu nosaka ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (*P-HPLC*), izmantojot UV vai fluorescences detektoru. Hromatogrāfijas parametrus izvēlas tā, lai *all-trans*-A vitamīna spirts neatdalītos no tā *cis*-izomēriem.

3. Reaģenti

- 3.1. Etanols, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Petrolēteris, viršanas diapazons 40-60 °C.
- 3.3. Metanols.
- 3.4. Kālija hidroksīda šķīdums, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Nātrija askorbāta šķīdums, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (skatīt 7.7. Novērojumu punktu).
- 3.6. Nātrija sulfīds, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Nātrija sulfīda šķīdums, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ glicerīnā, $\beta = 120 \text{ g/l}$, (ja $x = 9$) (skatīt 7.8. Novērojumu punktu).
- 3.7. Fenolfaleīna šķīdums, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ etanolā (3.1. punkts).

⁽¹⁾ Analīzes metode, kas paredzēta standartā EN 17547, tiek saukta par metodi, ko izmanto oficiālās kontrolēs, lai noteiktu A un E vitamīnu, kā alternatīvu šā pielikuma A daļā aprakstītajai A vitamīna noteikšanas metodei un šā pielikuma B daļā aprakstītajai E vitamīna noteikšanas metodei.

▼ **M9**

- 3.8. 2-propanols.
- 3.9. Kustīgā fāze priekš *HPLC*: metanola (3.3. punkts) un ūdens maisījums, piemēram, 980 + 20 (v + v). Precīzu attiecību nosaka izmantotās kolonnas raksturlielumi.
- 3.10. Slāpekļlis, bez skābekļa.
- 3.11. Īpaši tīrs all-*trans*-A vitamīna acetāts ar sertificētu aktivitāti, piemēram, $2,80 \times 10^6$ SV/g.
 - 3.11.1. All-*trans*-A vitamīna acetāta rezerves standartšķīdums: ar precizitāti līdz 0,1 mg 100 ml mērkolbā iesver 50 mg A vitamīna acetāta (3.11. punkts). Izšķīdina 2-propanolā (3.8. punkts) un papildina līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju. Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 1 400 SV A vitamīna/ml. Precīzais saturs jānosaka atbilstoši 5.6.3.1. punktam.
 - 3.12. Īpaši tīrs all-*trans*-A vitamīna palmitāts ar sertificētu aktivitāti, piemēram, $1,80 \times 10^6$ SV/g.
 - 3.12.1. All-*trans*-A vitamīna palmitāta rezerves standartšķīdums: ar precizitāti līdz 0,1 mg 100 ml mērkolbā iesver 80 mg A vitamīna palmitāta (3.12. punkts). Izšķīdina 2-propanolā (3.8. punkts) un papildina līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju. Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 1 400 SV A vitamīna/ml. Precīzais saturs jānosaka atbilstoši 5.6.3.2. punktam.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenols (BHT) (skatīt 7.5. Novērojumu punktu).
4. **Iekārtas**
 - 4.1. Rotācijas vakuumiztvaicētājs.
 - 4.2. Brūnā stikla trauki.
 - 4.2.1. 500 ml plakandibena vai koniskas kolbas ar pieslēpēta stikla uzmavu.
 - 4.2.2. 10, 25, 100 un 500 ml šaurkakla mērkolbas ar pieslēpēta stikla aizbāžņiem.
 - 4.2.3. 1 000 ml koniskas dalāmpiltuves ar pieslēpēta stikla aizbāžņiem.
 - 4.2.4. 250 ml bumbierveida kolbas ar pieslēpēta stikla uzmavām.
 - 4.3. Alīna kondensators, apvalka garums 300 mm, ar pieslēpēta stikla savienojumu un adapteri gāzu padeves caurulei.
 - 4.4. 185 mm diametra kroku filtrs fāžu atdalīšanai (piemēram, *Schleicher & Schuell* 597 HY 1/2).
 - 4.5. *HPLC* iekārta ar injekcijas sistēmu.
 - 4.5.1. Šķīdumu hromatogrāfa kolonna, 250×4 mm, C_{18} , 5 vai 10 μ m iesaiņojums, vai līdzvērtīga (izpildes kritērijs: viena smaile visiem retinola izomēriem *HPLC* apstākļos).
 - 4.5.2. UV vai fluorescences detektors ar regulējamu viļņu garumu.
 - 4.6. Spektrofotometrs ar 10 mm kvarca šūnām.
 - 4.7. Ūdens vanna ar magnētisko maisītāju.
 - 4.8. Ekstrakcijas aparāts (skatīt 1. attēlu), kurā ietilpst:

▼M9

- 4.8.1. viena litra tilpuma stikla cilindrs ar pieslēpētu kaklu un aizbāzni;
- 4.8.2. pieslēpēta stikla ieliktnis, kas aprīkots ar sānu nozarojumu un regulējamu cauruli, kura iet caur centru. Regulējamajai caurulei ir U veida apakšējais gals un sprausla pretējā galā, lai virsējo šķidrums slāni cilindrā varētu novadīt uz dalāmpiltuvi.

5. **Procedūra**

Piezīme. A vitamīns ir jutīgs pret (UV) gaismu un oksidāciju. Visas darbības veic, izvairoties no gaismas klātbūtnes (izmantojot brūna stikla traukus vai stikla traukus, kas ir aizsargāti ar alumīnija foliju), kā arī no skābekļa klātbūtnes (noskalo ar slāpekli). Ekstrakcijas laikā gaisu virs šķidrums aizstāj ar slāpekli (periodiski atbrīvojot aizbāzni, lai izvairītos no pārmērīga spiediena).

5.1. *Parauga sagatavošana*

Paraugu samal tā, lai tas izietu caur sietu ar 1 mm acojumu un lai malšanas laikā nerastos siltums. Paraugs jāsamal pirms svēršanas un pārziņepjošanas, lai novērstu A vitamīna zudumus. Paraugu(-us) nemal, ja daļiņu izmēra sadalījums ir atbilstošs (piemēram, premiksus un barības piedevas).

5.2. *Pārziņepjošana*

Atkarībā no A vitamīna satura svara 500 ml plakandibena vai koniskā kolbā (4.2.1. punkts) ar precizitāti līdz 1 mg iesver 2 g līdz 25 g parauga. Zemas koncentrācijas gadījumā parauga svaru var palielināt, lai testa daļā būtu pietiekami daudz daļiņu. Svārstot pakāpeniski pievieno 130 ml etanola (3.1. punkts), apmēram 100 mg BHT (3.13. punkts), 2 ml nātrija askorbāta šķīduma (3.5. punkts) un 2 ml nātrija sulfīda šķīduma (3.6. punkts). Kolbai pievieno kondensatoru (4.3. punkts) un kolbu iegremdē ūdens vannā ar magnētisko maisītāju (4.7. punkts). Uzvāra un ļauj notikt attecei piecas minūtes. Tad caur kondensatoru (4.3. punkts) pievieno 25 ml kālija hidroksīda šķīduma (3.4. punkts) un, maisot lēnā slāpekļa plūsmā, ļauj notikt attecei vēl 25 minūtes. Tad noskalo kondensatoru apmēram ar 20 ml ūdens un atdzesē kolbas saturu līdz istabas temperatūrai.

5.3. *Ekstrakcija*

Pārziņepjoto šķīdumu dekantējot kvantitatīvi pārnēs uz 1 000 ml dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts) vai ekstrakcijas aparātu (4.8. punkts), noskalojot kopumā ar 250 ml ūdens. Pārziņepjošanas kolbu secīgi noskalo ar 25 ml etanola (3.1. punkts) un 100 ml petrolētera (3.2. punkts) un noskalojumus pārnēs uz dalāmpiltuvi vai ekstrakcijas iekārtu. Ūdens un etanola attiecība kombinētajos šķīdumos ir apmēram 2:1. Kārtīgi sakrata divas minūtes un ļauj nogulsneties divas minūtes.

5.3.1. *Ekstrakcija, izmantojot dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts)*

Kad slāņi ir atdalījušies (skatīt 7.3. Novērojumu punktu), petrolētera slāni pārnēs uz citu dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts). Tādu ekstrakciju divas reizes atkārt ar 100 ml petrolētera (3.2. punkts) un divas reizes – ar 50 ml petrolētera (3.2. punkts).

Kombinētos ekstraktus divas reizes mazgā dalāmpiltuvē ar 100 ml ūdens devām, viegli svārstot, lai neveidotos emulsijas, tad, atkārtoti kratot, ar jaunām 100 ml ūdens devām, līdz ūdens, pievienojot fenoltaleīna šķīdumu (3.7. punkts), kļūst bezkrāsains (parasti pietiek ar četrām mazgāšanas reizēm). Lai atdalītu suspendētu ūdeni, mazgāto

▼M9

ekstraktu caur sausu kroku filtru fāžu atdalīšanai (4.4. punkts) filtrē 500 ml mērkolbā (4.2.2. punkts). Dalāmpiltuvi un filtru noskalo ar 50 ml petrolētera (3.2. punkts), papildina līdz zīmei ar petrolēteri (3.2. punkts) un rūpīgi samaisa.

5.3.2. Ekstrakcija, izmantojot ekstrakcijas aparātu (4.8. punkts)

Kad slāņi ir atdalījušies (skatīt 7.3. Novērojumu punktu), stikla cilindra aizbāzni (4.8.1. punkts) nomaina ar pieslīpēta stikla ieliktni (4.8.2. punkts) un regulējamās caurules U veida apakšējo galu novieto tā, lai tas atrastos tieši virs slāņu saskares līmeņa. Ievadot slāpekli caur sānu nozarojumu, pārnēs augšējo petrolētera slāni uz 1 000 ml dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts). Stikla cilindrā ievieto 100 ml petrolētera (3.2. punkts), noslēdz ar aizbāzni un kārtīgi sakrata. Ļauj slāņiem atdalīties un pārnēs augšējo slāni uz dalāmpiltuvi kā iepriekš. Atkārtoti ekstrahē ar papildu 100 ml petrolētera (3.2. punkts), tad divas reizes ar 50 ml petrolētera (3.2. punkts) devām un pārnēs petrolētera slāņus uz dalāmpiltuvi.

Mazgā kombinētos petrolētera ekstraktus, kā aprakstīts 5.3.1. punktā, un turpina rīkoties saskaņā ar minēto punktu.

5.4. Parauga šķīduma sagatavošana priekš HPLC

Alikvoto daļu petrolētera šķīduma (no 5.3.1. vai 5.3.2. punkta) ar pipeti pārnēs 250 ml bumbierveida kolbā (4.2.4. punkts). Rotācijas iztvaicētājā (4.1. punkts) samazinātā spiedienā ūdens vannas temperatūrā, kas nepārsniedz 40 °C, iztvaicē šķīdinātāju, līdz tas ir gandrīz sauss. Atjauno atmosfēras spiedienu, pievienojot slāpekli (3.10. punkts), un izņem kolbu no rotācijas iztvaicētāja. Atlikušo šķīdinātāju atdala ar slāpekļa (3.10. punkts) plūsmu un tūlīt izšķīdina atlikumu noteiktā tilpumā (10–100 ml) metanola (3.3. punkts) (A vitamīna koncentrācijai jābūt diapazonā no 5 SV/ml līdz 30 SV/ml).

5.5. Noteikšana ar HPLC

A vitamīnu atdala C₁₈ apgrieztās fāzes kolonnā (4.5.1. punkts) un koncentrāciju izmēra, izmantojot UV detektoru (325 nm) vai fluorescences detektoru (ierosa 325 nm, emisija 475 nm) (4.5.2. punkts).

Injicē alikvoto daļu (piemēram, 20 µl) šķīduma metilspirtā, kas iegūts 5.4. punktā, un eluē ar kustīgo fāzi (3.9. punkts). Aprēķina vairāku viena parauga šķīduma injekciju vidējo smailes augstumu (platību) un vairāku kalibrēšanas šķīdumu (5.6.2. punkts) injekciju vidējos smailes augstumus (platības).

HPLC nosacījumi

Orientējoši piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus.

Šķīdumu hromatogrāfa kolonna (4.5.1. punkts):	250 × 4 mm, C ₁₈ , 5 vai 10 µm iesaiņojums, vai līdzvērtīga
---	--

Kustīgā fāze (3.9. punkts):	metanola (3.3. punkts) un ūdens maisījums, piemēram, 980 + 20 (v + v).
-----------------------------	--

Plūsmas ātrums:	1–2 ml/min
-----------------	------------

Detektors (4.5.2. punkts):	UV detektors (325 nm) vai fluorescences detektors (ierosa 325 nm/emisija 475 nm)
----------------------------	--

▼ **M9**5.6. *Kalibrēšana*

5.6.1. Darba standartšķīdumu sagatavošana

20 ml A vitamīna acetāta rezerves standartšķīduma (3.11.1. punkts) vai 20 ml A vitamīna palmitāta rezerves standartšķīduma (3.12.1. punkts) ar pipeti pārnes 500 ml plakandibena vai koniskā kolbā (4.2.1. punkts) un hidrolizē, kā norādīts 5.2. punktā, taču nepievienojot BHT. Tad ekstrahē ar petrolēteri (3.2. punkts) saskaņā ar 5.3. punktu un papildina līdz 500 ml ar petrolēteri (3.2. punkts). Rotācijas iztvaicētājā iztvaicē 100 ml tāda ekstrakta (skatīt 5.4. punktu), līdz tas ir gandrīz sauss, ar slāpekļa plūsmu (3.10. punkts) atdala atlikušo šķīdinātāju un atkārtoti izšķīdina atlikumu 10,0 mililitros metanola (3.3. punkts). Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 560 SV A vitamīna/ml. Precīzais saturs jānosaka atbilstoši 5.6.3.3. punktam. Darba standartšķīdums jāsatavosvaigs pirms izmantošanas.

2,0 ml tāda darba standartšķīduma ar pipeti pārnes 20 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar metanolu (3.3. punkts) un samaisa. Šā atšķaidītā darba standartšķīduma nominālā koncentrācija ir 56 SV A vitamīna/ml.

5.6.2. Kalibrēšanas šķīdumu un kalibrēšanas grafika sagatavošana

1,0, 2,0, 5,0 un 10,0 ml atšķaidītā darba standartšķīduma ar pipeti pārnes 20 ml mērkolbās, papildina līdz zīmei ar metanolu (3.3. punkts) un samaisa. Minēto šķīdumu nominālās koncentrācijas ir 2,8, 5,6, 14,0 un 28,0 SV A vitamīna/ml.

20 µl katra kalibrēšanas šķīduma injicē vairākas reizes un nosaka vidējos smailes augstumus (laukumus). Izmantojot vidējos smailes augstumus (laukumus), izveido kalibrēšanas grafiku, kas satur UV kontroles rezultātus (5.6.3.3. punkts).

5.6.3. Standartšķīdumu UV standartizācija

5.6.3.1. A vitamīna acetāta rezerves standartšķīdums

2,0 ml A vitamīna acetāta rezerves standartšķīduma (3.11.1. punkts) ar pipeti pārnes 50 ml mērkolbā (4.2.2. punkts) un papildina līdz zīmei ar 2-propanolu (3.8. punkts). Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 56 SV A vitamīna/ml. 3,0 ml šā atšķaidītā A vitamīna acetāta šķīduma ar pipeti pārnes 25 ml mērkolbā un papildina līdz zīmei ar 2-propanolu (3.8. punkts). Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 6,72 SV A vitamīna/ml. Šā šķīduma UV spektru spektrofotometrā (4.6. punkts) salīdzina ar 2-propanola (3.8. punkts) spektru intervālā no 300 nm līdz 400 nm. Ekstinkcijas maksimumam jābūt robežās starp 325 nm un 327 nm.

A vitamīna satura aprēķināšana:

$$A \text{ vitamīna SV/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ A vitamīna acetātam} = 1\,530 \text{ pie } 326 \text{ nm } 2 - \text{propanolā})$$

5.6.3.2. A vitamīna palmināta rezerves standartšķīdums

2,0 ml A vitamīna palmināta rezerves standartšķīduma (3.12.1. punkts) ar pipeti pārnes 50 ml mērkolbā (4.2.2. punkts) un papildina līdz zīmei ar 2-propanolu (3.8. punkts). Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 56 SV A vitamīna/ml. 3,0 ml šā atšķaidītā A vitamīna palmināta

▼ M9

šķīduma ar pipeti pārnes 25 ml mērkolbā un papildina līdz zīmei ar 2-propanolu (3.8. punkts). Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 6,72 SV A vitamīna/ml. Šā šķīduma UV spektru spektrofotometrā (4.6. punkts) salīdzina ar 2-propanola (3.8. punkts) spektru intervālā no 300 nm līdz 400 nm. Ekstinkcijas maksimumam jābūt robežās starp 325 nm un 327 nm.

A vitamīna satura aprēķināšana:

$$A \text{ vitamīna SV/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ A vitamīna palminātam} = 957 \text{ pie } 326 \text{ nm } 2 - \text{propanolā})$$

5.6.3.3. A vitamīna darba standartšķīdums

3,0 ml A vitamīna neatšķaidīta darba standartšķīduma, kas sagatavots saskaņā ar 5.6.1. punktu, ar pipeti pārnes 50 ml mērkolbā (4.2.2. punkts) un papildina līdz zīmei ar 2-propanolu (3.8. punkts). 5,0 ml šā šķīduma ar pipeti pārnes 25 ml mērkolbā un papildina līdz zīmei ar 2-propanolu (3.8. punkts). Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 6,72 SV A vitamīna/ml. Šā šķīduma UV spektru spektrofotometrā (4.6. punkts) salīdzina ar 2-propanola (3.8. punkts) spektru intervālā no 300 nm līdz 400 nm. Ekstinkcijas maksimumam jābūt robežās starp 325 nm un 327 nm.

A vitamīna satura aprēķināšana:

$$A \text{ vitamīna SV/ml} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ A vitamīna spirtam} = 1\,821 \text{ pie } 325 \text{ nm } 2 - \text{propanolā})$$

6. Rezultātu aprēķināšana

Nemot vērā parauga šķīduma A vitamīna smaiļu vidējo augstumu (laukumu), nosaka parauga šķīduma koncentrāciju SV/ml, izmantojot kalibrēšanas grafiku (5.6.2. punkts).

A vitamīna saturu w (SV/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

c = A vitamīna koncentrācija SV/ml parauga šķīdumā (5.4. punkts),

V_1 = parauga šķīduma (5.4. punkts) tilpums mililitros,

V_2 = 5.4. punktā paņemtās alikvotās daļas tilpums ml,

m = analizējamā parauga svars gramos.

7. Novērojumi

- 7.1. Paraugiem ar zemu A vitamīna koncentrāciju var būt lietderīgi apvienot divu pārziepjošanas reižu petrolētera ekstraktus (svērtais daudzums 25 g) vienā parauga šķīdumā *HPLC* noteikšanai.

▼ **M9**

- 7.2. Analīzei paņemtā parauga svarā nav vairāk par 2 g tauku.
- 7.3. Ja fāzes neatdalās, tad pievieno apmēram 10 ml etanola (3.1. punkts), lai izjauktu emulsiju.
- 7.4. Mencu aknu eļļai un citiem tīriem taukiem pārziepjošanas laiku pagarina līdz 45–60 minūtēm.
- 7.5. BHT vietā var izmantot hidrohinonu.
- 7.6. Izmantojot normālās fāzes kolonnu, var atdalīt retinola izomērus. Tomēr tādā gadījumā, lai veiktu aprēķinus, jāsummē visu *cis* un *trans* izomēru smaiļu augstumi (laukumi).
- 7.7. Nātrija askorbāta šķīduma vietā var izmantot apmēram 150 mg askorbīnskābes.
- 7.8. Nātrija sulfīda šķīduma vietā var izmantot apmēram 50 mg *EDTA*.
- 7.9. Analizējot A vitamīnu piena aizstājējbarībā, īpaša uzmanība jāpievērš:
- pārziepjošanas laikā (5.2. punkts): ņemot vērā paraugā esošo tauku daudzumu, var būt jāpalielina kālija hidroksīda šķīduma daudzums (3.4. punkts),
 - ekstrakcijas laikā (5.3. punkts): ņemot vērā emulsiju klātbūtni, var būt jākorrigē ūdens/etanola 2:1 attiecība.

Lai pārbaudītu, vai izmantotā analīzes metode rada ticamus rezultātus par konkrēto matrici (piena aizstājējbarību), papildu analizējamam paraugam veic atgūstamības testu. Ja atgūstamības procents nepārsniedz 80 %, analītiskais rezultāts jākorrigē, ņemot vērā atgūstamību.

8. **Atkārtojamība**

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās paralēlās noteikšanās, kuras veiktas ar vienu paraugu, nedrīkst pārsniegt 15 % attiecībā pret lielāko rezultātu.

9. **Salīdzinošā pētījuma rezultāti ⁽¹⁾**

	Premikss	Premiksa barība	Minerālu koncentrāts	Proteīnu barība	Sivēnu barība
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
vidējais [SV/kg]	$17,02 \times 106$	$1,21 \times 106$	537 100	151 800	18 070
s_r [SV/kg]	$0,51 \times 106$	$0,039 \times 106$	22 080	12 280	682
r [SV/kg]	$1,43 \times 106$	$0,109 \times 106$	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [SV/kg]	$1,36 \times 106$	$0,069 \times 106$	46 300	23 060	3 614

⁽¹⁾ Veica Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) Barības darba grupa.

▼ **M9**

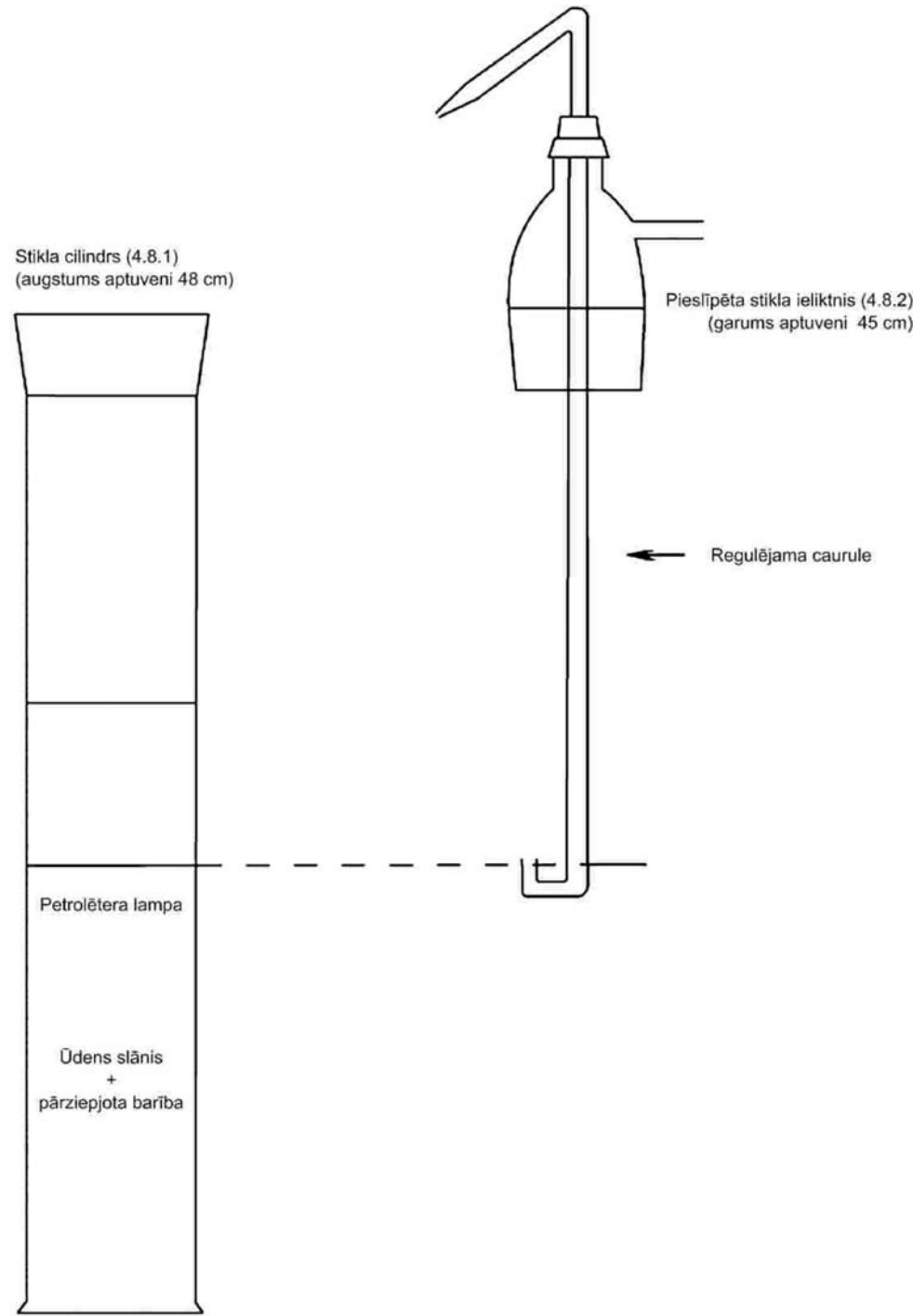
	Premikss	Premiksa barība	Minerālu koncentrāts	Proteīnu barība	Sivēnu barība
R [SV/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: laboratoriju skaits,
n: atsevišķo vērtību skaits,
s_r: atkārtojamības standartnovirze,
s_R: reproducējamības standartnovirze,
r: atkārtojamība,
R: reproducējamība,
CV_r: atkārtojamības variācijas koeficients,
CV_R: reproducējamības variācijas koeficients.

▼ M9

1. attēls

Ekstrakcijas aparāts (4.8. punkts)



▼ **M9****B. E VITAMĪNA NOTEIKŠANA**

E vitamīns jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17547 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – A, E un D vitamīna satura noteikšana ⁽¹⁾ – Metode, kurā izmanto cietās fāzes ekstrakciju (*SPE*) un attīrīšanu, kā arī augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (*HPLC*)”, vai
- saskaņā ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas metodi (*RP-HPLC*) ar UV vai fluorescences detektoru, kā aprakstīts turpmāk no 1. līdz 9. punktam.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt E vitamīna daudzumu barībā. E vitamīna saturu izsaka kā DL- α -tokoferola acetātu mg/kg. 1 mg DL- α -tokoferola acetāta atbilst 0,91 mg DL- α -tokoferola (E vitamīna).

Kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 2 mg E vitamīna/kg. Minēto kvantitatīvās noteikšanas robežu var sasniegt tikai ar fluorescences detektoru. Ar UV detektoru kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 10 mg/kg.

2. Princips

Paraugu hidrolizē kālija hidroksīda šķīdumā etanolā, un E vitamīnu ekstrahē petrolēterī. Šķīdinātāju atdala iztvaicējot, atlikumu izšķīdina metanolā un vajadzības gadījumā atšķaida līdz nepieciešamajai koncentrācijai. E vitamīna saturu nosaka ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (*P-HPLC*), izmantojot fluorescences vai UV detektoru.

3. Reaģenti

- 3.1. Etanols, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Petrolēteris, viršanas diapazons 40–60 °C.
- 3.3. Metanols.
- 3.4. Kālija hidroksīda šķīdums, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Nātrija askorbāta šķīdums, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (skatīt 7.7. Novērojumu punktu).
- 3.6. Nātrija sulfīds, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Nātrija sulfīda šķīdums, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ glicerīnā, $\beta = 120 \text{ g/l}$, (ja $x = 9$) (skatīt 7.8. Novērojumu punktu).
- 3.7. Fenoltaleīna šķīdums, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ etanolā (3.1. punkts).
- 3.8. Kustīgā fāze priekš *HPLC*: metanola (3.3. punkts) un ūdens maisījums, piemēram, $980 + 20$ ($v + v$). Precīzu attiecību nosaka izmantotās kolonnas raksturlielumi.
- 3.9. Slāpekļis, bez skābekļa.
- 3.10. Īpaši tīrs DL- α -tokoferola acetāts ar sertificētu aktivitāti.

⁽¹⁾ Analīzes metode, kas paredzēta standartā EN 17547, tiek saukta par metodi, ko izmanto oficiālās kontrolēs, lai noteiktu A un E vitamīnu, kā alternatīvu šā pielikuma A daļā aprakstītajai A vitamīna noteikšanas metodei un šā pielikuma B daļā aprakstītajai E vitamīna noteikšanas metodei.

▼ **M9**

3.10.1. DL- α -tokoferola acetāta rezerves standartšķīdums: ar precizitāti līdz 0,1 mg 100 ml mērkolbā iesver 100 mg DL- α -tokoferola acetāta (3.10. punkts). Izšķīdina etanolā (3.1. punkts) un papildina līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju. 1 ml šā šķīduma satur 1 mg DL- α -tokoferola acetāta. (Par UV kontroli skatīt 5.6.1.3. punktu; par stabilizāciju skatīt 7.4. Novērojumu punktu).

3.11. Īpaši tīrs DL- α -tokoferols ar sertificētu aktivitāti.

3.11.1. DL- α -tokoferola rezerves standartšķīdums: ar precizitāti līdz 0,1 mg 100 ml mērkolbā iesver 100 mg DL- α -tokoferola (3.11. punkts). Izšķīdina etanolā (3.1. punkts) un papildina līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju. 1 ml šā šķīduma satur 1 mg DL- α -tokoferola. (Par UV kontroli skatīt 5.6.2.3. punktu; par stabilizāciju skatīt 7.4. Novērojumu punktu).

3.12. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenols (BHT) (skatīt 7.5. Novērojumu punktu).

4. **Iekārtas**

4.1. Rotācijas iztvaicētājs.

4.2. Brūnā stikla trauki.

4.2.1. 500 ml plakandibena vai koniskas kolbas ar pieslēpēta stikla uzmavu.

4.2.2. 10, 25, 100 un 500 ml šaurkakla mērkolbas ar pieslēpēta stikla aizbāžņiem.

4.2.3. 1 000 ml koniskas dalāmpiltuves ar pieslēpēta stikla aizbāžņiem.

4.2.4. 250 ml bumbierveida kolbas ar pieslēpēta stikla uzmavām.

4.3. Alīna kondensators, apvalka garums 300 mm, ar pieslēpēta stikla savienojumu un adapteri gāzu padeves caurulei.

4.4. 185 mm diametra kroku filtrs fāžu atdalīšanai (piemēram, *Schleicher & Schuell* 597 HY 1/2).

4.5. *HPLC* iekārta ar injekcijas sistēmu.

4.5.1. Šķīdumu hromatogrāfa kolonna, 250 × 4 mm, C₁₈, 5 vai 10 μm iesaiņojums, vai līdzvērtīga.

4.5.2. Fluorescences vai UV detektors ar regulējamu viļņu garumu.

4.6. Spektrofotometrs ar 10 mm kvarca šūnām.

4.7. Ūdens vanna ar magnētisko maisītāju.

4.8. Ekstrakcijas aparāts (skatīt 2. attēlu), kurā ietilpst:

4.8.1. viena litra tilpuma stikla cilindrs ar pieslēpētu kaklu un aizbāzni;

4.8.2. pieslēpēta stikla ieliktnis, kas aprīkots ar sānu nozarojumu un regulējamu cauruli, kura iet caur centru. Regulējamajai caurulei ir U veida apakšējais gals un sprausla pretējā galā, lai virsējo šķīduma slāni cilindrā varētu novadīt uz dalāmpiltuvi.

▼ M9

5. **Procedūra**

Piezīme. E vitamīns ir jutīgs pret (UV) gaismu un oksidāciju. Visas darbības veic, izvairoties no gaismas klātbūtnes (izmantojot brūna stikla traukus vai stikla traukus, kas ir aizsargāti ar alumīnija foliju), kā arī no skābekļa klātbūtnes (noskalo ar slāpekli). Ekstrakcijas laikā gaisu virs šķidruma aizstāj ar slāpekli (periodiski atbrīvojot aizbāzni, lai izvairītos no pārmērīga spiediena).

5.1. *Parauga sagatavošana*

Paragu samal tā, lai tas izietu caur sietu ar 1 mm acojumu un lai malšanas laikā nerastos siltums. Paraugš jāsamaļ pirms svēršanas un pārziepjošanas, lai novērstu E vitamīna zudumus.

5.2. *Pārziepjošana*

Atkarībā E vitamīna satura svāra 500 ml plakandibena vai koniskā kolbā (4.2.1. punkts) ar precizitāti līdz 0,01 g iesver 2 g līdz 25 g parauga. Svārstot pakāpeniski pievieno 130 ml etanola (3.1. punkts), apmēram 100 mg BHT (3.12. punkts), 2 ml nātrija askorbāta šķīduma (3.5. punkts) un 2 ml nātrija sulfīda šķīduma (3.6. punkts). Kolbai pievieno kondensatoru (4.3. punkts) un kolbu iegremdē ūdens vannā ar magnētisko maisītāju (4.7. punkts). Uzvāra un ļauj notikt attecei piecas minūtes. Tad caur kondensatoru (4.3. punkts) pievieno 25 ml kālija hidroksīda šķīduma (3.4. punkts) un, maisot lēnā slāpekļa plūsmā, ļauj notikt attecei vēl 25 minūtes. Tad noskalo kondensatoru apmēram ar 20 ml ūdens un atdzesē kolbas saturu līdz istabas temperatūrai.

5.3. *Ekstrakcija*

Pārziepjoto šķīdumu dekantējot kvantitatīvi pārnēs uz 1 000 ml dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts) vai ekstrakcijas aparātu (4.8. punkts), noskalojot kopumā ar 250 ml ūdens. Pārziepjošanas kolbu secīgi noskalo ar 25 ml etanola (3.1. punkts) un 100 ml petrolētera (3.2. punkts) un noskalojumus pārnēs uz dalāmpiltuvi vai ekstrakcijas iekārtu. Ūdens un etanola attiecība kombinētajos šķīdumos ir apmēram 2:1. Kārtīgi sakrata divas minūtes un ļauj nogulsneties divas minūtes.

5.3.1. *Ekstrakcija, izmantojot dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts)*

Kad slāņi ir atdalījušies (skatīt 7.3. Novērojumu punktu), petrolētera slāni pārnēs uz citu dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts). Tādu ekstrakciju divas reizes atkārt ar 100 ml petrolētera (3.2. punkts) un divas reizes – ar 50 ml petrolētera (3.2. punkts).

Kombinētos ekstraktus divas reizes mazgā dalāmpiltuvē ar 100 ml ūdens devām, viegli svārstot, lai neveidotos emulsijas, tad, atkārtoti kratot, ar jaunām 100 ml ūdens devām, līdz ūdens, pievienojot fenoltaleīna šķīdumu (3.7. punkts), kļūst bezkrāsains (parasti pietiek ar četrām mazgāšanas reizēm). Lai atdalītu suspendētu ūdeni, mazgāto ekstraktu caur sausu kroku filtru fāžu atdalīšanai (4.4. punkts) filtrē 500 ml mērkolbā (4.2.2. punkts). Dalāmpiltuvi un filtru noskalo ar 50 ml petrolētera (3.2. punkts), papildina līdz zīmei ar petrolēteri (3.2. punkts) un rūpīgi samaisa.

