



KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO REGLAMENTAS (ES) 2024/771

2024 m. vasario 29 d.

kuriuo iš dalies keičiamas Reglamentas (EB) Nr. 152/2009, nustatantis oficialiai pašarų kontrolei taikytinus ėminių ėmimo ir analizės metodus

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2017 m. kovo 15 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (ES) 2017/625 dėl oficialios kontrolės ir kitos oficialios veiklos, kuri vykdoma siekiant užtikrinti maisto ir pašarų srities teisės aktų bei gyvūnų sveikatos ir gerovės, augalų sveikatos ir augalų apsaugos produktų taisyklių taikymą, kuriuo iš dalies keičiami Europos Parlamento ir Tarybos reglamentai (EB) Nr. 999/2001, (EB) Nr. 396/2005, (EB) Nr. 1069/2009, (EB) Nr. 1107/2009, (ES) Nr. 1151/2012, (ES) Nr. 652/2014, (ES) 2016/429 ir (ES) 2016/2031, Tarybos reglamentai (EB) Nr. 1/2005 ir (EB) Nr. 1099/2009 bei Tarybos direktyvos 98/58/EB, 1999/74/EB, 2007/43/EB, 2008/119/EB ir 2008/120/EB, ir kuriuo panaikinami Europos Parlamento ir Tarybos reglamentai (EB) Nr. 854/2004 ir (EB) Nr. 882/2004, Tarybos direktyvos 89/608/EEB, 89/662/EEB, 90/425/EEB, 91/496/EEB, 96/23/EB, 96/93/EB ir 97/78/EB bei Tarybos sprendimas 92/438/EEB (Oficialios kontrolės reglamentas) ⁽¹⁾, ypač į jo 34 straipsnio 6 dalį,

kadangi:

- (1) Komisijos reglamentu (EB) Nr. 152/2009 ⁽²⁾ nustatyti oficialiai pašarų kontrolei taikytini ėminių ėmimo ir analizės metodai;
- (2) Reglamentu (EB) Nr. 152/2009 nustatyti ėminių ėmimo ir analizės metodai turėtų būti pritaikyti atsižvelgiant į mokslo ir technologijų žinių raidą. Šiuo reglamentu turėtų būti padaryti keli nedideli pakeitimai, atsižvelgiant į patirtį, įgytą taikant tam tikrą analizės metodą, arba siekiant paaiškinti tam tikras nuostatas;
- (3) Reglamente (EB) Nr. 152/2009 aprašytas ėminių ėmimo metodas nėra tinkamas ėminiams imti siekiant kontroliuoti mikrobiologinę taršą, todėl jis į taikymo sritį nepatenka. Tačiau, padarius pakeitimus Komisijos reglamentu (ES) Nr. 691/2013 ⁽³⁾, nebebuvo aiškiai nurodyta, kad tas metodas nėra įtrauktas į taikymo sritį, todėl kilo tam tikra painiava ir yra tikslinga vėl aiškiai nurodyti, kad tas metodas nepatenka į taikymo sritį;
- (4) atsižvelgiant į tai, kad pašarų pardavimas nuotolinio ryšio priemonėmis auga, tikslinga nustatyti konkrečias nuostatas dėl pašarų, kuriuos pašarų ūkio subjektai siūlo parduoti nuotolinio ryšio priemonėmis, ėminių ėmimo. Be nuostatų dėl analitinio matavimo neapibrėžties ir išgavos dydžio atliekant nepageidaujamų medžiagų analizę, tokios nuostatos taip pat turėtų būti taikomos atliekant pašarų priedų kiekio nustatymo analizę, nes šiuo atveju jos taip pat yra svarbios. Atsižvelgiant į įrodymus, kad taikant analizės metodą karbamido kiekiui nustatyti, kuris nepatenka į leidimo naudoti karbamidą kaip pašarų priedą taikymo sritį, gaunami netikslūs analizės rezultatai, reikėtų patikslinti to metodo taikymo sritį ir įtraukti informaciją apie metodo vertinimą bei jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatus;
- (5) keli Reglamentu (EB) Nr. 152/2009 nustatyti analizės metodai nebeatitinka numatytos paskirties, todėl jie turėtų būti panaikinti. Analizės metodas, taikomas lakiosioms azoto bazėms nustatyti, ir karbonatų nustatymo metodas turėtų būti panaikinti, nes Sąjungos pašarų teisės aktuose nebėra teisinio reikalavimo kontroliuoti atitiktį. Dabartiniame analizės metode, kuris taikomas diklazurilui nustatyti, yra redakcinių klaidų, todėl jis neduoda patikimų analizės rezultatų. Todėl jį reikėtų pakeisti patikslintu metodu, kuris, kaip įrodyta, duoda patikimų rezultatų. Taikant naujus laisvojo ir suminio gosipolio analizės metodus gauta įrodymų, kad Reglamentu (EB) Nr. 152/2009 nustatytas

⁽¹⁾ OL L 95, 2017 4 7, p. 1.

⁽²⁾ 2009 m. sausio 27 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 152/2009, nustatantis oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos ėminių ėmimo ir analizės metodus (OL L 54, 2009 2 26, p. 1).

⁽³⁾ 2013 m. liepos 19 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 691/2013, kuriuo iš dalies keičiamas Reglamento (EB) Nr. 152/2009 nuostatos dėl ėminių ėmimo ir analizės metodų (OL L 197, 2013 7 20, p. 1).

analizės metodas, taikomas laisvajam ir suminiam gosipoliui nustatyti, neduoda patikimų rezultatų, todėl jis turėtų būti panaikintas ir pakeistas nuoroda į Europos standartus (EN standartus). Analizės metodai, skirti nebeleidžiamų naudoti pašarų priedų neteisėtam buvimui kontroliuoti, turėtų būti panaikinti, nes per tą laiką buvo sukurti jautresni atrankiniai būdai ir analizės metodai;

- (6) be šio reglamento prieduose aprašytų analizės metodų, turėtų būti pateikta nuoroda į EN standartus, kad vykdant oficialią kontrolę būtų galima jais naudotis;
- (7) Komisijos įgyvendinimo reglamentu (ES) 2021/2047 ^(*) leista naudoti naują pašarų priedą amproliumą, todėl į Reglamento (EB) Nr. 152/2009 IV priedą turėtų būti įtrauktas analizės metodas, taikomas amproliumui nustatyti;
- (8) Reglamento (EB) Nr. 152/2009 pakeitimai yra esminiai ir susiję su daug jo priedų nuostatų, todėl, siekiant aiškumo, tikslinga visiškai pakeisti tuos priedus;
- (9) šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka Augalų, gyvūnų, maisto ir pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EB) Nr. 152/2009 pakeitimai

Reglamentas (EB) Nr. 152/2009 iš dalies keičiamas taip:

- 1) 1 straipsnio pirma pastraipa pakeičiama taip:

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

^(*) 2003 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1831/2003 dėl priedų, skirtų naudoti gyvūnų mityboje (OL L 268, 2003 10 18, p. 29).

^(**) 2002 m. gegužės 7 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2002/32/EB dėl nepageidaujamų medžiagų gyvūnų pašaruose (OL L 140, 2002 5 30, p. 10).“;

- 2) I priedas pakeičiamas šio reglamento I priedo tekstu;
- 3) II priedas pakeičiamas šio reglamento II priedo tekstu;
- 4) III priedas pakeičiamas šio reglamento III priedo tekstu;
- 5) IV priedas pakeičiamas šio reglamento IV priedo tekstu;
- 6) V priedas pakeičiamas šio reglamento V priedo tekstu;
- 7) VII priedas pakeičiamas šio reglamento VI priedo tekstu;
- 8) VIII priedas išbraukiamas.

^(*) 2021 m. lapkričio 23 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2021/2047 dėl leidimo naudoti amproliumo hidrochloridą (COXAM) kaip mėšinių viščiukų ir dedeklinių vištaičių lesalų priedą (leidimo turėtoja – bendrovė „HuvePharma NV“) (OL L 418, 2021 11 24, p. 13).

2 straipsnis

Įsigaliojimas

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

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2024 m. vasario 29 d.

Komisijos vardu

Pirmininkė

Ursula VON DER LEYEN

I PRIEDAS

„I PRIEDAS

ĖMINIŲ ĖMIMO METODAI

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

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

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

Jei atliekant regimąjį patikrinimą arba remiantis kita svarbia informacija nustatoma, kad pašarų partijos dalių, iš kurių turi būti paimti ėminiai, kokybė skiriasi nuo kitų tos pačios partijos pašarų, tokios partijos atskiriamos nuo likusių pašarų ir traktuojamos kaip atskira partijos dalis. Jei pašarų neišmanoma padalyti į atskiras partijos dalis, pašarai laikomi viena partija. Tokiais atvejais šis faktas paminimas ėminių ėmimo ataskaitoje.

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

Taip pat gali būti imami pašarų, kuriuos pašarų ūkio subjektai siūlo parduoti nuotolinio ryšio priemonėmis pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 767/2009 11 straipsnio 3 dalį ⁽¹⁾, ėminiai. Imant nuotolinio ryšio priemonėmis parduodamų pašarų ėminius iš esmės taikomi šiame priede nustatyti punktai. Konkretūs nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminių ėmimo aspektai aprašyti 11 punkte.

2. APIBRĖŽTYS

- Partija – nustatytas pašarų kiekis, kuriam būdingos vienodos savybės, pavyzdžiui, kilmė, veislė, pakuotės tipas, pakuotojas, siuntėjas arba ženklinimas, o gamybos proceso atveju – vienos gamybos įmonės produkcijos vienetą, pagamintą naudojant vienodus gamybos parametrus, arba keletą tokių vienetų, pagamintų vienas po kito ir laikomų kartu.
- Atrinktoji dalis – partija arba nustatyta partijos dalis.
- Užplombuotas ėminys – ėminys, užplombuotas taip, kad prie jo nebūtų galima prieiti nepažeidus arba nenuėmus plombos.
- Atskirasis ėminys – kiekis, paimtas iš vienos atrinktosios dalies vietos.
- Jungtinis ėminys – atskirųjų ėminių, paimtų iš vienos atrinktosios dalies, visuma.
- Sumažintasis ėminys – jungtinio ėminio dalis, atspindinti jo visumą, gauta reprezentatyviosios redukcijos metodu.
- Galutinis ėminys – jungtinio ėminio (sumaišyto), sumažintojo arba homogenizuoto jungtinio ėminio dalis, priklausomai nuo kontrolės tipo (žr. 9.4 punktą).
- Laboratorinis ėminys – laboratorijai skirtas ėminys (gautas laboratorijos), kuris gali būti galutinis, sumažintasis arba jungtinis ėminys.
- Nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminys – pašarų, siūlomų parduoti nuotolinio ryšio priemonėmis, partijos ėminys.

⁽¹⁾ 2009 m. liepos 13 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 767/2009 dėl pašarų tiekimo rinkai ir naudojimo, iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1831/2003 ir panaikinantį Direktyvas 79/373/EEB, 80/511/EEB, 82/471/EEB, 83/228/EEB, 93/74/EEB, 93/113/EEB, 96/25/EEB bei Sprendimą 2004/217/EB (OL L 229, 2009 9 1, p. 1).

3. BENDROSIOS NUOSTATOS

- Ėminius ima pareigūnai, kuriuos tam įgalioja kompetentinga institucija.
- Kai imamas nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminys, kompetentinga institucija pašarų ūkio subjekto paprašo nuotolinio ryšio priemonėmis jai pateikti tam tikrą pašarų kiekį.
- Ėminys turi būti užplombuotas taip, kad jo negalima būtų atidaryti nepažeidus arba nenuėmus plombos.
Plombos žymuo turi būti aiškus ir gerai matomas.
- Ėminio identifikavimas. Ėminys turi būti pažymėtas nenutrinamomis priemonėmis ir privalo būti identifiкуotas tokiu būdu, kad jį būtų galima vienareikšmiai susieti su ėminių ėmimo ataskaita.
- Iš kiekvieno jungtinio arba sumažintojo ėminio imama bent po du galutinius ėminius: bent vieną ėminį kontrolei atlikti (vykdymo užtikrinimo tikslais) ir bent vieną ėminį – pašarų ūkio subjektui (teisių gynimo tikslais). Galiausiai, dar vienas galutinis ėminys gali būti laikomas kontroliniu ėminiu. Jei visas jungtinis ėminys yra homogenizuotas, galutiniai ėminiai imami iš homogenizuoto jungtinio ėminio, išskyrus atvejus, kai tokia procedūra prieštarauja valstybių narių taisyklėms dėl pašarų ūkio subjekto teisių.
- Pagal Reglamento (ES) 2017/625 15 straipsnio 1 ir 2 dalis, kai tai būtina oficialiai imant ėminius, pašarų ūkio subjektai, kai to reikalauja kompetentingos institucijos:
 - suteikia kompetentingų institucijų darbuotojams prieigą prie jų kontroliuojamos įrangos, taip pat, jei reikia, prie tinkamos ėminių ėmimo įrangos ir asmeninių apsaugos priemonių;
 - padeda kompetentingų institucijų darbuotojams ir su jais bendradarbiauja, kad jie galėtų paimti ėminius, taip pat suteikia jiems prieigą prie pašarų.

4. APARATAS

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

4.2. Aparatas, rekomenduojamas kietųjų pašarų ėminiams imti

4.2.1. Ėminių ėmimas rankiniu būdu

4.2.1.1. Plokščiadugnis ėminių semtuvus vertikaliais kraštais.

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

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

4.2.2. Ėminių ėmimas mechaniniu būdu

Judančių pašarų ėminiams imti gali būti naudojamas tinkamas mechaninis aparatas. Mechaninis aparatas laikomas tinkamu, jei ėminiai imami bent iš visos srauto sekcijos.