5.3.2. *Ekstrakcija, izmantojot ekstrakcijas aparātu (4.8. punkts)*

Kad slāņi ir atdalījušies (skatīt 7.3. Novērojumu punktu), stikla cilindra aizbāzni (4.8.1. punkts) nomaina ar pieslēpēta stikla ieliktni (4.8.2. punkts) un regulējamās caurules U veida apakšējo galu novieto tā, lai tas atrastos tieši virs slāņu saskares līmeņa. Ievadot slāpekli caur sānu nozarojumu, pārnēs augšējo petrolētera slāni uz 1 000 ml dalāmpiltuvi (4.2.3. punkts). Stikla cilindrā ievieto 100 ml petrolētera (3.2. punkts), noslēdz ar aizbāzni

▼ **M9**

un kārtīgi sakrata. Ļauj slāņiem atdalīties un pārnēs augšējo slāni uz dalāmpiltuvi kā iepriekš. Atkārtoto ekstrakciju ar papildu 100 ml petrolētera (3.2. punkts), tad divas reizes ar 50 ml petrolētera (3.2. punkts) devām un pārnēs petrolētera slāņus uz dalāmpiltuvi.

Mazgā kombinētos petrolētera ekstraktus, kā aprakstīts 5.3.1. punktā, un turpina rīkoties saskaņā ar minēto punktu.

5.4. *Parauga šķīduma sagatavošana priekš HPLC*

Alikvoto daļu petrolētera šķīduma (no 5.3.1. vai 5.3.2. punkta) ar pipeti pārnēs 250 ml bumbierveida kolbā (4.2.4. punkts). Rotācijas iztvaicētājā (4.1. punkts) samazinātā spiedienā ūdens vannas temperatūrā, kas nepārsniedz 40 °C, iztvaicē šķīdinātāju, līdz tas ir gandrīz sauss. Atjauno atmosfēras spiedienu, pievienojot slāpekli (3.9. punkts), un izņem kolbu no rotācijas iztvaicētāja. Atlikušo šķīdinātāju atdala ar slāpekļa (3.9. punkts) plūsmu un tūlīt izšķīdina atlikumu noteiktā tilpumā (10–100 ml) metanola (3.3. punkts) (DL- α -tokoferola koncentrācijai jābūt diapazonā no 5 µg/ml līdz 30 µg/ml).

5.5. *Noteikšana ar HPLC*

E vitamīnu atdala C₁₈ apgrieztās fāzes kolonnā (4.5.1. punkts) un koncentrāciju izmēra, izmantojot fluorescences detektoru (ierosa 295 nm, emisija 330 nm) vai UV detektoru (292 nm) (4.5.2. punkts).

Injicē alikvoto daļu (piemēram, 20 µl) šķīduma metilspirtā, kas iegūts 5.4. punktā, un eluē ar kustīgo fāzi (3.8. punkts). Aprēķina vairāku viena parauga šķīduma injekciju vidējo smailes augstumu (platību) un vairāku kalibrēšanas šķīdumu (5.6.2. punkts) injekciju vidējos smailes augstumus (platības).

HPLC nosacījumi

Orientējoši piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus.

Šķīdumu hromatogrāfa kolonna (4.5.1. punkts): 250 × 4 mm, C₁₈, 5 vai 10 µm iesaiņojums, vai līdzvērtīga

Kustīgā fāze (3.8. punkts): metanola (3.3. punkts) un ūdens maisījums, piemēram, 980 + 20 (v + v)

Plūsmas ātrums: 1–2 ml/min

Detektors (4.5.2. punkts): fluorescences detektors (ierosa 295 nm/emisija 330 nm) vai UV detektors (292 nm)

5.6. *Kalibrēšana (DL- α -tokoferola acetāts vai DL- α -tokoferols)*

5.6.1. DL- α -tokoferola acetāta standarts

5.6.1.1. Darba standartšķīduma sagatavošana

25 ml DL- α -tokoferola acetāta rezerves standartšķīduma (3.10.1. punkts) ar pipeti pārnēs 500 ml plakandibena vai koniskā kolbā (4.2.1. punkts) un hidrolizē, kā aprakstīts 5.2. punktā. Tad ekstrahē ar petrolēteri (3.2. punkts) saskaņā ar 5.3. punktu un papildina līdz 500 ml ar petrolēteri. Rotācijas iztvaicētājā iztvaicē 25 ml tāda ekstrakta (skatīt 5.4. punkts), līdz tas ir gandrīz sauss, ar slāpekļa plūsmu (3.9. punkts)

▼ **M9**

atdala atlikušo šķīdinātāju un atkārtoti izšķīdina atlikumu 25,0 mililitros metanola (3.3. punkts). Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 45,5 µg DL-α-tokoferola/ml, kas atbilst 50 µg DL-α-tokoferola acetāta/ml. Darba standartšķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

5.6.1.2. Kalibrēšanas šķīdumu un kalibrēšanas grafika sagatavošana

1,0, 2,0, 4,0 un 10,0 ml darba standartšķīduma ar pipeti pārnes 20 ml mērkolbās, papildina līdz zīmei ar metanolu (3.3. punkts) un samaisa. Minēto šķīdumu nominālās koncentrācijas ir 2,5, 5,0, 10,0 un 25,0 µg/ml DL-α-tokoferola acetāta, t. i., 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml un 22,8 µg/ml DL-α-tokoferola.

20 µl katra kalibrēšanas šķīduma injicē vairākas reizes un nosaka vidējos smailes augstumus (laukumus). Izmantojot vidējos smailes augstumus (laukumus), veido kalibrēšanas grafiku.

5.6.1.3. DL-α-tokoferola acetāta rezerves standartšķīduma (3.10.1. punkts) UV standartizācija

5,0 ml DL-α-tokoferola acetāta rezerves standartšķīduma (3.10.1. punkts) atšķaida ar etanolu līdz 25,0 ml un šā šķīduma UV spektru spektrofotometrā (4.6. punkts) salīdzina ar etanola (3.1. punkts) spektru intervālā no 250 nm līdz 320 nm.

Absorbcijas maksimums ir 284 nm:

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

Tādā atšķaidījumā jāiegūst ekstinkcijas vērtība no 0,84 līdz 0,88.

5.6.2. DL-α-tokoferola standarts

5.6.2.1. Darba standartšķīduma sagatavošana

Ar pipeti pārnes 2 ml DL-α-tokoferola rezerves standartšķīduma (3.11.1. punkts) 50 ml mērkolbā, izšķīdina metanolā (3.3. punkts) un papildina līdz zīmei ar metanolu. Šā šķīduma nominālā koncentrācija ir 40 µg DL-α-tokoferola/ml, kas atbilst 44,0 µg DL-α-tokoferola acetāta/ml. Darba standartšķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

5.6.2.2. Kalibrēšanas šķīdumu un kalibrēšanas grafika sagatavošana

1,0, 2,0, 4,0 un 10,0 ml darba standartšķīduma ar pipeti pārnes 20 ml mērkolbās, papildina līdz zīmei ar metanolu (3.3. punkts) un samaisa. Minēto šķīdumu nominālās koncentrācijas ir 2,0, 4,0, 8,0 un 20,0 µg/ml DL-α-tokoferola, t. i., 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml un 22,0 µg/ml DL-α-tokoferola acetāta.

20 µl katra kalibrēšanas šķīduma injicē vairākas reizes un nosaka vidējos smailes augstumus (laukumus). Izmantojot vidējos smailes augstumus (laukumus), veido kalibrēšanas grafiku.

5.6.2.3. DL-α-tokoferola rezerves standartšķīduma (3.11.1. punkts) UV standartizācija

2,0 ml DL-α-tokoferola rezerves standartšķīduma (3.11.1. punkts) atšķaida ar etanolu līdz 25,0 ml un šā šķīduma UV spektru spektrofotometrā (4.6. punkts) salīdzina ar etanola (3.1. punkts) spektru intervālā no 250 nm līdz 320 nm. Absorbcijas maksimums ir 292 nm:

▼ **M9**

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

Tādā atšķaidījumā jāiegūst ekstinkcijas vērtība 0,6.

6. Rezultātu aprēķināšana

Ņemot vērā parauga šķīduma E vitamīna smaiļu vidējo augstumu (laukumu), nosaka parauga šķīduma koncentrāciju µg/ml (aprēķinātu kā α-tokoferola acetātu), izmantojot kalibrēšanas grafiku (5.6.1.2 vai 5.6.2.2. punkts).

E vitamīna saturu *w* (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} [\text{mg/kg}]$$

kur:

c = E vitamīna koncentrācija (kā α-tokoferola acetāts) parauga šķīdumā (5.4. punkts) µg/ml,

*V*₁ = parauga šķīduma (5.4. punkts) tilpums mililitros,

*V*₂ = paņemtās alikvotās daļas tilpums (5.4. punkts) ml,

m = analizējamā parauga svars gramos.

7. Novērojumi

7.1. Paraugiem E vitamīna koncentrāciju var būt lietderīgi apvienot divu pārziepjošanas reižu petrolētera ekstraktus (svērtais daudzums 25 g) vienā parauga šķīdumā *HPLC* noteikšanai.

7.2. Analīzei paņemtā parauga svarā nav vairāk par 2 g tauku.

7.3. Ja fāzes neatdalās, tad pievieno apmēram 10 ml etanola (3.1. punkts), lai izjauktu emulsiju.

7.4. Kad ir veikti DL-α-tokoferola acetāta vai DL-α-tokoferola šķīduma spektrofotometriskie mērījumi (saskaņā ar attiecīgi 5.6.1.3. vai 5.6.2.3. punktu), šķīdumam (3.10.1. vai 3.10.2. punkts) pievieno apmēram 10 mg BHT (3.12. punkts) un tur šķīdumu ledusskapī (ne ilgāk par četrām nedēļām).

7.5. BHT vietā var izmantot hidrohinonu.

7.6. Izmantojot normālās fāzes kolonnu, var atdalīt α-, β-, γ- un δ-tokoferolu.

7.7. Nātrija askorbāta šķīduma vietā var izmantot apmēram 150 mg askorbīnskābes.

7.8. Nātrija sulfīda šķīduma vietā var izmantot apmēram 50 mg *EDTA*.

7.9. E vitamīna acetāts sārmainos apstākļos hidrolizējas ļoti ātri, tāpēc ir ļoti jutīgs pret oksidāciju, jo īpaši tādu mikroelementu klātbūtnē kā dzelzs vai varš. Ja E vitamīnu nosaka premiksos, kuros vitamīna daudzums pārsniedz 5 000 mg/kg, tad rezultātā E vitamīns var noārdīties. Tāpēc apstiprinājumam jāiesaka metode, kurā ietilpst E vitamīna preparāta enzimatiskā šķelšana, neveicot sārmainās pārziepjošanas posmu.

▼ M9

8. Atkārtojamība

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās paralēlās noteikšanās, kuras veiktas ar vienu paraugu, nedrīkst pārsniegt 15 % attiecībā pret lielāko rezultātu.

9. Salīdzinošā pētījuma rezultāti ⁽¹⁾

	Premikss	Premiksa barība	Minerālu koncentrāts	Proteīnu barība	Sivēnu barība
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
vidējais [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: laboratoriju skaits,

n: atsevišķo vērtību skaits,

s_r: atkārtojamības standartnovirze,

s_R: reproducējamības standartnovirze,

r: atkārtojamība,

R: reproducējamība,

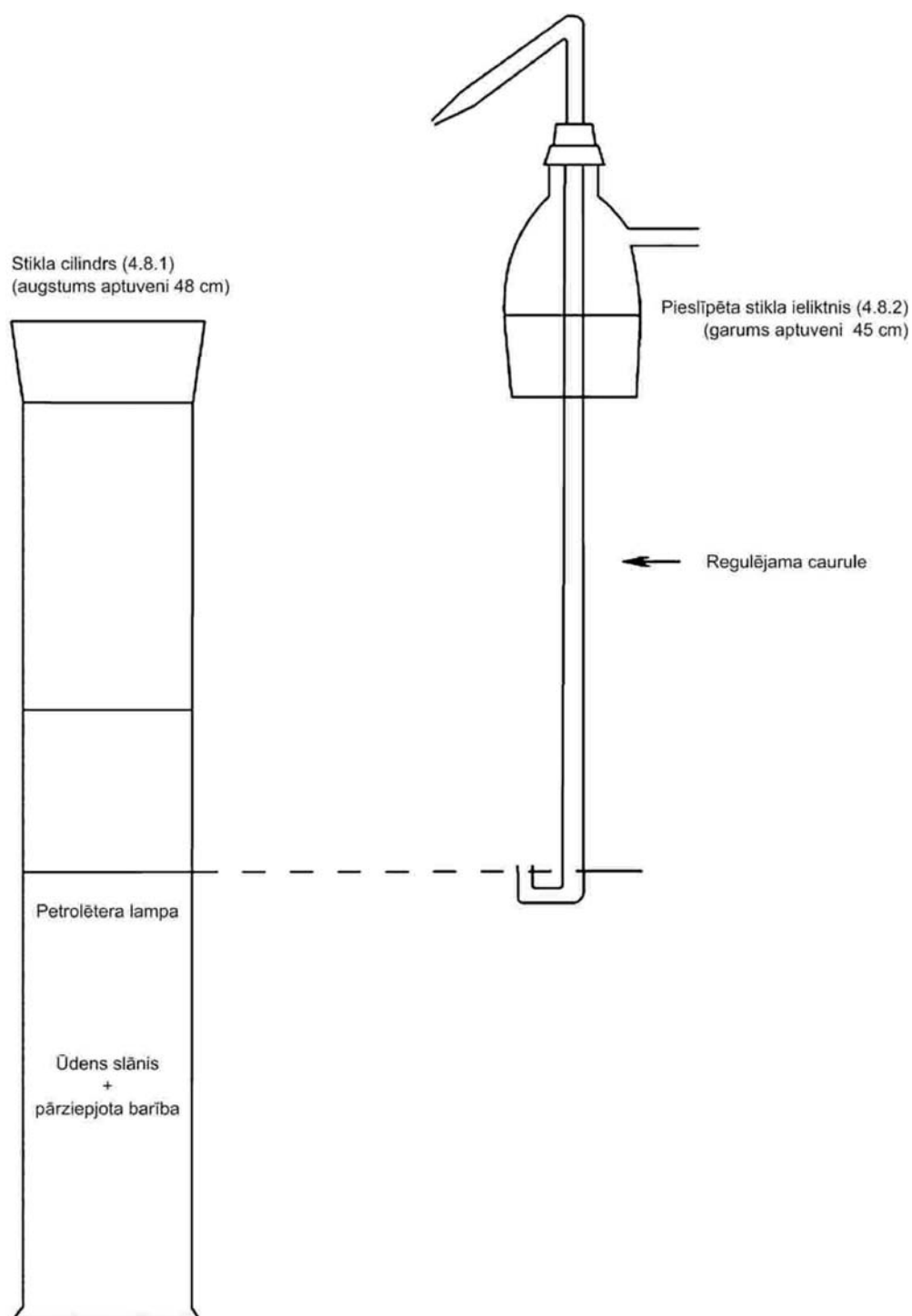
CV_r: atkārtojamības variācijas koeficients,

CV_R: reproducējamības variācijas koeficients.

⁽¹⁾ Veica Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) Barības darba grupa.

▼ **M9**

2. attēls

Ekstrakcijas aparāts (4.8. punkts)

▼ **M9****C. MIKROELEMENTU – DZELZS, VARA, MANGĀNA UN CINKA – NOTEIKŠANA**

Dzelzs, vara, mangāna un cinka saturs jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 15510 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Kalcija, nātrija, fosfora, magnija, kālija, dzelzs, cinka, vara, mangāna, kobalta, molibdēna un svina noteikšana, izmantojot *ICP-AES* metodi”, vai
- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 15621 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Kalcija, nātrija, fosfora, magnija, kālija, sēra, dzelzs, cinka, vara, mangāna un kobalta noteikšana pēc spiediena sadalīšanas, izmantojot *ICP-AES* metodi, vai
- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17053 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Mikroelementu, smago metālu un citu elementu noteikšana barībā, izmantojot *ICP-MS* metodi (multimetodi)”, vai
- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN ISO 6869 “Dzīvnieku barība. Kalcija, vara, dzelzs, magnija, mangāna, kālija, nātrija un cinka noteikšana. Metode, kurā izmanto atomu absorbcijas spektrometriju”, vai
- atomu absorbcijas spektrometrijas (*FAAS*) metodi, kas aprakstīti no 1. līdz 8. punktam.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt barībā mikroelementus – dzelzi, varu, mangānu un cinku ⁽¹⁾. Kvantitatīvās noteikšanas robežas ir šādas:

- dzelzs (Fe): 20 mg/kg,
- varš (Cu): 10 mg/kg,
- mangāns (Mn): 20 mg/kg,
- cinks (Zn): 20 mg/kg.

2. Princips

Pēc organisko vielu noārdīšanās, ja tādas ir, paraugu izšķīdina sāls-skābē. Dzelzi, varu, mangānu un cinku pēc attiecīgas atšķaidīšanas nosaka atomu absorbcijas spektrometrija.

3. Reāģenti*Ievadpiezīmes*

Reāģentu un analītisko šķīdumu gatavošanā lieto dejonizētu ūdeni, ko iegūst, divreiz destilējot ūdeni borsilikātskābes destilācijas iekārtā vai kvarca destilācijas iekārtā vai divreiz apstrādājot ar jonu apmaiņas sveķiem.

Reāģentiem jābūt vismaz analītiski tīriem. Tas, ka nosakāmā elementa nav, jāpārbauda tukšajā eksperimentā. Vajadzības gadījumā reāģenti vēl jāattīra.

⁽¹⁾ Šī metode ir validēta kopīgā izmēģinājumā attiecībā uz dažādām barības matricām. Plašāku informāciju skatīt vietnē <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

Turpmāk aprakstīto standartšķīdumu vietā var izmantot komerciālus standartšķīdumus, ja tiem ir garantija un tie pirms izmantošanas ir pārbaudīti.

- 3.1. Sālsskābe (blīvums 1,19 g/ml).
- 3.2. Sālsskābe (6 mol/l).
- 3.3. Sālsskābe (0,5 mol/l).
- 3.4. Fluorūdeņražskābe (38–40 % (v/v)), kurā dzelzs (Fe) saturs ir mazāks par 1 mg/litrā un atlikums pēc iztvaicēšanas ir mazāks par 10 mg (kā sulfāta)/litrā.
- 3.5. Sērskābe (blīvums 1,84 g/ml).
- 3.6. Ūdeņraža peroksīds (apmēram 100 skābekļa tilpumi (30 % no svara)).
- 3.7. Šādi sagatavots standarta dzelzs šķīdums (1 000 µg Fe/ml) vai līdzvērtīgs tirdzniecībā pieejams šķīdums: izšķīdina 1 g dzelzs stieples 200 mililitros 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts), pievieno 16 ml ūdeņraža peroksīda (3.6. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
 - 3.7.1. Darba standarta dzelzs šķīdums (100 µg Fe/ml), kas sagatavots, atšķaidot 1 daļu standarta šķīduma (3.7. punkts) ar 9 daļām ūdens.
- 3.8. Šādi sagatavots standarta vara šķīdums (1 000 µg Cu/ml) vai līdzvērtīgs tirdzniecībā pieejams šķīdums:
 - izšķīdina 1 g vara pulvera 25 mililitros 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts), pievieno 5 ml ūdeņraža peroksīda (3.6. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.8.1. Darba standarta vara šķīdums (10 µg Cu/ml), kas sagatavots, atšķaidot 1 daļu standarta šķīduma (3.8. punkts) ar 9 daļām ūdens un tad atšķaidot 1 daļu iegūtā šķīduma ar 9 daļām ūdens.
- 3.9. Šādi sagatavots standarta mangāna šķīdums (1 000 µg Mn/ml) vai līdzvērtīgs tirdzniecībā pieejams šķīdums:
 - izšķīdina 1 g mangāna pulvera 25 mililitros 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.9.1. Darba standarta mangāna šķīdums (10 µg Mn/ml), kas sagatavots, atšķaidot 1 daļu standarta šķīduma (3.9. punkts) ar 9 daļām ūdens un tad atšķaidot 1 daļu iegūtā šķīduma ar 9 daļām ūdens.
- 3.10. Šādi sagatavots standarta cinka šķīdums (1 000 µg Zn/ml) vai līdzvērtīgs tirdzniecībā pieejams šķīdums:
 - izšķīdina 1 g cinka pulvera 25 mililitros 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.
- 3.10.1. Darba standarta cinka šķīdums (10 µg Zn/ml), kas sagatavots, atšķaidot 1 daļu standarta šķīduma (3.10. punkts) ar 9 daļām ūdens un tad atšķaidot 1 daļu iegūtā šķīduma ar 9 daļām ūdens.
- 3.11. Lantāna hlorīda šķīdums: izšķīdina 12 g lantāna oksīda 150 mililitros ūdens, pievieno 100 ml 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts) un papildina līdz vienam litram ar ūdeni.

▼ **M9****4. Iekārtas**

- 4.1. Mufelkrāsns ar regulējamu temperatūru un, vēlams, pašrakstītāju.
- 4.2. Jālieto izturīgi borsilikātkstikla trauki, un ieteicams lietot iekārtu, kas paredzēta tikai mikroelementu noteikšanai.
- 4.3. Atomu absorbcijas spektrofotometrs, kas atbilst tām metodes prasībām, kuras attiecas uz jutību un precizitāti vajadzīgajā intervālā.

5. Procedūra ⁽¹⁾**5.1. Paraugi, kas satur organisku vielu****5.1.1. Pārņemšana un šķīduma sagatavošana analīzei ⁽²⁾**

- 5.1.1.1. Paraugu, kura svars ir 5–10 g un kas nosvērts ar 0,2 mg precizitāti, liek kvarca vai platīna tīgelī (skatīt b) piezīmi), žāvē žāvēšanas skapī 105 °C temperatūrā un liek tīgeli aukstajā mufelkrāsnī (4.1. punkts). Krāsni aizver (skatīt c) piezīmi) un apmēram 90 minūtēs pakāpeniski paaugstina temperatūru līdz 450–475 °C. Šo temperatūru uztur 4 līdz 16 stundas, piemēram, atstājot pa nakti, lai atdalītu oglekli saturošas vielas, tad atver krāsni un ļauj atdzist (skatīt d) piezīmi).

Samitrina pelnus ar ūdeni un pārnes tos 250 ml tilpuma vārglāzē. Tīgeli izmazgā ar apmēram 5 ml sālsskābes (3.1. punkts), ko lēni un uzmanīgi pievieno vārglāzes saturam (CO₂ veidošanās var izraisīt spēcīgu reakciju). Sakratot pa pilienam pievieno sālsskābi (3.1. punkts), līdz pārstāj veidoties burbuļi. Izlvaicē, līdz tas ir sauss, pa laikam apmaisot ar stikla stienīti.

Tad atlikumam pievieno 15 ml 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts) un pēc tam apmēram 120 ml ūdens. Maisa ar stikla stienīti, ko atstāj vārglāzē, un nosedz vārglāzi ar pulksteņstiklu. Lēni uzvāra un uztur viršanas temperatūrā, līdz vairs neredz, ka pelni izšķīst. Filtrē uz bezpelnu filtrpapīru un filtrātu savāc 250 ml tilpuma kolbā. Izmazgā vārglāzi un filtru ar 5 ml karstas 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts) un divreiz ar verdošu ūdeni. Uzpilda tilpuma kolbu līdz zīmei ar ūdeni (HCl koncentrācija apmēram 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Ja atlikums filtrā izskatās melns (ogleklis), tad to liek atpakaļ krāsnī un pārņemno vēlreiz 450–475 °C temperatūrā. Šī pārņemšana, kurai ir vajadzīgas tikai dažas (apmēram trīs līdz piecas) stundas, ir pabeigta, kad pelni izskatās balti vai gandrīz balti. Izšķīdina atlikumu

⁽¹⁾ Var izmantot citas šķelšanas metodes, ja ir pierādīts, ka tās uzrāda līdzīgus rezultātus (piemēram, šķelšana mikroviļņu spiedienā).

⁽²⁾ Rupjā lopbarība zaļmasā (svaiga vai kaltēta), kura var saturēt lielus daudzumus dārzeņu kvarca, kas var aizturēt mikroelementus un tāpēc ir jāatdala. Minēto barību paraugiem līdz ar to jāievēro šāda koriģēta procedūra. Veic 5.1.1.1. punktā minēto procedūru līdz filtrēšanai.

Divreiz ar verdošu ūdeni nomazgā filtrpapīru, kas satur nešķīstošo atlikumu, un ievieto to kvarca vai platīna tīgelī. Iedezina mufelkrāsni (4.1. punkts) temperatūrā, kas ir zem 550 °C, līdz viss oglekļa materiāls ir pilnībā izzudis. Ļauj atdzist, pievieno dažus pilienus ūdens un tad 10–15 ml fluorūdeņražskābes (3.4. punkts) un izlvaicē, līdz tas ir sauss, apmēram 150 °C temperatūrā. Ja atlikumā paliek kvarcs, tad to atkārtoti izšķīdina dažos mililitros fluorūdeņražskābes (3.4. punkts) un izlvaicē, līdz tas ir sauss. Pievieno dažus pilienus sērskābes (3.5. punkts) un karsē, līdz vairs nepaceļas balti dūmi. Pievieno 5 ml 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts), tad apmēram 30 ml ūdens, karsē, šķīdumu filtrē un ievieto 250 ml tilpuma kolbā, un papildina līdz zīmei ar ūdeni (HCl koncentrācija apmēram 0,5 mol/l). Pēc tam noteikšanu turpina no 5.1.2. punkta.

▼ **M9**

ar apmēram 2 ml sālsskābes (3.1. punkts), iztvaicē, līdz tas ir sauss, un pievieno 5 ml 6 mol/l sālsskābes (3.2. punkts). Sakarsē, šķīdumu filtrē un iepilda tilpuma kolbā, un papildina līdz zīmei ar ūdeni (HCl koncentrācija apmēram 0,5 mol/l).

Piezīmes:

- a) nosakot mikroelementus, ir svarīgi ņemt vērā kontaminācijas riskus, jo īpaši ar cinku, varu un dzelzi. Tāpēc paraugu gatavošanas iekārtai jābūt bez minētajiem metāliem.

Lai mazinātu vispārējo kontaminācijas risku, strādā bezputekļu atmosfērā ar ļoti tīrām iekārtām un kārtīgi izmazgātiem stikla traukiem. Cinka noteikšana ir īpaši jutīga pret daudzu veidu kontamināciju, piemēram, no stikla traukiem, reaģentiem, putekļiem u. tml.;

- b) pārpelnojamā parauga svaru aprēķina no aptuvenā mikroelementa satura barībā attiecībā pret izmantojamā spektrofotometra jutību. Ja barības mikroelementu saturs ir neliels, tad var būt jāsāk ar 10–20 g paraugu un galīgais šķīdums jāpapildina tikai līdz 100 ml;

- c) pārpelnošana jāveic slēgtā krāsnī bez gaisa vai skābekļa pieplūdes;

- d) pirometra rādītā temperatūra nedrīkst pārsniegt 475 °C.

5.1.2. Spektrofotometriskā noteikšana

5.1.2.1. Kalibrēšanas šķīdumu sagatavošana

Lai noteiktu katru elementu, no darba standartšķīdumiem, kas aprakstīti 3.7.1., 3.8.1., 3.9.1. un 3.10.1. punktā, pagatavo kalibrēšanas šķīdumus, kuru HCl koncentrācija ir 0,5 mol/l, un (dzelzij, mangānam un cinkam) lantāna hlorīda koncentrācija ir līdzvērtīga 0,1 % La (w/v).

Izvēlētajām mikroelementu koncentrācijām jāatrodas izmantotā spektrofotometra jutīguma intervālā. Tālāk tabulās ar piemēriem parādīts tipisku kalibrēšanas šķīdumu sastāvs; tomēr atkarībā no spektrofotometra jutības var būt jāizvēlas citas koncentrācijas.

Dzelzs

	0	0,5	1	2	3	4	5
µg Fe/ml							
ml darba standartšķīduma (3.7.1. punkts) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2. punkts)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantāna hlorīda šķīduma (3.11. punkts) un papildina līdz 100 ml ar ūdeni

▼ **M9****Varš**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml darba standartšķīduma (3.8.1. punkts) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2. punkts)	8	8	8	8	8	8	8

Mangāns

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml darba standartšķīduma (3.9.1. punkts) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2. punkts)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantāna hlorīda šķīduma (3.11. punkts) un papildina līdz 100 ml ar ūdeni

Cinks

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml darba standartšķīduma (3.10.1. punkts) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2. punkts)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantāna hlorīda šķīduma (3.11. punkts) un papildina līdz 100 ml ar ūdeni

5.1.2.2. Šķīduma sagatavošana analīzei

Vara noteikšanai parasti var tieši izmantot šķīdumu, kas sagatavots saskaņā ar 5.1.1. punktu. Ja tā koncentrācija jānoregulē atbilstīgi kalibrēšanas šķīdumu intervālam, tad alikvoto daļu ar pipeti var iepilināt 100 ml tilpuma kolbā un papildināt līdz zīmei ar 0,5 mol/l sālsskābi (3.3. punkts).

Dzelzs, mangāna un cinka noteikšanai saskaņā ar 5.1.1. punktu gatavotā šķīduma alikvoto daļu ar pipeti iepilina 100 ml tilpuma kolbā, pievieno 10 ml lantāna hlorīda šķīduma (3.11. punkts) un papildina līdz zīmei ar 0,5 mol/l sālsskābi (3.3. punkts) (skatīt arī 8. punktu "Novērojums").

5.1.2.3. Tukšais eksperiments

Tukšajam eksperimentam jāietver visi iepriekš paredzētie procedūras posmi, izņemot to, ka nav parauga materiāla. Kalibrēšanas šķīdumu "0" nedrīkst lietot kā tukšo šķīdumu.

5.1.2.4. Atomu absorbcijas mērīšana

Izmēra kalibrēšanas šķīdumu un analizējamā šķīduma atomu absorbciju, izmantojot oksidējošu gaisa-acetilēna liesmu šādos viļņu garumos:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Katru mērījumu veic četras reizes.

▼ M9**5.2. Minerālbarība**

Ja paraugā nav organisko vielu, tad iepriekšēja pārpalnošana nav vajadzīga. Rīkojas, kā aprakstīts 5.1.1.1. punktā, sākot no otrās daļas. Iztvaicēšanu ar fluorūdeņražskābi var neveikt.

6. Rezultātu aprēķināšana

Izmantojot kalibrēšanas līkni, aprēķina mikroelementu koncentrāciju analizējamajā šķīdumā un rezultātu izsaka mikroelementa miligramos uz parauga kilogramu (ppm).

7. Atkārtojamība

Viena laboranta divās paralēlās noteikšanās no viena parauga iegūtu rezultātu starpība nepārsniedz:

- 5 mg/kg no absolūtā lieluma, ja attiecīgā mikroelementa saturs ir līdz 50 mg/kg,
- 10 % no lielākā rezultāta, ja attiecīgā mikroelementa saturs ir no 50 līdz 100 mg/kg,
- 10 mg/kg no absolūtā lieluma, ja attiecīgā mikroelementa saturs ir no 100 līdz 200 mg/kg,
- 5 % no lielākā rezultāta, ja attiecīgā mikroelementa saturs pārsniedz 200 mg/kg.

8. Novērojums

Ja barībā ir daudz fosfātu, tas var traucēt noteikt dzelzi, mangānu un cinku. Tādu traucējumu var koriģēt, pievienojot lantāna hlorīda šķīdumu (3.11. punkts). Ja tomēr paraugā svara attiecība Ca + Mg/P ir > 2, tad lantāna hlorīda šķīdumu (3.11. punkts) analizējamajam šķīdumam un kalibrēšanas šķīdumiem var nepievienot.

D. HALOFUGINONA NOTEIKŠANA

DL-trans-7-brom-6-hlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]-hinazol in-4-(3H)-ona hidrobromīds

Halofuginona saturs jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibiotikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (LC-MS/MS)”, vai
- saskaņā ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķīduma hromato-grāfijas metodi (HPLC) ar UV noteikšanu, kā aprakstīts turpmāk no 1. līdz 8. punktam.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt halofuginona daudzumu barībā. Kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 1 mg/kg

2. Princips

Pēc apstrādes ar karstu ūdeni halofuginonu kā brīvu bāzi ekstrahē etilacetātā un pēc tam atdala kā hidrohlorīdu skābes ūdens šķīdumā. Ekstraktu attīra, izmantojot jonu apmaiņas hromatogrāfiju. Halofugi-nona saturu nosaka apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfijā (HPLC), izmantojot UV detektoru.

▼ **M9****3. Reāģenti**

- 3.1. Acetonitrils, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei.
- 3.2. Amberlīta XAD-2 sveķi.
- 3.3. Amonija acetāts.
- 3.4. Etilacetāts.
- 3.5. Ledus etiķskābe.
- 3.6. Halofuginona standartviela (DL-trans-7-brom-6-hlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]-hinazolīn-4-(3H)-ona hidrobromīds, E 764).
 - 3.6.1. Halofuginona rezerves standartšķīdums, 100 µg/ml

Ar 0,1 mg precizitāti 500 ml mērkolbā iesver 50 mg halofuginona (3.6. punkts), izšķīdina amonija acetāta buferšķīdumā (3.18. punkts), papildina līdz zīmei ar buferšķīdumu un samaisa. Tumšā vietā 5 °C temperatūrā tādu šķīdumu var glabāt trīs nedēļas.
 - 3.6.2. Kalibrēšanas šķīdumi

100 ml mērkolbās iepilda attiecīgi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 un 6,0 ml rezerves standartšķīduma (3.6.1. punkts). Papildina līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.21. punkts) un samaisa. Minēto šķīdumu koncentrācija ir attiecīgi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 un 6,0 µg/ml halofuginona. Minētie šķīdumi jā sagatavo svaigi pirms izmantošanas.
- 3.7. Sālsskābe (ρ_{20} apmēram 1,16 g/ml).
- 3.8. Metanols.
- 3.9. Sudraba nitrāts.
- 3.10. Nātrija askorbāts.
- 3.11. Nātrija karbonāts.
- 3.12. Nātrija hlorīds.
- 3.13. *EDTA* (etilēndiamīntetraacetātskābe, dinātrija sāls).
- 3.14. Ūdens, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei.
- 3.15. Nātrija karbonāta šķīdums, $c = 10$ g/100 ml.
- 3.16. Ar hloru piesātināts nātrija karbonāta šķīdums, $c = 5$ g/100 ml.

Ūdenī izšķīdina 50 g nātrija karbonāta (3.11. punkts), atšķaida līdz vienam litram un pievieno nātrija hlorīdu (3.12. punkts), līdz šķīdums ir piesātināts.
- 3.17. Sālsskābe, apmēram 0,1 mol/l.

Ar ūdeni atšķaida 10 ml HCl (3.7. punkts) līdz vienam litram.
- 3.18. Amonija acetāta buferšķīdums, apmēram 0,25 mol/l.

Ūdenī (3.14. punkts) izšķīdina 19,3 g amonija acetāta (3.3. punkts) un 30 ml etiķskābes (3.5. punkts) un atšķaida līdz vienam litram.

▼ **M9**

- 3.19. Amberlīta XAD-2 sveķu sagatavošana.

Attiecīgu daudzumu amberlīta (3.2. punkts) mazgā ar ūdeni, līdz visi hlorīda joni ir atdalīti, par ko liecina noliētās ūdens fāzes sudraba nitrāta (3.20. punkts) tests. Pēc tam sveķus mazgā ar 50 ml metanola (3.8. punkts), metanolu nolej un sveķus glabā svaigā metanolā.

- 3.20. Sudraba nitrāta šķīdums, apmēram 0,1 mol/l.

Izšķīdina 0,17 g sudraba nitrāta (3.9. punkts) 10 mililitros ūdens.

- 3.21. *HPLC* kustīgā fāze.