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

4.2.3. Dalytuvus

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

5. KIEKYBINIAI REIKALAVIMAI DĖL ATSKIRŲJŲ ĖMINIŲ SKAIČIAUS

- Kiekybiniai 5.1 ir 5.2 punktų reikalavimai dėl atskirųjų ėminių skaičiaus taikomi atrinktosioms dalims, kurios yra ne didesnės kaip 500 tonų ir iš kurių galima paimti ėminius, atspindinčius jų visumą. Aprašyta ėmimo procedūra taip pat taikoma kiekiam, didesniems nei nurodytas didžiausias atrinktosios dalies dydis, jei neatsižvelgiama į toliau 5.1.1, 5.1.3 ir 5.1.5 punktuose pateiktose lentelėse nurodytą didžiausią atskirųjų ėminių skaičių; atskirųjų ėminių skaičius nustatomas pagal procedūros atitinkamoje dalyje (žr. 5.3 punktą) pateiktą kvadratinės šaknies formulę, o mažiausias jungtinio ėminio dydis proporcingai padidinamas. Tai nereiškia, kad didelės partijos dėl to negalima padalyti į mažesnes partijos dalis ir imti ėminių iš partijos kiekvienos dalies laikantis 5.1 ir 5.2 punktuose aprašytos procedūros.
- Atrinktoji dalis turi būti tokia, kad iš jos būtų galima paimti kiekvienos jos sudedamosios dalies ėminį.
- Jei partijos arba partijų dalys yra labai didelės (> 500 tonų) ir jei partijos gabenamos arba laikomos taip, kad ėminių negalima imti pagal šio skyriaus 5.1 ir 5.2 punktuose nurodytą ėmimo procedūrą, taikoma 5.3 punkte nurodyta ėmimo procedūra.
- Kai imami nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminiai, kompetentinga institucija paprastai nežino partijos, iš kurios prašomas tam tikras kiekis, dydžio. Todėl 5.1 ir 5.2 punktuose nurodyta procedūra negali būti taikoma. Tokiu atveju taikoma 11 punkte aprašyta procedūra.
- Jei pašarų ūkio subjektui teisės aktais nustatytas reikalavimas šio reglamento laikytis pagal privalomos stebėsenos sistemą, pašarų ūkio subjektas, siekdamas atsižvelgti į darbinės charakteristikas, nuo šio punkto nustatytų kiekybinių reikalavimų gali nukrypti tik kompetentingai institucijai įtikinamai įrodęs, kad ėminių ėmimo procedūra lygiavertė reprezentatyvumo atžvilgiu, ir tik gavęs kompetentingos institucijos leidimą.
- Išimtiniais atvejais, jeigu nustatyto ėminių ėmimo metodo neįmanoma taikyti kiekybinių reikalavimų atžvilgiu dėl nepriimtinos komercinės žalos partijai (dėl įpakavimo būdų, gabenimo priemonių, laikymo būdo ir t. t.), galima taikyti kitokių ėminių ėmimo metodą, jei jis yra kuo reprezentatyvesnis ir yra išsamiai aprašytas bei patvirtintas dokumentais.

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

5.1.1. Piltiniai kietieji pašarai

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

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

5.1.2. Piltiniai skystieji pašarai

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

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

5.1.3. *Supakuoti pašarai*

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

Atrinktosios dalies dydis	Mažiausias vienetų, iš kurių reikia paimti (bent) vieną atskirąjį ėminį, skaičius (*)
1–20 vienetų	1 vienetas (**)
21–150 vienetų	3 vienetai (**)
151–400 vienetų	5 vienetai (**)
> 400 vienetų	$\frac{1}{4}$ atrinktąją dalį sudarančių vienetų skaičiaus kvadratinės šaknies (***), bet ne daugiau kaip 40 vienetų

(*) Jei atidarius vieneta galima padaryti poveikį analizei (pvz., jei tai greitai gendantys drėgni pašarai), atskirasis ėminys yra neatidarytas vienetas.

(**) Vienetų, kurių turinio masė yra ne didesnė kaip 1 kg arba vienas litras, atskirasis ėminys yra pradinio vieneto turinys.

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

5.1.4. *Pašarų briketai ir mineralų laižalai*

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

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

5.1.5. *Stambieji pašarai / pašariniai augalai*

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

(*) Pripažįstama, kad tam tikrais atvejais (pvz., jei tai yra silosas) neįmanoma paimti reikalingų atskirųjų ėminių nepadarant nepriimtinos žalos partijai. Tokiais atvejais galima taikyti alternatyvų ėminių ėmimo metodą, be to, buvo parengtos ėminių iš tokių partijų ėmimo gairės, o jas galima rasti adresu https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

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

5.2. **Kiekybiniai atskirųjų ėminių reikalavimai kontroliuojant pašaruose tikėtinais nevienodais pasiskirsčiusiais sudedamąsiais dalis ar medžiagas**

Šie kiekybiniai atskirųjų ėminių reikalavimai taikytini tokiomis aplinkybėmis:

- kontroliuojant aflatoksinus, rugių skalsę, kitus mikotoksinus ir kenksmingas botanines priemaišas pašarinėse žaliavose;
- kontroliuojant kryžminę taršą sudedamąja dalimi, įskaitant genetiškai modifikuotą medžiagą arba medžiagą, kuri, manoma, nevienodai pasiskirsčiusi pašaruose.

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

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

5.3. Labai didelėms partijoms taikomi kiekybiniai atskirųjų ėminių reikalavimai

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

6. KIEKYBINIAI JUNG TINIO ĖMINIO REIKALAVIMAI

Reikia paruošti vieną jungtinį vienos atrinktosios dalies ėminį.

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

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

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

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

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

7. KIEKYBINIAI GALUTINIŲ ĖMINIŲ REIKALAVIMAI

Galutiniai ėminiai

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

Kietieji pašarai	500 g (*) (**) (***) (****)
Skystieji arba pusiau skysti pašarai	500 ml (*)
(*) Pagal Reglamento (ES) Nr. 619/2011 nuostatas galutinio ėminio, skirto patikrinti, ar pašaruose nėra genetiškai modifikuotos medžiagos, masė privalo būti ne mažesnė nei 10 000 sėklų ir (arba) grūdų masė. Tai reiškia, kad jei tai yra kukurūzai – galutinio ėminio masė privalo būti ne mažesnė kaip 3 000 g, o jei tai sojos – 2 000 g. Jei tai kitos sėklos ir grūdai, pavyzdžiui, miežiai, sorgai, avižos, ryžiai, rugiai, kviečiai ir rapsai – galutinis 500 g ėminys atitinka daugiau nei 10 000 sėklų arba grūdų masę.	
(**) Jei jungtinis ėminys yra gerokai mažesnis nei 4 kg arba litrai (žr. 6 punkto išnašas), galima imti mažesnę galutinio ėminio kiekį, jei tai yra aprašyta ir patvirtinta dokumentais ėminių ėmimo ataskaitoje.	
(***) Jei imami ankštinių augalų, javų grūdų ir medžių riešutų ėminiai pesticidų likučiams juose nustatyti, mažiausias galutinio ėminio dydis yra 1 kg, laikantis 2002 m. liepos 11 d. Komisijos direktyvos 2002/63/EB, nustatančios Bendrijos mėginių ėmimo metodus oficialiai kontroliuojant pesticidų likučius augalinės ir gyvūninės kilmės produktuose ir ant jų bei panaikinančios Direktyvą 79/700/EEB, nuostatų (OL L 187, 2002 7 16, p. 30).	
(****) Atliekant regimąjį patikrinimą arba patikrinimą naudojant mikroskopą, patikrinimui naudojamo galutinio ėminio kiekis yra 1 kg.	

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

8.1. Bendrieji principai

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

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

Kai taikoma šiame punkte nurodyta ėminių ėmimo procedūra, apie tokią procedūrą pranešama pašarų ūkio subjektui arba jo atstovui. Jei pašarų ūkio subjektui arba jo atstovui kyla abejonių dėl šios ėminių ėmimo procedūros, pašarų ūkio subjektas arba jo atstovas leidžia kompetentingai institucijai imti ėminius iš visos partijos ir pašarų ūkio subjektas padengia su tuo susijusias išlaidas.

8.2. Laivu gabenamos didelės partijos

8.2.1. Dinaminis ėminių ėmimas iš didelių laivu gabenamų partijų

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

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

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

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

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

8.2.2. *Statinis ėminių ėmimas iš laivu gabenamų partijų*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. **ĖMINIŲ ĖMIMO, RUOŠIMO IR PAKAVIMO INSTRUKCIJOS**

9.1. **Bendrosios nuostatos**

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

9.2. Atskirieji ėminiai

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

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

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

Jeigu ėminiai imami iš supakuotų pašarų mažų partijų, kai, laikantis kiekybinių reikalavimų, reikia imti nedidelį atskirųjų ėminių skaičių, atskirasis ėminys yra vieno pradinio vieneto, kurio turinys yra ne didesnis kaip 1 kg ar 1 litras, turinys.

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

Kai imami nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminiai, atskirojo ėminio dydis priklauso nuo vieneto dydžio ir atskirais atvejais jame taip pat gali būti mažiau kaip 100 g arba 100 ml.

9.2.1. Piltiniai pašarai

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

9.2.2. Supakuoti pašarai

Atrinkus ėminiams imti reikiamą vienetų skaičių, kaip nurodyta 5 punkte, kiekvieno vieneto turinio dalis paimama semtuvu arba zondų. Prireikus ėminiai imami atskirai ištuštintus vienetus.

9.2.3. Homogeniniai arba homogenizuojami skystieji arba pusiau skysti pašarai

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

Atskiruosius ėminius galima imti išpilant talpyklos turinį.

9.2.4. Nehomogenizuojami skystieji arba pusiau skysti pašarai

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

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

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

9.2.5. Pašarų briketai ir mineralų laižalai

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

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

9.3. Jungtinių ėminių ruošimas

Atskirieji ėminiai sumaišomi, kad būtų gautas vienas jungtinis ėminys.

9.4. Galutinių ėminių ruošimas

Jungtinio ėminio medžiaga kruopščiai sumaišoma ⁽²⁾.

⁽²⁾ Visi ėminių gabalai sutrupinami (prireikus smulkinami atskirai ir grąžinami į ėminį).

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

9.4.1. Vienodai pasiskirsčiusios medžiagos

Jei tikrinamos sudedamosios dalys arba vienodai pašaruose pasiskirsčiusios medžiagos, jungtinis ėminys gali būti reprezentatyviai sumažinamas bent iki 2,0 kg arba 2,0 litro (sumažintasis ėminys) ⁽³⁾, geriausia naudojant mechaninį arba automatinį dalytuvą. Jei atliekama pesticidų liekanų ankštiniuose augaluose, javų grūduose ir medžių riešutuose kontrolė, mažiausias sumažintojo ėminio kiekis yra 3 kg. Jei dėl pašarų pobūdžio neįmanoma naudoti dalytuvo arba dalytuvo nėra, ėminį galima sumažinti taikant ketvirčiavimo metodą.

Iš jungtinio ėminio arba sumažintųjų ėminių paruošiamas maždaug toks pats kiekis galutinių ėminių (kontrolės, teisių gynimo tikslais ir tam tikrais atvejais kontroliniam ėminiui) laikantis 7 punkte nurodytų kiekybinių reikalavimų.

9.4.2. Nevienodai pasiskirsčiusios medžiagos

Atliekant sudedamųjų dalių, įskaitant genetiškai modifikuotas medžiagas, arba medžiagų, kurios, tikėtina, yra nevienodai pasiskirsčiusios pašaruose, kontrolę, jungtinis ėminys yra:

- i) visiškai homogenizuojamas. Paskui iš homogenizuoto jungtinio ėminio paimamas maždaug toks pats kiekis galutinių ėminių (kontrolės, teisių gynimo tikslais ir tam tikrais atvejais kontroliniam ėminiui) laikantis 7 punkte nurodytų kiekybinių reikalavimų; arba
- ii) sumažinamas iki bent 2 kg arba 2 litrų ⁽⁴⁾ naudojant mechaninį arba automatinį dalytuvą. Tik tuo atveju, jei dėl pašarų pobūdžio negalima naudoti dalytuvo, ėminį, jei reikia, galima sumažinti taikant ketvirčiavimo metodą. Siekiant nustatyti, ar pašaruose nėra genetiškai modifikuotų medžiagų, pagal Reglamentą (ES) Nr. 619/2011 sumažintasis ėminys turi būti sudarytas iš ne mažiau kaip 35 000 sėklų ir (arba) grūdų masės, kad būtų galima gauti galutinius ėminius vykdymo užtikrinimo, teisių gynimo tikslais ir tam tikrais atvejais kontroliniam ėminimui, kurie būtų sudaryti iš ne mažiau kaip 10 000 sėklų ir (arba) grūdų (žr. ^(**) išnašą 6 punkte ir ^(*) išnašą 7 punkte).

Iš sumažintųjų ėminių paimamas maždaug toks pats kiekis galutinių ėminių laikantis 7 punkte nurodytų kiekybinių reikalavimų.

9.5. Ėminių pakavimas

Konteineriai arba pakuotės plombuojami ir ženklinami taip, kad jų nebūtų galima atidaryti, nepažeidus plombos. Visa etiketė turi būti po plomba. Ėminys taip pat gali būti dedamas į talpyklą ar konteinerį, kuris uždaromas taip, kad jo negalima atidaryti nepataisomai nepažeidus talpyklos arba konteinerio, taip išvengiant talpyklos ar konteinerio panaudojimo antrą kartą.

9.6. Ėminių siuntimas į laboratoriją

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

10. ĖMINIŲ ĖMIMO ĮRAŠAI

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

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

Su įrašais gali susipažinti oficiali kontrolės laboratorija, be to, jie pateikiami pašarų ūkio subjektui ir (arba) pašarų ūkio subjekto paskirtai laboratorijai.

⁽³⁾ Išskyrus atvejus, kai tai yra stambieji pašarai arba pašariniai augalai, kurių savitasis tankis yra mažas.

⁽⁴⁾ Išskyrus atvejus, kai tai yra stambieji pašarai arba pašariniai augalai, kurių savitasis tankis yra mažas.