500 ml acetonitrila (3.1. punkts) samaisa ar 300 ml amonija acetāta buferšķīduma (3.18. punkts) un 1 200 ml ūdens (3.14. punkts). Izmanojot etiķskābi (3.5. punkts), korigē pH līmeni līdz 4,3. Šķīdumu filtrē caur 0,22 µm filtru (4.8. punkts) un atgāzo (piemēram, 10 minūtes apstrādājot ar ultraskaņu). Slēgtā konteinerā tumsā tādu šķīdumu var glabāt vienu mēnesi.

4. **Iekārtas**

- 4.1. Ultraskaņas vanna.

- 4.2. Rotācijas iztvaicētājs.

- 4.3. Centrifūga.

- 4.4. *HPLC* iekārta, kurai ir ultravioletais detektors ar maināmu viļņu garumu vai diodes matricu detektors.

- 4.4.1. Šķīdumu hromatogrāfa kolonna, 300 × 4 mm, C₁₈, 10 µm iesaiņojums, vai līdzvērtīga.

- 4.5. Stikla kolonna (300 × 10 mm), kas aprīkota ar keramiskā stikla filtru un krānu.

- 4.6. 150 mm diametra stikla šķiedras filtri.

- 4.7. Membrānfiltri, 0,45 µm.

- 4.8. Membrānfiltri, 0,22 µm.

5. **Procedūra**

Piezīme. Halofuginons kā brīvā bāze ir nestabils sārmainos un etilacetāta šķīdumos. To neatstāj etilacetātā ilgāk par 30 minūtēm.

- 5.1. *Vispārīga informācija*

- 5.1.1. Lai pārbaudītu, ka barībā nav halofuginona un traucējošu vielu, analizē tukšo barības paraugu.

- 5.1.2. Atgūstamības testu veic, analizējot tukšo barības paraugu, kas pastiprināts, pievienojot tik daudz halofuginona, cik ir paraugā. Lai stiprinātu paraugu 3 mg/kg līmenī, 300 µl rezerves standartšķīduma (3.6.1. punkts) pievieno 10 gramiem tukšā barības parauga, samaisa un gaida 10 minūtes, tad pāriet pie ekstrakcijas posma (5.2. punkts).

Piezīme. Šīs metodes nolūkos tukšais barības paraugs ir tāda paša veida kā analizējamais paraugs, un analizē neuzrādās halofuginons.

▼ **M9**5.2. *Ekstrakcija*

Ar precizitāti līdz 0,1 g iesver 10 g sagatavotā parauga 200 ml centrifūgas mēģenē, pievieno 0,5 g nātrija askorbāta (3.10. punkts), 0,5 g EDTA (3.13. punkts) un 20 ml ūdens un samaisa. Mēģeni uz piecām minūtēm ieliek ūdens vannā (80 °C). Atdzesē līdz istabas temperatūrai, tad pievieno 20 ml nātrija karbonāta šķīduma (3.15. punkts) un samaisa. Tūlīt pievieno 100 ml etilacetāta (3.4. punkts) un ar roku kārtīgi sakrata 15 sekundes. Tad mēģeni uz trīs minūtēm ieliek ultraskaņas vannā (4.1. punkts) un atbrīvo aizbāzni. Centrifugē divas minūtes un caur stikla šķiedras filtru (4.6. punkts) etilacetāta fāzi dekantē 500 ml dalāmpiltuvē. Parauga ekstrakciju atkārto ar otru 100 ml etilacetāta devu. Apvienotos ekstraktus vienu minūti mazgā ar 50 ml nātrija karbonāta šķīduma, kas piesātināts ar nātrija hlorīdu (3.16. punkts), un nolej ūdens slāni.

Organisko slāni ekstrahē vienu minūti ar 50 ml sālsskābes (3.17. punkts). Apakšējo skābes slāni nolaiž 250 ml dalāmpiltuvē. Pusotru minūti ar vēl vienu 50 ml sālsskābes devu atkārtoti ekstrahē organisko slāni un to pievieno pirmajam ekstraktam. Apvienotos skābes ekstraktus mazgā ar 10 ml etilacetāta (3.4. punkts), svārstot apmēram 10 sekundes.

Ūdens slāni kvantitatīvi pārnes 250 ml apaļkolbā un nolaiž organisko fāzi. Izmantojot rotācijas iztvaicētāju (4.2. punkts), iztvaicē visu atlikušo etilacetātu no skābes šķīduma. Ūdens vannā temperatūra nedrīkst pārsniegt 40 °C. Apmēram 25 mbar vakuumā 38 °C viss etilacetāta atlikums atdalīsies apmēram piecās minūtēs.

5.3. *Attīrīšana*5.3.1. *Amberlīta kolonnas sagatavošana*

Katram parauga ekstraktam sagatavo XAD-2 kolonnu. 10 g sagatavotā amberlīta (3.19. punkts) pārnes uz stikla kolonnu (4.5. punkts) ar metanolu (3.8. punkts). Sveķu slāņa virspusē pieliek nelielu stikla vates tamponu. Notecina metanolu no kolonnas un sveķus mazgā ar 100 ml ūdens, plūsmu apturot, kad šķidrums sasniedz sveķu slāņa virsu. Desmit minūtes pirms izmantošanas ļauj kolonnai nostabilizēties. Kolonna nedrīkst izteciēt sausa.

5.3.2. *Parauga attīrīšana*

Ekstraktu (5.2. punkts) kvantitatīvi pārnes uz sagatavotās amberlīta kolonnas (5.3.1. punkts) augšgalu un eluē, nolejot eluātu. Eluācijas ātrums nedrīkst pārsniegt 20 ml/min. Apaļkolbu izskalo ar 20 ml sālsskābes (3.17. punkts) un ar saskalojumu mazgā sveķu kolonnu. Skābes šķīduma atlikumu izpūš ar gaisa strūklu. Nolej saskalojumus. Kolonnai pievieno 100 ml metanola (3.8. punkts) un 5–10 ml ļauj eluēties, savāc eluātu 250 ml apaļkolbā. Atlikušo metanolu atstāj 10 minūtes, lai nostabilizējas ar sveķiem, un turpina eluāciju ar ātrumu, kas nepārsniedz 20 ml/min, eluātu savāc tajā pašā apaļkolbā. Ar rotācijas iztvaicētāju (4.2. punkts) iztvaicē metanolu, ūdens vannā temperatūra nedrīkst pārsniegt 40 °C. Atlikumu kvantitatīvi pārnes 10 ml mērkolbā, izmantojot kustīgo fāzi (3.21. punkts). Papildina līdz zīmei ar kustīgo fāzi un samaisa. Alikvotu izfiltrē caur membrānfiltru (4.7. punkts). Šo šķīdumu pataupa HPLC noteikšanai (5.4. punkts).

▼ M9**5.4. HPLC noteikšana****5.4.1. Parametri**

Orientējoši piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus:

šķīdrumu hromatogrāfa kolonna (4.4.1. punkts),

HPLC kustīgā fāze (3.21. punkts),

plūsmas ātrums: 1,5–2 ml/min,

noteikšanas viļņa garums: 243 nm,

injekcijas tilpums 40 līdz 100 µl.

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes injicējot kalibrēšanas šķīdumu (3.6.2. punkts) ar koncentrāciju 3,0 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgus smailes augstumus (vai laukumus) un aizturlaikus.

5.4.2. Kalibrēšanas grafiks

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.6.2. punkts) injicē vairākas reizes un izmēra katrai koncentrācijai atbilstošos smailes augstumus (laukumus). Izveido kalibrēšanas grafiku, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu vidējos smailes augstumus vai laukumus un uz abscisu ass – atbilstīgās koncentrācijas µg/ml.

5.4.3. Parauga šķīdums

Injicē parauga ekstraktu (5.3.2. punkts) vairākas reizes, izmantojot to pašu tilpumu, kāds bija kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka halofuginona smaīļu vidējo smailes augstumu (laukumu).

6. Rezultātu aprēķināšana

Nosaka parauga šķīduma koncentrāciju µg/ml, ņemot vērā parauga šķīduma halofuginona smaīļu vidējo augstumu (laukumu), izmantojot kalibrēšanas grafiku (5.4.2. punkts).

Halofuginona saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

kur:

c : halofuginona koncentrācija parauga šķīdumā µg/ml,

m : analizējamā parauga svars gramos.

7. Rezultātu validācija**7.1. Identitāte**

Nosakāmās vielas identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analizē vai izmantojot diodes matricu detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.6.2. punkts) spektru, kura koncentrācija ir 6,0 µg/ml.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiska analīze

Parauga ekstraktu stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.6.2. punkts). Pievienotā halofuginona daudzumam jābūt tādām pašām kā aplēstajam halofuginona daudzumam, kas atrasts parauga ekstraktā.

▼ **M9**

Tikai halofuginona smailes augstumu palielina, ņemot vērā gan pievienoto daudzumu, gan ekstrakta atšķaidījumu. Smailes platumam pusē no tās maksimālā augstuma jābūt $\pm 10\%$ no sākotnējā platumā.

7.1.2. **Diodes matricu noteikšana**

Rezultātus novērtē atbilstoši šādiem kritērijiem:

- a) parauga maksimālās absorbcijas viļņa garumam un standarta spektriem, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, atklāšanas sistēmas izšķirtspējas noteiktajās robežās jābūt vienādiem. Diodes matricu detektoram minētās robežas parasti ir ± 2 nm;
- b) no 225 līdz 300 nm parauga un standartspektri, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir no 10% līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir ievērojama, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta absorbcijas;
- c) no 225 līdz 300 nm parauga ekstrakta kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kurās relatīvā absorbcija ir no 10% līdz 100 %. Atbilstība šim kritērijam ir ievērojama, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no spektra absorbcijas pīķa smailē.

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

7.2. **Atkārtotamība**

Rezultātu starpība starp divām paralēlām noteikšanām, kas veiktas ar vienu paraugu, nedrīkst pārsniegt 0,5 mg/kg, ja halofuginona saturs ir līdz 3 mg/kg.

7.3. **Atgūstamība**

Stiprināta tukšā parauga atgūstamība ir vismaz 80 %.

8. **Salīdzinošā pētījuma rezultāti**

Tika organizēts salīdzinošais pētījums ⁽¹⁾, kurā astoņas laboratorijas analizēja trīs paraugus.

Rezultāti

	A paraugs (tukšais) saņemot	B paraugs (rupja maluma milti)		C paraugs (granulas)	
		Saņemot	Pēc diviem mēnešiem	Saņemot	Pēc diviem mēnešiem
Vidējais [mg/kg]	NN	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

⁽¹⁾ *Analyst* 108, 1983. gads, 1252.–1256. lpp.

▼ M9

	A paraugs (tukšais) saņemot	B paraugs (rupja maluma milti)		C paraugs (granulas)	
		Saņemot	Pēc diviem mēnešiem	Saņemot	Pēc diviem mēnešiem
Atg. [%]		86	74	88	75

NN = nav noteikts,

S_R = reproducējamības standartnovirze,

CV_R = reproducējamības variācijas koeficients (%),

Atg. = atgūstamība (%).

E. ROBENIDĪNA NOTEIKŠANA

1,3-bis [(4-hlorbenzilidēn)amino]guanidīna – hidrohlorīds

Robenidīna saturs jānosaka saskaņā ar

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibiotikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- saskaņā ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidruma hromato-grāfijas metodi (*HPLC*) ar UV noteikšanu, kā aprakstīts turpmāk no 1. līdz 8. punktam.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt robenidīna daudzumu barībā. Kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 5 mg/kg

2. Princips

Paraugu ekstrahē ar paskābinātu metanolu. Ekstraktu žāvē un alikvoto daļu attīra uz alumīnija oksīda kolonnas. Robenidīnu no kolonnas eluē ar metanolu, kas ir koncentrēts un papildināts līdz attiecīgam tīlpumam ar kustīgo fāzi. Robenidīna saturu nosaka apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijā (*HPLC*), izmantojot UV detek-toru.

3. Reaģenti

3.1. Metanols.

3.2. Paskābināts metanols.

4,0 ml sālskābes (p20 = 1,18 g/ml) pārnes 500 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar metanolu (3.1. punkts) un samaisa. Minēto šķīdumu saga-tavo svaigu pirms izmantošanas.

3.3. Acetonitrils, ekvivalents HPLC tīrības pakāpei.

3.4. Molekulārais siets.

3A tips, ar 8 līdz 12 acojuma graudiņiem (1,6 līdz 2,5 mm graudiņi, kristālisks alumosilikāts, poru diametrs 0,3 mm).

3.5. I aktivitātes pakāpes skābs alumīnija oksīds kolonnu hromatogrāfijai.

▼ **M9**

100 ml alumīnija oksīda pārnēs piemērotā konteinerā un pievieno 2,0 ml ūdens. Noslēdz ar aizbāzni un krata apmēram 20 minūtes. Glabā cieši noslēgtā konteinerā.

- 3.6. Kālija dihidrogēnfosfāta šķīdums, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Izšķīdina 3,40 g kālija dihidrogēnfosfāta tīrības pakāpes ūdenī (*HPLC* tīrības pakāpe) 1 000 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei un samaisa.

- 3.7. Dinātrija hidrogēnfosfāta šķīdums, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Izšķīdina 3,55 g bezūdens (vai 4,45 g dihidrāta, vai 8,95 g dodekahidrāta) dinātrija hidrogēnfosfāta tīrības pakāpes ūdenī (līdzvērtīga *HPLC* tīrības pakāpei) viena litra mērkolbā, papildina līdz zīmei un samaisa.

- 3.8. *HPLC* kustīgā fāze.

Samaisa kopā ar šādiem reaģentiem:

650 ml acetonitrila (3.3. punkts),

250 ml ūdens (ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei),

50 ml kālija dihidrogēnfosfāta šķīduma (3.6. punkts),

50 ml dinātrija hidrogēnfosfāta šķīduma (3.7. punkts).

Šķīdumu filtrē caur 0,22 μm filtru (4.6. punkts) un atgāzo (piemēram, 10 minūtes apstrādājot ar ultraskaņu).

- 3.9. Standartviela.

Tīrs robenidīns: 1,3-bis [(4-hlorbenzilizidēn)amino]guanidīna-hidrohlorīds.

- 3.9.1. Robenidīna rezerves standartšķīdums: 300 $\mu\text{g/ml}$

Ar precizitāti līdz 0,1 mg iesver 30 mg robenidīna standartvielas (3.9. punkts). Izšķīdina paskābinātā metanolā (3.2. punkts) 100 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju un samaisa. Ietin kolbu alumīnija folijā un glabā tumšā vietā.

- 3.9.2. Robenidīna starpposma standartšķīdums: 12 $\mu\text{g/ml}$

10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.9.1. punkts) pārnēs 250 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.8. punkts) un samaisa. Ietin kolbu alumīnija folijā un glabā tumšā vietā.

- 3.9.3. Kalibrēšanas šķīdumi

50 ml mērkolbās pārnēs 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 un 25,0 ml starpposma standartšķīduma (3.9.2. punkts). Papildina līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.8. punkts) un samaisa. Minētie šķīdumi atbilst attiecīgi 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 un 6,0 $\mu\text{g/ml}$ robenidīna. Minētie šķīdumi jāsaņem svaigi pirms izmantošanas.

- 3.10. Ūdens ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei.

4. **Iekārtas**

- 4.1. Stikla kolonna.

Izgatavota no brūnā stikla, aprīkota ar krānu un rezervuāru, kura tilpums ir apmēram 150 ml, iekšējais diametrs no 10 līdz 15 mm, garums 250 mm.

▼ **M9**

- 4.2. Mehāniskais kratītājs vai magnētiskais maisītājs.
- 4.3. Rotācijas iztvaicētājs.
- 4.4. *HPLC* iekārta, kurai ir ultravioletais detektors ar maināmu viļņu garumu vai diodes matricu detektors, kas darbojas 250 līdz 400 mm diapazonā.
- 4.4.1. Šķīdumu hromatogrāfa kolonna, 300 × 4 mm, C₁₈, 10 μm iesaiņojums, vai līdzvērtīga.
- 4.5. Stikla šķiedras filtrpapīrs (GF/A Watmans vai līdzvērtīgs).
- 4.6. Membrānfilttri, 0,22 μm.
- 4.7. Membrānfilttri, 0,45 μm.

5. **Procedūra**

Piezīme. Robenidīns ir gaismjutīgs. Visās darbībās izmanto brūnā stikla traukus.

5.1. *Vispārīga informācija*

- 5.1.1. Lai pārbaudītu, ka barībā nav robenidīna un traucējošu vielu, analizē tukšo barības paraugu.

- 5.1.2. Atgūstamības testu veic, analizējot tukšo barības paraugu (5.1.1. punkts), kas pastiprināts, pievienojot tik daudz robenidīna, cik ir paraugā. Lai pastiprinātu paraugu līdz līmenim 60 mg/kg, 3,0 ml rezerves standartšķīduma (3.9.1. punkts) pārnes 250 ml koniskā kolbā. Slāpekļa plūsmā šķīdumu iztvaicē līdz apmēram 0,5 ml. Pirms ekstrakcijas (5.2. punkts) pievieno 15 g tukšā barības parauga, samaisa un atstāj uz 10 minūtēm.

Piezīme. Šīs metodes nolūkos tukšais barības paraugs ir tāda paša veida kā analizējamais paraugs, un analizē neuzrādās robenidīns.

5.2. *Ekstrakcija*

Ar precizitāti līdz 0,01 g iesver apmēram 15 g sagatavotā parauga. Pārnes 250 ml koniskā kolbā un pievieno 100,0 ml paskābināta metanola (3.2. punkts), aiztaisa ar aizbāzni un krata vienu stundu kratītājā (4.2. punkts). Izfiltrē šķīdumu caur stikla šķiedras filtrpapīru (4.5. punkts) un visu filtrātu savāc 150 ml koniskā kolbā. Pievieno 7,5 g molekulārā sieta (3.4. punkts), aiztaisa ar aizbāzni un krata piecas minūtes. Tūlīt izfiltrē caur stikla šķiedras filtrpapīru. Minēto šķīdumu saglabā attīrīšanas posmam (5.3. punkts).

5.3. *Attīrīšana*

5.3.1. Alumīnija oksīda kolonnas sagatavošana

Nelielu stikla vates tamponu ieliek stikla kolonnas (4.1. punkts) apakšējā galā un saspiež ar stikla spieķīti. Iesver 11,0 g sagatavotā alumīnija oksīda (3.5. punkts) un pārnes kolonnā. Šajā posmā pēc iespējas samazina gaisa iedarbību. Viegli uzsit pa uzpildīto kolonnu tās apakšējā galā, lai alumīnija oksīds sablīvētos.

▼ **M9**5.3.2. **Parauga attīrīšana**

Ar pipeti pārnes kolonnā 5,0 ml parauga ekstrakta, kas sagatavots saskaņā ar (5.2. punkts). Pipetes galu pieliek klāt kolonnas sienai un ļauj, lai šķīdums absorbējas uz alumīnija oksīda. Robenidīnu no kolonnas eluē ar 100 ml metanola (3.1. punkts) ar plūsmas ātrumu no 2 līdz 3 ml/minūtē un savāc eluātu 250 ml apaļkolbā. Ar rotācijas iztvaicētāju (4.3. punkts) iztvaicē metanola šķīdumu līdz sausam stāvoklim 40 °C temperatūrā pazeminātā spiedienā. Atlikumu no jauna izšķīdina 3 līdz 4 mililitros kustīgās fāzes (3.8. punkts) un kvantitatīvi pārnes 10 ml mērkolbā. Kolbu izskalo ar vairākām 1 līdz 2 ml kustīgās fāzes devām un saskalojumus pārnes uz mērkolbu. Papildina līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju un samaisa. Alikvotu izfiltrē caur 0,45 µm membrānfiltru (4.7. punkts). Šo šķīdumu pataupa noteikšanai (5.4. punkts).

5.4. **HPLC noteikšana**5.4.1. **Parametri**

Orientējoši piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus:

šķīdumu hromatogrāfa kolonna (4.4.1. punkts),

HPLC kustīgā fāze (3.8. punkts),

plūsmas ātrums: plūsmas ātrums 1,5 līdz 2 ml/min,

detektora viļņa garums 317 nm,

injekcijas tilpums 20 līdz 50 µl.

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes injicējot kalibrēšanas šķīdumu (3.9.3. punkts) ar koncentrāciju 3,6 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgus smailes augstumus un aizturlaikus.

5.4.2. **Kalibrēšanas grafiks**

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.9.3. punkts) injicē vairākas reizes un izmēra katrai koncentrācijai atbilstošos smailes augstumus (laukumus). Izveido kalibrēšanas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu vidējos smailes augstumus vai laukumus un uz abscisu ass – atbilstīgās koncentrācijas µg/ml.

5.4.3. **Parauga šķīdums**

Injicē parauga ekstraktu (5.3.2. punkts) vairākas reizes, izmantojot to pašu tilpumu, kāds bija kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka robenidīna smailes vidējo smailes augstumu (laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Nemot vērā parauga šķīduma robenidīna smailes vidējo augstumu (laukumu), nosaka parauga šķīduma koncentrāciju µg/ml, izmantojot kalibrēšanas grafiku (5.4.2. punkts).

Robenidīna saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

▼ **M9**

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

kur:

c = robenidīna koncentrācija parauga šķīdumā µg/ml,

m = analizējamā parauga svars gramos.

7. Rezultātu validācija

7.1. Identitāte

Nosakāmās vielas identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analīzē vai izmantojot diodes matricu detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.9.3. punkts) spektru, kura koncentrācija ir 6 µg/ml.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiska analīze

Parauga ekstraktu stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.9.3. punkts). Pievienotā robenidīna daudzumam jābūt tādām pašām kā aplēstajam robenidīna daudzumam, kas atrasts parauga ekstraktā.

Tikai robenidīna smailes augstumu palielina, ņemot vērā gan pievienoto daudzumu, gan ekstrakta atšķaidījumu. Smailes platumam pusē no tās maksimālā augstuma jābūt apmēram 10 % no sākotnējā platuma.

7.1.2. Diodes matricu noteikšana

Rezultātus novērtē atbilstoši šādiem kritērijiem:

- a) parauga maksimālās absorbcijas viļņa garumam un standarta spektriem, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, atklāšanas sistēmas izšķirtspējas noteiktajās robežās jābūt vienādiem. Diodes matricu detektoram minētās robežas parasti ir apmēram 2 nm;
- b) no 250 līdz 400 nm parauga un standartspektri, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir no 10% līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir ievērota, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta absorbcijas;
- c) no 250 līdz 400 nm parauga ekstrakta kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kurās relatīvā absorbcija ir no 10% līdz 100 %. Atbilstība šim kritērijam ir ievērota, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no spektra absorbcijas pīķa smailē.

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

7.2. Atkārtotamība

Starpība starp rezultātiem, kas iegūti divās paralēlās noteikšanās, kuras veiktas ar vienu paraugu, nedrīkst pārsniegt 10 % no lielākā rezultāta attiecībā uz robenidīnu, kura saturs ir lielāks par 15 mg/kg.

▼ **M9**7.3. *Atgūstamība*

Stiprināta tukšā parauga atgūstamība ir vismaz 85 %.

8. **Salīdzinošā pētījuma rezultāti**

ES līmenī tika noorganizēts salīdzinošais pētījums, kurā 12 laboratorijas analizēja četrus saberztas vai granulu formas mājputnu un trušu barības paraugus. Visus paraugus analizēja divas reizes. Rezultāti ir norādīti šajā tabulā.

	Mājputnu barība		Trušu barība	
	Rupja maluma milti	Granulas	Rupja maluma milti	Granulas
Vidējais [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
Atgūstamība [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = atkārtojamības standartnovirze,

CV_r = atkārtojamības variācijas koeficients, %,

S_R = reproducējamības standartnovirze,

CV_R = reproducējamības variācijas koeficients, %.

F. DIKLAZURILA NOTEIKŠANA

(+)-4-hlorfenil [2,6-dihlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazīn-2-il)fenil] acetonitrils

Diklazurila saturs jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskontaminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu vienas antibiotikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisījumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- trīspakāpju gradienta apgrieztās fāzes augstas efektivitātes šķidruma hromatogrāfiju (*HPLC*) ar UV detektoru, kā aprakstīts turpmāk no 1. līdz 9. punktam.

1. **Mērķis un tvērums**

Šī metode ļauj noteikt diklazurila daudzumu barības maisījumos un premiksos ⁽¹⁾. Noteikšanas robeža ir 0,1 mg/kg, kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 0,5 mg/kg. Kvantitatīvās noteikšanas apakšējās robežas ir sasniedzamas, taču tas jāvalidē lietotājam.

2. **Princips**

Pievieno iekšējo standartu, tad paraugu ekstrahē ar paskābinātu metanolu. Barības ekstrakta alikvotu attīra, izmantojot C18 cietās fāzes ekstrakcijas kolonnu. Diklazurilu no kolonnas eluē ar paskābinātu metanola un ūdens

⁽¹⁾ Šo metodi var izmantot arī diklazurila noteikšanai barības sastāvdaļās.

▼ **M9**

maisījumu. Pēc iztvaicēšanas atlikumu izšķīdina DMF/ūdenī. Premiksiem ekstraktu iztvaicē un atlikumu izšķīdina DMF/ūdenī. Diklazurila saturu nosaka trīspakāpju gradienta apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfijā (*HPLC*), izmantojot UV detektoru.

3. **Reaģenti**

3.1. Ūdens, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei.

3.2. Amonija acetāts.

3.3. Tetrabutilamonija hidrogēnsulfāts (TBHS).

3.4. Acetonitrils, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei.

3.5. Metanols, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei

3.6. N, N-dimetilformamīds (DMFA).

3.7. Sālsskābe, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Standartviela: diklazurils: (+)-4-hlorfenil [2,6-dihlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazīn-2-il)fenil] acetonitrils ar garantētu tīrību.

3.8.1. Diklazurila rezerves standartšķīdums, 500 µg/ml.

Ar precizitāti līdz 0,1 mg 50 ml mērkolbā iesver 25 mg diklazurila standartvielas (3.8. punkts). Izšķīdina DMF (3.6. punkts), papildina līdz zīmei ar DMF (3.6. punkts) un samaisa. Ietin kolbu alumīnija folijā vai izmanto kolbu no brūnā stikla, uzglabā ledusskapī. Temperatūrā, kas ir ≤ 4 °C, šķīdumu var glabāt vienu mēnesi ⁽¹⁾.

3.8.2. Diklazurila standartšķīdums, 50 µg/ml.

5,00 ml rezerves standartšķīduma (3.8.1. punkts) pārnes 50 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar DMF (3.6. punkts) un samaisa. Ietin kolbu alumīnija folijā vai izmanto kolbu no brūnā stikla, uzglabā ledusskapī. Temperatūrā, kas ir ≤ 4 °C, šķīdumu var glabāt vienu mēnesi.

3.9. Iekšējā standartviela: 2,6 dihlor- α -(4-hlorfenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazīn-2 (3H) – il) α -metilbenzol-acetonitrils.

3.9.1. Iekšējās rezerves standartšķīdums, 500 µg/ml.

Ar precizitāti līdz 0,1 mg 50 ml mērkolbā iesver 25 mg iekšējās standartvielas (3.9. punkts). Izšķīdina DMF (3.6. punkts), papildina līdz zīmei ar DMF (3.6. punkts) un samaisa. Ietin kolbu alumīnija folijā vai izmanto kolbu no brūnā stikla, uzglabā ledusskapī. Temperatūrā, kas ir ≤ 4 °C, šķīdumu var glabāt vienu mēnesi.

3.9.2. Iekšējais standartšķīdums, 50 µg/ml

5,00 ml iekšējās rezerves standartšķīduma (3.9.1. punkts) pārnes 50 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar DMF (3.6. punkts) un samaisa. Ietin kolbu alumīnija folijā vai izmanto kolbu no brūnā stikla, uzglabā ledusskapī. Temperatūrā, kas ir ≤ 4 °C, šķīdumu var glabāt vienu mēnesi.

3.9.3. Iekšējais standartšķīdums premiksiem, p/1 000 mg/ml (p = diklazurila nominālais saturs premiksā mg/kg)

Ar precizitāti līdz 0,1 mg iesver p/10 mg iekšējās standartvielas 100 ml mērkolbā, izšķīdina DMF (3.6. punkts) ultraskaņas vannā (4.7. punkts), papildina līdz zīmei ar DMF un samaisa. Ietin kolbu alumīnija folijā vai izmanto kolbu no brūnā stikla, uzglabā ledusskapī. Temperatūrā, kas ir ≤ 4 °C, šķīdumu var glabāt vienu mēnesi.

⁽¹⁾ Var būt iespējams uzglabāt ilgāk (līdz 1 gadam), taču tas jāapstiprina katrai laboratorijai atsevišķi.

▼ **M9**

3.10. Kalibrēšanas šķīdumi

3.10.1. Kalibrēšanas šķīdums, 1 µg/ml (diklazarils)

Ar pipeti pārnes 1,00 ml diklazarila standartšķīduma (3.8.2. punkts) un 2,00 ml iekšējā standartšķīduma (3.9.2. punkts) 50 ml mērkolbā. Pievieno 17 ml DMF (3.6. punkts), papildina līdz zīmei ar ūdeni (3.1. punkts) un samaisa. Minētais šķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

3.10.2. Kalibrēšanas šķīdums, 2 µg/ml (diklazarils)

Ar pipeti pārnes 2,00 ml diklazarila standartšķīduma (3.8.2. punkts) un 2,00 ml iekšējā standartšķīduma (3.9.2. punkts) 50 ml mērkolbā. Pievieno 16 ml DMF (3.6. punkts), papildina līdz zīmei ar ūdeni (3.1. punkts) un samaisa. Minētais šķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

3.10.3. Kalibrēšanas šķīdums, 3 µg/ml (diklazarils)

Ar pipeti pārnes 3,00 ml diklazarila standartšķīduma (3.8.2. punkts) un 2,00 ml iekšējā standartšķīduma (3.9.2. punkts) 50 ml mērkolbā. Pievieno 15 ml DMF (3.6. punkts), papildina līdz zīmei ar ūdeni (3.1. punkts) un samaisa. Minētais šķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

3.10.4. Kalibrēšanas šķīdums, 4 µg/ml (diklazarils)

Ar pipeti pārnes 4,00 ml diklazarila standartšķīduma (3.8.2. punkts) un 2,00 ml iekšējā standartšķīduma (3.9.2. punkts) 50 ml mērkolbā. Pievieno 14 ml DMF (3.6. punkts), papildina līdz zīmei ar ūdeni (3.1. punkts) un samaisa. Minētais šķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

3.10.5. Kalibrēšanas šķīdums, 5 µg/ml (diklazarils)

Ar pipeti pārnes 5,00 ml diklazarila standartšķīduma (3.8.2. punkts) un 2,00 ml iekšējā standartšķīduma (3.9.2. punkts) 50 ml mērkolbā. Pievieno 13 ml DMF (3.6. punkts), papildina līdz zīmei ar ūdeni (3.1. punkts) un samaisa. Minētais šķīdums jāgatavo svaigs pirms izmantošanas.

Piezīme. Izmantojot pašreizējo protokolu, kalibrēšanas šķīdumi (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. un 3.10.5. punkts) aptver diklazarila koncentrāciju barībā diapazonā no 0,5 līdz 2,5 mg/kg.

3.11. C₁₈ cietās fāzes ekstrakcijas kolonna, piemēram, *Mega Bond Elut*, kuras izmērs ir 20 cc, sorbenta svars – 5 000 mg (priekšnoteikums saskaņā ar piegādātāja vadlīnijām).

3.12. Ekstrakcijas šķīdinātājs: paskābināts metanols.

Ar pipeti iepilina 5,0 ml sālsskābes (3.7. punkts) 1 000 mililitros metanola (3.5. punkts) un samaisa.

3.13. Kustīgā fāze priekš *HPLC*

3.13.1. A eluents: amonija acetāta-tetrabutilamonija hidrogēnsulfāta šķīdums.

Izšķīdina 5 g amonija acetāta (3.2. punkts) un 3,4 g TBHS (3.3. punkts) 1 000 mililitros ūdens (3.1. punkts) un samaisa.

3.13.2. B eluents: acetonitrils (3.4. punkts).

3.13.3. C eluents: metanols (3.5. punkts).

▼ **M9****4. Iekārtas**

- 4.1. Mehāniskais kratītājs.
- 4.2. Iekārta trīspakāpju gradienta *HPLC*.
- 4.2.1. Šķīdumu hromatogrāfa kolonna, *Hypersil ODS*, 3 µm iesaiņojums, 100 × 4,6 mm, vai līdzvērtīga.
- 4.2.2. UV detektors ar maināmu viļņu garumu vai diodes matricu detektors
- 4.3. Rotācijas iztvaicētājs.
- 4.4. Membrānfiltrs 0,45 µm.
- 4.5. Vienreizējās lietošanas šļirce, 5 ml
- 4.6. Vakuumlīnija
- 4.7. Ultraskaņas vanna.

5. Procedūra**5.1. *Vispārīga informācija*****5.1.1. Barības tukšais paraugs**

Lai pārbaudītu, ka barībā nav diklaurila un traucējošu vielu, analizē tukšo barības paraugu. Tukšais barības paraugs pēc veida ir līdzīgs analizējamajam paraugam, un, pārbaudot to, neuzrādās diklaurils vai noteikšanu traucējošas vielas.

5.1.2. Atgūstamības tests

Atgūstamības testu veic, analizējot tukšo barības paraugu, kas pastiprināts, pievienojot tik daudz diklaurila, cik ir paraugā. Lai paraugu pastiprinātu līdz 1 mg/kg, 50 g tukšajam barības paraugam pievieno 0,1 ml rezerves standartšķīduma (3.8.1. punkts), rūpīgi samaisa un atstāj uz 10 minūtēm, pirms ekstrakcijas (5.2. punkts) vairākas reizes rūpīgi samaisot.

Ja nav analizējamajam paraugam līdzīga tukšā barības parauga (skatīt 5.1.1. punktu), tad atgūstamības testu var veikt, izmantojot standarta piedevu metodi. Tādā gadījumā analizējamo paraugu pastiprina ar diklaurila daudzumu, kas ir līdzīgs analizējamajā paraugā jau esošajam daudzumam. Tādu paraugu analizē kopā ar nepastiprināto paraugu un atgūstamību aprēķina pēc starpības.

5.2. *Ekstrakcija***5.2.1. Barības maisījumi**

Ar precizitāti līdz 0,01 g iesver apmēram 50 g parauga. Pārnes 500 ml koniskā kolbā, pievieno 1,00 ml iekšējā standarta šķīduma (3.9.2. punkts), 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12. punkts), kolbu noslēdz ar aizbāzni. Maisījumu krata kratītājā (4.1. punkts) visu nakti. Ļauj nogulsnēties 10 minūtes. Pārnes šķīduma augšējā slāņa 20 ml alikvotu piemērotā stikla traukā un atšķaida ar 20 ml ūdens (3.1. punkts). Minēto šķīdumu pārnes uz ekstrakcijas kolonnu (3.11. punkts) un izlaiž cauri, izmantojot vakuumu (4.6. punkts). Kolonu mazgā ar 25 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12. punkts) un ūdens (3.1. punkts) maisījumu tilpuma attiecībās 65 + 35 (V + V). Savāktās frakcijas izlej un savienojumus eluē ar 25 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12. punkts) un ūdens maisījumu tilpuma attiecībās 80 + 20 (V + V). Šo frakciju iztvaicē sausu ar rotācijas iztvaicētāja (4.3. punkts) palīdzību 60 °C. temperatūrā. Atlikumu izšķīdina 1,0 ml DMF (3.6. punkts), pievieno 1,5 ml ūdens (3.1. punkts) un samaisa. Izfiltrē caur membrānfiltru (4.4. punkts), kas uzstādīts uz vienreizējās lietošanas šļirces (4.5. punkts). Pāriet pie noteikšanas (5.3. punkts).