11. NUOTOLINIŲ BŪDU PARDUODAMŲ PAŠARŲ ĖMINYS

- Kai imamas nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminys, pašarų ūkio subjekto prašoma nuotolinio ryšio priemonėmis pateikti tam tikrą pašarų kiekį. Šiuo atveju kompetentinga institucija, prašydama pateikti pašarų, neprivalo pašarų ūkio subjektui nurodyti savo oficialios tapatybės, ji gali tai daryti neatskleisdama tapatybės.
- Nuotoliniu būdu parduodamų pašarų jungtinį ėminį ir galutinius ėminius iš karto gavus siuntą turi paimti šiuo tikslu įgalioti asmenys. Norint sudaryti jungtinį ėminį, atsitiktinai ir tolygiai iš suminės gautos dalies turi būti paimamas atitinkamas skaičius atskirųjų ėminių ir jie, kiek įmanoma, kruopščiai sumaišomi ir (arba) homogenizuojami, laikantis 5 punkte ir 9.2 bei 9.3 punktuose nustatytų principų. Jei pašarai supakuoti į atskirus vienetus, turėtų būti gauti ne mažiau kaip 4 vienetai, iš kurių turi būti imamas bent vienas atskiras ėminys. Jei kiekvienu konkrečiu atveju įrodoma, kad gauti vienetai yra iš skirtingų partijų, vienetų, iš kurių imami ėminiai, skaičius turi būti sumažintas, o ėminiai imami tik iš tos pačios partijos vienetų. Kai atliekama nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminio sudedamųjų dalių ar medžiagų, kurios yra nevienodai pasiskirsčiusios pašaruose, analizė, atskirųjų ėminių skaičius turi būti bent 2,5 karto didesnis už ėminių skaičių, kai atliekama vienodai pašaruose pasiskirsčiusių medžiagų analizė.

Tada iš jungtinio ėminio, jei įmanoma, vadovaujantis 9.4 punkte nustatytais principais, imami atitinkami galutiniai ėminiai (kontrolei, teisių gynimo tikslais ir tam tikrais atvejais kontroliniam ėminiui), o ėminių ėmimo įrašuose nurodoma, kad tai yra nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminys. Tada kompetentinga institucija nedelsdama informuoja pašarų ūkio subjektą apie ėminių ėmimą. Pašarų ūkio subjektui taip pat pranešama, kad kompetentinga institucija, jei įmanoma, vieną ėminį saugo konkrečioje vietoje teisių gynimo tikslais arba kad jis siunčiamas pašarų ūkio subjektui arba pašarų ūkio subjekto pagal galiojančias nacionalines taisykles nurodytai laboratorijai.

Jei ėminys siunčiamas tiesiai oficialiai laboratorijai, galutinį ėminį laboratorijoje turi paruošti ir užplombuoti šiuo tikslu įgalioti asmenys arba tam tikslui įgaliotų asmenų akivaizdoje. Suformavus galutinius ėminius, nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminio ėmimo įrašai turi būti nedelsiant siunčiami kompetentingai institucijai, o ji apie ėminių ėmimą informuoja pašarų ūkio subjektą.

Laikoma, kad pašarų ūkio subjekto kompetentingai institucijai pateiktas kiekis yra tos pačios klasės ar to paties aprašymo pašarų partijos dalis. Pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 178/2002 ⁽³⁾ 15 straipsnį, jei nustatyta, kad partijos dalis neatitinka ES reikalavimų, daroma prielaida (taip pat ir tada, kai tai yra nuotoliniu būdu parduodamų pašarų ėminys), kad tas pat būdinga visiems tos partijos pašarams, išskyrus atvejus, kai išsamiai įvertinus (jei reikia, atlikus patikrinimą vietoje) nerasta įrodymų, kad likusi partijos dalis neatitinka ES reikalavimų.“

⁽³⁾ 2002 m. sausio 28 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 178/2002, nustatantis maistui skirtų teisės aktų bendruosius principus ir reikalavimus, įsteigiantis Europos maisto saugos tarnybą ir nustatantis su maisto saugos klausimais susijusias procedūras (OL L 31, 2002 2 1, p. 1).

II PRIEDAS

„II PRIEDAS

BENDROSIOS NUOSTATOS DĖL PAŠARŲ ANALIZĖS METODŲ

A. ĖMINIŲ RUOŠIMAS ANALIZEI

1. Tikslas

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

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

Laikomasi ne tik šiame priede aprašytų procedūrų, bet ir standarte EN ISO 6498 nustatytų ėminių ruošimo gairių.

2. Taikytinos atsargumo priemonės

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

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

Smulkinama, maišoma ir siojama nedelsiant, kad ėminį kuo mažiau veiktų oras ir šviesa. Nenaudojami malūnėliai ir smulkintuvai, kurie gali gerokai įkaininti ėminį.

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

Įrodyta, kad tam tikrais atvejais, kai ėminys homogenizuojamas paruošiant suspensiją vien tik gerai sumaišant su vandeniu, susidaro homogeniškesni poėminiai nei tie, kuriuos galima gauti smulkinant ir homogenizuojant sausuoju būdu, ypač kai cheminės medžiagos pasiskirsčiusios vienodai. Tačiau kai homogenizuojama pakankamai ilgai smulkinant sausuoju būdu taip pat galima gauti homogeninius poėminius.

Tam tikrais atvejais, pvz., nustatant rugių skalsę, kenksmingas botanines priemaišas ir kt., ėminys homogenizuojamas ne jį susmulkinant, o pakankamai gerai sumaišant.

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

3. Procedūra

3.1. Bendroji procedūra

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

3.1.1. Pašarai, kuriuos galima smulkinti be paruošimo

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

3.1.2. Pašarai, kurie prieš juos smulkinant džiovinami

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

3.1.3. Skystieji arba pusiau skysti pašarai

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

3.1.4. Kiti pašarai

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

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

- Atliekant regimąjį patikrinimą (nenaudojant mikroskopo), patikrinimui naudojamas visas jungtinis arba galutinis ėminys.
- Jei tiriama naudojant mikroskopą, laboratorija gali sumažinti jungtinį ėminį arba dar labiau sumažinti sumažintąjį ėminį. Galutiniai ėminiai teisių gynimo tikslais ir tam tikrais atvejais kontroliniam ėminiui imami laikantis tokios pačios procedūros kaip galutinio ėminio reikalavimų vykdymo procedūra.
- Jei homogenizuotas visas jungtinis ėminys, galutiniai ėminiai imami iš homogenizuoto jungtinio ėminio.
- Siekiant nustatyti rugių skalę ir kenksmingas botanines priemaišas, galutinį ėminį reikia padalyti į du maždaug 500 gramų masės poėminius. Tiriamas vienas poėminis. Jei poėminių rezultatas yra ne didesnis kaip 50 % didžiausios leidžiamosios koncentracijos (analizės riba), ėminys atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją. Jei rezultatas viršija 50 % didžiausios leidžiamosios koncentracijos, reikia ištirti kitą poėminį ir siekiant patikrinti, ar laikomasi didžiausios leidžiamosios koncentracijos, naudojamas dviejų poėminių rezultatų vidurkis.

4. Ėminių laikymas

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

B. NUOSTATOS DĖL ANALIZĖS METODAMS NAUDOJAMŲ REAGENTŲ IR APARATŪROS

1. Jei analizės metuose nenurodyta kitaip, visi analiziniai reagentai turi būti analitiškai grynai (a. g.). Atliekant pėdsakų analizę, reagentų grynumas turi būti patikrintas atliekant tuščiąjį bandymą. Atsižvelgiant į gautą rezultatą, gali tekti papildomai gryninti reagentus.
2. Visoms tirpalų ruošimo, skiedimo, skalavimo arba plovimo operacijoms, minimoms analizės metuose, nenurodant naudojamo tirpiklio arba skiediklio tipo, turi būti naudojamas vanduo. Paprastai vanduo demineralizuojamas arba distiliuojamas. Konkrečiais atvejais, nurodytais analizės metode, jam turi būti taikomos specialios gryninimo procedūros.
3. Atsižvelgiant į paprastai kontrolės laboratorijų turimą įrangą, analizės metuose nurodomi tik specialios paskirties arba tam tikru būdu naudojami prietaisai ir aparatūra. Jie turi būti švarūs, ypač kai reikia nustatyti labai mažus cheminių medžiagų kiekius.

C. ANALIZĖS METODŲ TAIKYMAS IR REZULTATŲ IŠRAIŠKA

1. Ekstrahavimo procedūra

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

2. Gryninimo procedūra

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

3. Nustatymų skaičius

Jei analizuojant nepageidaujamas medžiagas, pirmojo nustatymo rezultatas yra gerokai ($> 50\%$) mažesnis nei kontroliuojama specifikacijos vertė, papildomas nustatymas nebūtinai, jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros. Kitais atvejais kartotinė analizė (antrasis nustatymas) yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinio tarpusavio užteršimo arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Tolesniam vertinimui naudojama dviejų nustatymų vidutinė vertė.

Jei atliekant mažiausios arba didžiausios leidžiamosios pašarų priedų koncentracijos kontrolę pirmojo nustatymo rezultatas yra didesnis nei mažiausia koncentracija arba mažesnis nei didžiausia koncentracija, papildomas nustatymas nebūtinai, jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros. Kitais atvejais kartotinė analizė (antrasis nustatymas) yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinio tarpusavio užteršimo arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Tolesniam vertinimui naudojama dviejų nustatymų vidutinė vertė.

Jei atliekant nurodyto medžiagos arba sudedamosios dalies kiekio kontrolę, pirmojo nustatymo rezultatas patvirtina nurodytą kiekį, t. y. analizės rezultatas atitinka priimtą nurodyto kiekio kitimo intervalą, papildomas nustatymas nebūtinai, jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros. Kitais atvejais kartotinė analizė (antrasis nustatymas) yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinio tarpusavio užteršimo arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Tolesniam vertinimui naudojama dviejų nustatymų vidutinė vertė (analizės rezultatų vidurkis atitinka priimtą nurodyto kiekio kitimo intervalą arba jo neatitinka).

Kai kuriais atvejais priimtinas kitimo intervalas yra nustatytas teisės aktuose, kaip antai Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 767/2009 ir Reglamente (ES) 2019/4 ⁽¹⁾.

4. Taikyto analizės metodo pateikimas ataskaitoje

Analizės ataskaitoje nurodomas taikytas analizės metodas.

5. Analizės rezultato pateikimas ataskaitoje

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

Dauguma norminių lygių (pvz., didžiausia arba mažiausia koncentracija) ES gyvūnų pašarų teisės aktuose nustatyti dėl pašarų, kurių drėgnis yra 12 %. Todėl tais atvejais, siekiant įvertinti ėminio analizės rezultatą pagal norminį lygį, analizės rezultatą pirmiausia reikia padalyti iš ėminio sausosios medžiagos kiekio (%), padauginto iš 88, kaip nurodyta šioje formulėje:

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

kurioje:

M_c – ėminio drėgnis (%). $100 - M_c$ reiškia sausosios medžiagos kiekį ėminyje (%);

R_{ana} – išmatuotas ėminio analizės rezultatas;

$R_{12\%}$ – pašarų, kurių drėgnis 12 %, rezultatas; turi būti vertinama pagal norminį lygį.

⁽¹⁾ 2018 m. gruodžio 11 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (ES) 2019/4 dėl vaistinių pašarų gamybos, pateikimo rinkai ir naudojimo, kuriuo iš dalies keičiamas Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 183/2005 ir panaikinama Tarybos direktyva 90/167/EEB (OL L 4, 2019 1 7, p. 1).

Be to, jei tenkinamos šios sąlygos:

- analizės rezultatas yra gerokai ($> 50\%$) mažesnis arba didesnis už kontroliuojamą informaciją ir (arba) specifikaciją etiketėje (priklausomai nuo to, ar etiketėje pateiktoje informacijoje ir (arba) specifikacijoje nurodytas didžiausias, ar mažiausias kiekis);
- pašarų, kurių ėminiai imami, drėgnis yra žinomas ir galima nustatyti, kad pakoregavus drėgnį vertinimas nepasikeis,

tada, su sąlyga, kad taikomos tinkamos kokybės procedūros, o analizės tikslas – tik patikrinti, ar laikomasi teisės aktų nuostatų, drėgnio galima nekoreguoti (pvz., tais atvejais, kai nėra specifikacijos ar norminio lygio), išskyrus atvejus, kai tai būtina aiškinimui.

Jei analizės rezultatas koreguojamas pagal drėgnį, ta pačia tvarka taip pat turi būti pakoreguota atitinkama matavimo neapibrėžtis.

Nustatant rugių skalsę arba kenksmingas botanines priemaišas atliekant regimąjį patikrinimą arba mikroskopu drėgnio koreguoti nebūtina.

6. **Analitinio matavimo neapibrėžtis ir išgavos dydis atliekant nepageidaujamų medžiagų analizę**

Dėl nepageidaujamų medžiagų, kaip apibrėžta Direktyvoje 2002/32/EB, laikoma, kad gyvūnų pašarams skirtas produktas neatitinka nustatyto didžiausio kiekio, jei manoma, kad su pašaru, kurio drėgmės kiekis yra 12% , susijęs analizės rezultatas (dviejų nesusijusių nustatymų vidutinė vertė) viršija didžiausią kiekį, įskaitant išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį, taikant aprėpties faktorių 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95% pasiklivimo lygmuo, ir išgavos dydžio pataisą. Tai reiškia, kad atitiktai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija, atlikus išgavos dydžio pataisą ir atėmus išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį. Ši procedūra taikoma tais atvejais, kai galima įvertinti analizės metodo išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį ir išgavos dydžio pataisą (to daryti nereikia, pvz., kai atliekamas regimasis patikrinimas arba tiriama mikroskopu).

Jei ėminio, paimto teisių gynimo tikslais, analizės rezultatas viršija didžiausią kiekį (neatsižvelgiant į išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį), tai patvirtina nustatytą neatitikimą kontroliniam ėminiui, jei dėl to nėra konkrečių nacionalinių taisyklių.

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

- a) atlikus išgavos pataisą, jei tinkama ir aktualu, o ją atlikus – tai turi būti nurodoma. Turi būti nurodytas išgavos dydis, išskyrus atvejus, kai vidinė paklaidos pataisa yra procedūros dalis: paklaida yra išmatuotos vertės ir etaloninės koncentracijos vertės skirtumas. Pataisa dėl išgavos dydžio nebūtina, jei jis yra $90\text{--}110\%$;
- b) kaip „ $x \pm U$ “, čia x – analizės rezultatas, U – išplėstinė analitinio matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties faktorių 2 ⁽²⁾, kuriuo užtikrinamas maždaug 95% pasiklivimo lygmuo.