▼ **M9**

5.2.2. Premiksi

Ar precizitāti līdz 0,001 g iesver apmēram 1 g parauga. Pārnes 500 ml koniskā kolbā, pievieno 1,00 ml iekšējā standarta šķīduma (3.9.3. punkts), 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.12. punkts), kolbu noslēdz ar aizbāzni. Maisījumu krata kratītājā (4.1. punkts) visu nakti. Ļauj nogulsnēties 10 minūtes. Šķīduma augšējā slāņa alikvotu 10 000/p ml (p = diklazurila nominālais saturs premiksā mg/kg) pārnes piemērotā izmēra apaļkolbā. Izlvaicē to sausu, izmantojot rotācijas izlvaicētāju (4.3. punkts), 60 °C temperatūrā. Atlikumu no jauna izšķīdina 10,0 ml DMF (3.6. punkts), pievieno 15,0 ml ūdens (3.1. punkts) un samaisa. Pāriet pie noteikšanas (5.3. punkts).

5.3. *HPLC noteikšana*

5.3.1. Parametri

Orientējoši piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus.

— Šķīdumu hromatogrāfa kolonna (4.2.1. punkts): 100 × 4,6 mm, *Hypersil ODS*, 3 μm iesaiņojums, vai līdzvērtīga

— Kustīgā fāze:

— A eluents (3.13.1. punkts): amonija acetāta un tetrabutilamonija hidrogēnsulfāta šķīdums ūdenī,

— B eluents (3.13.2. punkts): acetonitrils,

— C eluents (3.13.3. punkts): metanols.

— Eluācijas veids – lineārs gradients

— sākotnējie parametri: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ ($V + V + V$),

— pēc 10 min gradienta eluācijas 30 minūtēs līdz: $A + B + C = 45 + 20 + 35$ ($V + V + V$),

— pēc tam 10 minūtes skalo ar B.

— Plūsmas ātrums: 1,5–2 ml/min

— Injekcijas tilpums 20 μl

— Detektora viļņa garums 280 nm

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes injicējot kalibrēšanas šķīdumu (3.10.2. punkts), kas satur 2 μg/ml diklazurila un iekšējā standarta, līdz sasniedz nemainīgus smailes augstumus un aizturlaikus.

5.3.2. Kalibrēšanas šķīdumu hromatogrāfiskā analīze

Divas reizes injicē pa 20 μl no katra kalibrēšanas šķīduma (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. un 3.10.5. punkts), identificē un integrē diklazurila un iekšējā standarta pīķus un uzzīmē kalibrēšanas līkni, pamatojoties uz diklazurila vidējā smailes augstuma vai laukuma attiecību pret iekšējā standarta smailes vidējo augstumu vai laukumu pretstatā diklazurila koncentrācijai kalibrēšanas šķīdumos (μg/ml).

5.3.3. Paraugu šķīdumu hromatogrāfiskā analīze

Divas reizes injicē 20 μl parauga šķīduma (5.2.1. vai 5.2.2. punkts) un nosaka diklazurila vidējo smailes augstumu vai laukumu un iekšējā standarta smailes.

▼ M9

6. Rezultātu aprēķināšana

6.1. Barības maisījumi

Diklazurila saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ vai } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

kur:

- augstums (d,s) ir diklazurila smailes augstums parauga šķīdumā (5.2.1. punkts),
- laukums (d,s) ir diklazurila smailes laukums parauga šķīdumā (5.2.1. punkts),
- augstums (i,s) ir iekšējā standarta smailes augstums parauga šķīdumā (5.2.1. punkts),
- laukums (i,s) ir iekšējā standarta smailes laukums parauga šķīdumā (5.2.1. punkts),
- b ir tādas kalibrēšanas līknes krustpunkts, kas uzzīmēta, pamatojoties uz kalibrēšanas šķīdumiem (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. un 3.10.5. punkts) saskaņā ar 5.3.2. punktu,
- a ir tādas kalibrēšanas līknes slīpums, kas uzzīmēta, pamatojoties uz kalibrēšanas šķīdumiem (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. un 3.10.5. punkts) saskaņā ar 5.3.2. punktu,
- m ir analizējamā parauga masa gramos,
- V ir parauga ekstrakta galīgais tilpums mililitros pēc atkārtotas izšķīdināšanas saskaņā ar 5.2.1. punktu (t. i., 2,5 ml).

6.2. Premiksi

Diklazurila saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ vai } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

kur:

- augstums (d,s) ir diklazurila smailes augstums parauga šķīdumā (5.2.2. punkts),
- laukums (d,s) ir diklazurila smailes laukums parauga šķīdumā (5.2.2. punkts),
- augstums (i,s) ir iekšējā standarta smailes augstums kalibrēšanas šķīdumā (5.2.2. punkts),
- laukums (i,s) ir iekšējā standarta smailes laukums parauga šķīdumā (5.2.2. punkts),
- b ir tādas kalibrēšanas līknes krustpunkts, kas uzzīmēta, pamatojoties uz kalibrēšanas šķīdumiem (3.10.1, 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. un 3.10.5. punkts) saskaņā ar 5.3.2. punktu,
- a ir tādas kalibrēšanas līknes slīpums, kas uzzīmēta, pamatojoties uz kalibrēšanas šķīdumiem (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. un 3.10.5. punkts) saskaņā ar 5.3.2. punktu,
- m ir analizējamā parauga masa gramos,
- V ir parauga ekstrakta galīgais tilpums mililitros pēc atkārtotas izšķīdināšanas saskaņā ar 5.2.2. punktu (t. i., 25 ml),
- p ir diklazurila nominālais saturs mg/kg premiksā.

▼ **M9****7. Rezultātu validācija****7.1. Identitāte**

Nosakāmās vielas identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analīzē vai izmantojot diodes matricu detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta spektru (5.2.1. vai 5.2.2. punkts) ar kalibrēšanas šķīduma (3.10.2. punkts) spektru.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiska analīze

Parauga ekstraktu (5.2.1. vai 5.2.2. punkts) stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.10.2. punkts). Pievienotā diklaurila daudzumam jābūt tādā pašam kā aplēstajam diklaurila daudzumam, kas atrasts parauga ekstraktā.

Tikai diklaurila smailes augstumu un iekšējā standarta smailes augstumu palielina, ņemot vērā gan pievienoto daudzumu, gan ekstrakta atšķaidījumu. Smailes platumam pusē no tās augstuma jābūt $\pm 10\%$ robežās no diklaurila smailes sākotnējā platuma vai nepastiprināta parauga ekstrakta iekšējā standarta smailes sākotnējā platuma.

7.1.2. Diodes matricu noteikšana

Rezultātus novērtē atbilstoši šādiem kritērijiem:

- a) parauga maksimālās absorbcijas viļņa garumam un standarta spektriem, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, atklāšanas sistēmas izšķirtspējas noteiktajās robežās jābūt vienādiem. Diodes matricu detektoram minētās robežas parasti ir ± 2 nm;
- b) no 230 līdz 320 nm parauga un standartspektri, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir no 10 % līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir ievērota, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta;
- c) no 230 līdz 320 nm parauga ekstrakta kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kurās relatīvā absorbcija ir no 10 % līdz 100 %. Atbilstība šim kritērijam ir ievērota, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no absorbcijas vērtības pīķa smailē.

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

7.2. Atkārtotamība

No diviem apakšparaugiem divos neatkarīgos mērījumos iegūto rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

- 30 % no lielākās noteiktās vērtības, ja diklaurila saturs ir no 0,5 mg/kg līdz 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg, ja diklaurila saturs ir no 2,5 mg/kg līdz 5 mg/kg,
- 15 % no lielākās noteiktās vērtības, ja diklaurila saturs pārsniedz 5 mg/kg.

▼ M9

7.3. *Atgūstamība*

Stiprināta (tukšā parauga atgūstamība ir vismaz 80 %).

8. **Salīdzinošā pētījuma rezultāti**

Tika organizēti divi salīdzinošie pētījumi. Pirmajā pētījumā, ko 1994. gadā veica cita laboratoriju grupa, tika analizēti divi premiksu (O 100, A 100) paraugi un trīs mājputnu papildbarības (L1, Z1, K1) paraugi. Viens premiksa paraugs tika sajaukts ar organisku matricu (O 100), bet otrs ar neorganisku matricu (A 100). Teorētiskais saturs ir 100 mg diklazurila uz kg. Laboratorijām tika uzdots analizēt katru paraugu vienu reizi vai divos eksemplāros. (Sīkāka informācija par pirmo salīdzinošo ir pieejama žurnālā *Journal of AOAC International*, 77. sējums, Nr. 6, 1994. gads, 1359.–1361. lpp.).

Otrajā salīdzinošajā pētījumā tika analizēti trīs mājputnu barības maisījumi, kuros diklazurila koncentrācija bija 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2), un tukšais barības paraugs (MAT 3). Sīkāka informācija par otro pētījumu ir pieejama *JRC tehniskajā ziņojumā* (2016) un žurnālā *AOAC International*, 102. sējums, Nr. 2, 2019. gads, 646.–652. lpp. Abu salīdzinošo pētījumu rezultāti ir norādīti šajā tabulā.

	1. paraugs A 100	2. paraugs O 100	3. paraugs L1	4. paraugs Z1	5. paraugs K1	6. paraugs MAT 1	7. paraugs MAT 2	8. paraugs MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Vidējais (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Nominālais saturs (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Atsauce (*)	Pirmais pētījums, kas veikts 1994. gadā	Pirmais pētījums, kas veikts 1994. gadā	Pirmais pētījums, kas veikts 1994. gadā	Pirmais pētījums, kas veikts 1994. gadā	Pirmais pētījums, kas veikts 1994. gadā	Otrais pētījums, kas veikts 2015. gadā	Otrais pētījums, kas veikts 2015. gadā	Otrais pētījums, kas veikts 2015. gadā

L = laboratoriju skaits,

n = atsevišķo vērtību skaits,

S_r = atkārtotamības standartnovirze,

CV_r = atkārtotamības variācijas koeficients,

S_R = reproducējamības standartnovirze,

CV_R = reproducējamības variācijas koeficients (%),

LOQ = kvantitatīvās noteikšanas robeža.

(*) Pirmais pētījums, kas veikts 1994. gadā: *Journal of AOAC International*, 77. sējums, Nr. 6, 1994. gads, 1359.–1361. lpp.; otrais pētījums, kas veikts 2015. gadā: *JRC tehniskais ziņojums Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study* (2016).

▼ **M9****9. Vispārīgas piezīmes**

Vispirms jāparāda, ka diklazurila signāla izmaiņas mērāmo koncentrāciju diapazonā ir lineāras.

Vismaz diklazurila analīzei barības maisījumā ar augstu tauku saturu (ja tauku saturs pārsniedz 12 %) analītisko metodi var aizstāt ar citām metodēm, kuru pamatā ir *HPLC*, piemēram, augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju apvienojumā ar masspektrometriju (*HPLC-MS*) metodi, ja alternatīvajai metodei ir līdzvērtīgi veikspējas rādītāji (atgūstamības procents, atkārtojamības precizitāte un reproducējamības nosacījumi).

G. LAZALOCĪDNĀTRIJA NOTEIKŠANA

Poliētera monokarbonskābes nātrija sāls, kuru ražo Streptomyces lasaliensis

Lazalocīdnātrija saturs jānosaka saskaņā ar

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibiotikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- saskaņā ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķīduma hromato-grāfijas metodi (*HPLC*), izmantojot spektrofotometru (fluores-cences) detektoru, kā aprakstīts turpmāk no 1. līdz 8. punktam.

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt lazalocīdnātrija daudzumu barībā. Noteikšanas robeža ir 5 mg/kg, kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 10 mg/kg.

2. Princips

Lazalocīdnātriju no parauga ekstrahē ar paskābinātu metanolu un nosaka ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrā-fiju (*HPLC*), izmantojot spektrofotometru (fluorescences) detektoru.

3. Reāģenti

3.1. Kālija dihidrogēnfosfāts (KH_2PO_4).

3.2. Ortofosforskābe, w (w/w) = 85 %.

3.3. Ortofosforskābes šķīdums, c = 20 %.

Atšķaida 23,5 ml ortofosforskābes (3.2. punkts) līdz 100 ml tilpumam ar ūdeni.

3.4. 6-metil-2-heptilamīns (1,5-dimetilheksilamīns), w (w/w) = 99 %.

3.5. Metanols, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei

3.6. Sālsskābe, blīvums 1,19 g/ml.

3.7. Fosfāta buferšķīdums, c = 0,01 mol/l.

Izšķīdina 1,36 g KH_2PO_4 (3.1. punkts) 500 mililitros ūdens (3.11. punkts), pievieno 3,5 ml ortofosforskābes (3.2. punkts) un 10,0 ml 6-metil-2-heptilamīna (3.4. punkts). Koriģē pH līdz 4,0 ar ortofosforskābes šķīdumu (3.3. punkts) un atšķaida līdz 1 000 ml tilpumam ar ūdeni (3.11. punkts).

▼ M9

3.8. Paskābināts metanols.

5,0 ml sālsskābes (3.6. punkts) pārnes 1 000 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar metanolu (3.5. punkts) un samaisa. Minētais šķīdums jāsatavo svaigs pirms izmantošanas.

3.9. *HPLC* kustīgā fāze, fosfāta bufera-metanola šķīdums 5 + 95 (V + V).

Samaisa 5 ml fosfāta buferšķīduma (3.7. punkts) ar 95 ml metanola (3.5. punkts).

3.10. Lazalocīdnātrija standartviela ar garantētu tīrību, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (poliētera monokarbonskābes nātrija sāls, kuru ražo *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1. Lazalocīdnātrija rezerves standartšķīdums, 500 µg/ml.

Ar 0,1 mg precizitāti 100 ml mērkolbā iesver 50 mg lazalocīdnātrija (3.10. punkts), izšķīdina paskābinātā metanolā (3.8. punkts), papildina līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju un samaisa. Minētais šķīdums jāsatavo svaigs pirms izmantošanas.

3.10.2. Lazalocīdnātrija starpposma standartšķīdums, 50 µg/ml.

10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.10.1. punkts) ar pipeti pārnes 100 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar paskābināto metanolu (3.8. punkts) un samaisa. Minētais šķīdums jāsatavo svaigs pirms izmantošanas.

3.10.3. Kalibrēšanas šķīdumi

50 ml mērkolbās iepilda attiecīgi 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 un 10,0 ml starpposma standartšķīduma (3.10.2. punkts). Papildina līdz zīmei ar paskābināto metanolu (3.8. punkts) un samaisa. Minētie šķīdumi atbilst attiecīgi šādām lazalocīdnātrija koncentrācijām: 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 un 10,0 µg. Minētie šķīdumi jāsatavo svaigi pirms izmantošanas.

3.11. Ūdens, ekvivalents *HPLC* tīrības pakāpei.**4. Iekārtas**

4.1. Ultraskaņas vanna (vai vibrējoša ūdens vanna) ar temperatūras kontroli.

4.2. Membrānfiltrī, 0,45 µm.

4.3. *HPLC* iekārta ar injekcijas sistēmu, piemērota 20 µl tilpumu injekcijai.4.3.1. Šķidrumu hromatogrāfa kolonna, 125 × 4 mm, apgrieztās fāzes C_{18} , 5 µm iesaiņojums, vai līdzvērtīga.

4.3.2. Spektrofluorimetrs ar maināmu ierosas un emisijas viļņu garumu.

5. Procedūra5.1. *Vispārīga informācija*

5.1.1. Barības tukšais paraugs

Lai veiktu atpazīšanas testu (5.1.2. punkts), analizē tukšo barības paraugu, lai pārbaudītu, ka barībā nav ne lazalocīdnātrija, ne noteikšanu traucējošu vielu. Tukšais barības paraugs pēc veida ir līdzīgs analizējamajam paraugam, un, pārbaudot to, neuzrādās lazalocīdnātrijs vai noteikšanu traucējošas vielas.

▼ **M9**5.1.2. *Atgūstamības tests*

Atgūstamības testu veic, analizējot tukšo barības paraugu, kas pastiprināts, pievienojot tik daudz lazalocīdnātrija, cik ir paraugā. Lai paraugu pastiprinātu līdz līmenim 100 mg/kg, 10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.10.1. punkts) pārnes 250 ml koniskā kolbā un šķīdumu iztvaicē līdz apmēram 0,5 ml. Pirms ekstrakcijas (5.2. punkts) pievieno 50 g tukšā barības parauga, vairākas reizes kārtīgi samaisa un atstāj uz 10 minūtēm.

Ja nav analizējamajam paraugam līdzīga tukšā barības parauga (skatīt 5.1.1. punktu), tad atgūstamības testu var veikt, izmantojot standarta piedevu metodi. Tādā gadījumā analizējamo paraugu pastiprina ar lazalocīdnātrija daudzumu, kas ir līdzīgs analizējamajā paraugā jau esošajam daudzumam. Tādu paraugu analizē kopā ar nepastiprināto paraugu, un atgūstamību aprēķina pēc starpības.

5.2. *Ekstrakcija*5.2.1. *Barība*

Ar precizitāti līdz 0,01 mg iesver 5–10 g parauga 250 ml koniskā kolbā ar aizbāzni. Ar pipeti pievieno 100,0 ml paskābināta metanola (3.8. punkts). Valīgi aizkorķē korķi un pasvārsta, lai disperģējas. Kolbu uz 20 minūtēm ieliek ultraskaņas vannā (4.1. punkts) apmēram 40 °C temperatūrā, tad izņem un atdzesē līdz istabas temperatūrai. Ļauj nostāties apmēram vienu stundu, kamēr suspendētā viela nogulsņējas, tad alikvoto devu izfiltrē caur 0,45 µm membrānfiltu (4.2. punkts) piemērotā traukā. Pāriet pie noteikšanas (5.3. punkts).

5.2.2. *Premiksi*

Ar precizitāti līdz 0,001 g iesver apmēram 2 g nesamalta premiksa 250 ml mērkolbā. Ar pipeti pievieno 100,0 ml paskābināta metanola (3.8. punkts) un pasvārsta, lai disperģējas. Kolbu ar tās saturu uz 20 minūtēm ieliek ultraskaņas vannā (4.1. punkts) apmēram 40 °C temperatūrā, tad izņem un atdzesē līdz istabas temperatūrai. Atšķaida līdz zīmei ar paskābināto metanolu (3.8. punkts) un rūpīgi samaisa. Ļauj nostāties vienu stundu, kamēr suspendētā viela nogulsņējas, tad alikvoto devu izfiltrē caur 0,45 µm membrānfiltu (4.2. punkts). Atšķaida atbilstošu tilpumu tīrā filtrāta ar paskābinātu metanolu (3.8. punkts), izveidojot galīgā testa šķīdumu, kas satur apmēram 4 µg/ml lazalocīdnātrija. Pāriet pie noteikšanas (5.3. punkts).

5.3. *HPLC noteikšana*5.3.1. *Parametri*

Orientējoši piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus.

HPLC kolonna (4.3.1. punkts): 125 × 4 mm, apgrieztās fāzes C₁₈, 5 µm iesaiņojums, vai līdzvērtīga

Kustīgā fāze (3.9. punkts): fosfāta buferšķīduma (3.7. punkts) un metanola (3.5. punkts) maisījums, 5 + 95 (V + V)

Plūsmas ātrums: 1,2 ml/min

Noteikšanas viļņa garums: ierosa: 310 nm,
emisija: 419 nm,

Injekcijas tilpums: 20 µl

▼M9

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes injicējot kalibrēšanas šķīdumu (3.10.3. punkts) ar koncentrāciju 4,0 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgus smailes augstumus (vai laukumus) un aizturlaiku.

5.3.2. Kalibrēšanas grafiks

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.10.3. punkts) injicē vairākas reizes un izmēra katrai koncentrācijai atbilstošos smailes augstumus (laukumus). Izveido kalibrēšanas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot vidējos smailes augstumus (laukumus) un uz abscisu ass – atbilstīgās koncentrācijas µg/ml.

5.3.3. Parauga šķīdums

Vairākas reizes injicē parauga ekstraktus, kas iegūti saskaņā ar 5.2.1. vai 5.2.2. punktu, izmantojot to pašu tilpumu, kāds bija kalibrēšanas šķīdumam, un nosaka lazalocīdnātrija smailes vidējos augstumus (laukumus).

6. Rezultātu aprēķināšana

Lazalocīdnātrija šķīduma koncentrāciju (µg/ml) nosaka pēc parauga šķīduma (5.3.3. punkts) vidējā smailes augstuma (laukuma), salīdzinot ar kalibrēšanas grafiku.

6.1. Barība

Lazalocīdnātrija saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

c = lazalocīdnātrija koncentrācija parauga šķīdumā (5.2.1. punkts) µg/ml,

V_1 = parauga ekstrakta tilpums ml atbilstoši 5.2.1. punktam (t. i., 100 ml),

m = analizējamā parauga svars gramos.

6.2. Premiksi

Lazalocīdnātrija saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

kur:

c = lazalocīdnātrija koncentrācija parauga šķīdumā (5.2.2. punkts) µg/ml,

V_2 = parauga ekstrakta tilpums ml atbilstoši 5.2.2. punktam (t. i., 250 ml),

f = atšķaidījuma pakāpe atbilstoši 5.2.2. punktam,

m = analizējamā parauga svars gramos.

▼ **M9****7. Rezultātu validācija****7.1. Identitāte**

Metodes, kuru pamatā ir spektrofлуориметриja, interference ietekmē mazāk nekā tās, kur izmanto UV staru detektoru. Nosakāmās vielas identitāti var apstiprināt ar paralēlu hromatogrāfisko analīzi.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiska analīze

Parauga ekstraktu (5.2.1. vai 5.2.2. punkts) stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu A kalibrēšanas šķīduma (3.10.3. punkts). Pievienotā lazalocīdnātrija daudzumam jābūt tādā pašam kā aplēstajam lazalocīdnātrija daudzumam, kas atrasts parauga ekstraktā. Tikai lazalocīdnātrija smailes augstumu palielina, ņemot vērā pievienoto lazalocīdnātrija daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu. Smailes platumam pusē no tā augstuma jābūt $\pm 10\%$ robežās no nepastiprinātā parauga ekstrakta sākotnējās smailes.

7.2. Atkārtojamība

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

— 15 % no lielākās noteiktās vērtības, ja lazalocīdnātrija saturs ir no 30 mg/kg līdz 100 mg/kg,

— 15 mg/kg, ja lazalocīdnātrija saturs ir no 100 mg/kg līdz 200 mg/kg,

— 7,5 % no lielākās noteiktās vērtības, ja lazalocīdnātrija saturs pārsniedz 200 mg/kg.

7.3. Atgūstamība

Stiprināta (tukšā) barības parauga atgūstamība ir vismaz 80 %. Stiprinātu premiksu paraugu atgūstamība ir vismaz 90 %.

8. Salīdzinošā pētījuma rezultāti

Tika organizēts salīdzinošais pētījums (*), kurā 12 laboratorijas analizēja divus premiksus (1. un 2. paraugs) un piecus barības paraugus (3. līdz 7. paraugs). Visus paraugus analizēja divas reizes. Rezultāti ir norādīti šajā tabulā.

	1. paraugs Premikss vistām	2. paraugs Premikss tītariem	3. paraugs Granulas tītariem	4. paraugs Drupatas vistām	5. paraugs Barība tītariem	6. paraugs A barība mājputniem	7. paraugs B barība mājputniem
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Vidējais [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

▼ M9

	1. paraugs Premikss vistām	2. paraugs Premikss tītariem	3. paraugs Granulas tītariem	4. paraugs Drupatas vistām	5. paraugs Barība tītariem	6. paraugs A barība mājputniem	7. paraugs B barība mājputniem
Nominālais saturs [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50(+)	35(+)

L = laboratoriju skaits,

n = atsevišķo rezultātu skaits,

s_r = atkārtojamības standartnovirze,

s_R = reproducējamības standartnovirze,

CV_r = atkārtojamības variācijas koeficients, %,

CV_R = reproducējamības variācijas koeficients, %.

(*) *Analyst*, 1995. gads, 120, 2175.–2180. lpp.

(**) Ražotāja deklarētais saturs.

(+) Laboratorijā sagatavotā barība.

H. AMPROLIJA HIDROHLORĪDA NOTEIKŠANA

1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridīna hlorīda monohidrohlorīds

1. Mērķis un tvērums

Šī metode ļauj noteikt amprolija daudzumu barībā. Noteikšanas robeža ir 1 mg/kg, kvantitatīvās noteikšanas robeža ir 5 mg/kg.

2. Princips

Paraugu ekstrahē ar metanola un ūdens maisījumu. Pēc atšķaidīšanas ar kustīgo fāzi un membrānfiltrācijas amprolija saturu nosaka ar katjonu apmaiņas augstas efektivitātes šķīdumu hromatogrāfijas metodi (HPLC), izmantojot UV detektoru.

3. Reāģenti

3.1. Metanols.

3.2. Acetonitrils, ekvivalents HPLC tīrības pakāpei.

3.3. Ūdens, ekvivalents HPLC tīrības pakāpei.

3.4. Nātrija dihidrogēnfosfāta šķīdums, c = 0,1 mol/l.

Izšķīdina 13,80 g nātrija dihidrogēnfosfāta ūdenī (3.3. punkts) 1 000 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar ūdeni (3.3. punkts) un samaisa.

3.5. Nātrija perhlorāta šķīdums, c = 1,6 mol/l.

Izšķīdina 224,74 g nātrija perhlorāta monohidrāta ūdenī (3.3. punkts) 1 000 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar ūdeni (3.3. punkts) un samaisa.

3.6. Kustīgā fāze priekš HPLC (skatīt 9.1. Novērojumu punktu).

Acetonitrila (3.2. punkts), nātrija dihidrogēnfosfāta šķīduma (3.4. punkts) un nātrija perhlorāta šķīduma (3.5. punkts) maisījums 450 + 450 + 100 (v + v + v). Pirms lietošanas filtrē caur 0,22 μm membrānfiltru (4.3. punkts) un šķīdumu atgāzo (piemēram, ultraskaņas vannā (4.4. punkts) vismaz 15 minūtes).

3.7. Standartviela: tīrs amprolijs 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridīna hlorīds, E 750 (skatīt 9.2. punktu).

▼ **M9**

3.7.1. Amprolija rezerves standartšķīdums, 500 µg/ml.

Ar precizitāti līdz 0,1 mg iesver 50 mg amprolija (3.7. punkts) 100 ml mērkolbā, izšķīdina 80 mililitros metanola (3.1. punkts) un kolbu uz 10 minūtēm ievieto ultraskaņas vannā (4.4. punkts). Pēc apstrādes ar ultraskaņu šķīdumu atdzesē līdz istabas temperatūrai, papildina līdz zīmei ar ūdeni un samaisa. Temperatūrā, kas ir $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, šķīdumu var glabāt vienu mēnesi.

3.7.2. Amprolija starpposma standartšķīdums, 50 µg/ml.

5,0 ml rezerves standartšķīduma (3.7.1. punkts) ar pipeti iepilina 50 ml mērkolbā, papildina līdz zīmei ar ekstrakcijas šķīdinātāju (3.8. punkts) un samaisa. Temperatūrā, kas ir $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, šķīdumu var glabāt vienu mēnesi.

3.7.3. Kalibrēšanas šķīdumi

Pārnes 0,5, 1,0 un 2,0 ml starpposma standartšķīduma (3.7.2. punkts) 50 ml mērkolbu komplektos. Papildina līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.6. punkts) un samaisa. Tādi šķīdumi atbilst attiecīgi šādām koncentrācijām: 0,5, 1,0 un 2,0 µg/ml amprolija. Minētie šķīdumi jā sagatavo svaigi pirms izmantošanas.

3.8. Ekstrakcijas šķīdinātājs.

Metanola (3.1. punkts) un ūdens maisījums 2 + 1 (v + v).

4. **Iekārtas**

4.1. HPLC iekārta ar injekcijas sistēmu, piemērota 100 µl tilpumu

4.1.1. Šķidrums hromatogrāfa kolonna, 125 × 4 mm, katjonu apmaiņa *Nucleosil 10 SA*, 5 vai 10 µm iesaiņojums, vai līdzvērtīga.

4.1.2. UV detektors ar maināmu viļņu garumu vai diodes matricu detektors

4.2. Membrānfiltres, *PTFE* materiāls, 0,45 µm.

4.3. Membrānfiltres, 0,22 µm.

4.4. Ultraskaņas vanna.

4.5. Mehāniskais kratītājs vai magnētiskais maisītājs.

5. **Procedūra**5.1. *Vispārīga informācija*

5.1.1. Barības tukšais paraugs

Lai veiktu atgūstamības testu (5.1.2. punkts), analizē tukšo barības paraugu, lai pārbaudītu, ka barībā nav ne amprolija, ne noteikšanu traucējošu vielu. Tukšais barības paraugs pēc veida ir līdzīgs analizējamajam paraugam, un, pārbaudot to, nav jāuzrādās amprolijam vai noteikšanu traucējošām vielām.

5.1.2. Atgūstamības tests

Atgūstamības testu veic, analizējot tukšo barības paraugu, kas pastiprināts, pievienojot tik daudz amprolija, cik ir paraugā. Lai paraugu pastiprinātu līdz līmenim 100 mg/kg, 10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.7.1. punkts) pārnes 250 ml koniskā kolbā un šķīdumu iztvaicē līdz apmēram 0,5 ml. Pirms ekstrakcijas (5.2. punkts) pievieno 50 g tukšā barības parauga, vairākas reizes kārtīgi samaisa un atstāj uz 10 minūtēm.

▼ **M9**

Ja nav analizējamajam paraugam līdzīga tukšā barības parauga (skatīt 5.1.1. punktu), tad atgūstamības testu var veikt, izmantojot standarta piedevu metodi. Tādā gadījumā analizējamo paraugu pastiprina ar amprolija daudzumu, kas ir līdzīgs analizējamajā paraugā jau esošajam daudzumam. Tādu paraugu analizē kopā ar nepastiprināto paraugu un atgūstamību aprēķina pēc starpības.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. Premiksi (satur < 1 % amprolija) un barība.

Atkarībā no amprolija satura ar precizitāti līdz 0,01 g iesver 5 līdz 40 g parauga, ko pārnes 500 ml koniskā kolbā, un pievieno 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.8. punkts). Kolbu ievieto ultraskaņas vannā (4.4. punkts) un atstāj uz 15 minūtēm. Kolbu izņem no ultraskaņas vannas un vienu stundu krata kratītājā vai maisa ar magnētisko maisītāju (4.5. punkts). Ekstrakta alikvotu atšķaida ar kustīgo fāzi (3.6. punkts), līdz amprolija koncentrācija sasniedz 0,5–2 µg/ml, un samaisa (skatīt 9.3. Novērojumu punktu). Šā atšķaidītā šķīduma 5 līdz 10 ml filtrē ar membrānfiltru (4.2. punkts). Pāriet pie noteikšanas (5.3. punkts).

5.2.2. Premiksi (satur ≥ 1 % amprolija).

Atkarībā no amprolija satura ar precizitāti līdz 0,001 g iesver 1 līdz 4 g premiksa, ko pārnes 500 ml koniskā kolbā, un pievieno 200 ml ekstrakcijas šķīdinātāja (3.8. punkts). Kolbu ievieto ultraskaņas vannā (4.4. punkts) un atstāj uz 15 minūtēm. Kolbu izņem no ultraskaņas vannas un vienu stundu krata kratītājā vai maisa ar magnētisko maisītāju (4.5. punkts). Ekstrakta alikvotu atšķaida ar kustīgo fāzi (3.6. punkts), līdz amprolija koncentrācija sasniedz 0,5–2 µg/ml, un samaisa. Šā atšķaidītā šķīduma 5 līdz 10 ml filtrē ar membrānfiltru (4.2. punkts). Pāriet pie noteikšanas (5.3. punkts).

5.3. *HPLC noteikšana*

5.3.1. Parametri.

Orientējoši piedāvā šādus parametrus; var izmantot citus parametrus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus.

HPLC kolonna (4.1.1. 125 × 4 mm, katjonu apmaiņa *Nucleosil 10 SA*, 5 vai 10 µm iesaiņojums, vai līdzvērtīga

Kustīgā fāze (3.6. punkts): acetonitrila (3.2. punkts), nātrija dihidrogēnfosfāta šķīduma (3.4. punkts) un nātrija perhlorāta šķīduma (3.5. punkts) maisījums 450 + 450 + 100 (v + v + v)

Plūsmas ātrums: 0,7–1 ml/min

Noteikšanas viļņa garums: 264 nm,

Injekcijas tilpums: 100 µl

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes injicējot kalibrēšanas šķīdumu (3.7.3. punkts) ar koncentrāciju 1,0 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgus smailes augstumus un aizturlaiku.

5.3.2. Kalibrēšanas grafiks

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.7.3. punkts) injicē vairākas reizes un mēra katrai koncentrācijai atbilstošos smailes augstumus (laukumus). Izveido kalibrēšanas grafiku, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu vidējos smailes augstumus (laukumus) un uz abscisu ass – atbilstīgās koncentrācijas µg/ml.

▼ M9**5.3.3. Parauga šķīdums**

Injicē parauga ekstraktu (5.2. punkts) vairākas reizes, izmantojot to pašu tilpumu, kāds bija kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka amprolija smailes vidējo smailes augstumu (laukumu).

6. Rezultātu aprēķināšana

Nemot vērā parauga šķīduma amprolija smaiļu vidējo augstumu (laukumu), nosaka parauga šķīduma koncentrāciju µg/ml, izmantojot kalibrēšanas grafiku (5.3.2. punkts).

Amprolija saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

V = ekstrakcijas šķīdinātāja (3.8. punkts) tilpums mililitros atbilstoši 5.2. punktam (t. i., 200 ml),

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

f = atšķaidījuma pakāpe atbilstoši 5.2. punktam,

m = analizējamā parauga svars gramos.

7. Rezultātu validācija**7.1. Identitāte**

Nosakāmās vielas identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analizē vai izmantojot diodes matricu detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta (5.2. punkts) spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.7.3. punkts) spektru, kura koncentrācija ir 2,0 µg/ml.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiska analīze

Parauga ekstraktu (5.2. punkts) stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.7.3. punkts). Pievienotā amprolija daudzumam jābūt tādā pašam kā aplēstajam amprolija daudzumam, kas atrasts parauga ekstraktā.

Tikai amprolija smailes augstumu palielina, ņemot vērā gan pievienoto daudzumu, gan ekstrakta atšķaidījumu. Smailes platumam pusē no tās augstuma jābūt $\pm 10\%$ robežās no nepastiprināta parauga ekstrakta amprolija smailes sākotnējā platumā.

7.1.2. Diodes matricu noteikšana

Rezultātus novērtē atbilstoši šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas viļņa garumam un standarta spektriem, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, atklāšanas sistēmas izšķirtspējas noteiktajās robežās jābūt vienādiem. Diodes matricu detektoram minētās robežas parasti ir ± 2 nm;

b) no 210 līdz 320 nm parauga un standartspektri, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir 10 % līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir ievērojama, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta;

▼ **M9**

- c) no 210 līdz 320 nm parauga ekstrakta kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kurās relatīvā absorbcija ir 10 % līdz 100 %. Atbilstība šim kritērijam ir ievērojama, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojumu punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no absorbcijas vērtības pīķa smailē.

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

7.2. *Atkārtojamība*

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu starpība nedrīkst pārsniegt:

- 15 % no lielākās noteiktās vērtības, ja amprolija saturs ir no 25 mg/kg līdz 500 mg/kg,
- 75 mg/kg, ja amprolija saturs ir no 500 mg/kg līdz 1 000 mg/kg,
- 7,5 % no lielākās noteiktās vērtības, ja amprolija saturs ir vairāk par 1 000 mg/kg.

7.3. *Atgūstamība*

Stiprināta (tukšā parauga atgūstamība ir vismaz 90 %).

8. **Salīdzinošā pētījuma rezultāti**

Tika organizēts salīdzinošais pētījums, kurā analizēja trīs mājputnu barības paraugus (1. līdz 3. paraugs), vienu minerālbarības paraugu (4. paraugs) un vienu premiksu (5. paraugs). Rezultāti ir norādīti šajā tabulā.

	1. paraugs (barības tukšais paraugs)	2. paraugs	3. paraugs	4. paraugs	5. paraugs
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
vidējais [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
Nominālais saturs [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: laboratoriju skaits,

n: atsevišķo vērtību skaits,

s_r: atkārtojamības standartnovirze,

CV_r: atkārtojamības variācijas koeficients,

s_R: reproducējamības standartnovirze,

CV_R: reproducējamības variācijas koeficients.

▼ **M9****9. Novērojumi**

- 9.1. Ja paraugs satur tiamīnu, tad tiamīna smaile hromatogrammā parādās neilgi pirms amprolija smailes. Izmantojot šo metodi, amprolijs un tiamīns jāatdala. Ja šajā metodē izmantotā kolonna (4.1.1. punkts) amproliju un tiamīnu neatdala, tad līdz 50 % acetonitrila devas kustīgajā fāzē (3.6. punkts) aizstāj ar metanolu.
- 9.2. Saskaņā ar britu farmakopeju amprolija šķīduma ($c = 0,02$ mol/l) spektrs sālsskābes šķīdumā ($c = 0,1$ mol/l) sasniedz maksimumu pie 246 nm un 262 nm. Absorbēšana pie 246 nm ir 0,84, bet pie 262 nm – attiecīgi 0,80.
- 9.3. Ekstrakts vienmēr jāatšķaida tikai ar kustīgo fāzi, citādi amprolija smailes aizturamība var ievērojami mainīties jonu spēka izmaiņu dēļ.

I. NARAZĪNA NOTEIKŠANA

Narazīna saturs jānosaka saskaņā ar

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibio-tikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- metodi, kas paredzēta standartā EN ISO 14183 “Dzīvnieku barība. Monensīna, narazīna un salinomicīna satura noteikšana – Šķīduma hromatogrāfijas metode, izmantojot pēckolonnas derivatizāciju”.

J. NIKARBAZĪNA NOTEIKŠANA

Nikarbazīna saturs jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibio-tikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- metodi, kas paredzēta standartā EN 15782 “Dzīvnieku barība. Nikarbazīna noteikšana – Augstas izšķirtspējas šķīduma hromato-grāfijas metode”.

K. DEKOKVINĀTA NOTEIKŠANA

Dekokvināta saturs jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibio-tikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- metodi, kas paredzēta standartā EN ISO 16162 “Dzīvnieku barība. Nikarbazīna noteikšana, izmantojot *HPLC* ar fluorescences noteikšanu”.

▼ **M9****L. MONENZĪNA NOTEIKŠANA**

Monenzīna saturs jānosaka saskaņā ar

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibio-tikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- metodi, kas paredzēta standartā EN ISO 14183 “Dzīvnieku barība. Monensīna, narazīna un salinomicīna satura noteikšana – Šķidruma hromatogrāfijas metode, izmantojot pēckolonnas derivatizāciju”.

M. SALINOMICĪNA NOTEIKŠANA

Salinomicīna saturs jānosaka saskaņā ar

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibio-tikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- metodi, kas paredzēta standartā EN ISO 14183 “Dzīvnieku barība. Monensīna, narazīna un salinomicīna satura noteikšana – Šķidruma hromatogrāfijas metode, izmantojot pēckolonnas derivatizāciju”.

N. SEMDURAMICĪNA NOTEIKŠANA

Semduramicīna saturs jānosaka saskaņā ar:

- analīzes metodi, kas paredzēta standartā EN 17299 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Atļauto kokcidios-tatu skrīnings un noteikšana piedevu, kā arī 1 % un 3 % šķērskon-taminācijas līmenī un neregistrētu kokcidios-tatu un vienas antibio-tikas skrīnings un noteikšana subpiedevu līmenī barības maisī-jumos, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju – Noteikšana, izmantojot tandēma masspektrometriju (*LC-MS/MS*)”, vai
- metodi, kas paredzēta standartā EN 16158 “Dzīvnieku barība. Semduramicīna satura noteikšana – Šķidruma hromatogrāfijas metode, izmantojot “koka” analīzes metodi”.

O. EN STANDARTI

Piemērojot Regulas (ES) 2017/625 34. panta 2. punkta a) apakšpunktu, ir atbilstīgi šādi EN standarti:

EN ISO 30024 “Dzīvnieku barība. Fitāzes aktivitātes noteikšana”;

EN 17050 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Joda noteikšana dzīvnieku barībā, izmantojot *ICP-MS* metodi”;

EN 17550 “Dzīvnieku barība. Karotinoīdu noteikšana dzīvnieku barības maisījumos un premiksos ar augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju, izmantojot UV detekciju (*HPLC-UV*)”;

EN 15784 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – *Bacillus* spp noteikšana un skaitšana”;

▼ M9

EN 15785 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – *Bifidobacterium* spp izolēšana un skaitīšana”;

EN 15786 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – *Pediococcus* spp noteikšana un skaitīšana”;

EN 15787 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – *Lactobacillus* spp, ko izmanto kā barības piedevu, noteikšana un skaitīšana”;

EN 15788 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – *Enterococcus* (*E. faecium*) spp, ko izmanto kā barības piedevu, noteikšana un skaitīšana”;

EN 15789 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – *Saccharomyces cerevisiae*, ko izmanto kā barības piedevu, noteikšana un skaitīšana”;

EN 15510 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Kalcija, nātrija, fosfora, magnija, kālija, dzelzs, cinka, vara, mangāna, kobalta, molibdēna un svina noteikšana, izmantojot *ICP-AES* metodi” (tādu pārtikas piedevu analīzei kā kobalts un molibdēns);

EN 15621 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Kalcija, nātrija, fosfora, magnija, kālija, sēra, dzelzs, cinka, vara, mangāna un kobalta noteikšana pēc spiediena sadalīšanas, izmantojot *ICP-AES* metodi (tādu pārtikas piedevu analīzei kā kobalts);

EN 16159 “Dzīvnieku barība. Selēna noteikšana ar hidrīda ģenerēšanas atomu absorbcijas spektrometriju (*HGAAS*) pēc šķelšanas mikroviļņu spiedienā (šķelšana ar 65 % slāpekļskābi un 30 % ūdeņraža peroksīdu)” (tādu pārtikas piedevu analīzei kā selēns);

EN 17053 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Mikroelementu, smago metālu un citu elementu noteikšana barībā, izmantojot *ICP-MS* metodi (multimetodi)” (tādu pārtikas piedevu analīzei kā kobalts, molibdēns un selēns).

▼ M9

V PIELIKUMS

ANALĪZES METODES, AR KO KONTROLĒ NEVĒLAMAS VIELAS
BARĪBĀA. DIOKSĪNU (*PCBPCDD/PCDF*) UN *PCB* DAUDZUMU NOTEIKŠANA

I NODAĻA

PARAUGU ŅEMŠANAS UN ANALĪTISKO REZULTĀTU
INTERPRETĀCIJAS METODES

1. Tvērums un definīcijas

Polihlordibenzo-p-dioksīnu (*PCDD*), polihlordibenzofurānu (*PCDF*), dioksīniem līdzīgu polihlorbifenilu (*PCB*)⁽¹⁾ un tādu *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem, paraugus, kas paredzēti barības oficiālajai kontrolei, ņem saskaņā ar I pielikuma noteikumiem. Attiecībā uz tādu vielu vai produktu kontroli, kas vienmērīgi izkliedēti visā barībā, piemēro I pielikuma 5.1. punktā paredzētās kvantitatīvās prasības. Minētajā veidā iegūtos kopparaugus uzskata par raksturīgiem tām partijām vai apakšpartijām, no kurām tie ņemti. Atbilstību Direktīvā 2002/32/EK noteiktajiem maksimālajiem līmeņiem [maksimāli pieļaujamajiem daudzumiem] konstatē, pamatojoties uz laboratorijas paraugos noteiktajiem līmeņiem.

⁽¹⁾ TEF (= toksiskās ekvivalences faktoru) tabula *PCDD*, *PCDF* un dioksīniem līdzīgiem *PCB*: PVO-TEF riska novērtējumam attiecībā uz cilvēku veselību, kura pamatā ir secinājumi, kas sagatavoti Pasaules Veselības organizācijas (PVO) Starptautiskās ķīmiskās drošības programmas (*IPCS*) ekspertu sanāksmē, kura notika 2005. gada jūnijā Ženēvā (Martin van den Berg *et al.*, *The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences* 93(2), 223–241 (2006)).

Radniecīgā viela	TEF vērtība	Radniecīgā viela	TEF vērtība
Polihlordibenzo-p-dioksīni (<i>PCDD</i>) un polihlordibenzofurāni (<i>PCDF</i>)		“Dioksīniem līdzīgie” <i>PCB</i> Neorto <i>PCB</i> + mono-orto <i>PCB</i>	
2,3,7,8- <i>TCDD</i>	1		
1,2,3,7,8- <i>PeCDD</i>	1	Neorto <i>PCB</i>	
1,2,3,4,7,8- <i>HxCDD</i>	0,1	<i>PCB</i> 77	0,0001
1,2,3,6,7,8- <i>HxCDD</i>	0,1	<i>PCB</i> 81	0,0003
1,2,3,7,8,9- <i>HxCDD</i>	0,1	<i>PCB</i> 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8- <i>HpCDD</i>	0,01	<i>PCB</i> 169	0,03
<i>OCDD</i>	0,0003	Mono-orto <i>PCB</i>	
2,3,7,8- <i>TCDF</i>	0,1	<i>PCB</i> 105	0,00003
1,2,3,7,8- <i>PeCDF</i>	0,03	<i>PCB</i> 114	0,00003
2,3,4,7,8- <i>PeCDF</i>	0,3	<i>PCB</i> 118	0,00003
1,2,3,4,7,8- <i>HxCDF</i>	0,1	<i>PCB</i> 123	0,00003
1,2,3,6,7,8- <i>HxCDF</i>	0,1	<i>PCB</i> 156	0,00003
1,2,3,7,8,9- <i>HxCDF</i>	0,1	<i>PCB</i> 157	0,00003
2,3,4,6,7,8- <i>HxCDF</i>	0,1	<i>PCB</i> 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8- <i>HpCDF</i>	0,01	<i>PCB</i> 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9- <i>HpCDF</i>	0,01		
<i>OCDF</i>	0,0003		

Lietotie saīsinājumi: “T” = tetra; “Pe” = penta; “Hx” = hekša; “Hp” = hepta; “O” = okta; “CDD” = hlordibenzdioksīns; “CDF” = hlordibenzfurāns; “CB” = hlorbifenils.

▼ M9

Šajā daļā piemēro Komisijas Īstenošanas Regulas (ES) 2021/808 ⁽²⁾ I pielikumā sniegtās definīcijas.

Papildus minētajām definīcijām šajā daļā piemēro arī turpmāk minētās definīcijas.

“Skrīninga metodes” ir metodes, ko izmanto tādu paraugu atlasei, kuros *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* līmenis pārsniedz maksimālo līmeni vai intervences līmeni. Tās nodrošina iespēju izmaksu ziņā lietderīgi apstrādāt lielu daudzumu paraugu, tādējādi uzlabojot izredzes atklāt jaunus incidentus ar augstu patērētāju eksponētību un apdraudējumu to veselībai. Skrīninga metožu pamatā ir bioanalīzes vai *GC-MS* metodes. Rezultātus no paraugiem, kas pārsniedz robežvērtību, kuru izmanto, lai pārbaudītu atbilstību maksimālajam līmenim, verificē ar pilnīgu atkārtotu analīzi no sākotnējā parauga, izmantojot apstiprināšanas metodi.

“Apstiprināšanas metodes” ir metodes, ar kurām iegūst pilnīgu informāciju vai papildu informāciju, kas vajadzīga *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* precīzai kvalitatīvai un kvantitatīvai noteikšanai maksimālajā vai (vajadzības gadījumā) intervences līmenī. Šādas metodes izmanto gāzu hromatogrāfiju/augstas izšķirtspējas maspektrometriju (*GC-HRMS*) vai gāzu hromatogrāfiju/tandēma masas spektrometriju (*GC-MS/MS*).

2. Partijas vai apakšpartijas atbilstība maksimālajam līmenim

2.1. Attiecībā uz *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem

Partija vai apakšpartija atbilst maksimālajam līmenim, ja *PCB* 28, *PCB* 52, *PCB* 101, *PCB* 138, *PCB* 153 un *PCB* 180 (turpmāk tekstā *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem) analītiskais rezultāts nepārsniedz maksimālo līmeni [maksimāli pieļaujamo daudzumu], kas noteikts Direktīvā 2002/32/EK, ņemot vērā mērījumu paplašināto nenoteiktību ⁽³⁾. Partija vai apakšpartija neatbilst maksimālajam līmenim, kas noteikts Direktīvā 2002/32/EK, ja divu lielāko analītisko rezultātu vidējais aritmētiskais ⁽⁴⁾, kas iegūts otrreizējā analīzē ⁽⁵⁾, pēc mērījuma paplašinātās nenoteiktības atņemšanas neapšaubāmi pārsniedz maksimālo līmeni, proti, atbilstības novērtēšanai izmanto analīzē iegūto koncentrāciju, no kuras atņemta paplašinātā mērījumu nenoteiktība.

⁽²⁾ Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2021/808 (2021. gada 22. marts) par produktīviem dzīvniekiem izmantotu farmakoloģiski aktīvo vielu atlieku analīzes metožu veikspēju un rezultātu interpretēšanu, kā arī par paraugu ņemšanas metodēm un ar ko atceļ Lēmumus 2002/657/EK un 98/179/EK (OV L 180, 21.5.2021., 84. lpp.).

⁽³⁾ Attiecīgā gadījumā piemēro principus, kas aprakstīti dokumentā *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf).

⁽⁴⁾ Saistībā ar “lielākā analītiskā rezultāta” jēdzienu jāizmanto kvantitatīvās noteikšanas robeža, lai aprēķinātu katras kvantitatīvi nenoteiktās radniecīgās vielas devumu. Saistībā ar “mazākā analītiskā rezultāta” jēdzienu jāizmanto nulle, lai aprēķinātu katras kvantitatīvi nenoteiktās radniecīgās vielas devumu. Saistībā ar “vidējā analītiskā rezultāta” jēdzienu jāizmanto puse no kvantitatīvās noteikšanas robežas, lai aprēķinātu katras kvantitatīvi nenoteiktās radniecīgās vielas devumu.

⁽⁵⁾ Otrreizēja analīze: atsevišķa interesējošo vielu analīze, izmantojot otru tā paša homogenizētā parauga alikvotu. Parasti piemērojamas II pielikuma C nodaļas 3. punktā noteiktās prasības attiecībā uz otrreizējo analīzi. Tomēr attiecībā uz metodēm, kurās attiecībā uz attiecīgajām analizējamajām vielām izmanto ar ¹³C iezīmētus iekšējos standartus, otrreizējā analīze ir vajadzīga tikai tad, ja rezultāts, ko iegūst pēc pirmās noteikšanas, ir neatbilstošs. Otrreizējā analīze ir nepieciešama, lai izslēgtu iekšējās šķērskontaminācijas iespēju vai paraugu nejaušu samainīšanu. Ja analīzi veic kontaminācijas incidenta laikā, tad apstiprināšanu ar otrreizēju analīzi var neveikt, ja vien analīzei atlasītie paraugi izsekojamā veidā ir saistīti ar šo kontaminācijas incidentu un konstatētais līmenis ievērojami pārsniedz maksimālo līmeni.

▼ M9

Mērījumu paplašināto nenoteiktību aprēķina, izmantojot pārklāšanās koeficientu 2, kas nodrošina apmēram 95 % ticamības līmeni. Partija vai apakšpartija ir neatbilstoša, ja no izmērīto vērtību vidējā aritmētiskā atskaitot vidējā lieluma paplašināto nenoteiktību, iegūst starpību, kas pārsniedz maksimālo līmeni.

Noteikumus, kas minēti iepriekšminētajās šā punkta daļās, piemēro analītiskajam rezultātam, kas iegūts parauga oficiālajā kontrolē. Ja analīze vajadzīga aizstāvības vai arbitrāžas nolūkos, piemēro valsts tiesību aktus.

2.2. Attiecībā uz PCDD/F un dioksīniem līdzīgiem PCB

Partija vai apakšpartija atbilst maksimālajam līmenim, ja tādas atsevišķas analīzes rezultāts:

- kas veikta, izmantojot skrīninga metodi ar šķietamās atbilstības attiecību mazāku par 5 %, liecina par to, ka līmenis nepārsniedz attiecīgo PCDD/PCDF maksimālo līmeni un PCDD/PCDF un dioksīniem līdzīgo PCB summu, kas noteikta Direktīvā 2002/32/EK,
- kas veikta, izmantojot apstiprināšanas metodi, nepārsniedz attiecīgo PCDD/PCDF maksimālo līmeni un PCDD/PCDF un dioksīniem līdzīgu PCB summu, kas noteikta Direktīvā 2002/32/EK, ņemot vērā mērījumu paplašināto nenoteiktību.

Veicot skrīningu, jānosaka robežvērtība, kas jāņem vērā testos pieņemumu izteikšanai par parauga atbilstību attiecīgajam maksimālajam līmenim, kas noteikts attiecībā uz PCDD/PCDF vai attiecībā uz PCDD/PCDF un dioksīniem līdzīgu PCB summu.

Partija vai apakšpartija neatbilst maksimālajam līmenim, kas noteikts Direktīvā 2002/32/EK, ja divu lielāko analītisko rezultātu⁽⁶⁾ vidējais aritmētiskais, kas iegūts otrreizējā analīzē⁽⁷⁾ ar apstiprināšanas metodi un ņemot vērā mērījumu paplašināto nenoteiktību, neapšaubāmi pārsniedz maksimālo līmeni, proti, atbilstības novērtēšanai izmanto analizē iegūto koncentrāciju pēc tam, kad no tās atņemta mērījuma paplašinātā nenoteiktība.

Paplašināto mērījuma nenoteiktību aprēķina, izmantojot pārklāšanās koeficientu 2, kas nodrošina apmēram 95 % ticamības līmeni. Partija vai apakšpartija ir neatbilstoša, ja no izmērīto vērtību vidējā aritmētiskā atskaitot vidējā lieluma paplašināto nenoteiktību, iegūst starpību, kas pārsniedz maksimālo līmeni.

Atsevišķo PCDD/F un dioksīniem līdzīgu PCB analītiskā rezultāta aprēķinātā paplašinātās nenoteiktības summa ir jāizmanto kā PCDD/F un dioksīniem līdzīgu PCB summa.

⁽⁶⁾ Saistībā ar "lielākā analītiskā rezultāta" jēdzienu jāizmanto kvantitatīvās noteikšanas robeža, lai aprēķinātu katras kvantitatīvi nenoteiktās radniecīgās vielas devumu toksicitātes ekvivalentā (TEQ). Saistībā ar "mazākā analītiskā rezultāta" jēdzienu jāizmanto nulle, lai aprēķinātu katras kvantitatīvi nenoteiktās radniecīgās vielas devumu TEQ. Saistībā ar "vidējā analītiskā rezultāta" jēdzienu jāizmanto puse no kvantitatīvās noteikšanas robežas, lai aprēķinātu katras kvantitatīvi nenoteiktās radniecīgās vielas devumu TEQ.

⁽⁷⁾ Parasti piemērojamas II pielikuma C nodaļas 3. punktā noteiktās prasības attiecībā uz otrreizējo analīzi. Tomēr attiecībā uz apstiprināšanas metodēm, kurās attiecībā uz attiecīgajām analizējamajām vielām izmanto ar ¹³C iezīmētus iekšējos standartus, otrreizējā analīze ir vajadzīga tikai tad, ja rezultāts, ko iegūst pēc pirmās noteikšanas, ir neatbilstošs. Otrreizējā analīze ir nepieciešama, lai izslēgtu iekšējās šķērskontaminācijas iespēju vai paraugu nejašu samaiņīšanu. Ja analīzi veic kontaminācijas incidenta laikā, tad apstiprināšanu ar otrreizēju analīzi var neveikt, ja vien analīzei atlasītie paraugi izsekojamā veidā ir saistīti ar šo kontaminācijas incidentu un konstatētais līmenis ievērojami pārsniedz maksimālo līmeni.

▼ M9

Noteikumus, kas minēti iepriekš minētajās šā punkta daļās, piemēro analītiskajam rezultātam, kas iegūts parauga oficiālajā kontrolē. Ja analīze vajadzīga aizstāvības vai arbitrāžas nolūkos, piemēro valsts tiesību aktus.

3. **Rezultāti, kas pārsniedz intervences līmeņus [iedarbības robežlielumus], kā noteikts Direktīvas 2002/32/EK II pielikumā**

Intervences līmeņi paredzēti izmantošanai paraugu atlasei gadījumos, kad ir jāidentificē kontaminācijas avots un jāveic pasākumi tās samazināšanai vai likvidēšanai. Skrīninga metodes nosaka šo paraugu atlasei piemērotas robežvērtības. Ja avota identificēšanai un kontaminācijas samazināšanai vai novēršanai jāveic plašas darbības, ir lietderīgi apstiprināt intervences līmeņa pārsniegšanu, veicot otrreizēju analīzi ar apstiprināšanas metodi un ņemot vērā paplašināto mērījuma nenoteiktību ⁽⁸⁾.

II NODAĻA

PARAUGU GATAVOŠANA UN PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ ANALĪZES METODĒM, KO IZMANTO DIOKSĪNU (*PCDD/PCDF*) UN DIOKSĪNIEM LĪDZĪGU *PCB* DAUDZUMU OFICIĀLAI KONTROLEI BARĪBĀ

1. Piemērošanas joma

Šajā nodaļā noteiktās prasības piemēro, ja barību analizē, lai veiktu 2,3,7,8-aizvietoto *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* daudzumu oficiālu kontroli, un attiecībā uz paraugu gatavošanu un analītiskajām prasībām citiem regulatīviem mērķiem, tostarp kontroli, ko veic pārtikas aprītē iesaistīts uzņēmējs, lai nodrošinātu atbilstību Eiropas Parlamenta un Padomes Regulas (EK) Nr. 183/2005 ⁽⁹⁾ noteikumiem.

PCDD/F un dioksīniem līdzīgu *PCB* klātbūtnes monitoringu barībā var veikt, izmantojot divus dažādus analītisko metožu veidus.

a) *Skrīninga metodes*

Skrīninga metožu izmantošanas mērķis ir atlasīt paraugus, kuros *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* līmenis pārsniedz maksimālo līmeni vai intervences līmeni. Skrīninga metodēm ir jānodrošina iespēja izmaksu ziņā lietderīgi apstrādāt lielu daudzumu paraugu, tādējādi uzlabojot izredzes atklāt jaunus incidentus ar augstu patērētāju eksponētību un apdraudējumu to veselībai. Tās ir jāpiemēro ar mērķi nepieļaut šķietami atbilstošu rezultātu iegūšanu. Tās var ietvert bioanalīzes metodes un *GC-MS* metodes.

Ar skrīninga metodēm salīdzina analītisko rezultātu un robežvērtību, sniedzot apstiprinošu/neapstiprinošu lēmumu attiecībā uz maksimālā līmeņa vai intervences līmeņa pārsniegšanu. *PCDD/F* koncentrācija un *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summa paraugos, kas, iespējams, neatbilst maksimālajam līmenim, ir jānosaka/jāapstiprina ar apstiprināšanas metodi.

Turklāt, izmantojot skrīninga metodes, var iegūt norādes par *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* līmeni paraugā. Ja piemēro bioanalīzes skrīninga metodes, rezultātu izsaka bioanalīzes ekvivalentos (*BEQ*), savukārt, ja piemēro fizikāli ķīmiskās *GC-MS* metodes, to izsaka toksicitātes ekvivalentos (*TEQ*). Ar skrīninga metodēm iegūtie rezultāti, kas izteikti skaitliski, ir piemēroti, lai pierādītu atbilstību vai iespējamu

⁽⁸⁾ Skaidrojums un prasības attiecībā uz otrreizējo analīzi intervences līmeņa kontrolei ir identiski 5. zemsvītras piezīmē attiecībā uz maksimālo līmeni norādītajiem.

⁽⁹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 183/2005 (2005. gada 12. janvāris), ar ko paredz barības higiēnas prasības (OV L 35, 8.2.2005., 1. lpp.).

▼ **M9**

neatbilstību, vai intervences līmeņu pārsniegšanu un lai norādītu koncentrācijas atbilstošo diapazonu, ja turpmāk tiks izmantotas apstiprināšanas metodes. Tās nav piemērotas tādiem nolūkiem kā fona līmeņu izvērtēšana, uzņemta daudzuma aplēšana, līmeņu tendenču izsekošana laikā vai un maksimālā līmeņa atkārtota izvērtēšana.

b) *Apstiprināšanas metodes*

Ar apstiprināšanas metodēm var nepārprotami identificēt un kvantitatīvi noteikt *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgo *PCB* klātbūtni paraugā, un tās sniedz pilnu informāciju atsevišķu radniecīgo vielu līmenī. Tādējādi ar šīm metodēm var kontrolēt maksimālos līmeņus un intervences līmeņus, tostarp apstiprināt ar skrīninga metodēm iegūtus rezultātus. Turklāt rezultāti var tikt izmantoti citiem nolūkiem, piemēram, lai noteiktu zemus fona līmeņus pārtikas monitoringā, uzraudzītu tendences laikā, novērtētu eksponētību un izveidotu datubāzi intervences līmeņu un maksimālo līmeņu iespējamai atkārtotai izvērtēšanai. Turklāt tiem ir būtiska nozīme arī radniecīgo struktūru noteikšanā, lai identificētu iespējamās kontaminācijas avotu. Šajās metodēs izmanto *GC-HRMS*. Lai apstiprinātu atbilstību vai neatbilstību maksimālajam līmenim, var izmantot arī *GC-MS/MS*.

2. **Vispārīga informācija**

Lai aprēķinātu toksicitātes ekvivalenta koncentrāciju (*TEQ*), katras vielas koncentrāciju konkrētajā paraugā reizina ar vielas attiecīgo toksiskās ekvivalences faktoru (*TEF*) (sk. 1. zemsivītras piezīmi I nodaļā), pēc tam šos reizinājumus summē, lai iegūtu dioksīniem līdzīgu savienojumu kopējo koncentrāciju, kas izteikta toksicitātes ekvivalentos (*TEQ*).

Šajā A daļā atsevišķas radniecīgās vielas kvantitatīvās noteikšanas pieņemtā specifiskā robeža ir zemākā analizējamās vielas koncentrācija, ko var izmērīt ar pietiekamu statistisku ticamību, kas atbilst identifikācijas kritērijiem, kuri aprakstīti starptautiski atzītos standartos, piemēram, standartā EN 16215:2012 (Dzīvnieku barība. Dioksīnu un dioksīniem līdzīgu *PCB* noteikšana ar *GC-HRMS* metodi un *PCB* indikatoru noteikšana ar *GC-HRMS* metodi) un/vai EPA 1613. un 1668. metodes pārskatītajā redakcijā.

Atsevišķas radniecīgas vielas kvantitatīvās noteikšanas robežu var identificēt kā:

- a) analizējamās vielas koncentrāciju parauga ekstraktā, kas izraisa atbilstošu reakciju pie diviem dažādiem joniem, kurus monitorē ar signāla/trokšņa attiecību 3:1 mazāk jutīgam izejas datu signālam; vai
- b) ja tehnisku iemeslu dēļ signāla/trokšņa attiecības aprēķins nenodrošina ticamus rezultātus, zemākais koncentrācijas punkts kalibrēšanas līknē, kas dod pieņemamu ($\leq 30\%$) un pastāvīgu (mērot vismaz analītisko paraugu sēriju sākumā un beigās) novirzi no vidējās signāla relatīvās attiecības pret masas vienību, kuru aprēķina visiem kalibrēšanas līknes punktiem katrā paraugu sērijā. Kvantitatīvās noteikšanas robežu (*LOQ*) aprēķina pēc zemākā koncentrācijas punkta, ņemot vērā iekšējos standartus un parauga daudzumu.

▼ **M9**

Bioanalīžu skrīninga metodes radniecīgās vielas līmenī nesniegs rezultātus, bet vienīgi norādi⁽¹⁰⁾ par *TEQ* līmeni, kas izteikts *BEQ*, lai apstiprinātu faktu, ka ne visi parauga ekstraktā esošie savienojumi, kas testā rada signālu, var atbilst visām *TEQ* principa prasībām.

Skrīninga un apstiprināšanas metodes var piemērot tikai konkrētas matricēs kontroles vajadzībām, ja metodes ir pietiekami jutīgas, lai ticami noteiktu līmeni pie intervences līmeņa vai maksimālā līmeņa.

3. **Kvalitātes nodrošināšanas prasības**

- 3.1. Jāveic pasākumi, lai nevienā no paraugu ņemšanas un analīzes procedūras posmiem nepieļautu paraugu šķērskontamināciju.
- 3.2. Paraugi jāglabā un jātransportē stikla, alumīnija, polipropilēna vai polietilēna traukos, kas piemēroti glabāšanai un neietekmē *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* koncentrāciju paraugos. No parauga konteina jāizvāc papīra putekļu pēdas.
- 3.3. Paraugi jāuzglabā un jātransportē tā, lai saglabātu barības parauga integritāti.
- 3.4. Vajadzības gadījumā katru laboratorijas paraugu rūpīgi sasmalcina un samaisa, izmantojot apstrādi, kas nodrošina pilnīgu homogenizāciju (piemēram, samaļ tā, lai paraugs pilnībā izietu caur 1 mm sietu). Pārlietu mitri paraugi pirms sasmalcināšanas jāizžāvē.
- 3.5. Jāveic reāģentu, stikla trauku un aprīkojuma kontrole, lai nepieļautu ar *TEQ* vai *BEQ* pamatoto rezultātu ietekmēšanu.
- 3.6. Jāveic tukšā analīze, visu analītisko procedūru izpildot bez analizējamā parauga.
- 3.7. Attiecībā uz bioanalīžu metodēm jāpārbauda visi analizē izmantotie stikla trauki un šķīdinātāji, vai tajos nav savienojumi, kas traucē noteikamo savienojumu konstatēšanu darba diapazonā. Stikla trauki jāskalo ar šķīdinātājiem vai jākārsē temperatūrā, kas piemērota tam, lai notīrītu *PCDD/F*, dioksīnam līdzīgu savienojumu un traucējošo savienojumu pēdas no to virsmas.
- 3.8. Ekstrakcijai izmantojamā parauga daudzumam jābūt pietiekami liels, lai tiktu ievērotas prasības attiecībā uz pietiekami zemu darba diapazonu, tostarp maksimālo līmeņu vai intervences līmeņa koncentrāciju.
- 3.9. Īpašajām paraugu sagatavošanas procedūrām, ko izmanto attiecīgajiem produktiem, ir jābūt apstiprinātām saskaņā ar starptautiski pieņemtām vadlīnijām, piemēram, EN ISO 6498.

⁽¹⁰⁾ Bioanalīžu metodes nav īpaši paredzētas tām radniecīgajām vielām, kas iekļautas *TEF* shēmā. Citi strukturāli radniecīgi *AhR* aktīvi savienojumi var būt parauga ekstraktā, kas ietekmē vispārējo signālu. Tādēļ *TEQ* līmeni paraugā nevar noteikt ar bioanalītiskajiem rezultātiem un tos var vienīgi izmantot kā norādi.

▼ **M9****4. Prasības laboratorijām**

4.1. Saskaņā ar Regulas (EK) 2017/625 noteikumiem laboratorijas akreditē atzīta iestāde, kas darbojas saskaņā ar standartu ISO/IEC *Guide 58*, lai nodrošinātu to, ka laboratorijās piemēro analīžu kvalitātes nodrošināšanu. Laboratorijas akreditē, ievērojot EN ISO/IEC 17025 standartu. Piemēro principus, kas aprakstīti dokumentā *Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis* ⁽¹¹⁾.

4.2. Laboratoriju kompetence ir jāpierāda ar pastāvīgu un sekmīgu piedalīšanos starplaboratoriju pētījumos, kuros nosaka PCDD/F un dioksīniem līdzīgus PCB attiecīgās barības matricās un koncentrācijas diapazonos.

4.3. Laboratorijas, kurās paraugu regulārai kontrolei izmanto skrīninga metodes, izveido ciešu sadarbību ar laboratorijām, kas izmanto apstiprināšanas metodes, gan attiecībā uz kvalitātes kontroli, gan iespējami inficētu paraugu analītiskā rezultāta apstiprināšanu.

5. Pamatprasības, kas jāievēro attiecībā uz dioksīnu (PCDD/F) un dioksīniem līdzīgu PCB analītisko procedūru**5.1. Zems darba diapazons un kvantitatīvās noteikšanas robežas**

PCDD/F nosakāmajiem daudzumiem jābūt augšējo femtogramu (10^{-15} g) robežās, jo daži no tādiem savienojumiem ir ārkārtīgi toksiski. Attiecībā uz lielāko daļu PCB radniecīgo vielu kvantitatīvās noteikšanas robeža nanogramu (10^{-9} g) robežās ir pietiekama. Lai izmērītu toksiskākas dioksīniem līdzīgu PCB radniecīgās vielas (jo īpaši neorto aizvietotās radniecīgās vielas), darba diapazona zemākais punkts atbilst zemākajam pikogramu (10^{-12} g) līmenim. Attiecībā uz visām pārējām PCB radniecīgām vielām kvantitatīvās noteikšanas robeža nanogramu (10^{-9} g) robežās ir pietiekama.

5.2. Augsta selektivitāte (specifiskums)

5.2.1. Jāatšķir PCDD/F un dioksīniem līdzīgi PCB no daudziem citiem vienkāršiem ekstrahētiem savienojumiem un varbūtēji traucējošiem savienojumiem, kuru koncentrācija līdz vairākām kārtām pārsniedz nosakāmās vielas koncentrāciju. Attiecībā uz GC-MS metodēm ir jādiferencē tādas atšķirīgas radniecīgās vielas kā toksiskās vielas (piemēram, septiņpadsmit 2,3,7,8-aizvietotie PCDD/F un divpadsmit dioksīniem līdzīgi PCB) un citas radniecīgās vielas.

5.2.2. Izmantojot bioanalīzes metodes, nosakāmos savienojumus jāspēj konstatēt kā PCDD/F un/vai dioksīniem līdzīgu PCB summu. Paraugu attīra, lai likvidētu savienojumus, kas rada šķietami neatbilstošus rezultātus, vai savienojumus, kas var mazināt signālu, radot šķietami atbilstošus rezultātus.