Tačiau jei analizės rezultatas yra gerokai ($> 50\%$) mažesnis nei kontroliuojama specifikacijos vertė ir jei taikomos atitinkamos kokybės procedūros, o analizės tikslas yra tik patikrinti atitiktį teisės aktų nuostatomis, ataskaitoje išgavos dydžio bei išplėstinės analitinio matavimo neapibrėžties galima nenurodyti (pvz., kai nėra specifikacijų arba norminių lygių), nebent matavimo apibrėžtis būtų reikalinga rezultatų aiškinimui.

7. **Analitinio matavimo neapibrėžtis ir išgavos dydis atliekant pašarų priedų kiekio analizę**

Siekiant patikrinti, ar esamas pašarų kiekis atitinka leidžiamą mažiausią ir didžiausią pašarų priedų kiekį, laikoma, kad jis neatitinka nustatyto mažiausio ir didžiausio kiekio, jei manoma, kad su pašaru, kurio drėgmės kiekis yra 12% , susijęs analizės rezultatas (dviejų nesusijusių nustatymų vidutinė vertė):

⁽²⁾ 95% pasiklivimo intervalas gali būti pasiektas naudojant kitą veiksnių, pavyzdžiui, Studento faktorių.

- viršija didžiausią kiekį, atsižvelgiant į išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį ir išgavos dydžio pataisą. Tai reiškia, kad atitiktai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija (t. y. dviejų nustatymų vidutinė vertė), atlikus išgavos dydžio pataisą ir atėmus išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį;
- yra mažesnis už mažiausią kiekį, atsižvelgiant į išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį ir išgavos dydžio pataisą. Tai reiškia, kad atitiktai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija (t. y. dviejų nustatymų vidutinė vertė), atlikus išgavos dydžio pataisą ir pridėjus išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį.

Jei ėminio, paimto teisių gynimo tikslais, analizės rezultatas viršija didžiausią kiekį (neatsižvelgiant į išplėstinę analitinio matavimo neapibrėžtį), tai patvirtina nustatytą neatitikimą kontroliniam ėminiui, jei dėl to nėra konkrečių nacionalinių taisyklių.

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

- a) atlikus išgavos pataisą, jei tinkama ir aktualu, o ją atlikus – tai turi būti nurodoma. Turi būti nurodytas išgavos dydis, išskyrus atvejus, kai vidinė paklaidos pataisa yra procedūros dalis: paklaida yra išmatuotos vertės ir etaloninės koncentracijos vertės skirtumas. Pataisa dėl išgavos dydžio nebūtina, jei jis yra 90–110 %;
- b) kaip „ $x \pm U$ “, čia x – analizės rezultatas (dviejų nustatymų vidutinė vertė), U – išplėstinė analitinio matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties faktorių 2 ⁽³⁾, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasiklivimo lygmuo.

⁽³⁾ 95 % pasiklivimo intervalas gali būti pasiektas naudojant kitą veiksnį, pavyzdžiui, Stjudento faktorių.“

III PRIEDAS

„III PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI, TAIKOMI PAŠARINIŲ ŽALIAVŲ IR KOMBINUOTŲJŲ PAŠARŲ SUDĖČIAI
KONTROLIUOTI

A. DRĖGMĖS KIEKIO NUSTATYMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti pašarų drėgmės kiekį. Jei pašaruose yra lakiųjų medžiagų, pvz., organinių rūgščių, reikia turėti omenyje, kad nustatant drėgmės kiekį nustatomas didelis lakiųjų medžiagų skaičius.

Jis netaikomas analizuojant pieno gaminius kaip pašarines žaliavas ir kombinuotuosius pašarus, kuriuos iš esmės sudaro pieno gaminiai, gyvūninius ir augalinius riebalus bei aliejus arba aliejingąsias sėklas ir vaisius.

Drėgnis aliejingosiose sėklose nustatomas taikant standarte EN ISO 665 „Drėgmės ir lakiųjų medžiagų kiekio nustatymas“ nustatytą metodą, atsižvelgiant į tai, kad prieš nustatant drėgnį sojos turi būti susmulkinamos.

2. Metodas

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

3. Aparatūra

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

3.2. Analizinės svarstyklės, tikslumas 1 mg.

3.3. Sausi korozijai atsparaus metalo arba stikliniai indai su sandariai uždengiamais dangčiais; darbinis paviršius tiriamajam ėminiui paskleisti maždaug 0,3 g/cm² tankiu.

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

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

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

4. Procedūra

Pastaba: Šiame skirsnyje aprašyti veiksmai turi būti atliekami iškart atidarius ėminių pakuotes. Analizė turi būti atliekama bent du kartus.

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

4.1. Ėminių ruošimas

4.1.1. Pašarai, išskyrus pašarus pagal 4.1.2 ir 4.1.3 punktus

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

4.1.2. Javai ir kruopos

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

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

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

4.2. Džiovinimas

Indas su dangčiu (3.3 punktas) 30 min $\pm$ 1 min. džiovinamas iki 103 °C įkaitintoje džiovinimo spintoje. Tada išimamas iš džiovinimo spintos ir laikomas eksikatoriuje (3.6 punktas), kad atvėstų iki kambario temperatūros.

4.2.1. Pašarai, išskyrus pašarus pagal 4.2.2 ir 4.2.3 punktus

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

Jei pašarus daugiausia (> 50 %) sudaro aliejai ir gyvūniniai bei augaliniai riebalai, džiovinama spintoje dar 30 min. 103 °C temperatūroje. Šių dviejų svėrimų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,1 % drėgmės kiekio.

4.2.2. Javai, miltai, kruopos ir rupūs miltai

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

4.2.3. Kombinuotieji pašarai, kuriuose yra daugiau nei 4 % sacharozės arba laktozės: pašarinės žaliavos, pvz., saldžiosios ceratonijos ankštys, hidrolizuotieji javų produktai, salyklos, džiovinti runkelių griežiniai, žuvų sultys ir cukraus žlaugtai

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

Slėgis sumažinamas iki 100 mm Hg stulpelio ir tokiaime slėgyje keturias valandas džiovinama karšto sauso oro srove arba džiovikliu (20 ėminių reikia apie 300 g). Pastaruoju atveju, pasiekus nurodytą slėgį, vakuuminis siurblys išjungiamas. Džiovinimo trukmė skaičiuojama nuo to momento, kai džiovinimo spintos temperatūra vėl pakyla iki 80–85 °C. Džiovinimo spintos slėgis atsargiai padidinamas iki atmosferos slėgio. Spinta atidaroma, indas nedelsiant uždengiamas dangčiu, išimamas iš spintos, laikomas 30–45 min. eksikatoriuje (3.6 punktas), kad atvėstų, ir pasveriamas 1 mg tikslumu. Džiovinama dar 30 min. vakuuminėje džiovinimo spintoje 80–85 °C temperatūroje ir dar kartą pasveriamas. Šių dviejų svėrimų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,1 % drėgmės kiekio.

4.3. Pradinis (dalinis) džiovinimas

Kad būtų galima ištirti stabilias medžiagas drėgnuose pašaruose, kuriuose sausųjų medžiagų masės dalis yra mažesnė nei 85 % (pvz., stambieji pašarai, suminiai sumaišyti daviniai, (ne)skystas pašaras), prieš smulkinant juos būtina iš dalies išdžiovinti; tiriant nestabiliąsias chemines medžiagas, dalinis džiovinimas negalimas.

Dalinis džiovinimas gali būti atliekamas naudojant krosnelę su ventiliatoriumi arba mikrobangų krosnį, arba džiovinimu šalčiu. Išskyrus džiovinimą šalčiu, pašarus siekiama išdžiovinti išlaikant žemesnę nei 60 °C ėminio temperatūrą, kad cheminė sudėtis būtų paveikta kuo mažiau. Džiovinant pašarus aukštesnėje kaip 60 °C temperatūroje jie chemiškai pakinta (pvz., baltymai pradeda irti). Prieš nustatant dalinę sausąją medžiagą, išdžiovinti pašarai maždaug 15 min. laikomi kambario temperatūroje pusiausvyrai nusistovėti, kad būtų kuo labiau sumažintas galimas drėgmės pokytis, kuris gali atsirasti smulkinant ir laikant pašarus. Džiovinant pašarus žemesnėje kaip 60 °C temperatūroje visas vanduo iš pašarų nepašalinamas; todėl (pradinis) dalinis džiovinimas nereikia neatitinka suminės sausosios medžiagos. Po džiovinimo, nustačius kitas chemines sudedamąsias dalis, poėminis susmulkinamas ir nustatoma (galutinė) sausoji medžiaga iš dalies išdžiovintame ėminyje (likusi drėgmė 3–15 %).

Todėl sausajai medžiagai nustatyti rekomenduojama taikyti dviejų etapų procedūrą. Pirmiausia nustatomas dalinis sausųjų medžiagų kiekis (jei sausųjų medžiagų kiekis yra mažesnis kaip 85 %), tada susmulkintame tiriamajame ėminyje nustatomas likęs sausųjų medžiagų kiekis. Suminis sausųjų medžiagų kiekis apskaičiuojamas padauginus dalinį sausųjų medžiagų kiekį iš likusio sausųjų medžiagų kiekio.

5. Rezultatų apskaičiavimas

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

5.1. Džiovinimas, kai netaikomas pradinis džiovinimas

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

kurioje:

m – = tiriamojo ėminio pradinis svoris gramais;

m₀ – = išdžiovinto tiriamojo ėminio svoris gramais.

5.2. Džiovinimas, kai taikomas pradinis džiovinimas ⁽²⁾

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

kurioje:

m – = tiriamojo ėminio pradinis svoris gramais;

m₁ – = tiriamojo ėminio svoris po pradinio džiovinimo gramais;

m₂ – = tiriamojo ėminio svoris po trupinio arba smulkinimo gramais;

m₀ – = išdžiovinto tiriamojo ėminio svoris gramais.

⁽²⁾ Išsamesnės informacijos apie skaičiavimą žr. standartą EN ISO 6498 „Pašarai. Ėminių paruošimo gairės.“

5.3. Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas ne didesnis nei 0,2 % drėgmės kiekio absoliučiosios vertės, išskyrus drėgną gyvūnų augintinių ėdalą ir šunų kramtalus, – šiuo atveju skirtumas turi būti ne didesnis nei 0,5 % drėgmės kiekio absoliučiosios vertės.

6. Pastaba

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

B. GYVŪNINIŲ IR AUGALINIŲ RIEBALŲ BEI ALIEJŲ DRĖGMĖS KIEKIO NUSTATYMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti vandens ir lakiųjų medžiagų kiekį gyvūniniuose ir augaliniuose riebaluose bei aliejuose.

2. Metodas

Ėminys džiovinamas 103 °C temperatūroje iki pastoviosios masės (paeiliui sveriant du kartus, masės sumažėjimas turi neviršyti 1 mg). Masės sumažėjimas nustatomas sveriant.

3. Aparatūra

- 3.1. Indas plokščiu dugnu iš korozijai atsparios medžiagos, skersmuo 8–9 cm, aukštis – maždaug 3 cm.
- 3.2. Maždaug 10 cm ilgio gyvsidabrio termometras, su padalomis nuo maždaug 80 °C iki bent 110 °C, su pastorintu burbuliuku ir plėtimosi vamzdžiu viršutiniame gale.
- 3.3. Smėlio vonia arba elektrinė kaitlentė.
- 3.4. Eksikatorius su veiksmingu džiovikliu.
- 3.5. Analizinės svarstyklės.

4. Procedūra

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

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

Siekiant užtikrinti visišką drėgmės pašalinimą, dar keletą kartų kaitinama iki 103 °C ± 2 °C, kaskart tarp kaitinimų atvėsinant ėminį iki 93 °C. Tada paliekama eksikatoriuje (3.4 punktas) atvėsti iki kambario temperatūros ir pasveriamas. Šis veiksmas kartojamas tol, kol, paeiliui sveriant du kartus, masės sumažėjimas nebeviršys 2 mg.

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

5. Rezultatų apskaičiavimas

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

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

kurioje:

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

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

Pakartojamumas

Dviejų to paties ėminio lygiagrečiai atliktos drėgmės kiekio analizės rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,1 % absoliučiaja verte.

C. AZOTO KIEKIO NUSTATYMAS IR ŽALIŲ BALTŲMŲ KIEKIO APSKAIČIAVIMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti žalių baltymų kiekį pašaruose pagal Kjeldalio metodu nustatomą azoto kiekį ⁽³⁾.

2. Metodas

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

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

3. Reagentai

- 3.1. Kalio sulfatas.
- 3.2. Katalizatorius: vario (II) oksidas CuO arba vario (II) sulfato pentahidratas CuSO₄ 5H₂O.
- 3.3. Cinko granulės.
- 3.4. Sieros rūgštis, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.5. Sieros rūgštis, standartinis titrimetrinis tirpalas, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l.
- 3.6. Sieros rūgštis, standartinis titrimetrinis tirpalas, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l.
- 3.7. Sieros rūgštis, standartinis titrimetrinis tirpalas, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l.
- 3.8. Indikatorius metilraudonasis: 300 mg metilraudonojo ištirpinama 100 ml etanolio, $\sigma = 95-96$ % (tūrinis proc., V/V).
- 3.9. Natrio hidroksido tirpalas (galima naudoti techninį hidroksidą) $\beta = 40$ g/100 ml (m/V: 40 %).
- 3.10. Natrio hidroksidas, standartinis titrimetrinis tirpalas, $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l.
- 3.11. Natrio hidroksidas, standartinis titrimetrinis tirpalas, $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l.
- 3.12. Pemzos granulės, išplautos vandenilio chlorido rūgštyje ir iškaitintos.
- 3.13. Acetanilidas (lyd. temp. = 114 °C, N kiekis = 10,36 %).
- 3.14. Sacharozė (neturinti azoto).
- 3.15. Boro rūgštis (H₃BO₃).