⁽¹¹⁾ *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pccd-f_pcb_en.pdf), *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

▼ M9

- 5.3. *Liela precizitāte (ticamība un precizitāte, biotesta acīmredzamā atgūstamība)*
- 5.3.1. Attiecībā uz *GC-MS* metodēm ir jānodrošina pareizs patiesās koncentrācijas novērtējums paraugā. Liela precizitāte ir vajadzīga, lai noteiktā *TEQ* līmeņa mazās ticamības dēļ nevarētu noraidīt parauga analīzes rezultātus. Precizitāti izsaka kā *ticamību* (starpība starp vidējo aritmētisko rezultātu, kas analītam noteikts sertificētā materiālā, un tā sertificēto vērtību, izsakot procentuāli) un *precizitāti* (RSD_R relatīvā standartnovirze, ko aprēķina no rezultātiem, kuri iegūti saskaņā ar reproducējamības nosacījumiem).
- 5.3.2. Attiecībā uz bioanalīžu metodēm ir jānosaka biotesta acīmredzamā atgūstamība. Biotesta acīmredzamā atgūstamība ir *BEQ* līmenis, kas aprēķināts no *TCDD* vai *PCB* 126 kalibrēšanas līknes, kas koriģēta atbilstīgi tukšajam paraugam, pēc tam dalot ar *TEQ* līmeni, kas noteikts, izmantojot apstiprināšanas metodi. Tā rezultātā jākorrigē tādi koeficienti kā *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu savienojumu zudums ekstrakcijas laikā un attīrīšanas posmos, vienlaikus ekstrahēti savienojumi, kas palielina vai samazina signālu (agonistiska un antagonistiska iedarbība), līknes atbilstības kvalitāte vai atšķirības starp *TEF* un relatīvās potences (*REP*) vērtībām. Biotesta acīmredzamā atgūstamība tiek aprēķināta no piemērotiem standartparaugiem ar dažādām reprezentatīvām radniecīgām vielām aptuveni interesējošā koncentrācijā.
- 5.4. *Validēšana maksimālā līmeņa diapazonā un vispārīgi kvalitātes kontroles pasākumi*
- 5.4.1. Validēšanas procedūras un regulārās analīzes gaitā laboratorijas pierāda metodes veikspēju maksimālā līmeņa diapazonā, piemēram, maksimālais līmenis 0,5x, 1x un 2x ar atbilstošu variācijas koeficientu atkārtotai analīzei.
- 5.4.2. Kvalitātes iekšējās kontroles nolūkos regulāri izdara tukšo paraugu analīzes un kontrolparaugu analīzes ar standartvielu piedevas analīzi vai kontrolparaugu analīzi (ja iespējams, ieteicams izmantot sertificētu standartmateriālu). Lai pārliecinātos, ka analīzes veikspēja atbilst prasībām, izveido un pārbauda tukšo paraugu analīžu, kontrolparaugu analīžu ar standartvielu piedevas analīzi vai kontrolparaugu analīžu kvalitātes kontroles grafikus.
- 5.5. *Kvantitatīvās noteikšanas robeža*
- 5.5.1. Attiecībā uz bioanalīžu skrīninga metodēm kvantitatīvās noteikšanas robežas (*LOQ*) nav obligāti jānosaka, taču metodei ir jāpierāda, ka tā var diferencēt tukšā parauga vērtību un robežvērtību. Lai noteiktu *BEQ* līmeni, jānosaka ziņojamā līmeņa robeža to paraugu analizēšanai, kuros uzrādītais signāls ir zem šā līmeņa. Ir jāpierāda, ka ziņojamais līmenis atšķiras no procedūras tukšajiem paraugiem vismaz ar koeficientu trīs un tā signāls ir zemāks par darba diapazonu. Tādēļ tas jāaprēķina no paraugiem, kuros noteicamie savienojumi aptuveni atbilst vajadzīgajam obligātajam līmenim, un nevis no S/T attiecības vai tukšās analīzes.
- 5.5.2. Kvantitatīvās noteikšanas robežai apstiprināšanas metodē ir jābūt aptuveni vienai piektdaļai no maksimālā līmeņa.
- 5.6. *Analītiskie kritēriji*
- Lai iegūtu uz ticamus rezultātus ar apstiprināšanas vai skrīninga metodēm, attiecīgi *TEQ* vai *BEQ* vērtībai maksimālā līmeņa diapazonā ir jāatbilst turpmāk minētajiem kritērijiem atkarībā no tā, vai vērtība tiek noteikta kā kopējais *TEQ* vai kopējais *BEQ* (kā *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summa) vai atsevišķi *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgiem *PCB*:

▼ M9

	Skrīnings ar bioanalīžu vai fizikāli ķīmiskām metodēm	Apstiprināšanas metodes
Šķietami atbilstoša attiecība (*)	< 5 %	
Ticamība		no –20 % līdz +20 %
Atkārtojamība (RSD_r)	< 20 %	
Starpprecizitāte (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) Attiecībā uz maksimālo līmeni.

5.7. Īpašas prasības skrīninga metodēm

5.7.1. Skrīningā var izmantot gan *GC-MS*, gan bioanalītiskās metodes. Attiecībā uz *GC-MS* metodēm jāievēro 6. punktā noteiktās prasības. Īpašas prasības attiecībā uz šūnu bioanalīžu metodēm tiek noteiktas 7. punktā.

5.7.2. Laboratorijas, kas paraugu regulārai kontrolei izmanto skrīninga metodes, izveido ciešu sadarbību ar laboratorijām, kas izmanto apstiprināšanas metodi.

5.7.3. Skrīninga metodes veikspējas verifikācija ir vajadzīga regulāras analīzes laikā, veicot analīzes kvalitātes kontroli un metožu pastāvīgu validēšanu. Atbilstošu rezultātu kontrolei ir vajadzīga ilgstoša programma.

5.7.4. Pārbaude uz šūnas signāla iespējamo slāpēšanu un citotoksicitāti:

regulārā skrīninga gaitā 20 % no paraugu ekstraktiem veic mērījumus, pievienojot 2,3,7,8-TCDD, kas atbilst maksimālajam līmenim vai intervences līmenim, un bez tiem, lai pārbaudītu, vai parauga ekstraktā esošās traucējošās vielas iespējami neslāpē signālu. Parauga ar standartvielu piedevu izmērīto koncentrāciju salīdzina ar parauga ekstrakta, kam nav pievienota standartviela, koncentrācijas summu, pieskaitot standartvielu piedevu koncentrāciju. Ja šī izmērītā koncentrācija pārsniedz aprēķināto (summu) koncentrāciju vairāk nekā par 25 %, tas norāda uz iespējamo signāla slāpēšanu un attiecīgo paraugu iesniedz, lai veiktu *GC-HRMS* apstiprinošu analīzi. Rezultātus monitorē, izmantojot kvalitātes kontroles grafikus.

5.7.5. Atbilstošu paraugu kvalitātes kontrole:

atkarībā no parauga matricas un laboratorijas pieredzes aptuveni no 2% līdz 10 % atbilstošo paraugu apstiprina ar *GC/HRMS* metodēm.

5.7.6. Šķietami atbilstošo paraugu proporcijas noteikšana, izmantojot kvalitātes kontroles datus:

ir jānosaka tādu šķietami atbilstošu rezultātu proporcija, kas iegūti, veicot skrīningu paraugiem, kuros ir pārsniegts maksimālais līmenis vai intervences līmenis. Faktiski, šķietami atbilstošo rezultātu proporcijai jābūt mazākai par 5 %. Ja atbilstošo paraugu kvalitātes kontroles

▼ **M9**

gaitā no vienas matricēs/matricu grupas var iegūt vismaz 20 apstiprinātus rezultātus, secinājumus par šķietami atbilstošo rezultātu proporciju iegūst no šīs datubāzes. Rezultātus no paraugiem, kas analizēti starplaboratoriju pētījumos vai kontaminācijas incidentu laikā un kā koncentrācijas diapazons ir, piemēram, 2x lielāks par maksimālo līmeni (ML), arī var iekļaut obligātajos 20 rezultātos, kuri jāvērtē attiecībā uz šķietamo atbilstību. Paraugos iekļauj visbiežāk izmantojamās radniecīgās vielas, kas iegūtas no dažādiem avotiem.

Lai gan skrīninga testus ieteicams veikt, lai noteiktu paraugus, kuros pārsniegts intervences līmenis, kritērijs šķietami atbilstošo rezultātu proporcijas noteikšanai ir maksimālais līmenis, ņemot vērā apstiprināšanas metodes paplašināto mērījuma nenoteiktību.

- 5.7.7. Potenciāli neatbilstošos paraugus, kas iegūti, veicot skrīningu, vienmēr verificē ar pilnu atkārtotu sākotnējā parauga analīzi, izmantojot apstiprināšanas analīzes metodi. Šos paraugus var izmantot arī, lai novērtētu šķietami neatbilstošo rezultātu proporciju. Attiecībā uz skrīninga metodēm šķietami neatbilstošo rezultātu proporcija ir to rezultātu frakcija, kas atzīti par atbilstošiem ar apstiprināšanas analīzi, arī tad, ja iepriekšējā skrīningā iegūtais paraugs tika uzskatīts par iespējami neatbilstošu. Skrīninga metodes priekšrocību izvērtējuma pamatā jābūt šķietami neatbilstošo paraugu un pārbaudīto paraugu kopējā skaita salīdzinājumam. Šai attiecībai jābūt pietiekami mazai, lai skrīninga metodi izmantotu lietderīgi.

- 5.7.8. Bioanalīžu metodes saskaņā ar validēšanas nosacījumiem nodrošina atbilstošu norādi par *TEQ* līmeni, kas aprēķināts un izteikts kā *BEQ*.

Arī to bioanalīzes metožu gadījumā, kas tiek piemērotas atkārtotamības apstākļos, laboratorijas *RSD*, parasti būtu mazāka par reproducējamības nosacījumos iegūtu *RSD*.

6. Īpašas prasības, kas jāievēro attiecībā uz *GC-MS* metodēm, kuras izmanto skrīningam vai apstiprināšanai

- 6.1. *Pieļaujamā starpība starp *PVO TEQ* lielāko un mazāko analītisko rezultātu*

Lai apstiprinātu, ka ir pārsniegts maksimālais līmenis vai (vajadzības gadījumā) intervences līmeni, starpība starp lielāko un mazāko analītisko rezultātu nedrīkst pārsniegt 20 %.

6.2. *Atgūstamības kontrole*

- 6.2.1. Lai validētu analītisko procedūru, sākot analīzi, piemēram, pirms ekstrakcijas, jāpievieno ar ^{13}C iezīmēti 2,3,7,8-hlor aizvietoti iekšējie *PCDD/F* standarti un ar ^{13}C iezīmēti dioksīniem līdzīgu *PCB* iekšējie standarti. Katrai tetra- līdz oktahloratvasināto *PCDD/F* homologu grupai jāpievieno vismaz viena radniecīga viela, un vismaz viena radniecīga viela jāpievieno katrai dioksīniem līdzīgu *PCB* homologu grupai (alternatīvi jāpievieno vismaz viena radniecīga viela uz katru maspektrometrijai izraudzīto reģistrējamo jonu funkciju, ko izmanto *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* monitoringam). Attiecībā uz apstiprināšanas metodēm tiek izmantoti visi 17 ar ^{13}C iezīmēti 2,3,7,8-aizvietoti *PCDD/F* iekšējie standarti un visi 12 ar ^{13}C -iezīmēti dioksīniem līdzīgu *PCB* iekšējie standarti.

▼ **M9**

6.2.2. Izmantojot attiecīgus kalibrēšanas šķīdumus, nosaka relatīvā signāla koeficientus tām radniecīgajām vielām, kurām nav pievienots ar ^{13}C iezīmēts analogs.

6.2.3. Pirms ekstrakcijas iekšējie standarti obligāti jāpievieno augu un dzīvnieku izcelsmes barībai, kurā ir mazāk nekā 10 % tauku. Dzīvnieku izcelsmes barības, kas satur vairāk par 10 % tauku, analizēšanai iekšējos standartus pievieno pirms vai pēc tauku ekstrakcijas. Atkarībā no tā, kurā analīzes posmā sāk izmantot iekšējos standartus, jāveic atbilstīga ekstrakcijas efektivitātes validācija.

6.2.4. Pirms *GC-MS* analīzes jāpievieno 1 vai 2 atgūstamības (surogāta) standarts(-i).

6.2.5. Nepieciešams veikt atgūstamības kontroli. Attiecībā uz apstiprināšanas metodēm atsevišķu iekšējo standartu atgūstamībai jābūt intervālā no 60 % līdz 120 %. Lielāka vai mazāka atsevišķu radniecīgo vielu, jo īpaši dažu hepta- un oktahloratvasināto dibenzo-p-dioksīnu un dibenzozofurānu atgūstamība ir pieņemama ar nosacījumu, ka to daļa *TEQ* vērtībā nepārsniedz 10 % no kopējās *TEQ* vērtības (kuras pamatā ir *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summa). Ja piemēro *GC-MS* skrīninga metodes, atgūstamībai jābūt diapazonā no 30 % līdz 140 %.

6.3. *Traucējošu vielu likvidēšana*

— No tādiem traucējošiem hloratvasinātiem savienojumiem kā *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem, un hloratvasinātiem difenilēteriem *PCDD/F* jāatdala ar piemērotām hromatogrāfijas metodēm (ieteicams, ar florisila, alumīnija oksīda un/vai aktīvās ogles kolonnu).

— Izomēru atdalīšana ar gāzu hromatogrāfiju nepārsniedz 25 % pilnas amplitūdas robežās starp 1,2,3,4,7,8-HxCDF un 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibrēšana ar standartlīkni*

Kalibrēšanas līknes diapazons ietver maksimālajam līmenim vai intervences līmenim atbilstošo diapazonu.

6.5. *Īpaši kritēriji apstiprināšanas metodēm*

— *GC/HRMS*:

augstas izšķirtspējas maspektrometrijā (*HRMS*) izšķirtspēja parasti ir lielāka par 10 000 visam masas diapazonam 10 % atstarpē starp signāliem.

Papildu identifikācijas un apstiprināšanas kritēriju ievērošana, kā aprakstīts starptautiski atzītos standartos, piemēram, standartā EN 16215:2012 (Dzīvnieku barība. Dioksīnu un dioksīniem līdzīgu *PCB* noteikšana ar *GC-HRMS* metodi un *PCB* indikatoru noteikšana ar *GC-HRMS* metodi) un/vai EPA 1613. un 1668. metodes pārskatītajā redakcijā.

— *GC-MS/MS*:

▼ M9

vismaz divu īpašu prekursoru jonu, kuriem ir viens konkrēts atbilstošs pārejas produkta jons, monitorings visām marķētajām un nemarķētajām analizējamajām vielām analīzes tvērumā.

Maksimālā atļautā $\pm 15\%$ pieļaušana relatīvajai jonu intensitātei, atlasītiem produkta pārejas joniem salīdzinājumā ar aprēķinātajām vai noteiktajām vērtībām (kalibrēšanas standarta vidējais rādītājs), piemērojot identiskus MS/MS apstākļus, jo īpaši sadursmes enerģiju un sadursmes gāzes spiedienu katrā analizējamās vielas pārejā.

Katra četrpola izšķirtspēja jānosaka vienāda ar vai augstāka par masas vienības izšķirtspēju (masas vienības izšķirtspēja – pietiekama izšķirtspēja, lai atdalītu vienas masas vienības divas smailes), lai mazinātu iespējamus traucējumus interesējošajām analizējamajām vielām.

Papildu identifikācijas un apstiprināšanas kritēriju ievērošana, kā aprakstīts starptautiski atzītos standartos, piemēram, standartā EN 16215:2012 (Dzīvnieku barība. Dioksīnu un dioksīniem līdzīgu PCB noteikšana ar GC-HRMS metodi un PCB indikatoru noteikšana ar GC-HRMS metodi) un/vai EPA 1613. un 1668. metodes pārskatītajā redakcijā.

7. Īpašas prasības bioanalīzes metodēm

Bioanalīzes metodes ir metodes, kuru pamatā ir tādu bioloģisko principu izmantošana kā šūnu testi, receptoru testi vai imūntesti. Ar šo punktu tiek noteiktas prasības attiecībā uz bioanalīzes metodēm kopumā.

Skrīninga metode faktiski paraugu klasificē kā atbilstošu vai iespējami neatbilstošu. Tādēļ aprēķinātais *BEQ* līmenis tiek salīdzināts ar robežvērtību (sk. 7.3. punktu). Paraugi, kuros nosakāmā koncentrācija ir zem robežvērtības, tiek uzskatīti par atbilstīgiem, savukārt paraugi, kuros nosakāmā koncentrācija ir vienāda ar robežvērtību vai virs tās, tiek uzskatīti par iespējami neatbilstīgiem, kas jāanalizē ar apstiprināšanas metodi. Praksē par robežvērtību var tikt izmantots *BEQ* līmenis, kas atbilst divām trešdaļām maksimālā līmeņa, ja vien tiek nodrošināts, ka šķietamā atbilstība ir mazāka par 5 %, kā arī neatbilstīgie rezultāti ir pieņemamā īpatsvarā. Attiecībā uz atsevišķiem *PCDD/F* maksimālajiem līmeņiem un *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summu, veicot paraugu atbilstības pārbaudi bez frakcionēšanas, *PCDD/F* ir vajadzīgas atbilstošas biotesta robežvērtības. Attiecībā uz tādu paraugu pārbaudi, kuros ir pārsniegti intervences līmeņi, piemērota robežvērtība ir attiecīgā intervences līmeņa atbilstošā procentuālā daļa.

Ja paredzamā koncentrācija ir izteikta *BEQ*, paraugiem jābūt darba diapazonā un tiem jāpārsniedz ziņojamā līmeņa robeža (sk. 7.1.1. un 7.1.6. punktu).

7.1. Testa signāla novērtējums

7.1.1. Vispārīgas prasības

- Aprēķinot koncentrāciju no *TCDD* kalibrēšanas līknes, līknes variācijas koeficients augstākajā punktā būs krasi atšķirīgs (augsts variācijas koeficients (*CV*)). Darba diapazons ir zona, kurā *CV* ir mazāks par 15 %. Darba diapazona zemākais punkts (ziņojamā līmeņa robeža) ir jānosaka vismaz ar koeficientu trīs virs tukšā parauga

▼ M9

procedūrā iegūtā rezultāta. Darba diapazona augstāko punktu parasti apzīmē ar EC_{70} vērtību (70 % no maksimāli efektīvās koncentrācijas), bet zemāko norāda, ja CV šajā diapazonā ir augstāks par 15 %. Darba diapazonu nosaka validēšanas laikā. Robežvērtībām (sk. 7.3. punktu) jāatbilst darba diapazonam.

- Standartšķīdumi un parauga ekstrakti jāanalizē trīs vai vismaz divas reizes. Izmantojot divreiz analizēta parauga ekstraktu, standartšķīdums vai kontrolekstrakta analīze, ko sadala četrās līdz sešās porcijās uz plāksnes, atbilst signālam vai koncentrācijai (iespējams tikai darba diapazonā), kurā $CV < 15$ %.

7.1.2. Kalibrēšana

7.1.2.1. Kalibrēšana ar standartlīkni

- Koncentrāciju paraugos aprēķina, salīdzinot testa signālu ar $TCDD$ (vai PCB 126 vai $PCDD/PCDF$ /dioksīniem līdzīgu PCB standartmaisījuma) kalibrēšanas līkni BEQ līmeņa noteikšanai ekstraktā un pēc tam paraugā.

- Kalibrēšanas līknes ietver no 8 līdz 12 koncentrācijām (kas pārbaudītas vismaz divas reizes), ar pietiekamu skaitu koncentrāciju līknes zemākajā daļā (darba diapazons). Īpaša uzmanība jāpievērš līknes atbilstības kvalitātei darba diapazonā. Nelineārā regresijā R^2 vērtībai pašai par sevi nav būtiskas nozīmes atbilstības ticamības noteikšanā. Piemērotāku atbilstību sasniedz, samazinot atšķirību starp aprēķinātajām un novērojamajām koncentrācijām līknes darba diapazonā, piemēram, samazinot atlikušo pakāpes summu.

- Aplēsto līmeni parauga ekstraktā pēc tam koriģē atbilstīgi BEQ līmenim, ko aprēķina atbilstīgi matricas/šķīdinātāja tukšajam paraugam (ņemot vērā lietoto šķīdinātāju un ķīmikāliju piemaisījumu), un acīmredzamajai atgūstamībai (ko aprēķina pēc BEQ līmeņa piemērotos standartparaugos ar reprezentatīvajiem radniecīgiem paraugiem ap maksimālo līmeni vai intervences līmeni). Lai veiktu atgūstamības korekciju, acīmredzamajai atgūstamībai jābūt vajadzīgajā diapazonā (sk. 7.1.4. punktu). Standartparaugiem, kurus izmanto atgūstamības korekcijai, jāatbilst 7.2. punktā noteiktajām prasībām.

7.1.2.2. Kalibrēšana ar standartparaugiem

Var izmantot arī tādu kalibrēšanas līkni, kas sagatavota no vismaz četriem standartparaugiem (sk. 7.2.4. punktu): vienu negatīvās kontroles paraugu kopā ar trīs standartparaugiem, kuros ir 0,5x, 1x un 2x maksimālais līmenis vai intervences līmenis, tādējādi likvidējot nepieciešamību veikt ar tukšo paraugu un atgūstamību saistītas korekcijas, ja standartparaugu matricas īpašības atbilst nezināmajiem paraugiem. Šajā gadījumā testa signālu, kas atbilst divām trešdaļām no maksimālā līmeņa (sk. 7.3. punktu), var aprēķināt tieši no šiem paraugiem un izmantot par robežvērtību. Tādu paraugu pārbaudei, kuros pārsniegti intervences līmeņi, par robežvērtību jāuzskata šo intervences līmeņu atbilstīga procentuālā daļa.

▼M9

7.1.3. *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* atsevišķa noteikšana

Ekstraktus var sašķelt frakcijās, kas satur *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgus *PCB*, ļaujot noteikt *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* atsevišķus *TEQ* līmeņus (*BEQ*). *PCB* 126 standarta kalibrēšanas līkni vēlams izmantot, lai novērtētu dioksīniem līdzīgu *PCB* saturošas frakcijas rezultātus.

7.1.4. Biotesta acīmredzamā atgūstamība

“Biotesta acīmredzamo atgūstamību” aprēķina no piemērotiem standartparaugiem, kuros reprezentatīvās radniecīgās vielas ir aptuveni maksimālajā līmenī vai intervences līmenī, izsakot kā *BEQ* līmeņa procentuālo daļu salīdzinājumā ar *TEQ* līmeni. Atkarībā no izmantotā testa veida un *TEF*⁽¹²⁾ atšķirības starp *TEF* un *REP* koeficientiem, ko piemēro attiecībā uz dioksīniem līdzīgiem *PCB*, var radīt zemu acīmredzamo atgūstamību dioksīniem līdzīgiem *PCB* salīdzinājumā ar *PCDD/F*. Tāpēc, ja *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* noteikšanu veic atsevišķi, biotesta acīmredzamā atgūstamība dioksīniem līdzīgiem *PCB* ir intervālā no 20 % līdz 60 %, *PCDD/F* – intervālā no 50 % līdz 130 % (diapazoni attiecas uz *TCDD* kalibrēšanas līkni). Tā kā dioksīniem līdzīgu *PCB* daļa *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summā var būt izteikta ar dažādām matricām un paraugiem, biotesta acīmredzamā atgūstamība attiecībā uz *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summu atspoguļo šo sastāvu un atgūstamībai jābūt intervālā no 30 % līdz 130 %. Ja *TEF* vērtības Savienības tiesību aktos attiecībā uz i un dioksīniem līdzīgiem *PCB* tiek būtiski pārskatītas, šie diapazoni ir jāpārskata.

7.1.5. Atgūstamības kontrole attīrīšanai

Veicot attīrīšanu, savienojumu zudumu pārbauda validēšanas laikā. Tukšais paraugs, kam pievienots standarts ar dažādu radniecīgo vielu maisījumu, jāiesniedz attīrīšanai (vismaz $n = 3$), pārbaudot atgūstamību un atšķirību ar apstiprināšanas metodi. Atgūstamībai jābūt 60 % līdz 120 % intervālā, jo īpaši attiecībā uz radniecīgām vielām, kuru devums *TEQ* līmenim dažādos maisījumos pārsniedz 10 %.

7.1.6. Ziņojamā līmeņa robeža

Ziņojot par *BEQ* līmeņiem, ziņojamā līmeņa robežu nosaka no attiecīgajiem matricas paraugiem, tostarp parastām radniecīgām vielām, un nevis no standartu kalibrēšanas līknes tās zemās precizitātes dēļ līknes zemākajā diapazonā. Jāņem vērā ekstrakcijas un attīrīšanas procedūras ietekme. Ziņojamā līmeņa robežu nosaka ar koeficientu ne mazāku par 3 virs procedūras tukšajiem paraugiem.

7.2. Standartparaugu izmantošana

7.2.1. Standartparaugi ietver parauga matrici, radniecīgās vielas un *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* koncentrācijas diapazonus aptuveni maksimālajā līmenī vai intervences līmenī.

7.2.2. Katrā analīžu sērijā ir jāiekļauj negatīvās kontroles paraugs un, ja tas nav iespējams, procedūras tukšais paraugs un standartparaugs pie maksimālā līmeņa vai intervences līmeņa. Šos paraugus ekstrahē un analizē vienlaikus identiskos apstākļos. Standartparauga signālam ievērojami jāpārsniedz tukšā parauga signāls, lai nodrošinātu testa piemērotību. Šos paraugus var izmantot tukšajām korekcijām un atgūstamības korekcijām.

⁽¹²⁾ Spēkā esošo prasību pamatā ir *TEF*, kas publicēti *M. Van den Berg et al, Toxicol Sci* 93 (2), 223.–241. lpp. (2006).

▼ **M9**

7.2.3. Standartparaugi, kas izvēlēti atgūstamības korekcijai, ir reprezentatīvi attiecībā uz testa paraugiem, kas nozīmē, ka radniecīgās vielas nevar radīt pazeminātus koncentrācijas rezultātus.

7.2.4. Papildu standartparaugus, kuros maksimālais līmenis vai intervences līmenis ir, piemēram, 0,5 un 2 reizes lielāks par maksimālo līmeni, var iekļaut, lai pierādītu testa veikspēju vajadzīgajā diapazonā maksimālā līmeņa vai intervences līmeņa kontrolei. Lai testa paraugos aprēķinātu *BEQ* līmeņus, šos paraugus var kombinēt (sk. 7.1.2.2. punktu).

7.3. *Robežvērtību noteikšana*

Jānosaka saistība starp bioanalītiskajiem rezultātiem *BEQ* un apstiprināšanas metodes izmantojuma rezultātā iegūtajiem rezultātiem *TEQ*, piemēram, veicot ar matrici iezīmētas kalibrēšanas eksperimentus, kuros izmanto standartparaugus ar standartvielu piedevu, kas ir 0, 0,5, 1 un 2 reizes lielāka par *ML*, atkārtot sešas reizes katrā līmenī ($n = 24$). Korekcijas koeficientus (tukšais paraugs un atgūstamība) var aprēķināt no šīs saistības, taču tie jāpārbauda saskaņā ar 7.2.2. punktu.

Lai pieņemtu lēmumu par parauga atbilstību maksimālā līmeņa vai intervences līmeņa kontroles kritērijiem, ir jānosaka robežvērtības, ja nepieciešams, nosakot maksimālos līmeņus vai intervences līmeni attiecībā uz *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgiem *PCB* katram atsevišķi, vai *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summai. Tos atspoguļo bioanalītisko rezultātu izklides *zemākais* beigu punkts (koriģēts atbilstīgi tukšajam paraugam un atgūstamībai), kas atbilst apstiprināšanas metodes izšķiršanas robežai, kuras pamatā ir 95 % ticamības līmenis, nosakot, ka šķietamās atbilstības attiecība ir mazāka par 5 % un *RSD_R* ir mazāka par 25 %. Apstiprināšanas metodes izšķiršanas robeža ir maksimālais līmenis, ņemot vērā paplašināto mērījuma nenoteiktību.

Robežvērtību (kā *BEQ*) var aprēķināt atbilstīgi vienai no 7.3.1., 7.3.2. un 7.3.3. punktā noteiktajām pieejām (sk. 1. attēlu).

7.3.1. Prognozējamā intervāla *zemākās* 95 % robežas izmantošana pie apstiprināšanas metodes izšķiršanas robežas:

$$Τιμή αποκοπής = BEQ_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_I - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

kur:

BEQ_{DL} *BEQ* atbilst apstiprināšanas metodes izšķiršanas robežai, kas ir maksimālais līmenis, ņemot vērā paplašināto mērījuma nenoteiktību;

s_{y,x} atlikusī standartnovirze;

t_{α,f = m-2} pārbaudāmais koeficients ($\alpha = 5\%$, $f =$ vienas brīvības pakāpe);

m kalibrācijas punktu kopējais skaits (rādītājs *j*);

n atkārtoto mērījumu skaits katrā līmenī;

x_i ar apstiprināšanas metodi noteiktā kalibrēšanas punkta “*i*” parauga koncentrācija (*TEQ*);

$\bar{x}$ visu kalibrēšanas paraugu koncentrāciju vidējais aritmētiskais (*TEQ*);

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_I - \bar{x})^2$ kvadrātu summas parametrs, *i* = kalibrācijas punkta *i* rādītājs.

▼ **M9**

- 7.3.2. Aprēķināšana no bioanalītiskajiem rezultātiem (kas koriģēti atbilstīgi tukšajam paraugam un atgūstamībai), kuri iegūti no apstiprināšanas metodes izšķiršanas robežas līmenī kontaminētu paraugu ($n \geq 6$) vairākkārtējas analīzes, izsakot tos kā datu izkliedes *zemāko* beigu punktu attiecīgajā vidējā BEQ vērtībā:

$$\text{Robežvērtība} = BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

kur:

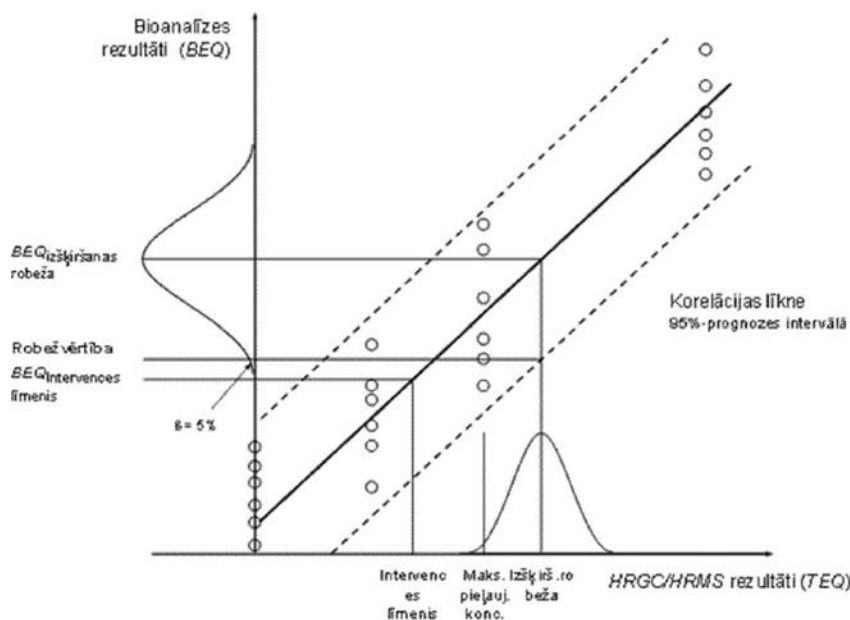
SD_R ir biotesta rezultātu standartnovirze ar BEQ_{DL} , kas izmērīta saskaņā ar starplaboratorijas reproducējamības nosacījumiem.

- 7.3.3. Bioanalītisko rezultātu vidējā aritmētiskā rezultāta aprēķināšana (BEQ koriģēta atbilstīgi tukšajam paraugam un atgūstamībai), vairākkārtēji analizējot paraugus ($n \geq 6$), kuri kontaminēti par 2/3 no maksimālā līmeņa vai intervences līmeņa, balstoties uz novērojumu, ka šis līmenis aptuveni atbilst 7.3.1. punktā vai 7.3.2. punktā noteiktajai robežvērtībai.

Robežvērtību aprēķina ar 95 % ticamības līmeni, kur šķietami atbilstošo paraugu proporcija nav lielāka par 5 %, un $RSD_R < 25$ %:

- 1) no 95 % prognozes intervāla *zemākās* robežas pie apstiprināšanas metodes izšķiršanas robežas;
- 2) no apstiprināšanas metodes izšķiršanas robežas līmenī kontaminētu paraugu ($n \geq 6$) vairākkārtējas analīzes, kura izteikta kā datu izkliedes *zemākais* beigu punkts (1. Attēlā attēlota zvanveida līknes formā) atbilstošajā vidējā BEQ vērtībā.

1. attēls.



- 7.3.4. Robežvērtību ierobežojumi

Ar BEQ pamatotās robežvērtības, kas aprēķinātas no validēšanas laikā iegūtajām RSD_R , izmantojot nelielu skaitu paraugu ar atšķirīgām matricu/radniecīgo vielu īpašībām, var būt augstākas par maksimālajiem līmeņiem vai intervences līmeņiem, kuru pamatā ir TEQ , to lielākas precizitātes dēļ, ko nevar iegūt regulārajā analīzē, ja ir jākontrolē nezināms iespējami radniecīgo vielu īpašību spektrs. Šādos gadījumos robežvērtības aprēķina no $RSD_R = 25$ % vai ieteicams izmantot divas trešdaļas no maksimālā līmeņa vai intervences līmeņa.

▼ **M9**7.4. *Veiktspējas rādītāji*

7.4.1. Tā kā attiecībā uz bioanalīžu metodēm nav iespējams izmantot iekšējos standartus, bioanalīžu metožu atkārtotamības testus veic, lai iegūtu informāciju par standartnovirzi testa sēriju ietvaros un to starplaikā. Atkārtotamībai jābūt mazākai par 20 %, un reproducējamībai laboratorijā jābūt mazākai par 25 %. To pamatā ir aprēķinātie līmeņi *BEQ* pēc tukšā parauga un atgūstamības korekcijas.

7.4.2. Validēšanas procedūras ietvaros jāuzrāda tests, ar ko atšķir tukšo paraugu no parauga ar koncentrāciju pie robežvērtības, ļaujot veikt paraugu identificēšanu virs atbilstošās robežvērtības (sk. 7.1.2. punktu).

7.4.3. Jādefinē nosakāmie savienojumi, iespējamie traucējumi un maksimāli pieļaujamā tukšā parauga koncentrācija.

7.4.4. Parauga ekstrakta, ja to nosaka trijos atkārtojumos, procentuālā standartnovirze signālā vai koncentrācija, kas aprēķināta no signāla (iespējams tikai darba diapazonā), nedrīkst pārsniegt 15 %.

7.4.5. Standartparauga(-u) nekoriģētos rezultātus, kas izteikti *BEQ* (tukšais paraugs un maksimālais līmenis vai intervences līmenis), izmanto bioanalīžu metodes veiktspējas novērtēšanai konstantā periodā.

7.4.6. Izveido un pārbauda procedūras tukšos paraugus un katra veida standartparauga kvalitātes kontroles grafikus, lai pārliecinātos, ka analīžu veiktspēja atbilst prasībām, jo īpaši attiecībā uz procedūras tukšajiem paraugiem un, konkrēti, vajadzīgo minimālo atšķirību darba diapazona zemākajā punktā un standartparaugiem attiecībā uz reproducējamību laboratorijā. Procedūras tukšie paraugi jākontrolē tā, lai paraugu atdalīšanas laikā nepieļautu šķietami atbilstošu rezultātu iegūšanu.