⁽³⁾ N kiekis gali būti nustatomas visuose pašaruose, tačiau apskaičiuojant žalių baltymų kiekį 6,25 konversijos koeficientas gali būti netaikomas vabzdžių pašarinėms žaliavoms (mažesnis konversijos koeficientas), tam tikrų gyvūnų augintinių ėdalui ir kraujo plazmos baltymams (didesnis konversijos koeficientas).

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

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

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

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

Priklausomai nuo naudojamo vandens, skirtingų partijų boro rūgšties tirpalų pH vertė gali skirtis. Boro rūgšties tirpalo pH vertė turi būti 4.3–4.7. Dažnai būtina koreguoti nedideliu šarmo tirpalo tūriu, kad būtų gautas teigiamas tuščiasis ėminys.

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

3.19. Vandenilio chlorido rūgšties standartinis titrimetrinis tirpalas $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

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

4. Aparatūra

Aparatūra, tinkama taikyti šlapiąjį skaidymą, distiliuoti ir titruoti pagal Kjeldalio procedūrą.

5. Procedūra

5.1. Šlapiasis skaidymas

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

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

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

5.2. Distiliavimas

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

5.2.1. Distiliavimas į sieros rūgštį

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

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

5.2.2. Distiliavimas į boro rūgštį

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

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

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

5.3. Titravimas

Tęsiama pagal 5.3.1 arba 5.3.2 punktą.

5.3.1. Sieros rūgštis

Priklausomai nuo naudotos sieros rūgšties koncentracijos, sieros rūgšties perteklius surinkimo kolboje titruojamas natrio šarmo (3.10 arba 3.11 punktas) tirpalu tol, kol pasiekiamas ekvivalentinis taškas.

5.3.2. Boro rūgštis

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

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

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

Konkretus distiliatorius (titratorius) naudojamas pagal gamintojo instrukcijas.

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

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

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

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

5.4. Tuščiasis bandymas

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

Apskaičiuojama pagal 6.1 arba 6.2 punktą.

6.1. Apskaičiavimas titruojant pagal 5.3.1 punktą

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

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

kurioje:

V_0 – NaOH (3.10 arba 3.11 punktas) tūris, sunaudotas tuščiajam bandymui, ml;

V_1 – NaOH (3.10 arba 3.11 punktas) tūris, sunaudotas ėminiui titruoti, ml;

c – natrio hidroksido (3.10 arba 3.11 punktas) koncentracija, mol/l;

m – ėminio svoris, g.

6.2. Apskaičiavimas titruojant pagal 5.3.2 punktą

6.2.1. Titravimas vandenilio chlorido rūgštimi

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

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

kurioje:

m – tiriamosios dalies svoris, g;

c – vandenilio chlorido rūgšties standartinio titrimetrinio tirpalo (3.19 punktas) koncentracija, mol/l;

V_0 – tuščiajam bandymui sunaudotas vandenilio chlorido rūgšties tūris, ml;

V_1 – tiriamajai daliai sunaudotas vandenilio chlorido rūgšties tūris, ml.

6.2.2. Titravimas sieros rūgštimi

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

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

kurioje:

m – tiriamosios dalies svoris, g;

c – sieros rūgšties standartinio titrimetrinio tirpalo (3.6 punktas) koncentracija, mol/l;

V_0 – tuščiajam bandymui sunaudotas sieros rūgšties (3.6 punktas) tūris, ml;

V_1 – tiriamajai daliai sunaudotas sieros rūgšties (3.6 punktas) tūris, ml.

7. Metodo tikrinimas

7.1. Pakartojamumas

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

- 0,4 % absoliučiąja verte, kai žalių baltymų kiekis mažesnis nei 20 %,
- 2,0 % didesnės vertės, kai žalių baltymų kiekis 20–40 %,
- 0,8 % absoliučiąja verte, kai žalių baltymų kiekis didesnis nei 40 %.

7.2. Atkuriamumas

Dviejų skirtingose laboratorijose atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- 1,8 % absoliučiąja verte, kai žalių baltymų kiekis mažesnis nei 20 %,
- 9,0 % didesnės vertės, kai žalių baltymų kiekis 20–40 %,
- 3,6 % absoliučiąja verte, kai žalių baltymų kiekis didesnis nei 40 %.

7.3. Tikslumas

Atliekama tinkamo acetanilido (3.13 punktas) kiekio (pvz., 0,2–0,3 g) analizė (šlapiasis skaidymas, distiliavimas ir titravimas), idėjus 1 g sacharozės (3.14 punktas); 1 g acetanilido sunaudoja 14,80 ml sieros rūgšties (3.5 punktas). Išgavos dydis turi būti ne mažesnis nei 99 %.

8. Pastabos

- 8.1. Aparatūra gali būti rankinio, pusiau automatinio arba automatinio tipo. Jei naudojama aparatūra, kai ėminį po šlapiojo skaidymo reikia supilti į distiliavimo įrenginį, turi būti supilama be nuostolių. Jei distiliavimo aparato kolba neturi lašinamojo piltuvo, natrio šarmo tirpalas įpilamas prieš pat kolbą prijungiant prie kondensatoriaus, skystį iš lėto pilant kolbos sienoje.
- 8.2. Jei skaidymo produktas sukietėja, analizė pradedama iš naujo su didesniu nei 5.1 punkte nurodytu sieros rūgšties tirpalo (3.4 punktas) kiekiu.
- 8.3. Produktams, kuriuose azoto kiekis nedidelis, į surinkimo kolbą įpilamo sieros rūgšties tirpalo (3.7 punktas) turis prireikęs gali būti sumažintas iki 10 arba 15 ml, skiedžiant vandeniu iki 25 ml.
- 8.4. Atliekant įprastą analizę, galima taikyti alternatyviusius metodus žalių baltymų kiekiui nustatyti, bet šioje C dalyje aprašytas Kjeldalio metodas yra pamatinis metodas. Rezultatų gautų alternatyviaisiais metodais (pvz., DUMAS) lygiavertiškumas palyginti su pamatiniu metodu turi būti įrodytas kiekvienai matricai atskirai. Kadangi alternatyviuoju metodu gauti rezultatai ir pamatiniu metodu gauti rezultatai gali šiek tiek skirtis, netgi patikrinus lygiavertiškumą, analizės ataskaitoje būtina nurodyti žalių baltymų kiekiui nustatyti taikytą analizės metodą.

D. KARBAMIDO KIEKIO NUSTATYMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti kaip pašarų priedas naudojamo karbamido koncentraciją atrajotojų pašaruose.

2. Metodas

Ėminys suspenduojamas vandenyje kartu su skaidrinančiąja medžiaga. Suspensija filtruojama. Dedama 4-dimetilaminobenzaldehido (4-DMAB), ir karbamido kiekis filtrate nustatomas matuojant absorbciją, kai bangos ilgis 420 nm.

3. Reagentai

- 3.1. 4-dimetilaminobenzaldehido tirpalas: 1,6 g 4-DMAB ištirpinama 100 ml 96 % etanolio ir įpilama 10 ml vandenilio chlorido rūgšties ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Šį reagentą galima laikyti ne ilgiau kaip dvi savaites.
- 3.2. Carrez I tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.3. Carrez II tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.4. Aktyvintosios anglis, kurios nesugeria karbamido (turi būti patikrinta).
- 3.5. Karbamido 0,1 % (m/V) tirpalas.

4. Aparatūra

- 4.1. Maišiklis (vartytuvas), dažnis maždaug 35–40 sūk./min.
- 4.2. Mėgintuvėliai: 160 × 16 mm su šlifo kamščiais.
- 4.3. Spektrofotometras.

5. **Procedūra**

5.1. *Ėminio analizė*

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

Į mėgintuvėlius su šlifo kamščiais įpilama 5 ml skaidraus bespalvio filtrato, 5 ml 4-DMAB tirpalo (3.1 punktas) ir sumaišoma. Mėgintuvėliai statomi į vandens vonią 20 °C (+/-4 °C) temperatūroje. Po penkiolikos minučių spektrofotometru matuojama ėminio tirpalo absorbcija, kai bangos ilgis 420 nm. Palyginamuoju tirpalu naudojamas tuščiajam bandymui ruošti naudojamų reagentų tirpalas.

5.2. *Kalibravimo kreivė*

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

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Pagal kalibravimo kreivę nustatomas karbamido kiekis ėminyje.

Rezultatas išreiškiamas karbamido kiekiu mg viename ėminio kilograme.

7. **Metodo įvertinimas**

7.1. *Pakartojamumas*

Dviejų toje pačioje laboratorijoje to paties veiklos vykdytojo atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- esant 420 nm
 - 50 % didesnės vertės, kai karbamido kiekis nuo 3 000 iki mažiau kaip 5 000 mg/kg,
 - 25 % didesnės vertės, kai karbamido kiekis nuo 5 000 iki mažiau kaip 7 000 mg/kg,
 - 20 % didesnės vertės, jei karbamido kiekis 7 000 mg/kg arba didesnis;
- esant 435 nm
 - 40 % didesnės vertės, kai karbamido kiekis nuo 3 000 iki mažiau kaip 5 000 mg/kg,
 - 25 % didesnės vertės, kai karbamido kiekis nuo 5 000 iki mažiau kaip 9 000 mg/kg,
 - 5 % didesnės vertės, kai karbamido kiekis 9 000 mg/kg arba didesnis.

7.2. *Atkuriamumas*

Dviejų skirtingose laboratorijose ir (arba) skirtingų veiklos vykdytojų atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- esant 420 nm
 - 3 000 mg/kg absoliučiąja verte, kai karbamido kiekis nuo 3 000 iki mažiau kaip 12 000 mg/kg,
 - 4 500 mg/kg absoliučiąja verte, kai karbamido kiekis 12 000 mg/kg arba didesnis;
- esant 435 nm
 - 50 % didesnės vertės, kai karbamido kiekis nuo 3 000 iki mažiau kaip 8 000 mg/kg,
 - 25 % didesnės vertės, kai karbamido kiekis 8 000 mg/kg arba didesnis.

8. **Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai**

Buvo atlikti ES tarplaboratoriniai tyrimai, kuriuose dalyvavo 18 laboratorijų. Buvo analizuojama po du atsitiktinai atrinktų penkių atrajotojų kombinuotųjų pašarų ėminius (1-oje ir 2-oje lentelėse nurodyti kaip MAT), kurių tyrimo rezultatai teigiami (1 analizė), o vienas atrajotojų kombinuotųjų pašarų tuščiasis ėminys buvo ištirtas vieną kartą.

Pašalinus riktus, taikant tinkamų verčių variacijos analizę, buvo atlikti pakartojamumo (r) ir atkuriamumo (R) ribų skaičiavimai, kaip apibrėžta tarptautinėse gairėse.

Toliau lentelėse pateikiami apskaičiuoti metodo veiksmingumo duomenys (pakartojamumas, atkuriamumas). Iš visų tirtų ėminių, įskaitant tuščiąją medžiagą, klaidingai teigiamų arba klaidingai neigiamų rezultatų nenustatyta.

1 lentelė

Metodo veiksmingumo parametrai matuojant karbamidą visose medžiagose, kai $\lambda = 420$

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Avys	Galvijai	Avys	Avys	Galvijai
Tikslinė masės dalis (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Vidutinė masės dalis (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s _R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s _r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD _R (%)	27	19	13	10	14
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD _r (%)	17	9	7	7	6
Atkuriamumo riba R [R = 2,8 × s _R]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Pakartojamumo riba r [r = 2,8 × s _r]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

2 lentelė

Metodo veiksmingumo parametrai matuojant karbamidą visose medžiagose, kai $\lambda = 435$

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Avys	Galvijai	Avys	Avys	Galvijai
Tikslinė masės dalis (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Vidutinė masės dalis (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s _R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s _r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167

Atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Pakartojamumo santykinis standartinis nuokrypis RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Atkuriamumo riba R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Pakartojamumo riba r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. Pastabos

- 9.1. Tais atvejais, kai karbamido kiekis yra didesnis nei 3 %, imama 1 g ėminio arba pradinis tirpalas skiedžiamas tiek, kad jo 500 ml būtų ne daugiau nei 50 mg karbamido.
- 9.2. Tuo atveju, kai karbamido yra mažai, ėminio kiekis padidinamas tiek, kad filtratas dar liktų skaidrus ir bespalvis.
- 9.3. Iš pirmiau pateiktų jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatų nematyti didelio skirtumo tarp rezultatų glaudumo, išmatavus karbamidą esant 420 arba 435 nm.

E. AMINORŪGŠČIŲ (IŠSKYRUS TRIPTOFANĄ) KIEKIO NUSTATYMAS

Analizės metodai, naudotini aminorūgštims (išskyrus triptofaną) nustatyti:

- EN ISO 13903 „Pašarai. Aminorūgščių kiekio nustatymas“;
- EN ISO 17180 „Pašarai. Lizino, metionino ir treonino nustatymas komerciniuose aminorūgščių produktuose ir premiksuose“⁽⁴⁾;
- toliau 1–10 dalyse aprašyti analizės metodai.

1. Tikslas ir taikymo sritis

Naudojant aminorūgščių analizatorių, šiuo metodu galima nustatyti laisvųjų (sintetinių ir gamtinių) aminorūgščių ir suminių (peptidiniais ryšiais sujungtų ir laisvųjų) aminorūgščių kiekį pašarinėse žaliavose, kombinuotuosiuose pašaruose ir premiksuose, kuriuose yra mažiau nei 10 %⁽⁵⁾ kiekvienos amino rūgšties. Šis metodas tinka šioms aminorūgštims: cisteinui (cistinui), metioninui, lizinui, treoninui, alaninui, argininui, asparto ir glutamo rūgštims, glicinui, histidinui, izoleucinui, leucinui, fenilalaninui, prolinui, serinui, tirozinui ir valinui.

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

2. Metodas

2.1. Laisvosios aminorūgštys

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

⁽⁴⁾ Standarte EN 17180 nustatytas analizės metodas nurodytas kaip alternatyvus metodas, taikytinas oficialios kontrolės tikslais nustatant aminorūgštis pašaruose, kuriuose yra daugiau kaip 10 % aminorūgščių.