7.4.7. Rezultātus, kas ar apstiprināšanas metodēm iegūti no iespējami inficētiem paraugiem, un 2 % līdz 10 % atbilstošu paraugu (ne mazāk kā 20 paraugi uz vienu matrici) apkopo un izmanto, lai novērtētu skrīninga metodes veiktspēju un *BEQ* un *TEQ* saistību. Šo datubāzi var izmantot to robežvērtību atkārtotam novērtējumam, kas piemērojamas regulārajiem paraugiem attiecībā uz validētām matricām.

7.4.8. Metodes sekmīgu izpildi var arī pierādīt, piedaloties starplaboratoriju pētījumos. Rezultātus no paraugiem, kuri analizēti starplaboratoriju pētījumos un kuru koncentrācijas diapazons ir, piemēram, 2x lielāks par maksimālo līmeni, var iekļaut šķietami atbilstošās attiecības novērtējumā, ja laboratorija var pierādīt sekmīgu izpildi. Paraugos iekļauj visbiežāk izmantojamās radniecīgās vielas, kas iegūtas no dažādiem avotiem.

7.4.9. Incidentu laikā robežvērtības var atkārtoti novērtēt, atspoguļojot šā konkrētā incidenta īpašo matrici un radniecīgo vielu īpašības.

8. **Rezultātu paziņošana**8.1. *Apstiprināšanas metodes*

8.1.1. Analītiskajos rezultātos iekļauj atsevišķu *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* radniecīgo vielu koncentrācijas, ziņojot par mazāko, lielāko un vidējo analītisko rezultātu, lai rezultātu ziņojumā iekļautu pēc iespējas pilnīgāku informāciju un tādējādi dotu iespēju interpretēt rezultātus saskaņā konkrētām prasībām.

▼ **M9**

- 8.1.2. Ziņojumā norāda *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* ekstrahēšanā izmantoto metodi.
- 8.1.3. Gadījumos, kad ir pārsniegts maksimālais līmenis (šādā gadījumā – atgūstamība attiecībā uz vienu no divām otrreizējām analizēm) un citos gadījumos pēc pieprasījuma, ir jānorāda atsevišķu iekšējo standartu atgūstamība, ja tā nav 6.2.5. punktā norādītajā diapazonā.
- 8.1.4. Lemjot par parauga atbilstību, ir jāņem vērā paplašinātā mērījuma nenoteiktība, tāpēc ir jāsniedz arī šis parametrs. Līdz ar to analītiskos rezultātus paziņo kā “ $x \pm U$ ”, kur x ir analītiskais rezultāts un U – mērījuma paplašinātā nenoteiktība, izmantojot pārklāšanās koeficientu 2, kas nodrošina aptuveni 95 % ticamības līmeni. Ja *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgus *PCB* nosaka atsevišķi, tad atsevišķo *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* analītisko rezultātu aplēstā paplašinātās nenoteiktības summa jāizmanto kā *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summa.
- 8.1.5. Rezultāti jāizsaka tādās pašās vienībās un ar vismaz tādu pašu nozīmīgo rādītāju skaitu kā maksimālais līmenis, kas noteikts Direktīvā 2002/32/EK.
- 8.2. *Bioanalīžu skrīninga metodes*
- 8.2.1. Skrīninga rezultāts jāizsaka kā “atbilstīgs” vai “iespējami neatbilstīgs”.
- 8.2.2. Paraugi, kuros signāls ir zem ziņojamā līmeņa robežas, jāizsaka kā paraugi “zem ziņojamā līmeņa robežas”.
- 8.2.3. Paraugi, kuros signāls ir zem ziņojamā līmeņa robežas, jāizsaka kā paraugi “zem ziņojamā līmeņa robežas”. Paraugus, kuros signāls ir virs ziņojamā līmeņa robežas, paziņo kā tādus, kas “pārsniedz darba diapazonu”, un līmeni, kas atbilst darba diapazona augstākajam punktam, izsaka *BEQ*.
- 8.2.4. Attiecībā uz visiem parauga matricēs veidiem ziņojumā norāda novērtējuma pamatā esošo maksimālo līmeni vai intervences līmeni.
- 8.2.5. Ziņojumā norāda izmantotā testa veidu, testa pamatprincipus un kalibrēšanas veidu.
- 8.2.6. Ziņojumā norāda *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* ekstrahēšanā izmantoto metodi.
- 8.2.7. Attiecībā uz paraugiem, par kuriem ir aizdomas, ka tie nav atbilstoši, ziņojumā jāiekļauj piezīme par veicamajiem pasākumiem. *PCDD/F* koncentrācija un *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summa šajos paraugos ar paaugstinātu līmeni ir jānosaka/jāapstiprina ar apstiprināšanas metodi.
- 8.2.8. Neatbilstošus rezultātus paziņo tikai no apstiprināšanas analīzes.
- 8.3. *Skrīninga fizikāli ķīmiskās metodes*
- 8.3.1. Skrīninga rezultāts jāizsaka kā “atbilstīgs” vai “iespējami neatbilstīgs”.
- 8.3.2. Attiecībā uz visiem parauga matricēs veidiem ziņojumā norāda novērtējuma pamatā esošo maksimālo līmeni vai intervences līmeni.

▼ M9

- 8.3.3. Turklāt var sniegt atsevišķu *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* radniecīgo vielu koncentrācijas, ziņojot par mazāko, lielāko un vidējo analītisko rezultātu. Rezultāti jāizsaka tādās pašās vienībās un ar vismaz tādu pašu nozīmīgo rādītāju skaitu kā maksimālais līmenis, kas noteikts Direktīvā 2002/32/EK.
- 8.3.4. Gadījumos, kad ir pārsniegts maksimālais līmenis (šajā gadījumā – atgūstamība attiecībā uz vienu no divām otrreizējām analizēm) un pārējos gadījumos pēc pieprasījuma, ir jānorāda atsevišķu iekšējo standartu atgūstamība, ja tā nav 6.2.5. punktā norādītajā diapazonā.
- 8.3.5. Ziņojumā norāda izmantoto *GC-MS* metodi.
- 8.3.6. Ziņojumā norāda *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* ekstrahēšanā izmantoto metodi.
- 8.3.7. Attiecībā uz paraugiem, par kuriem ir aizdomas, ka tie nav atbilstoši, ziņojumā jāiekļauj piezīme par veicamajiem pasākumiem. *PCDD/F* koncentrācija un *PCDD/F* un dioksīniem līdzīgu *PCB* summa šajos paraugos ar paaugstinātu līmeni ir jānosaka/jāapstiprina ar apstiprināšanas metodi.
- 8.3.8. Par neatbilstošiem rezultātiem izlemj tikai pēc apstiprināšanas analīzes.

III NODAĻA

PARAUGU GATAVOŠANA UN PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ ANALĪZES METODĒM, KO IZMANTO *PCB*, KAS NAV LĪDZĪGI DIOKSĪNIEM, DAUDZUMU OFICIĀLAI KONTROLEI BARĪBĀ

1. **Piemērošanas joma**

Šajā nodaļā noteiktās prasības piemēro, ja barību analizē, lai oficiāli kontrolētu *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem, līmeni, un attiecībā uz paraugu sagatavošanu un analītiskajām prasībām citiem regulatīviem mērķiem, tostarp kontroli, ko veic pārtikas aprītē iesaistīts uzņēmējs, lai nodrošinātu atbilstību Regulas (EK) Nr. 183/2005 noteikumiem.

2. **Piemērojamās noteikšanas metodes**

Gāzu hromatogrāfija/elektronu satveres detektors (*GC-ECD*), *GC-LRMS*, *GC-MS/MS*, *GC-HRMS* vai līdzvērtīgas metodes.

3. **Nosakāmās vielas identificēšana un apstiprināšana**

- 3.1. Relatīvais aizturtais attiecībā uz iekšējiem standartiem vai etalonstandartiem (pieņemamā novirze no $\pm 0,25\%$).

- 3.2. *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem, atdalīšana no traucējošajām vielām, izmantojot gāzu hromatogrāfiju, tostarp vienlaikus eluējot ar *PCB*, jo īpaši, ja paraugu koncentrācija atbilst atļautajai robežkoncentrācijai un ja ir jāapstiprina neatbilstība⁽¹³⁾.

- 3.3. Prasības *GC-MS* paņēmieniem

Monitorēt vismaz šādu skaitu molekulāro jonu vai raksturīgo jonu no molekulu klastera:

a) divus konkrētus jonus *HRMS* gadījumā;

b) trīs konkrētus jonus *LRMS* gadījumā;

⁽¹³⁾ Radniecīgās vielas, kuras bieži vienlaikus eluē ir, piemēram, *PCB* 28/31, *PCB* 52/69 un *PCB* 138/163/164. Attiecībā uz *GC-MS* metodēm jāapsver arī iespējamie traucējumi, ko rada izteikti hloratvasināto radniecīgo vielu fragmenti.

▼ **M9**

- c) divus īpašus prekursoru jonus, kuriem katram ir viens konkrēts atbilstošs pārejas produkta jons *MS-MS* gadījumā.

Maksimāli pieļaujamā pielāide attiecībā uz atlasīto masas fragmentu kopīgo koncentrāciju.

Atlasīto masas fragmentu kopīgās koncentrācijas relatīvā novirze no teorētiskās kopīgās koncentrācijas vai kalibrēšanas standarta attiecībā uz nosakāmo jonu (monitorē jonus, kuros ir vislielākā kopīgā koncentrācija) un jona(-u) apzīmētāju: $\pm 15 \%$.

3.4. Prasības *GC-ECD* paņēmieniem

Rezultātus, kas pārsniedz maksimālo līmeni, apstiprina ar divām *GC* kolonnām, kuru stacionārās fāzes ir ar atšķirīgu polaritāti.

4. Metodes veikspējas pierādīšana

Metodes veikspēja tiek validēta maksimālā līmeņa diapazonā (maksimālais līmenis reiz 0,5 līdz 2) ar piemērotu atkārtotas analīzes variāciju koeficientu (sk. 9. punktu par starpprecizitātes prasībām).

5. Kvantitatīvās noteikšanas robeža

PCB, kas nav līdzīgi dioksīniem, *LOQ* ⁽¹⁴⁾ summa nepārsniedz vienu trešdaļu no maksimālā līmeņa ⁽¹⁵⁾.

6. Kvalitātes kontrole

Regulāri jāveic tukšo paraugu kontrole, analīzes ar inficēto paraugu un kvalitātes kontrolparaugu, līdzdalība starplaboratoriju pētījumos par attiecīgajām matricēm.

7. Atgūstamības kontrole

- 7.1. Jāizmanto piemēroti iekšējie standarti ar fizikāli ķīmiskām īpašībām, kas līdzvērtīgas nosakāmās vielas īpašībām.

- 7.2. Iekšējo standartu pievienošana

Pievienošana produktiem (pirms ekstrakcijas un attīrīšanas procesa).

- 7.3. Prasības metodēm, kurās izmanto visas sešas ar izotopiem marķētas *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem, radniecīgās vielas:

- a) rezultātus koriģē atbilstīgi iekšējo standartu atgūstamībai;
- b) ar izotopu iezīmētu iekšējo standartu atgūstamībai jābūt intervālā no 60 % līdz 120 %;
- c) zemāka vai augstāka atgūstamība atsevišķām radniecīgām vielām, kuru veidotā daļa *PCB*, kas nav līdzīgi dioksīniem, summā ir mazāka par 10 %, ir pieņemama.

- 7.4. Prasības attiecībā uz metodēm, kurās neizmanto visus sešus ar izotopu iezīmētus iekšējos standartus vai citus iekšējos standartus:

- a) iekšējā(-o) standarta(-u) atgūstamības kontroli veic attiecībā uz visiem paraugiem;
- b) iekšējā(-o) standarta(-u) atgūstamībai jābūt intervālā no 60 % līdz 120 %;
- c) rezultātus koriģē atbilstīgi iekšējo standartu atgūstamībai.

⁽¹⁴⁾ Attiecīgā gadījumā piemēro principus, kas aprakstīti dokumentā *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>).

⁽¹⁵⁾ Ļoti ieteicams, lai reaģenta tukšā parauga koncentrācijas daļa parauga kontaminanta koncentrācijā būtu iespējami zemāka. Laboratorija ir atbildīga par tukšā parauga koncentrācijas vērtību maiņas kontroli, jo īpaši, ja tukšā parauga koncentrācijas vērtības tiek atskaitītas.

▼ M9

- 7.5. Neiezīmētu radniecīgo vielu atgūstamība jāpārbauda, izmantojot paraugus ar standartvielu piedevu vai kvalitātes kontrolparaugus maksimālā līmeņa diapazonā. Šo radniecīgo vielu atgūstamība ir uzskatāma par pieņemamu, ja tā ir intervālā no 60 % līdz 120 %.

8. Prasības laboratorijām

Saskaņā ar Regulas (EK) 2017/625 noteikumiem laboratorijas akreditē atzīta iestāde, kas darbojas saskaņā ar standartu ISO/IEC *Guide 58*, lai nodrošinātu to, ka laboratorijās piemēro analīžu kvalitātes nodrošināšanu. Laboratorijas akreditē, ievērojot EN ISO/IEC 17025 standartu. Turklāt attiecīgā gadījumā piemēro principus, kas aprakstīti dokumentā *Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCB analysis* ⁽¹⁶⁾.

9. Veiktspējas rādītāji: kritēriji tādu PCB, kas nav līdzīgi dioksīniem un ir maksimālajā līmenī, summas noteikšanai

	Izotopu atšķaidīšanas masspektrometrija (*)	Citi paņēmieni
Ticamība	no – 20 līdz + 20 %	no – 30 līdz + 30 %
Starpprecizitāte (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Starpība starp lielākā un mazākā analītiskā rezultāta aprēķiniem	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Jālieto visi seši ar ¹³C iezīmētie analogi, kā iekšējie standarti.

10. Rezultātu paziņošana

- 10.1. Analītiskajos rezultātos jānorāda atsevišķu PCB, kas nav līdzīgi dioksīniem, koncentrācijas un tādu PCB radniecīgo vielu koncentrācija, norādot mazāko, lielāko un vidējo analītisko rezultātu, lai ziņojumā iekļautu maksimāli daudz informācijas par rezultātiem un tādējādi dotu iespēju tos interpretēt saskaņā ar īpašām prasībām.
- 10.2. Ziņojumā norāda PCB ekstrahēšanā izmantoto metodi.
- 10.3. Gadījumos, kad ir pārsniegts maksimālais līmenis un citos gadījumos pēc pieprasījuma, ir jānorāda atsevišķu iekšējo standartu atgūstamība, ja tā nav 7. punktā norādītajā diapazonā.
- 10.4. Tā kā, lemjot par parauga atbilstību, ir jāņem vērā mērījuma paplašinātā nenoteiktība, ir jāsniedz arī šis parametrs. Līdz ar to analītiskos rezultātus paziņo kā “x +/- U”, kur x ir analītiskais rezultāts un U – mērījuma paplašinātā nenoteiktība, izmantojot pārklāšanās koeficientu 2, kas nodrošina aptuveni 95 % ticamības līmeni.
- 10.5. Rezultāti jāizsaka tādās pašās vienībās un ar vismaz tādu pašu nozīmīgo rādītāju skaitu kā maksimālais līmenis, kas noteikts Direktīvā 2002/32/EK.

B. EN STANDARTI

Piemērojot Regulas (ES) 2017/625 34. panta 2. punkta a) apakšpunktu, ir atbilstīgi šādi EN standarti:

⁽¹⁶⁾ Skatīt 9. zemsvītras piezīmi.

▼ **M9**

EN 17194 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Dezoksīnivalenola, aflatoksinā B1, fumonizīna B1 un B2, toksīnu T-2 un HT-2, zearalenona un ohratoksīna A noteikšana barības sastāvdaļās un barības maisījumos ar *LC-MS/MS*;

EN 17270 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Teobromīna noteikšana barības sastāvdaļās un barības maisījumos, tostarp no kakao iegūtās sastāvdaļās, ar šķidruma hromatogrāfiju”;

EN 17504 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Gosi-pola noteikšana kokvilnas sēklās un barībā ar *LC-MS/MS*;

EN 17362 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Pentahlorfenola (*PCP*) noteikšana barības sastāvdaļās un barības maisījumos ar *LCMS/MS*”;

EN 16279 “Dzīvnieku barība. Fluorīda satura noteikšana pēc apstrādes ar sālskābi, izmantojot jonu jutīgo elektrodu metodi (*ISE*)”;

EN 17053 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Mikroelementu, smago metālu un citu elementu noteikšana barībā, izmantojot *ICP-MS* metodi (multimetodi)”;

EN 15550 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Kadmija un svina noteikšana ar grafiāta kivetes atomabsorbcijas spektrometriju (*GF-AAS*) pēc augstspiediena mineralizācijas”;

EN 16206 “Dzīvnieku barība. Arsēna noteikšana ar hidrīda ģenerēšanas atomu absorbcijas spektrometriju (*HGAAS*) pēc šķelšanas mikroviļņu spiedienā (šķelšana ar 65 % slāpekļskābi un 30 % ūdeņraža peroksīdu)”;

EN 16277 “Dzīvnieku barība. Dzīvsudraba noteikšana ar aukstā tvaika atomu absorbcijas spektrometriju (*CVAAS*) pēc šķelšanas mikroviļņos (šķelšana ar 65 % slāpekļskābi un 30 % ūdeņraža peroksīdu);

EN 16278 “Dzīvnieku barība. Neorganiskā arsēna noteikšana ar hidrīda ģenerēšanas atomu absorbcijas spektrometriju (*HG-AAS*) pēc šķelšanas mikroviļņos un atdalīšanas ar cietās fāzes ekstrakciju (*SPE*);

EN 17374 “Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Neorganiskā arsēna noteikšana dzīvnieku barībā ar jonu apmaiņas hromatogrāfiju *HPLC-ICP-MS*

▼ **M2**

VI PIELIKUMS

ANALĪZES METODES, LAI NOTEIKTU DZĪVNIĒKU IZCELSMES
SASTĀVDAĻAS BARĪBAS OFICIĀLAI KONTROLEI▼ **M8**

1. MĒRĶIS UN DARBĪBAS JOMA

Lai barībā noteiktu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas, saskaņā ar pielikumā izklāstītajiem noteikumiem izmanto gaismas mikroskopiju vai polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR).

Šīs divas metodes ļauj noteikt dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu klātbūtni premiksos, barības sastāvdaļās un barības maisījumos. Tomēr ar tām nevar aprēķināt minēto sastāvdaļu daudzumu premiksos, barības sastāvdaļās un barības maisījumos. Abām metodēm noteikšanas robeža ir mazāka par 0,1 % (masas).

PĶR metode ļauj noteikt premiksos, barības sastāvdaļās un barības maisījumos klātesošo dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu taksonomisko grupu.

Šīs metodes piemēro Eiropas Parlamenta un Padomes Regulas (EK) Nr. 999/2001 ⁽¹⁾ 7. panta 1. punktā, minētās regulas IV pielikumā un Eiropas Parlamenta un Padomes Regulas (EK) Nr. 1069/2009 ⁽²⁾ 11. panta 1. punktā noteikto aizliegumu piemērošanas kontrolei.

Atkarībā no testējamās barības veida minētās metodes atsevišķi vai kopā var izmantot viena operatīvā protokola ietvaros atbilstīgi standarta darbības procedūrām (*SOP*), ko izveidojusi un savā tīmekļa vietnē ⁽³⁾ publicējusi ES references laboratorija attiecībā uz dzīvnieku proteīniem barībā (*EURL-AP*).

▼ **M2**

2. METODES

▼ **M8**2.1. **Gaismas mikroskopija**2.1.1. *Principi*

Dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas, kuras var būt analīzei nosūtītajos premiksos, barības sastāvdaļās un barības maisījumos, identificē pēc raksturīgiem un ar mikroskopu nosakāmiem elementiem, piemēram, muskuļu šķiedrām un citām gaļas daļiņām, skrimšļiem, kauliem, ragiem, matiem, sariem, bezmugurkaulnieku kutikulas fragmentiem, kukaiņu trahejas struktūrām, asins produktiem, piena tauku lodītēm, laktozes kristāliem, spalvām, olu čaumalām, asakām un zvīņām.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 999/2001 (2001. gada 22. maijs), ar ko paredz noteikumus dažu transmisīvo sūkļveida encefalopātiju profilaksei, kontrolei un apkarošanai (OV L 147, 31.5.2001., 1. lpp.).

⁽²⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 1069/2009 (2009. gada 21. oktobris), ar ko nosaka veselības aizsardzības noteikumus attiecībā uz dzīvnieku izcelsmes blakusproduktiem un atvasinātajiem produktiem, kuri nav paredzēti cilvēku patēriņam, un ar ko atceļ Regulu (EK) Nr. 1774/2002 (Dzīvnieku izcelsmes blakusproduktu regula) (OV L 300, 14.11.2009., 1. lpp.).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>

▼ **M8**

Mikroskopiskās pārbaudes pēc paraugu sagatavošanas veic izgulsnējot.

Paraugu izgulsnēšanas posmu veic šādi:

- a) lai noteiktu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas, kas nav sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļas, veic vienkāršu izgulsnēšanu ar tetrahloretilēnu (TCE), un to dara, kā norādīts 2.1.3.4.3. punktā;
- b) lai noteiktu sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļas, veic divkāršu izgulsnēšanu ar petrolēteri/tetrahloretilēnu (PE/TCE), un to dara, kā norādīts 2.1.3.4.4. punktā.

2.1.2. *Reaģenti un aprīkojums*

2.1.2.1. Reaģenti

2.1.2.1.1. Koncentrēšanas aģents

- Tetrahloretilēns (relatīvais blīvums 1,62).
- Petrolēteris (PE), viršanas temperatūra 40–60 °C (relatīvais blīvums 0,65).

2.1.2.1.2. Krāsošanas reaģents

- Alizarīnsarkanais šķīdums (atšķaida 2,5 ml 1M sāļsskābes 100 mililitros ūdens un pievieno šim šķīdumam 200 mg alizarīnsarkanā).

2.1.2.1.3. Ietvarvide

- Sārms (NaOH 2,5 % (m/V) vai KOH 2,5 % (m/V)).
- Glicerīns (neatšķaidīts, viskozitāte: 1 490 cP) vai ietvarvide ar identiskām īpašībām nepastāvīga priekšmetstikliņa sagatavošanai.
- *Norland*® *Optical Adhesive 65* (viskozitāte: 1 200 cP) vai ietvarvide ar identiskām īpašībām pastāvīga priekšmetstikliņa sagatavošanai.

2.1.2.1.4. Krāsojoša ietvarvide

- Lugola šķīdums (izšķīdina 2 g kālija jodīda 100 mililitros ūdens un pievieno 1 g joda, bieži sakratot).
- Cistīna reaģents (2 g svina acetāta, 10 g NaOH/100 ml ūdens).
- Fēlinga reaģents (pirms lietošanas sagatavo no divu izejas standartšķīdumu A un B vienādām daļām (1/1): A šķīdums (6,9 g vara (II) sulfāta pentahidrāta izšķīdina 100 ml ūdens); B šķīdums (34,6 g kālija nātrija tartrāta tetrahidrāta un 12 g NaOH izšķīdina 100 ml ūdens).
- Tetrametilbenzidīna/ūdeņraža peroksīds (1 g 3,3',5,5' tetrametilbenzidīna (TMB) izšķīdina 100 ml ledus etiķskābes un 150 ml ūdens. Pirms izmantošanas 4. daļas šā TMB šķīduma sajauc ar 1. daļu 3 % ūdeņraža peroksīda).

2.1.2.1.5. Skalošanas aģenti

- Etanols ≥ 96 % (tehniskais).
- Acetons (tehniskais).

2.1.2.1.6. Balināšanas reaģents

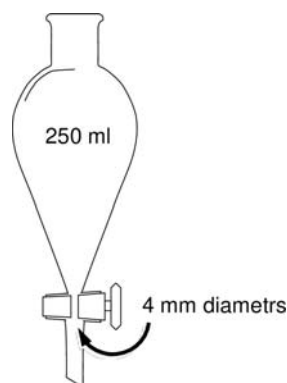
- Komerčiāls nātrija hipohlorīta šķīdums (9–14 % aktīvā hlora).

▼ **M8**

2.1.2.2.

Aprīkojums

- Analītiskie svāri ar precizitāti līdz 0,001 g.
- Smalcināšanas ierīce: naža vai rotora dzirnavas. Rotora dzirnavās aizliegts izmantot dzirnavu sietus ar $\leq 0,5$ mm acīm.
- Sieti ar 0,25 mm un 1 mm platām kvadrātveida acīm. Lai izvairītos no materiālu zudumiem, sietu diametrs (izņemot parauga priekšsijāšanai) nepārsniedz 10 cm. Sietu kalibrēšana nav vajadzīga.
- Konusveida dalāmpiltuve ar 250 ml tilpumu, aprīkota ar teflona vai slīpēta stikla krānu konusa pamatnē. Krāna atvērumsa diametrs ir ≥ 4 mm. Var izmantot (tikai vienkāršas izgulsnēšanas posmam ar TCE) arī izgulsnēšanas vārglāzi ar konisku dibenu, ja laboratorija ir pierādījusi, ka noteikšanas robežas ir identiskas tām, ko iegūst, izmantojot konusveida dalāmpiltuvi.

*Dalāmpiltuve*

- Stereomikroskops ar kopējā palielinājuma amplitūdu vismaz no $6,5\times$ līdz $40\times$.
- Optiskais mikroskops ar kopējā palielinājuma amplitūdu vismaz no $100\times$ līdz $400\times$ un atstarotas gaismas gaišo lauku. Papildus var izmantot polarizēto gaismu un diferenciālās interferences kontrastu.
- Laboratorijas standarta stikla trauki.
- Aprīkojums priekšmetstikliņu sagatavošanai: parasti mikroskopa priekšmetstikliņi, priekšmetstikliņi ar iedobi, segstikliņi (20×20 mm), pincete, smalka lāpstīņa.
- Laboratorijas krāsns.
- Centrifūga.
- Filtrpapīrs: kvalitatīvs celulozes filtrs (poru lielums: 4–11 μm).

2.1.3.

Paraugu ņemšana un paraugu sagatavošana

2.1.3.1.

Atlase

Izmanto reprezentatīvu paraugu, kas ņemts saskaņā ar I pielikumu.

▼ **M8**

2.1.3.1.1. Paraugu žāvēšana

Parausus, kuru mitruma saturs ir $> 14 \%$, pirms izmantošanas žāvē saskaņā ar III pielikumu.

2.1.3.1.2. Paraugu priekšsijāšana

Lai savāktu informāciju par iespējamo vidiskas izcelsmes piesārņojumu barībā, granulētu barību un kodolus ieteicams priekšsijāt līdz 1 mm izmēram un tad iegūtās divas frakcijas, kuras jāuzskata par atsevišķiem paraugiem, sagatavot un analizēt atsevišķi, kā arī atsevišķi ziņot par tām.

2.1.3.2. Veicamie piesardzības pasākumi

Lai laboratorijā novērstu savstarpēju piesārņošanu, visu vairākkārt izmantojamo aprīkojumu pirms izmantošanas rūpīgi notīra. Dalāmpiltuvi pirms tīrīšanas sadala pa daļām. Dalāmpiltuves daļas un stikla traukus no sākuma mazgā ar rokām un tad mazgāšanas ierīcē. Sietus tīra, izmantojot suku ar cietiem, sintētiskiem sariem. Ja sijāti taukaini līdzekļi, piemēram, zivju milti, sietu galīgo tīrīšanu ieteicams veikt ar acetonu un saspīestu gaisu.

2.1.3.3. Tauku vai eļļas paraugu sagatavošana

Šo protokolu izmanto, sagatavojot tauku paraugus:

- ja tauki ir cieti, tos sasilina krāsnī, līdz tie kļūst šķidri,
- izmantojot pipeti, 40 ml tauku no parauga apakšpuses pārnes uz centrifugēšanas mēģeni,
- paraugu centrifugē 10 minūtes ar 4 000 apgr./min,
- ja pēc centrifugēšanas tauki ir cieti, tos sasilina krāsnī, līdz tie kļūst šķidri,
- centrifugēšanu atkārto 5 minūtes ar 4 000 apgr./min,
- izmantojot nelielu karoti vai lāpstiņu, pusi no dekantētā piemaisījuma pārbaudīšanai pārnes uz mikroskopa priekšmetstikliņiem; Kā ietvarvidi ieteicams izmantot glicerīnu,
- atlikušos piemaisījumus izmanto nogulšņu sagatavošanā, kā aprakstīts 2.1.3.4.3. punkta pirmajā ievilkumā.

To pašu protokolu (izņemot pirmo un ceturto ievilkumu) piemēro, lai sagatavotu eļļas paraugus.

2.1.3.4. Tādu paraugu sagatavošana, kas nav tauku vai eļļas paraugi

2.1.3.4.1. Pakārtotu paraugu ņemšana un smalcināšana: vismaz 50 g parauga ņem pakārtota parauga analīzei un tad sasmalcina.

2.1.3.4.2. Izejvielu sagatavošana: sagatavo vismaz 5 g samalta pakārtotā parauga. To sijā līdz 0,25 mm lielumam un pārbauda abas iegūtās frakcijas.

▼M8

- 2.1.3.4.3. Vienkārša izgulsnēšana ar TCE, lai noteiktu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas, kas nav sauszemes bezmugurkaulnieki.

— Nogulšņu ekstrakcija un sagatavošana:

10 g (ar precizitāti līdz 0,01 g) smalcināta pakārtotā parauga pārnes dalāmpiltuvē vai izgulsnēšanas vārglāzē ar konisku dibenu un pievieno 50 ml TCE. Attiecībā uz zivju miltiem vai citiem tīriem dzīvnieku izcelsmes produktiem, minerālu sastāvdaļām vai premiksiem, kas rada vairāk nekā 10 % nogulšņu, piltuvē pārnesto daudzumu samazina līdz 3 g. Maisījumu vismaz 30 sekundes spēcīgi krata un uzmanīgi pievieno vēl vismaz 50 ml TCE, noskalojot piltuves iekšējo virsmu, lai atdalītu jebkādas pielipušas daļiņas. Iegūto maisījumu nostādina vismaz piecas minūtes, pirms atver krānu nogulšņu atdalīšanai.

Ja izmanto izgulsnēšanas vārglāzi ar konisku dibenu, maisījumu spēcīgi maisa vismaz 15 sekundes un jebkādas daļiņas, kas pielipušas vārglāzes malām, uzmanīgi noskalo no iekšējās virsmas ar vismaz 10 ml tīra TCE. Maisījumu nostādina trīs minūtes un tad atkal maisa 15 sekundes, un jebkādas vārglāzes maliņām pielipušās daļiņas uzmanīgi noskalo no iekšējās virsmas ar vismaz 10 ml TCE. Maisījumu nostādina vismaz piecas minūtes un tad, uzmanīgi dekantējot, šķidro frakciju atdala un atmet, cenšoties saglabāt visas nogulsnes.

Nogulsnes savāc uz filtrpapīra, kas ievietots piltuvē, lai varētu atdalīt atlikušo TCE, vienlaikus izvairoties no tauku nogulsnēšanās nogulsnēs. Nogulsnes izžāvē. Lai kontrolētu nogulsnēšanās posmu, nogulsnes pēc tam ieteicams nosvērt (ar precizitāti līdz 0,001 g). Visbeidzot, nogulsnes sijā līdz 0,25 mm lielumam un pārbauda divas iegūtās frakcijas, ja vien netiek atzīts, ka sijāšana nav vajadzīga.

— Flotātu ekstrakcija un sagatavošana:

pēc tam, kad ar iepriekš aprakstīto metodi atgūtas nogulsnes, dalāmpiltuvē paliek divas fāzes: no TCE sastāvoša šķidra fāze un no flotējoša materiāla sastāvošai cietā fāze. Cietā fāze ir flotāts, ko atgūst, ja no piltuves, atverot krānu, pilnībā nolej TCE. Apgriežot dalāmpiltuvi, flotātu pārnes Petri trauciņā un ar gaisu žāvē velkmes skapī. To sijā līdz 0,25 mm lielumam un pārbauda abas iegūtās frakcijas.

— Krāsošanas reaģentu izmantošana:

Lai atvieglotu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu noteikšanu, laborants paraugu sagatavošanas laikā var izmantot reaģentus saskaņā ar pamatnostādņēm, ko *EURL-AP* izstrādājusi un publicējusi savā tīmekļa vietnē.

▼M8

Ja nogulsnes krāsotas ar alizarīnsarkano šķīdumu, piemēro šādu protokolu:

- Izzāvētās nogulsnes pārnes stikla mēģenē un divreiz noskalo ar apmēram 5 ml etanola (katru reizi virpuļmikseri izmanto 30 sekundes, šķīdinātāju nostādina apmēram pusotras minūtes un nolej).
- Nogulsnes balina, pievienojot vismaz 1 ml nātrija hipohlorīta šķīduma. Reakcijai ļauj turpināties 10 minūtes. Mēģeni piepilda ar ūdeni, nogulsnes nostādina 2–3 minūtes un lēni nolej ūdeni un suspendētās daļiņas.
- Nogulsnes noskalo vēl divas reizes ar apmēram 10 ml ūdens (katru reizi virpuļmikseri izmanto 30 sekundes, ļauj nogulsnēties un nolej ūdeni).
- pievieno 2–10 pilienus alizarīnsarkanā šķīduma un maisījumu ievieto virpuļmikserī. Reakcijai ļauj notikt 30 sekundes un iekrāsotās nogulsnes divreiz noskalo ar apmēram 5 ml etanola un tad vienreiz ar acetonu (katru reizi virpuļmikseri izmanto 30 sekundes, šķīdumu nostādina apmēram 1 minūti un nolej).
- Iekrāsotās nogulsnes žāvē.

2.1.3.4.4. Divkārsā izgulsnēšana ar PE/TCE sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļu noteikšanai.

Visus posmus veic 250 ml konusveida dalāmpiltuvē, kā aprakstīts 2.1.2.2. punkta ceturtajā ievilkumā.

- 10 g (ar precizitāti līdz 0,01 g) smalcināta pakārtotā parauga pārnes dalāmpiltuvē un tam vispirms veic vienkāršu izgulsnēšanu ar TCE, kā aprakstīts 2.1.3.4.3. punktā, ieskaitot nogulšņu atgūšanu uz filtrpapīra, kas novietots uz piltuves. Šīs nogulsnes var izmantot tāpat kā ar 2.1.3.4.3. punktā aprakstīto procedūru iegūtās nogulsnes.
- Nelielo daudzumu TCE, kas notecināts kopā ar nogulsnēm, pārnes mērcilindrā. Atverot dalāmpiltuves krānu, turpina piepildīt mērcilindru, līdz iegūst 30 ml TCE. Kad šis tilpums ir sasniegts, krānu aizver.
- Šo savāktu TCE tilpumu aizstāj, dalāmpiltuvē pievienojot 30 ml petrolētera ar 40–60 °C viršanas temperatūru. Dalāmpiltuves saturu rūpīgi samaisa, lai iegūtu 30 % PE/70 % TCE maisījumu (ar blīvumu aptuveni 1,26 g/cm³). Ļauj materiālam nogulsnēties 10 minūtes. Atdalīsies divas jaunas frakcijas: otrās nogulsnes un galīgais flotāts (< 1,26 g/cm³). Otrās nogulsnes paredzēts atgūt Petri trauciņā (vai uz piltuves uzlikta filtrpapīra), atverot krānu, līdz dalāmpiltuvē paliek tikai nedaudz šķīdinātāja maisījuma un galīgais flotāts. Atlikušo šķīdumu un galīgo flotātu savāc atsevišķi uz filtrpapīra, kas novietots uz piltuves. Dalāmpiltuves sienu skalo ar PE, lai savāktu visu materiālu no galīgā flotāta. Gala flotātam ļauj izžūt. Galīgo flotātu sijā līdz 0,25 mm lielumam, un pārbauda divas iegūtās frakcijas, lai noteiktu sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļas, ja vien netiek atzīts, ka sijāšana nav vajadzīga.

▼ **M8**2.1.4. *Mikroskopiskā pārbaude*

2.1.4.1. Priekšmetstikliņa sagatavošana

Mikroskopa priekšmetstiklīņus sagatavo no nogulsniem un, atkarībā no laboranta izvēles, no flotāta vai izejvielas. Vajadzības gadījumā, lai noteiktu tikai sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļas, no iegūtā galīgā flotāta sagatavo arī priekšmetstiklīņus, kā aprakstīts 2.1.3.4.4. punktā. Sagatavo divas iegūtās frakcijas (smalko un rupjo). Uz priekšmetstiklīņiem uznestie frakciju paraugi raksturo visu frakciju.

Lai nodrošinātu pilnīgu pārbaudes protokola izpildi, kā noteikts 2.1.4.2. punktā, sagatavo pietiekamu skaitu priekšmetstiklīņu.

Saskaņā ar *SOP*, ko izstrādājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*, mikroskopa priekšmetstiklīņus pārklāj ar atbilstošu ietvarvidi. Priekšmetstiklīņus pārklāj ar segstiklīņiem.

2.1.4.2. Novērojumu plūsmkarte dzīvnieku izcelsmes daļiņu noteikšanai barības maisījumos, barības sastāvdaļās un premiksos.

Sagatavotos mikroskopa priekšmetstiklīņus novēro saskaņā ar 1. un 2. diagrammā norādītajām novērojumu plūsmkartēm.

Nogulšņu un, atkarībā no laboranta izvēles, flotātu vai izejvielu mikroskopiskos novērojumus veic, izmantojot optisko mikroskopu. Turklāt, lai noteiktu sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļas, novērojumus veic arī attiecībā uz galīgo flotātu, kas iegūts, kā aprakstīts 2.1.3.4.4. punktā, saskaņā ar 3. diagrammu. Attiecībā uz rupjajām frakcijām papildus optiskajam mikroskopam var izmantot stereomikroskopu. Katru priekšmetstiklīņu pilnībā pārbauda dažādos palielinājumos. Precīzi skaidrojumi par to, kā izmantot plūsmkarti, ir sīki izklāstīti *SOP*, ko izstrādājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*.

Stingri ievēro katrā novērojumu plūsmkarti posmā noteikto minimālo novērojamo priekšmetstiklīņu skaitu, izņemot gadījumus, kad frakcijas materiāla kopums ir nepietiekams noteiktā priekšmetstiklīņu skaita nodrošināšanai, piemēram, ja nogulsnes neiegūst. Daļiņu skaita reģistrēšanai vienā noteikšanā izmanto ne vairāk kā 6 priekšmetstiklīņus.

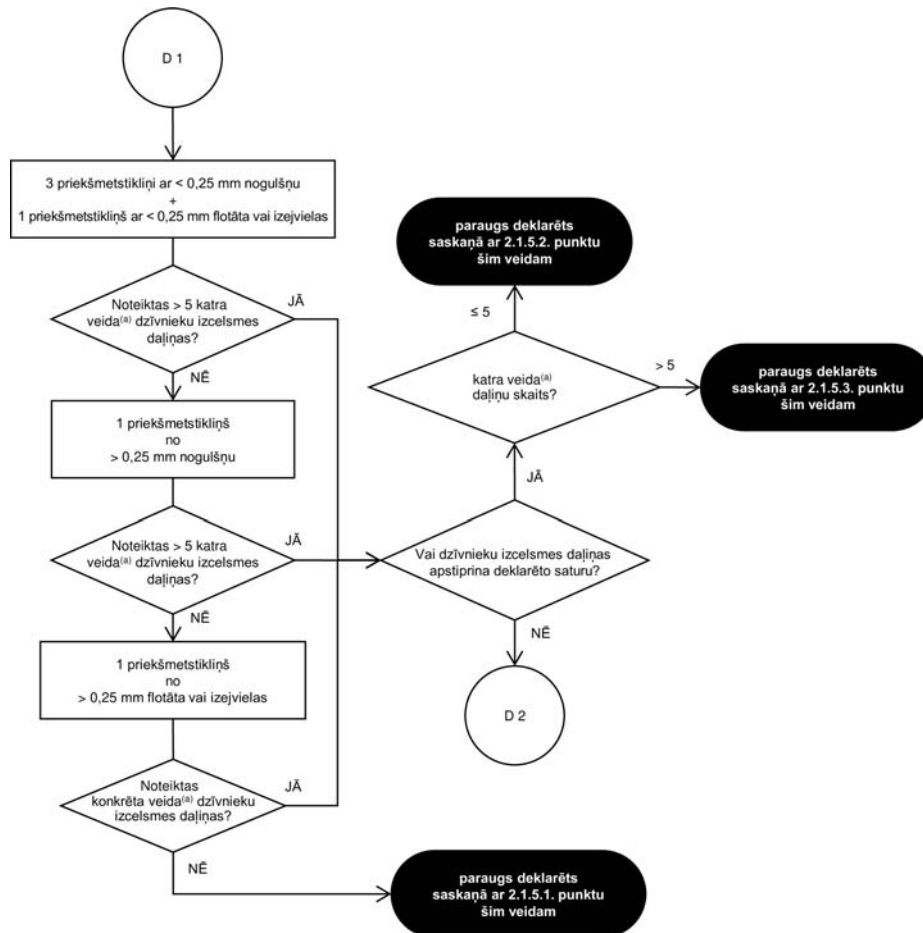
Ja uz flotāta vai izejvielas sagatavo papildu priekšmetstiklīņus ar specifiskāku krāsojošu ietvarvidi, kā aprakstīts 2.1.2.1.4. punktā, lai sīkāk raksturotu struktūras (piemēram, spalvas, mati, muskuļi vai asins daļiņas), kas noteiktas uz priekšmetstiklīņiem, kuri sagatavoti ar citām ietvarvidēm, kā aprakstīts 2.1.2.1.3. punktā, tad daļiņu skaitu aprēķina, pamatojoties uz vienā noteikšanā izmantoto priekšmetstiklīņu skaitu, kas nepārsniedz 6, ieskaitot papildu priekšmetstiklīņus ar specifiskāku ietvarvidi. Papildu priekšmetstiklīņus, kuri sagatavoti no galīgā flotāta, kas iegūts, kā aprakstīts 2.1.3.4.4. punktā, lai noteiktu sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļas, neņem vērā citu daļiņu veidu (suszemes mugurkaulnieku un zivju izcelsmes) noteikšanai.

Lai atvieglotu daļiņu veida un izcelsmes identificēšanu, laborants var izmantot tādus palīginstrumentus kā, piemēram, lēmumatbalsta sistēma, attēlu bibliotēkas un standartparaugi.

▼ **M8**

1. diagramma

Pirmās noteikšanas novērojumu plūsmkarte pēc vienkāršas izgulsnēšanas ar TCE dzīvnieku izcelsmes daļiņu, kas nav no sauszemes bezmugurkaulniekiem, noteikšanai barības maisījumos, barības sastāvdaļās un premiksos

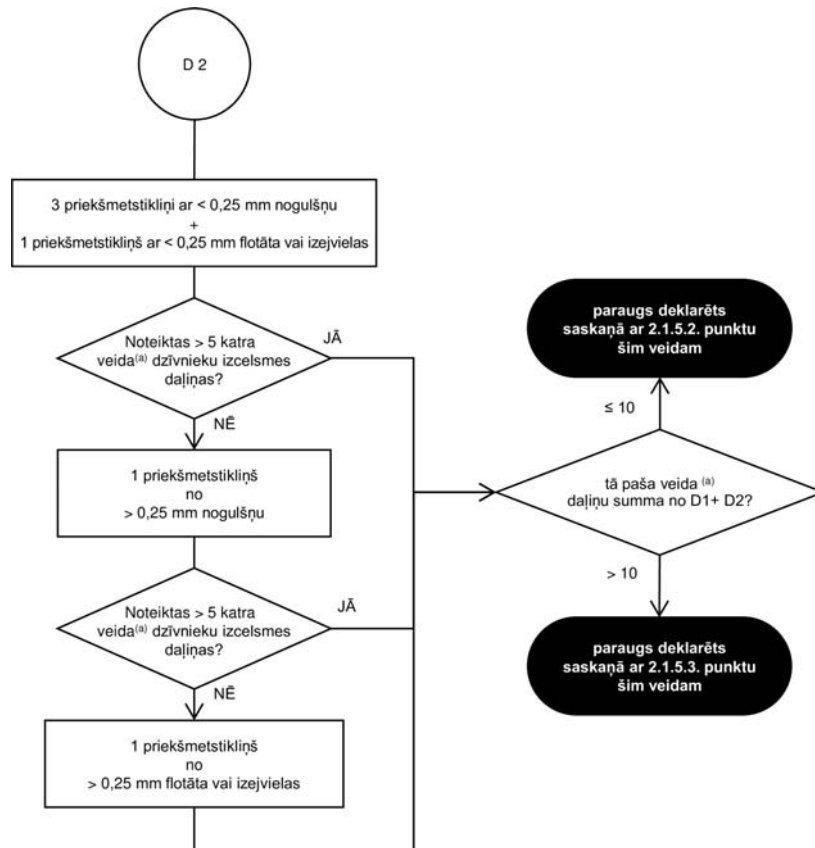


("D1" un "D2" attiecas uz pirmo un otro noteikšanu; (a): sauszemes mugurkaulnieki, zivis)

▼ **M8**

2. diagramma

Otrās noteikšanas novērojumu plūsmkarte pēc vienkāršas izgulsnēšanas ar TCE dzīvnieku izcelsmes daļiņu, kas nav no sauszemes bezmugurkaulniekiem, noteikšanai barības maisījumos, barības sastāvdaļās un premiksos

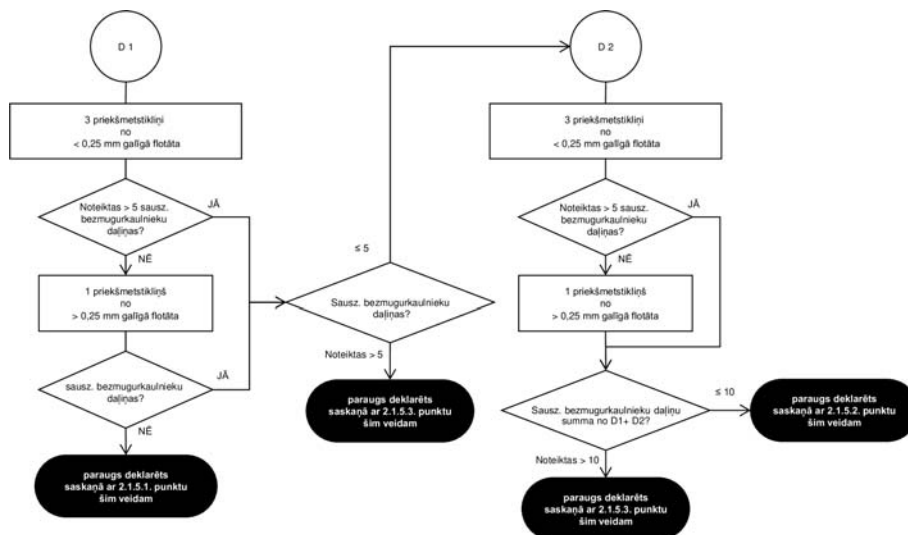


("D1" un "D2" attiecas uz pirmo un otro noteikšanu; (a): sauszemes mugurkaulnieki, zivis)

▼M8

3. diagramma

Novērojumu plūsmkarte pēc divkārtšas izgulsnēšanas ar PE/TCE sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes sastāvdaļu noteikšanai barības maisījumos, barības sastāvdaļās un premiksos



("D1" un "D2" attiecas uz pirmo un otro noteikšanu.)

2.1.4.3. Noteikšanu skaits

Noteikšanas veic dažādiem pakārtotiem paraugiem, kur katra parauga svars ir 50 g.

Ja pēc pirmās noteikšanas, kas veikta attiecīgi saskaņā ar 1. vai 3. diagrammā norādīto novērojumu plūsmkarti, dzīvnieku izcelsmes daļiņas nav noteiktas, papildu noteikšana nav jāveic, un analīzes rezultātu paziņo, lietojot 2.1.5.1. punktā izklāstīto formulējumu.

Ja pēc pirmās noteikšanas, kas veikta saskaņā ar 1. diagrammā norādīto novērojumu plūsmkarti, ir noteiktas viena vai vairākas konkrēta veida (t. i., sauszemes mugurkaulnieku vai zivju) dzīvnieku izcelsmes daļiņas un atklāto daļiņu veids atbilst parauga deklarētajam saturam, otrā noteikšana nav jāveic. Ja konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņu skaits, kas noteikts pirmās noteikšanas laikā, ir lielāks par 5, analīzes rezultātu paziņo par katru dzīvnieku veidu, lietojot 2.1.5.3. punktā izklāstīto formulējumu. Pretējā gadījumā analīzes rezultātu paziņo par katru dzīvnieku veidu, lietojot 2.1.5.2. punktā izklāstīto formulējumu.

Ja pēc pirmās noteikšanas, kas veikta saskaņā ar 3. diagrammā norādīto novērojumu plūsmkarti, ir noteiktas vairāk nekā 5 sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes daļiņas, otra noteikšana nav jāveic, un analīzes rezultātu paziņo, lietojot 2.1.5.3. punktā izklāstīto formulējumu šim veidam.

▼M8

Visos citos gadījumos – arī tad, ja laboratorijai nav iesniegta satura deklarācija, – veic otru noteikšanu, izmantojot jaunu pakārtoto paraugu. Ja pēc otrās noteikšanas, kas veikta attiecīgi saskaņā ar 2. vai 3. diagrammā norādīto novērojumu plūsmkarti, šo divu noteikšanu laikā noteikto konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļu summa ir lielāka par 10, analīzes rezultātu paziņo par katru dzīvnieku veidu, lietojot 2.1.5.3. punktā izklāstīto formulējumu. Pretējā gadījumā analīzes rezultātu paziņo par katru dzīvnieku veidu, lietojot 2.1.5.2. punktā izklāstīto formulējumu.

2.1.5. *Rezultātu izteikšana*

Paziņojot rezultātus, laboratorija norāda, kāda veida materiāls ir analizēts (nogulsnes, flotāts, galīgais flotāts vai izejviela). Ziņojumā skaidri jānorāda, cik noteikšanas ir veiktas un vai nav veikta frakciju sijāšana pirms priekšmetstikliņu sagatavošanas saskaņā ar 2.1.3.4.3. punkta pirmā ievilkuma trešo daļu vai 2.1.3.4.4. punkta trešo ievilkumu.

Laboratorijas ziņojumā jābūt vismaz informācijai par sauszemes mugurkaulnieku vai zivju izcelsmes sastāvdaļu klātbūtni.

Par dažātajām situācijām paziņo kādā no tālāk minētajiem veidiem.

2.1.5.1. Nav noteikta neviena konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņa:

— “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā nav noteikta neviena sauszemes mugurkaulnieku izcelsmes daļiņa.”

— “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā nav noteikta neviena zivju izcelsmes daļiņa.”

— “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā nav noteikta neviena sauszemes bezmugurkaulnieku izcelsmes daļiņa.”

2.1.5.2. Veicot tikai vienu noteikšanu, ir noteiktas 1 līdz 5 konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņas, vai divu noteikšanu gadījumā ir noteiktas 1 līdz 10 konkrēta veida daļiņas (noteikto daļiņu skaits nepārsniedz izšķiršanas robežu, kas paredzēta *SOP*, kuras izstrādājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*):

Ja ir veikta tikai viena noteikšana:

— “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā ir noteiktas ne vairāk kā 5 daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes mugurkaulniekiem. Daļiņas tika identificētas kā ... [kauls, skrimslis, muskulis, spalva, rags, cits (precizēt)]. Šī niecīgā klātbūtne nesasniedz šai mikroskopiskajai metodei paredzēto izšķiršanas robežu.”

— “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā ir noteiktas ne vairāk kā 5 daļiņas, kuru izcelsme ir no zivīm. Daļiņas tika identificētas kā ... [asaka, zvīņa, skrimslis, muskulis, otolīts, žaunas, cits (precizēt)]. Šī niecīgā klātbūtne nesasniedz šai mikroskopiskajai metodei paredzēto izšķiršanas robežu.”

▼M8

Ja ir veiktas divas noteikšanas:

- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā divās noteikšanās ir noteiktas ne vairāk kā 10 daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes mugurkaulniekiem. Daļiņas tika identificētas kā ... [kauls, skrimslis, muskulis, spalva, rags, cits (precizēt)]. Šī necīgā klātbūtne nesasniedz šai mikroskopiskajai metodei paredzēto izšķiršanas robežu.”
- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā divās noteikšanās ir noteiktas ne vairāk kā 10 daļiņas, kuru izcelsme ir no zivīm. Daļiņas tika identificētas kā ... [asaka, zvīņa, skrimslis, muskulis, otolīts, žaunas, cits (precizēt)]. Šī necīgā klātbūtne nesasniedz šai mikroskopiskajai metodei paredzēto izšķiršanas robežu.”
- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā divās noteikšanās ir noteiktas ne vairāk kā 10 daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes bezmugurkaulniekiem. Daļiņas tika identificētas kā ... [kutikulas fragmenti, mutes daļas, muskuļi, trahejas struktūras, cits (precizēt)]. Šī necīgā klātbūtne nesasniedz šai mikroskopiskajai metodei paredzēto izšķiršanas robežu.”

Turklāt:

- ja paraugs bijis priekšsijāts, laboratorijas ziņojumā min, kāda veida frakcijā (sijātā frakcijā, granulētā frakcijā vai kodolos) dzīvnieku izcelsmes daļiņas ir noteiktas, jo tikai sijātajā frakcijā noteiktas dzīvnieku izcelsmes daļiņas var liecināt par vidišķas izcelsmes piesārņojumu.
- Ja ir noteiktas tikai tādas dzīvnieku izcelsmes daļiņas, kuras nav klasificējamas ne kā sauszemes mugurkaulnieki, ne zivis (piem., muskuļu šķiedras), ziņojumā norāda, ka ir noteiktas tikai šādas dzīvnieku izcelsmes daļiņas un ka nav iespējams izslēgt, ka to izcelsme ir no sauszemes mugurkaulniekiem.

2.1.5.3. Veicot tikai vienu noteikšanu, ir noteiktas vairāk nekā 5 konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņas, vai divu noteikšanu gadījumā ir noteiktas vairāk nekā 10 konkrēta veida daļiņas:

Ja ir veikta tikai viena noteikšana:

- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā ir noteiktas vairāk nekā 5 daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes mugurkaulniekiem. Daļiņas tika identificētas kā ... [kauls, skrimslis, muskulis, spalva, rags, cits (precizēt)].”
- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā ir noteiktas vairāk nekā piecas daļiņas, kuru izcelsme ir no zivīm. Daļiņas tika identificētas kā ... [asaka, zvīņa, skrimslis, muskulis, otolīts, žaunas, cits (precizēt)].”
- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā ir noteiktas vairāk nekā 5 daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes bezmugurkaulniekiem. Daļiņas tika identificētas kā ... [kutikulas fragmenti, mutes daļas, muskuļi, trahejas struktūras, cits (precizēt)].”

▼ **M8**

Ja ir veiktas divas noteikšanas:

- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā divās noteikšanās ir noteiktas vairāk nekā 10 daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes mugurkaulniekiem. Daļiņas tika identificētas kā ... [kauls, skrimslis, muskulis, spalva, rags, cits (precizēt)].”
- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā divās noteikšanās ir noteiktas vairāk nekā 10 daļiņas, kuru izcelsme ir no zivīm. Daļiņas tika identificētas kā ... [asaka, zvīņa, skrimslis, muskulis, otolīts, žaunas, cits (precizēt)].”
- “Cik bija iespējams saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā divās noteikšanās ir noteiktas vairāk nekā 10 daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes bezmugurkaulniekiem. Daļiņas tika identificētas kā ... [kutikulas fragmenti, mutes daļas, muskuļi, trahejas struktūras, cits (precizēt)].”

Turklāt:

- ja paraugs bijis priekšsijāts, laboratorijas ziņojumā min, kāda veida frakcijā (sijātā frakcijā, granulētā frakcijā vai kodolos) dzīvnieku izcelsmes daļiņas ir noteiktas, jo tikai sijātajā frakcijā noteiktas dzīvnieku izcelsmes daļiņas var liecināt par vidišķas izcelsmes piesārņojumu.
- Ja ir noteiktas tikai tādas dzīvnieku izcelsmes daļiņas, kuras nav klasificējamas ne kā sauszemes mugurkaulnieki, ne zivis (piem., muskuļu šķiedras), ziņojumā norāda, ka ir noteiktas tikai šādas dzīvnieku izcelsmes daļiņas un ka nav iespējams izslēgt, ka to izcelsme ir no sauszemes mugurkaulniekiem.

▼ **M2**

2.2.

PQR

2.2.1.

Principis

Dzīvnieku izcelsmes dezoksiribonukleīnskābes (DNS) fragmentus, kas var būt barības sastāvdaļās un barības maisījumos, nosaka ar PQR, izmantojot gēnu amplifikācijas tehniku, kas vērsta uz sugām raksturīgām DNS sekvencēm.

Lai pielietotu PQR metodi, no sākuma jāveic DNS ekstrakcija. Pēc tam iegūtajam DNS ekstraktam piemēro amplifikāciju, lai noteiktu dzīvnieku sugas, uz kurām vērsta analīze.

2.2.2.

Reāģenti un aprīkojums

2.2.2.1.

Reāģenti:

2.2.2.1.1.

Reāģenti DNS ekstrakcijai

Izmanto tikai tos reāģentus, ko apstiprinājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*.

2.2.2.1.2.

Reāģenti gēnu amplifikācijai

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Praimeris un zondes

Izmanto tikai *EURL-AP* apstiprinātus oligonukleotīdu sekvenču praimerus un zondes ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Izmanto tikai tos *Master Mix* šķīdumus, kas nesatur reaģentus, kuri dzīvnieku izcelsmes DNS klātbūtnes ietekmē varētu radīt nepareizus rezultātus ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reaģenti piesārņojuma attīrīšanai

2.2.2.1.2.3.1. Sālsskābes šķīdums (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Balinātājs (nātrija hipohlorīta šķīdums ar 0,15 % aktīvā hlora)

2.2.2.1.2.3.3. Nekodīgi reaģenti tādu dārgu iekārtu kā analītisko svaru (piemēram, *MP Biomedicals* ražotais *DNA Erase™*) attīrīšanai no piesārņojuma

2.2.2.2. Aprīkojums

2.2.2.2.1. Analītiskie svāri ar precizitāti līdz 0,001 g

2.2.2.2.2. Smalcināšanas ierīce

2.2.2.2.3. Termoprocesors reāllaika PĶR

2.2.2.2.4. Mikrocentrifūgas mēģeņu centrifūga

2.2.2.2.5. Mikropipešu komplekts 1 µl līdz 1 000 µl lieliem pilieniem

2.2.2.2.6. Molekulārās bioloģijas standarta plastmasas izstrādājumi: mikrocentrifūgas mēģenes, mikropipešu plastmasas uzgaļi ar filtru, termoprocesoram piemērotas plates

2.2.2.2.7. Saldētavas paraugu un reaģentu glabāšanai

2.2.3. *Paraugu ņemšana un paraugu sagatavošana*

2.2.3.1. Paraugu ņemšana

Izmanto reprezentatīvu paraugu, kas ņemts saskaņā ar I pielikumā izklāstītajiem noteikumiem.

2.2.3.2. Paraugu sagatavošana

Laboratorijas paraugu sagatavošana līdz pat DNS ekstrakcijai atbilst II pielikumā norādītajām prasībām. Vismaz 50 g parauga ņem pakārtota parauga analīzei un tad samal.

Paraugu sagatavo atsevišķā telpā, ko neizmanto DNS ekstrakcijai un gēnu amplifikācijas reakcijām, kā aprakstīts ISO 24276.

Sagatavo divus paraugus, no kuriem katrs sver vismaz 100 mg.

2.2.4. *DNS ekstrakcija*

DNS ekstrakciju veic katram paraugam, kas sagatavots, izmantojot *SOP*, ko izveidojusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*.

Saskaņā ar ISO 24276 katrai ekstrakcijas partijai veic divas ekstrakcijas kontroles:

— ekstrakcijas tukšā parauga kontroli,

— DNS ekstrakcijas pozitīvo kontroli.

⁽¹⁾ Saraksts ar šiem praimeriem un zondēm katrai dzīvnieku sugai, uz kuru ir vērsta analīze, ir pieejams *EURL-AP* tīmekļa vietnē.

⁽²⁾ Funkcionālu *Master Mix* piemēri ir pieejami *EURL-AP* tīmekļa vietnē.

▼ **M2**2.2.5. *Gēnu amplifikācija*

Gēnu amplifikāciju veic, izmantojot katrai identificējamajai sugai apstiprinātās metodes. Minētās metodes ir noteiktas *SOP*, ko izveidojusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*. Lai novērtētu inhibīciju, katru DNS ekstraktu analizē vismaz divos dažādos atšķaidījumos.

Saskaņā ar ISO 24276 katrai mērķa sugai veic divas amplifikācijas kontroles:

- katrai PQR analīžu partijai vai platei izmanto mērķa DNS pozitīvo kontroli,
- katrai PQR analīžu platei vai partijai izmanto amplifikācijas reaģenta kontroli (saukta arī par bezmatricas kontroli).

2.2.6. *Rezultātu interpretēšana un izteikšana*

Ziņojot par rezultātiem, laboratorija norāda vismaz analizēto paraugu svaru, izmantoto ekstrakcijas metodi, noteikšanas reižu skaitu un metodes noteikšanas robežu.

Rezultātus neinterpretē un par tiem neziņo, ja DNS ekstrakcijas pozitīvā kontrole un mērķa DNS pozitīvās kontroles nesniedz pozitīvus rezultātus par analizēto mērķi, bet amplifikācijas reaģenta kontrole ir negatīva.

Ja divu paraugu rezultāti ir nekonsekventi, atkārtoti vismaz gēnu amplifikāciju. Ja laboratorijai ir aizdomas par to, ka nekonsekvenču iemesls var būt DNS ekstrakti, pirms rezultātu interpretēšanas veic jaunu DNS ekstrakciju, kam seko gēnu amplifikācija.

Galīgos rezultātus izsaka, integrējot un interpretējot šo divu paraugu rezultātus saskaņā ar *SOP*, ko izstrādājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*.

2.2.6.1. Negatīvs rezultāts

Par negatīvu rezultātu ziņo šādi:

iesniegtajā paraugā netika konstatēts X DNS (X ir dzīvnieku suga vai dzīvnieku sugas grupa, uz kuru vērsta analīze).

2.2.6.2. Pozitīvs rezultāts

Par pozitīvu rezultātu ziņo šādi:

iesniegtajā paraugā netika konstatēts X DNS (X ir dzīvnieku suga vai dzīvnieku sugas grupa, uz kuru vērsta analīze).

▼ **M9***VII PIELIKUMS***METODE MĀJPUTNU BARĪBAS ENERĢĒTISKĀS VĒRTĪBAS APRĒĶINĀŠANAI****1. METODE ENERĢĒTISKĀS VĒRTĪBAS APRĒĶINĀŠANAI UN IZTEIKŠANAI**

Mājputnu barības maisījumu enerģētiskā vērtība jāaprēķina, izmantojot tālāk izklāstīto formulu, pamatojoties uz noteiktu barības analītisko komponentu procentuālajām attiecībām. Šo vērtību izsaka megadžoulos (MJ) no vielmaiņas rezultātā pārveidotās enerģijas (ME), koriģējot to slāpeklim, uz vienu kilogramu barības maisījuma:

$$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ kopproteīna} + 0,3431 \times \% \text{ jēltauku} + 0,1669 \times \% \text{ cietes} + 0,1301 \times \% \text{ kopējo cukuru (kas izteikti kā saharoze)}.$$

2. DEKLARĒTĀJĀM VĒRTĪBĀM PIEMĒROJAMĀS PIELAIDES

Ja oficiālā pārbaudē atklāj neatbilstību (lielāku vai mazāku barības enerģētisko vērtību) starp pārbaudes rezultātu un deklarēto enerģētisko vērtību, tad minimālā pieļaujamā pieļaide ir 0,4 MJ/kg ME.

3. REZULTĀTA IZTEIKŠANA

Pēc iepriekš minētās formulas piemērošanas iegūtais rezultāts jānorāda līdz vienam ciparam aiz komata.

4. PARAUGU ŅEMŠANAS UN ANALĪZES METODES

Barības maisījumu paraugu ņemšana un analītisko komponentu satura noteikšana, kas norādīta aprēķināšanas metodē, jāveic attiecīgi atbilstoši Kopienas paraugu ņemšanas metodēm un analīzes metodēm barības oficiālās kontroles veikšanai.

Jāpiemēro:

- jēltauku satura noteikšanai: III pielikuma H daļā noteiktā B procedūra jēleļļu un jēltauku noteikšanas metodei,
- cietes satura noteikšanai: III pielikuma L daļā noteiktā polarimetrijas metode.

METODE KAĶU UN SUŅU BARĪBAS SASTĀVDAĻU UN BARĪBAS MAISĪJUMU ENERĢĒTISKĀS VĒRTĪBAS APRĒĶINĀŠANAI

Mājputnu barības sastāvdaļu un barības maisījumu enerģētiskā vērtība jāaprēķina saskaņā ar EN 16967 "Dzīvnieku barība. Paraugu ņemšanas un analīzes metodes – Prognozējošie vienādojumi vielmaiņas rezultātā pārveidotās enerģijas aprēķināšanai kaķu un suņu barības sastāvdaļās un barības maisījumos (lolojuma-dzīvnieku barībā), tostarp diētiskajā barībā

▼ M9▼ B

IX PIELIKUMS

6. PANTĀ MINĒTĀS ATBILSTĪBAS TABULAS

1. **Direktīva 71/250/EEK**

Direktīva 71/250/EEK	Šī regula
1. panta pirmā daļa	3. pants
1. panta otrā daļa	2. pants
2. pants	—
3. pants	—
Pielikuma 1. daļa	II pielikums
Pielikuma 2. daļa	—
Pielikuma 3. daļa	—
Pielikuma 4. daļa	III pielikuma O daļa
Pielikuma 5. daļa	III pielikuma M daļa
Pielikuma 6. daļa	III pielikuma N daļa
Pielikuma 7. daļa	III pielikuma Q daļa
Pielikuma 9. daļa	III pielikuma K daļa
Pielikuma 10. daļa	—
Pielikuma 11. daļa	—
Pielikuma 12. daļa	III pielikuma J daļa
Pielikuma 14. daļa	III pielikuma D daļa
Pielikuma 16. daļa	—

2. **Direktīva 71/393/EEK**

Direktīva 71/393/EEK	Šī regula
1. pants	3. pants
2. pants	—
3. pants	—
Pielikuma I daļa	III pielikuma A daļa
Pielikuma II daļa	III pielikuma E daļa
Pielikuma III daļa	III pielikuma P daļa
Pielikuma IV daļa	III pielikuma H daļa

3. **Direktīva 72/199/EEK**

Direktīva 72/199/EEK	Šī regula
1. pants	3. pants
2. pants	—
3. pants	—
4. pants	—
I pielikuma 1. daļa	III pielikuma L daļa
I pielikuma 2. daļa	III pielikuma C daļa
I pielikuma 3. daļa	—
I pielikuma 4. daļa	—
I pielikuma 5. daļa	V pielikuma A daļa
II pielikums	—

▼B**4. Direktīva 73/46/EEK**

Direktīva 73/46/EEK	Šī regula
1. pants	3. pants
3. pants	—
4. pants	—
I pielikuma 1. daļa	III pielikuma B daļa
I pielikuma 2. daļa	—
I pielikuma 3. daļa	III pielikuma I daļa

5. Direktīva 76/371/EEK

Direktīva 76/371/EEK	Šī regula
1. pants	1. pants
2. pants	—
3. pants	—
Pielikums	I pielikums

6. Direktīva 76/372/EEK

Direktīva 76/372/EEK	Šī regula
1. pants	—
2. pants	—
3. pants	—
Pielikums	—

7. Direktīva 78/633/EEK

Direktīva 78/633/EEK	Šī regula
1. pants	3. pants
2. pants	—
3. pants	—
Pielikuma 1. daļa	—
Pielikuma 2. daļa	—
Pielikuma 3. daļa	IV pielikuma C daļa

8. Direktīva 81/715/EEK

Direktīva 81/715/EEK	Šī regula
1. pants	—
2. pants	—
3. pants	—
Pielikums	—

9. Direktīva 84/425/EEK

Direktīva 84/425/EEK	Šī regula
1. pants	—
2. pants	—
3. pants	—
Pielikums	—

▼B**10. Direktīva 86/174/EEK**

Direktīva 86/174/EEK	Šī regula
1. pants	4. pants
2. pants	—
3. pants	—
Pielikums	VII pielikums

11. Direktīva 93/70/EEK

Direktīva 93/70/EEK	Šī regula
1. pants	3. pants
2. pants	—
3. pants	—
Pielikums	IV pielikuma D daļa

12. Direktīva 93/117/EK

Direktīva 93/117/EK	Šī regula
1. pants	3. un 5. pants
2. pants	—
3. pants	—
Pielikuma 1. daļa	IV pielikuma E daļa
Pielikuma 2. daļa	VIII pielikuma A daļa

13. Direktīva 98/64/EK

Direktīva 98/64/EK	Šī regula
1. pants	3. un 5. pants
2. pants	—
3. pants	—
4. pants	—
Pielikuma A daļa	III pielikuma F daļa
Pielikuma C daļa	VIII pielikuma B daļa

14. Direktīva 1999/27/EK

Direktīva 1999/27/EK	Šī regula
1. pants	3. un 5. pants
2. pants	—
3. pants	—
4. pants	—
5. pants	—
6. pants	—
7. pants	—
Pielikuma A daļa	VIII pielikuma C daļa
Pielikuma B daļa	IV pielikuma F daļa
Pielikuma C daļa	VIII pielikuma D daļa

▼B**15. Direktīva 1999/76/EK**

Direktīva 1999/76/EK	Šī regula
1. pants	3. pants
2. pants	—
3. pants	—
4. pants	—
Pielikums	IV pielikuma G daļa

16. Direktīva 2000/45/EK

Direktīva 2000/45/EK	Šī regula
1. pants	3. pants
2. pants	—
3. pants	—
4. pants	—
Pielikuma A daļa	IV pielikuma A daļa
Pielikuma B daļa	IV pielikuma B daļa
Pielikuma C daļa	III pielikuma G daļa

17. Direktīva 2002/70/EK

Direktīva 2002/70/EK	Šī regula
1. pants	1. pants
2. pants	2. un 3. pants
3. pants	—
4. pants	—
5. pants	—
I pielikums	I pielikums un V pielikuma B daļas I punkts
II pielikums	II pielikums un V pielikuma B daļas II punkts

18. Direktīva 2003/126/EK

Direktīva 2003/126/EK	Šī regula
1. pants	3. pants
2. pants	—
3. pants	—
4. pants	—
5. pants	—
6. pants	—
Pielikums	VI pielikums