⁽⁵⁾ Šis metodas nebuvo patvirtintas atliekant jungtinį lyginamąjį premiksų, kurių sudėtyje yra daugiau kaip 10 % pašarų priedų, tyrimą. Tačiau jis su atitinkamais nedideliais pakeitimais taip pat taikomas šioms matricoms, su sąlyga, kad metodas vėliau patvirtinamas atliekant vienos laboratorijos tyrimą. Papildomos informacijos ieškoti svetainėje <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

2.2. *Suminis aminorūgščių kiekis*

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

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

3. **Reagentai**

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

- 3.1. Vandenilio peroksidas, (m/m) = 30 %.
- 3.2. Skrudžių rūgštis, (m/m) = 98–100 %.
- 3.3. Fenolis.
- 3.4. Natrio disulfitas.
- 3.5. Natrio hidroksidas.
- 3.6. 5-sulfosalicilo rūgšties dihidratas.
- 3.7. Vandenilio chlorido rūgštis, tankis maždaug 1,18 g/ml.
- 3.8. Trinatrio citrato dihidratas.
- 3.9. 2,2'-tiodietanolis (tiodiglikolis).
- 3.10. Natrio chloridas.
- 3.11. Ninhidrinas.
- 3.12. Petroleteris, virimo temperatūros intervalas – 40–60 °C.
- 3.13. Norleucinas arba kitas junginys, kurį galima naudoti kaip vidinį etaloną.
- 3.14. Azoto dujos (< 10 ppm deguonies).
- 3.15. 1-oktanolis.
- 3.16. Aminorūgštys.
 - 3.16.1. 1 dalyje (Tikslas ir taikymo sritis) išvardytos standartinės aminorūgščių medžiagos. Gryniesiems junginiams, kuriuose nėra kristalizacinio vandens. Džiovinami vakuumu virš P₂O₅ arba H₂SO₄ likus savaitei iki naudojimo.
 - 3.16.2. Cistino rūgštis.
 - 3.16.3. Metionino sulfonas.
- 3.17. Natrio hidroksido tirpalas, c = 7,5 mol/l:
300 g NaOH (3.5 punktas) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 litro.
- 3.18. Natrio hidroksido tirpalas, c = 1 mol/l:
40 g NaOH (3.5 punktas) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 1 litro.
- 3.19. Skrudžių rūgšties ir fenolio tirpalas:
889 g skrudžių rūgšties (3.2 punktas) sumaišoma su 111 g vandens ir įdedama 4,73 g fenolio (3.3 punktas).

- 3.20. Hidrolizės mišinys, $c = 6 \text{ mol/l}$ HCl tirpalas, kuriame yra 1 g/l fenolio:
įdedama 1 g fenolio (3.3 punktas) į 492 ml HCl (3.7 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.21. Ekstrahavimo mišinys, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ HCl tirpalas, kuriame yra 2 % tiodiglikolio: paimama 8,2 ml HCl (3.7 punktas), skiedžiama maždaug 900 ml vandens, įpilama 20 ml tiodiglikolio (3.9 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro (tiesiogiai nemaišyti 3.7 ir 3.9 punktuose nurodytų medžiagų).
- 3.22. 5-sulfosalicilo rūgštis, $\beta = 6 \%$:
60 g 5-sulfosalicilo rūgšties (3.6 punktas) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.23. Oksidavimo mišinys (peroksiskruzdžių rūgštis ir fenolis):
mažoje cheminėje stiklinėje sumaišoma 0,5 ml vandenilio peroksido (3.1 punktas) ir 4,5 ml skruzdžių rūgšties bei fenolio tirpalo (3.19 punktas). Laikoma 1 val. 20–30 °C temperatūroje, kad susidarytų peroksiskruzdžių rūgštis, ir prieš supilant į ėminį šaldoma ledo ir vandens vonioje (15 min).
Įspėjimas. Vengiama patekimo ant odos ir dėvimi apsauginiai drabužiai.
- 3.24. Citratinis buferinis tirpalas, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
maždaug 800 ml vandens ištirpinama 19,61 g natrio citrato (3.8 punktas), 5 ml tiodiglikolio (3.9 punktas), 1 g fenolio (3.3 punktas) ir 16,50 ml HCl (3.7 punktas). Nustatoma pH vertė 2,20. Skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.25. Plovimo buferiniai tirpalai, paruošti pagal naudojamo analizatoriaus (4.9 punktas) sąlygas.
- 3.26. Ninhidrino reagentas ruošiamas pagal analizatoriaus (4.9 punktas) sąlygas.
- 3.27. Aminorūgščių standartiniai tirpalai. Šie tirpalai laikomi žemesnėje nei 5 °C temperatūroje.
- 3.27.1. Aminorūgščių pradiniai standartiniai tirpalai (3.16.1 punktas).
 $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ kiekvienos rūgšties tirpalas vandenilio chlorido rūgštyje.
Galima naudoti esančius prekyboje.
- 3.27.2. Cistino rūgšties ir metionino sulfono pradinis standartinis tirpalas, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
0,2115 g cistino rūgšties (3.16.2 punktas) ir 0,2265 g metionino sulfono (3.16.3 punktas) ištirpinama citratiname buferiniame tirpale (3.24 punktas) 1 litro matavimo kolboje, iki žymės skiedžiama citratinu buferiniu tirpalu. Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 12 mėnesių. Šis tirpalas nenaudojamas, jei pradiniam standartiniame tirpale (3.27.1 punktas) yra cistino rūgšties ir metionino sulfono.
- 3.27.3. Pradinis standartinis vidinio etalono, pvz.: norleucino, tirpalas, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
0,6560 g norleucino (3.13 punktas) ištirpinama citratiname buferiniame tirpale (3.24 punktas) 250 ml matavimo kolboje, iki žymės skiedžiama citratinu buferiniu tirpalu. Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 6 mėnesius.
- 3.27.4. Standartinių aminorūgščių kalibravimo tirpalas, naudojamas hidrolizatams, $c = 5 \text{ nmol}/50 \text{ } \mu\text{l}$ cistino rūgšties ir metionino sulfono ir $c = 10 \text{ nmol}/50 \text{ } \mu\text{l}$ kitų aminorūgščių. 2,2 g natrio chlorido (3.10 punktas) ištirpinama 30 ml citratinio buferinio tirpalo (3.24 punktas) 100 ml cheminėje stiklinėje. Įpilama 4,00 ml aminorūgščių pradinio standartinio tirpalo (3.27.1 punktas), 4,00 ml cistino rūgšties ir metionino sulfono pradinio standartinio tirpalo (3.27.2 punktas) ir 0,50 ml pradinio standartinio vidinio etalono tirpalo (3.27.3 punktas), jei naudojamas. Natrio hidroksidu (3.18 punktas) nustatoma pH vertė 2,20.
Kiekybiškai supilama į 50 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės citratinu buferiniu tirpalu (3.24 punktas) ir sumaišoma.
Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 3 mėnesius.
Dar žr. 9.1 punkto pastabas.
- 3.27.5. Standartinių aminorūgščių kalibravimo tirpalas, naudojamas hidrolizatams, paruoštiems pagal 5.3.3.1 punktą, ir ekstraktams (5.2 punktas). Kalibravimo tirpalas ruošiamas pagal 3.27.4 punktą, bet nededama natrio chlorido.
Laikoma žemesnėje nei 5 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 3 mėnesius.

4. Aparatūra

- 4.1. 100 arba 250 ml apvaliadugnė kolba su grįžtamuoju kondensatoriumi.
- 4.2. 100 ml borosilikatinio stiklo butelis su užsukamu kamščiu ir guminiu ar tefloniniu tarpikliu (pvz.: Duran, Schott), tinkamas naudoti krosnyje.
- 4.3. Ventiliuojama krosnis su temperatūros reguliatoriumi, kurio tikslumas geresnis nei $\pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.4. pH-metras (trys skaičiai po kablelio).
- 4.5. Membraninis filtras (0,22 μm).
- 4.6. Centrifuga.
- 4.7. Sukamasis vakuuminis garintuvas.
- 4.8. Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.
- 4.9. Aminorūgščių analizatorius arba HPLC įranga su jonitiniu filtru, reakcijos su ninhidrinu įtaisu, pokolonėlinės derivatizacijos įtaisu ir fotometriniu detektoriumi.

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

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

5. Procedūra

5.1. Ėminio ruošimas

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

5.2. Laisvųjų aminorūgščių kiekio nustatymas

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

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

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

Chromatografinė analizė atliekama pagal 5.4 punktą.

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

5.3. Suminio aminorūgščių kiekio nustatymas

5.3.1. Oksidavimas

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

- į 100 ml apvaliadugnę kolbą (4.1 punktas) hidrolizei atvirame inde (5.3.2.3 punktas) arba
- į 250 ml apvaliadugnę kolbą (4.1 punktas), jei turi būti maža natrio koncentracija (5.3.3.1 punktas), arba
- į 100 ml butelį su užsukamu kamščiu (4.2 punktas) hidrolizei uždarytame inde (5.3.2.4 punktas).

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

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

Tęsiama pagal 5.3.2.1 punktą.

5.3.2. Hidrolizė

5.3.2.1. Oksiduotų ėminių hidrolizė

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

Atsižvelgiant į taikomą procedūrą, tęsiama pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4 punktą.

5.3.2.2. Neoksiduotų ėminių hidrolizė

Į 100 ml ar 250 ml apvaliadugnę kolbą (4.1 punktas) arba į 100 ml butelį su užsukamu kamščiu (4.2 punktas) 0,2 mg tikslumu pasverama 0,1–1 g paruošto ėminio (5.1 punktas). Pasvertojoje ėminio dalyje azoto turi būti apie 10 mg. Atsargiai įpilama 25 ml hidrolizavimo mišinio (3.20 punktas) ir sumaišoma su ėminiu. Tęsiama pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4 punktą.

5.3.2.3. Hidrolizė atvirame inde

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

Tęsiama pagal 5.3.3 punktą.

5.3.2.4. Hidrolizė uždarytame inde

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

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

Tęsiama pagal 5.3.3 punktą

5.3.3. pH reguliavimas

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

5.3.3.1. Chromatografinės analizės sistemoms (4.9 punktas), kurioms reikia mažos natrio koncentracijos.

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

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

Į hidrolizatus, gautus pagal 5.3.2.3 arba 5.3.2.4 punktą, įlašinami 2 lašai 1-oktanolio (3.15 punktas).

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

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

5.3.3.2. Visiems kitiems aminorūgščių analizatoriams (4.9 punktas)

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

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

5.3.4. Ėminio tirpalas chromatografijai

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

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

Atliekama chromatografinė analizė (5.4 punktas).

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

5.4. Chromatografija

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

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

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

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

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

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

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

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

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

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

- A – = smailės plotas, hidrolizatas arba ekstraktas
- B – = smailės plotas, kalibravimo standartinis tirpalas
- C – = vidinio etalono hidrolizate arba ekstrakto smailės plotas
- D – = vidinio etalono smailės plotas, kalibravimo standartinis tirpalas
- M – = nustatomos aminorūgšties molinė masė
- c – = etalono koncentracija $\mu\text{mol/ml}$
- m – = ėminio masė (g) (su pataisa pradinei masei, jei ėminys buvo džiovinamas ar iš jo šalinami riebalai)
- V – = suminis hidrolizato tūris (5.3.4 punktas) arba apskaičiuotas suminis praskiesto ekstrakto tūris (6.1 punktas) ml

Oksiduotų ėminių hidrolizatuose cistinas ir cisteinas nustatomi kaip cistino rūgštis, bet apskaičiuojami kaip cistinas ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, $M = 240,30 \text{ g/mol}$), naudojant $M = 120,15 \text{ g/mol}$ ($0,5 \times 240,30 \text{ g/mol}$).

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

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

- 6.1. Suminis praskiesto ekstrakto tūris (F) laisvosioms aminorūgštims (5.2 punktas) nustatyti apskaičiuojamas taip:

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

- V – = galutinio ekstrakto tūris

7. Metodo įvertinimas

Metodas buvo patikrintas 1990 m. atliekant palyginimą tarptautiniu lygiu, naudojant keturis skirtingus pašarus (mišriuosius kiaulių pašarus, broilerių kombinuotuosius pašarus, baltymų koncentratą, premiksus).

Pastaba. Šis metodas buvo išbandytas 2003 m. antruoje tarptautiniuose palyginamuosiuose tyrimuose, naudojant po dvi poras atsitiktinai atrinktų pašarų broileriams augimo pabaigoje, pašarų broileriams augimo pradžioje, kukurūzų, žuvų miltų ir naminių paukščių miltų ėminius. Išsamesnės informacijos žr. standartą EN ISO 13903.

1990 m. palyginimo vidurkio ir standartinio nuokrypio rezultatai, gauti atmetus riktus, pateikiami šio punkto lentelėse:

Vidurkiai g/kg

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrusis kiaulių pašaras	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Broilerių kombinuotasis pašaras	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Baltymų koncentratas	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiksas	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n – dalyvavusių laboratorijų skaičius.

7.1. Pakartojamumas

Pirmiau lentelėje pateikto palyginimo pakartojamumas, išreikštas kaip laboratorijos standartinis nuokrypis, pateiktas šiose lentelėse:

Pakartojamumo variacijos koeficientas (CV_r) (%)

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrusis kiaulių pašaras	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Broilerių kombinuotasis pašaras	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Baltymų koncentratas	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiksas	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n – dalyvavusių laboratorijų skaičius.

7.2. Atkuriamumas

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

Atkuriamumo variacijos koeficientas (CV_R) (%)

Pamatinė medžiaga	Aminorūgštis			
	Treoninas	Cisteinas (cistinas)	Metioninas	Lizinas
Mišrusis kiaulių pašaras	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Broilerių kombinuotasis pašaras	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Baltymų koncentratas	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15

Premiksas	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16
-----------	---------------	---	---------------	---------------

n – dalyvavusių laboratorijų skaičius.

8. **Pamatinių medžiagų naudojimas**

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

9. **Pastabos**

9.1. Dėl aminorūgščių analizatorių skirtumų tikrinama pagal galutinę standartinių aminorūgščių kalibravimo tirpalų (žr. 3.27.4 ir 3.27.5 punktus) ir hidrolizatų (žr. 5.3.4 punktą) koncentraciją.

Prietaiso tiesinio atsako intervalas turi būti tikrinamas visoms aminorūgštims.

Standartinis tirpalas skiedžiamas citratinio buferiniu tirpalu, kad smailių plotai būtų intervalo viduryje.

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

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

10. **Veiksmingumo kriterijai**

Dviejų jungtinių lyginamųjų tyrimų (1990 m. tyrimo duomenys pateikti 7 punkte, o 2005 m. – standarte EN/ISO 13903) rezultatų (išskyrus tiroziną) suvestinėje nurodyti šie pakartojamumo ir atkuriamumo kriterijai. Šiuose dviejuose tarplaboratoriniuose tyrimuose gautos vertės gali netikti kitoms nei nurodytosios koncentracijos vertėms ir matricoms.

10.1. *Pakartojamumas*

Dviejų toje pačioje laboratorijoje to paties veiklos vykdytojo atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- 6 % didesnės vertės suminiam šių aminorūgščių kiekiui: glicino, alanino, lizino, prolino, glutamo rūgšties, izoleucino ir histidino,
- 8 % didesnės vertės suminiam šių aminorūgščių kiekiui: treonino, fenilalalino, metionino, asparto rūgšties ir leucino,
- 10 % didesnės vertės suminiam šių aminorūgščių kiekiui: arginino ir valino,
- 12 % didesnės vertės suminiam serino aminorūgšties kiekiui,
- 15 % didesnės vertės suminiam cisteino (cistino) aminorūgšties kiekiui.

10.2. *Atkuriamumas*

Dviejų skirtingose laboratorijose ir (arba) skirtingų veiklos vykdytojų atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- 15 % didesnės vertės suminiam šių aminorūgščių kiekiui: glicino, alanino ir treonino,
- 20 % didesnės vertės suminiam šių aminorūgščių kiekiui: lizino, prolino, fenilalalino, metionino ir asparto rūgšties,
- 22 % didesnės vertės suminiam šių aminorūgščių kiekiui: glutamo rūgšties ir leucino,
- 27 % didesnės vertės suminiam arginino aminorūgšties kiekiui,
- 32 % didesnės vertės suminiam izoleucino aminorūgšties kiekiui,

- 35 % didesnės vertės suminiam šių aminorūgščių kiekiui: valino ir serino,
- 40 % didesnės vertės suminiam histidino aminorūgšties kiekiui,
- 50 % didesnės vertės suminiam cisteino (cistino) aminorūgšties kiekiui.

F. TRIPTOFANO KIEKIO NUSTATYMAS

Analizės metodai, naudotini triptofanui nustatyti:

- EN ISO 13904 „Pašarai. Triptofano kiekio nustatymas“;
- toliau 1–9 dalyse aprašyti analizės metodai.

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti pašaruose esančio triptofano suminį kiekį ir laisvąjį triptofaną. Šiuo metodu negalima atskirti D-ir L-formų.

2. Metodas

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

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

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

3. Reagentai

- 3.1. Turi būti naudojamas du kartus distiliuotas arba tokios pat kokybės vanduo (laidis < 10 µS/cm).
- 3.2. Standartinė medžiaga: triptofanas (grynumas/kiekis ≥ 99 %), išdžiovintas vakuume virš fosforo pentoksido.
- 3.3. Vidinio etalono medžiaga: α-metiltryptofanas (grynumas/kiekis ≥ 99 %), išdžiovintas vakuume virš fosforo pentoksido.
- 3.4. Bario hidroksido oktahidratas (siekiant išvengti BaCO₃ susidarymo, kuris galėtų trukdyti nustatymui, užtikrinama, kad Ba(OH)₂·8 H₂O visiškai nesiliestų su oru) (žr. 9.3 punkto pastabą).
- 3.5. Natrio hidroksidas.
- 3.6. Ortofosforo rūgštis, (m/m) = 85 %.
- 3.7. Vandenilio chlorido rūgštis, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanolis, HPLC grynumo.
- 3.9. Petroleteris, virimo temperatūros intervalas – 40–60 °C.
- 3.10. Natrio hidroksido tirpalas, c = 1 mol/l:
40,0 g NaOH (3.5 punktas) ištirpinama vandenyje ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro (3.1 punktas).
- 3.11. Vandenilio chlorido rūgštis, c = 6 mol/l:
paimama 492 ml HCl (3.7 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.12. Vandenilio chlorido rūgštis, c = 1 mol/l:
paimama 82 ml HCl (3.7 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

- 3.13. Vandenilio chlorido rūgštis, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
paimama 8,2 ml HCl (3.7 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.14. Orto fosforo rūgštis, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
paimama 34 ml ortofosforo rūgšties (3.6 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro (3.1 punktas).
- 3.15. Koncentruotas triptofano tirpalas (3.2 punktas), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
į 500 ml matavimo kolbą įdedama 0,2553 g triptofano (3.2 punktas), ištirpinama vandenilio chlorido rūgštyje (3.13 punktas) ir skiedžiama iki žymės vandenilio chlorido rūgštimi (3.13 punktas). Laikoma $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ne ilgiau kaip keturias savaites.
- 3.16. Koncentruotas vidinio etalono tirpalas, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
į 500 ml matavimo kolbą įdedama 0,2728 g α -metiltryptofano (3.3 punktas), ištirpinama vandenilio chlorido rūgštyje (3.13 punktas) ir skiedžiama iki žymės vandenilio chlorido rūgštimi (3.13 punktas). Laikoma $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ne ilgiau kaip keturias savaites.
- 3.17. Triptofano ir vidinio etalono kalibravimo standartinis tirpalas:
paimama 2,00 ml koncentruoto triptofano tirpalo (3.15 punktas) ir 2,00 ml koncentruoto vidinio etalono (α -metiltryptofano) tirpalo (3.16 punktas). Skiedžiama vandeniu (3.1 punktas) ir metanolio (3.8 punktas) iki maždaug tokio pat tūrio ir maždaug iki tokios pat metanolio koncentracijos (10–30 %) kaip galutinio hidrolizato tūris ir koncentracija.
Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.
Ruošiamas tirpalas saugomas nuo tiesioginių saulės spindulių.
- 3.18. Acto rūgštis.
- 3.19. 1,1,1-trichlor-2-metil-2-propanolis.
- 3.20. Etanolaminas, (m/m) > 98 %.
- 3.21. 1 g 1,1,1-trichlor-2-metil-2-propanolio (3.19 punktas) tirpalas 100 ml metanolio (3.8 punktas).
- 3.22. HPLC judančioji fazė: 3,00 g acto rūgšties (3.18 punktas) + 900 ml vandens (3.1 punktas) + 50,0 ml 1,1,1-trichlor-2-metil-2-propanolio (3.19 punktas) tirpalo (3.21 punktas) metanolyje (3.8 punktas) (1 g/100 ml). Etanolaminu (3.20 punktas) nustatoma pH vertė 5,00. Skiedžiama vandeniu (3.1 punktas) iki 1 000 ml.

4. Aparatūra

- 4.1. HPLC įranga ir fluorescencinis detektorius.
- 4.2. Skysčių chromatografijos kolonėlė, 125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , 3 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.
- 4.3. pH-metras.
- 4.4. Kolba iš polipropileno, talpa 125 ml, su plačiu kaklu ir užsukamu dangčiu.
- 4.5. Membraninis filtras (0,45 μm).
- 4.6. Autoklavas, 110 ($\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 1,4 ($\pm$ 0,1) bar.
- 4.7. Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.
- 4.8. Sūkurinė maišyklė.

5. Procedūra

5.1. Ėminių ruošimas

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

5.2. Laisvojo triptofano kiekio nustatymas (ekstraktas)

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

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

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

5.3. Suminio triptofano kiekio nustatymas (hidrolizatas)

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

Prieš atidarant autoklavą temperatūra sumažinama iki šiek tiek žemesnės nei 100 °C. Siekiant išvengti Ba(OH)₂·8 H₂O išsikristalizavimo, į šiltą mišinį įpilama 30 ml kambario temperatūros vandens. Švelniai purtoma arba maišoma. Įpilama 2,00 ml koncentruoto vidinio etalono (α-metiltriptofano) tirpalo (3.16 punktas). Indai 15 min. aušinami ant vandens arba ledo vonios.

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

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

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

5.4. HPLC nustatymas

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

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

Apskaičiuojamas triptofano kiekis (X) gramais 100 g ėminio.

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

- A – = vidinio etalono smailės plotas, kalibravimo standartinis tirpalas (3.17 punktas)
- B – = triptofano ekstrakto (5.2 punktas) ar hidrolizate (5.3 punktas) smailės plotas
- V₁ – = koncentruoto triptofano tirpalo (3.15 punktas), įpilamo į kalibravimo tirpalą (3.17 punktas), tūris ml (2 ml)
- c – = koncentruoto triptofano tirpalo (3.15 punktas), įpilamo į kalibravimo tirpalą (3.17 punktas), koncentracija μmol/ml (= 2,50)
- V₂ – = koncentruoto vidinio etalono tirpalo (3.16 punktas), įpilamo į ekstraktą (5.2 punktas) (= 5,00 ml) arba į hidrolizatą (5.3 punktas) (= 2,00 ml), tūris
- C – = vidinio etalono ekstrakto (5.2 punktas) arba hidrolizate (5.3 punktas) smailės plotas
- D – = triptofano kalibravimo standartiniame tirpale (3.17 punktas) smailės plotas
- V₃ – = koncentruoto vidinio etalono tirpalo (3.16 punktas), įpilamo į kalibravimo standartinį tirpalą (3.17 punktas), tūris ml (= 2,00 ml)
- m – = ėminio masė g (su pataisa pradinei masei, jei jis buvo išdžiovintas arba iš jo buvo pašalinti riebalai)
- M – = triptofano molekulinė masė (= 204,23 g/mol)

7. Pakartojamumas

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

8. Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai

Hidrolizės metodui sertifikuoti buvo atliktas ES jungtinis lyginamasis tyrimas (4-asis tarplaboratorinis palyginimas), per kurį iki dvylikos laboratorijų analizavo tris ėminius. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas penkis kartus. Rezultatai pateikiami šioje lentelėje:

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

L –	rezultatus pateikusių laboratorijų skaičius
n –	atskirų rezultatų, paliekamų po riktų (identifikuotų pagal <i>Cochran</i> , <i>Dixon</i> riktų kriterijų) pašalinimo, skaičius
s _r –	pakartojamumo standartinis nuokrypis
S _R –	atkuriamumo standartinis nuokrypis
r –	pakartojamumas
R –	atkuriamumas
CV _r –	pakartojamumo variacijos koeficientas (%)
CV _R –	atkuriamumo variacijos koeficientas (%)

Laisvojo triptofano ekstrahavimo metodui sertifikuoti buvo atliktas dar vienas ES jungtinis lyginamasis tyrimas (3–asis tarplaboratorinis palyginimas), per kurį iki trylikos laboratorijų analizavo du ėminius. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas penkis kartus. Rezultatai pateikiami šioje lentelėje:

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

L –	rezultatus pateikusių laboratorijų skaičius
n –	atskirų rezultatų, paliekamų po riktų (identifikuotų pagal Cochran, Dixon riktų kriterijų) pašalinimo, skaičius
s _r –	pakartojamumo standartinis nuokrypis
S _R –	atkuriamumo standartinis nuokrypis
r –	pakartojamumas
R –	atkuriamumas
CV _r –	pakartojamumo variacijos koeficientas (%)
CV _R –	atkuriamumo variacijos koeficientas (%)

Triptofano hidrolizės metodui sertifikuoti buvo atliktas dar vienas ES jungtinis lyginamasis tyrimas, per kurį ne daugiau kaip septynios laboratorijos analizavo keturis ėminius. Rezultatai pateikiami toliau. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas penkis kartus.

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

L –	rezultatus pateikusių laboratorijų skaičius
n –	atskirų rezultatų, paliekamų po riktų (identifikuotų pagal Cochran, Dixon riktų kriterijų) pašalinimo, skaičius
s _r –	pakartojamumo standartinis nuokrypis
S _R –	atkuriamumo standartinis nuokrypis
r –	pakartojamumas
R –	atkuriamumas
CV _r –	pakartojamumo variacijos koeficientas (%)
CV _R –	atkuriamumo variacijos koeficientas (%)

9. Pastabos

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

Izokratinis eliuavimas, po kurio kolonėlė plaunama taikant gradientinį eliuavimą:

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

- 9.2. Chromatografinė analizė bus nevienoda atsižvelgiant į HPLC tipą ir naudojamą kolonėlės įkrovos medžiagą. Pasirinkta sistema turi užtikrinti triptofano ir vidinio etalono smailių atsiskyrimą iki pat bazinės linijos. Be to, svarbu, kad irimo produktai būtų gerai atskirti nuo triptofano ir vidinio etalono. Siekiant patikrinti, ar bazinėje linijoje, kur turi būti vidinio etalono smailė, nėra priemaišų, analizuojami hidrolizatai be vidinio etalono. Svarbu, kad eliuavimo trukmė būtų pakankamai ilga visiems irimo produktams išplauti, antraip pavėlavusios eliuavimo smailės gali trukdyti vėliau atliekamoms chromatografavimo procedūroms.

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

9.3. Bario hidroksidas

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

G. ŽALIŲ ALIEJŲ IR RIEBALŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šis metodas taikomas žalių aliejų ir riebalų kiekiui pašaruose nustatyti.

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

Žaliems aliejams ir riebalams aliejingosiose sėklose ir vaisiuose, taip pat pašaruose, kuriuose žalio aliejaus arba riebalų kiekis yra didesnis kaip 15 %, nustatyti ekstrahavimas turėtų būti atliekamas pagal A procedūrą, o pakartotinis ekstrahavimas – pagal B procedūrą (5.3 punktas).

1.1. A procedūra. Tiesiogiai ekstrahuojami žali aliejai ir riebalai

Šis metodas taikomas augalinėms pašarinėms žaliavoms, išskyrus pašarus, įtrauktus į B procedūros taikymo sritį.

1.2. B procedūra. Suminis žalių aliejų ir riebalų kiekis

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

1.3. Rezultatų aiškinimas

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

2. **Metodas**

2.1. A procedūra

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

2.2. B procedūra

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

3. **Reagentai**

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

3.2. Natrio sulfatas, bevandenis.

3.3. Vandenilio chlorido rūgštis, $c = 3 \text{ mol/l}$.

3.4. Pagalbinė filtravimo priemonė, pvz., diatomitas, „hyflo-supercel“.

4. **Aparatūra**

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

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

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

5. **Procedūra**

5.1. A procedūra (žr. 8.1 punktą)

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

Tūta dedama į ekstrahavimo aparatą (4.1 punktas) ir ekstrahuojama šešias valandas petroleteriu (3.1 punktas). Petroleterio ekstraktas surenkamas į pasvertą sausą kolbą su pemzos gabaliukais ⁽⁶⁾.

Tirpiklis distiliuojamas. Likutis džiovinamas kolbą laikant džiovinimo spintoje (4.3 punktas) pusantros valandos. Kolba atvėsinama eksikatoriuje ir pasveriamas. Džiovinama dar 30 min, siekiant patikrinti, ar nekinta riebalų ir aliejų masė (paėliui sveriant du kartus, masės sumažėjimas turi neviršyti 1 mg).

⁽⁶⁾ Jei vėliau atliekami aliejaus arba riebalų kokybės bandymai, pemzos gabaliukai pakeičiami stikliniais rutuliukais.

5.2. B procedūra

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

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

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

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

5.3. A procedūra ir pakartotinis ekstrahavimas pagal B procedūrą

Žaliems aliejams ir riebalams aliejingosiose sėklose ir vaisiuose, taip pat pašaruose, kuriuose žalio aliejaus arba riebalų kiekis yra didesnis kaip 15 %, nustatyti ekstrahavimas turėtų būti atliekamas pagal A procedūrą, o pakartotinis ekstrahavimas – pagal B procedūrą.

Tai reiškia, kad ekstrahavus petroleteriu (A procedūra) likutis arba jo dalis pakartotinai ekstrahuojami vandenilio chlorido rūgštimi (B procedūra). Žalių aliejų ir riebalų kiekis yra per A ir B procedūras nustatytų kiekių suma.

6. Rezultatų išraiška

Likučio masė išreiškiama ėminio masės procentais.

7. Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties analizę atliekančio asmens atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- 0,2 %, absoliučiąja verte, kai žalių aliejų ir riebalų kiekis yra mažesnis nei 5 %,
- 4,0 % didžiausio rezultato vertės, kai kiekis 5–10 %,
- 0,4 % absoliučiąja verte, kai kiekis didesnis nei 10 %.

8. Pastabos

- 8.1. Jei produktus, turinčius didelį aliejų ir riebalų kiekį, sunku sutrupinti arba jie yra netinkami sumažintajam homogeniniam tiriamajam ėminiui paimti, atliekami toliau aprašyti veiksmai.

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

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

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

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

kurioje:

m_1 – likučio po pirmojo ekstrahavimo (aliekvotinės ekstrakto dalies) svoris gramais;

m_2 – likučio po antrojo ekstrahavimo svoris gramais.

- 8.2. Tam tikruose produktuose (pvz., kuriuose yra nedaug aliejų arba riebalų) tiriamojo ėminio masė gali būti padidinta.
- 8.3. Gyvūnų augintinių ėdalą, kuriame yra daug vandens, prieš hidrolizę ir ekstrahavimą gali tekti maišyti su bevandeniu natrio sulfatu, kaip tai daroma taikant B procedūrą.
- 8.4. Atliekant 5.2 punkte aprašytas procedūras, likučiu po filtravimo plauti veiksmingiau būtų naudoti ne šaltą, o karštą vandenį.
- 8.5. Kai kurių pašarų 1,5 val. džiovinimo trukmę gali tekti pailginti. Per ilgo džiovinimo vengiama, nes dėl to gali būti gauti mažesni rezultatai. Gali būti naudojama mikrobangų krosnis.

H. ŽALIOS LĄSTELIENOS KIEKIO NUSTATYMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

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

Metodas netaikomas lignoceliuliozei ir augalinėms anglims (dalelės per smulkios).

2. Metodas

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

3. Reagentai

- 3.1. Sieros rūgštis, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Priešputis (pvz., n-oktanolis).
- 3.3. Filtravimą greitinanti priemonė (Celite 545 arba lygiavertė), iškaitinta 500 °C temperatūroje keturias valandas (8.6 punktas).
- 3.4. Acetonas.
- 3.5. Petroleteris, kurio virimo temperatūros intervalas 40–60 °C.
- 3.6. Vandenilio chlorido rūgštis, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Kalio hidroksido tirpalas, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Aparatūra

- 4.1. Kaitinimo įrenginys šlapiajam skaidymui sieros rūgštimi arba kalio hidroksido tirpalu, turintis filtravimo tiglio (4.2 punktas) laikiklį, išleidimo vamzdį su čiaupu skysčiui išleisti ir vakuuminį siurbį, gali būti suslėgtojo oro. Kiekvieną dieną prieš naudojimą blokas penkias minutes šildomas verdančiu vandeniu.
- 4.2. Stiklinis filtravimo tiglio su sukepinto stiklo filtro plokšte, kurios akučių dydis 40–90 μm. Prieš naudojant pirmą kartą, tiglio kelias minutes kaitinamas iki 500 °C ir atvėsintas (8.6 punktas).

- 4.3. Ne mažesnės nei 270 ml talpos cilindras su grįžtamuju kondensatoriumi, tinkamas virinimui.
- 4.4. Džiovinimo spinta su šilumine rele.
- 4.5. Mufelinė krosnis su šilumine rele.
- 4.6. Ekstrahavimo įrenginys, kurį sudaro filtravimo tiglio (4.2 punktas) laikiklio plokštė ir išleidimo vamzdis su čiaupu vakuumui prijungti ir skysčiui išleisti.
- 4.7. Jungiamieji žiedai kaitinimo įrenginiui (4.1 punktas), tigliui (4.2 punktas) ir cilindrai (4.3 punktas) sujungti ir šaltojo ekstrahavimo įrenginiui (4.6 punktas) bei tigliui prijungti.

5. Procedūra

1 mg tikslumu pasveriama 1 g paruošto ėminio, ėminys dedamas į tigli (4.2 punktas) (žr. 9.1, 9.2 ir 9.3 punktų pastabas) ir pridedamas 1 g filtravimą greitinančios priemonės (3.3 punktas).

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

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

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

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

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

Tiglis džiovinamas džiovinimo spintoje iki pastoviosios masės $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po kiekvieno džiovinimo tiglio atvėsinama eksikatoriuje ir greitai pasveriamas. Tiglio dedamas į mufelinę krosnį ir ne mažiau nei 30 min. iškaitinamas $475\text{--}500\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki pastoviosios masės (paeiliui sveriant du kartus, masės sumažėjimas turi neviršyti 2 mg).

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

Atliekamas tuščiasis bandymas be ėminio. Masės sumažėjimas po sudeginimo iki pelenų neturi būti didesnis nei 4 mg.

6. Rezultatų apskaičiavimas

Žalios ląstelių kiekis ėminio masės procentais gaunamas pagal lygtį:

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

kurioje:

m = ėminio svoris g;

m_0 = ėminio masės sumažėjimas po sudeginimo iki pelenų g;

m_1 = masės sumažėjimas po sudeginimo iki pelenų, atliekant tuščiąjį bandymą, g.

7. Pakartojamumas

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

- 0,6 % absoliučiąja verte, kai žalios ląstelių kiekis mažesnis nei 10 %;
- 6 % didžiausiojo rezultato vertės, kai žalios ląstelių kiekis lygus ar didesnis nei 10 %.

8. **Atkuriamumas**

Dviejų skirtingose laboratorijose atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- 1,0 % absoliučiąja verte, kai žalios ląstelių kiekis mažesnis nei 10 %;
- 10 % didžiausiojo rezultato vertės, kai žalios ląstelių kiekis lygus ar didesnis nei 10 %.

9. **Pastabos**

- 9.1. Jei pašaruose yra daugiau nei 10 % žalių riebalų, prieš analizę jie turi būti pašalinti petroleteriu (3.5 punktas). Filtravimo tiglio (4.2 punktas) su jame esančia medžiaga prijungiamas prie šaltojo ekstrahavimo įrenginio (4.6 punktas) ir prijungus vakuumą likutis tris kartus plaunamas 30 ml petroleterio porcijomis, užtikrinant, kad likutis būtų sausas. Tiglio su jame esančia medžiaga prijungiamas prie kaitinimo įrenginio (4.1 punktas) ir analizė tęsiama, kaip aprašyta 5 punkte.
- 9.2. Jei pašaruose yra riebalų, kurių tiesiogiai negalima ekstrahuoti petroleteriu (3.5 punktas), riebalai turi būti pašalinti, kaip nurodyta 8.1 punkte, ir dar kartą šalinami po virinimo su rūgštimi. Pavirinus su rūgštimi ir išplovus, tiglio su jame esančia medžiaga prijungiamas prie šalto ekstrahavimo indo (4.6 punktas) ir tris kartus plaunamas 30 ml acetono (4.6 punktas), tada tris kartus 30 ml petroleterio porcijomis. Filtruojama prijungus vakuumą iki sauso likučio ir analizė tęsiama, kaip aprašyta 5 punkte, pradedant nuo apdorojimo kalio hidroksido tirpalu.
- 9.3. Jei pašarai turi daugiau kaip 5 % karbonatų, išreikštų kalcio karbonatu, tiglio (4.2 punktas) su pasvertu ėminiu prijungiamas prie kaitinimo įrenginio (4.1 punktas). Ėminys tris kartus plaunamas 30 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.6 punktas). Kiekvieną kartą įpylus rūgšties ėminys paliekamas stovėti prieš filtravimą maždaug vieną minutę. Vieną kartą plaunama 30 ml vandens ir procedūra tęsiama, kaip aprašyta 5 punkte.
- 9.4. Jei aparatas naudojamas kaip stovas (prie to paties kaitinimo įrenginio prijungti keli tigliai), atliekant vieną bandymų seriją negalima vykdyti dviejų to paties ėminio atskirų nustatymų.
- 9.5. Jei po virinimo sunku filtruoti rūgštinius ir šarminius tirpalus, per kaitinimo įrenginio išleidimo vamzdį leidžiamas suslėgtasis oras ir filtravimas tęsiamas.
- 9.6. Siekiant pratęsti stiklinių filtravimo tiglių naudojimo trukmę, deginimo iki pelenų temperatūra yra ne aukštesnė nei 500 °C. Reikia žiūrėti, kad kaitinant ir atvėsinant būtų išvengta staigių temperatūros svyravimų.

I. CUKRAUS KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

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

Šis metodas naudotinas cukraus kiekiui nustatyti, siekiant apskaičiuoti pašarų energetinę vertę.

Kai cukraus kiekis turi būti nustatomas kitais tikslais, galima naudoti kitus analizės metodus.

2. **Metodas**

Cukrūs ekstrahuojami praskiestu etanolio; tirpalas skaidrinamas I ir II Carrez tirpalais. Etanolį pašalinus, cukrų kiekis prieš ir po inversijos nustatomas *Luff-Schoorl* metodu.

3. **Reagentai**

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

- 3.2. Carrez I tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.3. Carrez II tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.4. Metiloranžinio 0,1 % (m/V) tirpalas.
- 3.5. Vandenilio chlorido rūgšties 4 mol/l tirpalas.
- 3.6. Vandenilio chlorido rūgšties 0,1 mol/l tirpalas.
- 3.7. Natrio hidroksido 0,1 mol/l tirpalas.
- 3.8. *Luff-Schoorl* reagentas:
 Atsargiai maišant citrinų rūgšties tirpalas (3.8.2 punktas) supilamas į natrio karbonato tirpalą (3.8.3 punktas). Įpilamas vario sulfato tirpalas (3.8.1 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro. Paliekama nusistovėti per naktį ir tirpalas filtruojamas.
 Tikrinama gauto reagento koncentracija ($\text{Cu} - 0,05 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 1 \text{ mol/l}$), žr. 5.4 punkto paskutinę pastraipą. Tirpalo pH yra apie 9,4.
- 3.8.1. Vario sulfato tirpalas: 25 g vario sulfato $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, neturinčio geležies, ištirpinama 100 ml vandens.
- 3.8.2. Citrinų rūgšties tirpalas: 50 g citrinų rūgšties $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ištirpinama 50 ml vandens.
- 3.8.3. Natrio karbonato tirpalas: 143,8 g bevandenio natrio karbonato ištirpinama maždaug 300 ml šilto vandens. Paliekama atvėsti.
- 3.9. Natrio tiosulfato 0,1 mol/l tirpalas.
- 3.10. Krakmolo tirpalas: 5 g tirpaus krakmolo mišinys su 30 ml vandens supilamas į 1 litrą verdančio vandens. Virinama tris minutes, tirpalas atvėsinaamas, prireikus į jį kaip konservanto įdedama 10 mg gyvsidabrio (II) jodido.
- 3.11. Sieros rūgšties 3 mol/l tirpalas.
- 3.12. Kalio jodido 30 % (m/V) tirpalas.
- 3.13. Pemzos granulės, virintos vandenilio chlorido rūgšties tirpale, išplautos ir išdžiovintos.
- 3.14. 3-metilbutan-1-olis.

4. Aparatūra

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

5. Procedūra

5.1. Ėminio ekstrahavimas

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

5.2. Redukuojančiųjų cukrų kiekio nustatymas

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

5.3. Suminio invertuotų cukrų kiekio nustatymas

Pipete paimama 50 ml tirpalo ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Įlašinami keli lašai metiloranžinio tirpalo (3.4 punktas) ir atsargiai, nuolat maišant, pilama vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.5 punktas) tol, kol neišnyksta tirpalo raudona spalva. Įpilama 15 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.6 punktas), kolba nuleidžiama į stipriai verdančio vandens vonią, kurioje laikoma trisdešimt minučių. Tirpalas greitai atvėsinaamas iki maždaug 20 °C temperatūros ir į jį įpilama 15 ml natrio hidroksido tirpalo (3.7 punktas). Skiedžiama vandeniu iki 100 ml ir sumaišoma. Paimama ne daugiau 25 ml šio tirpalo, kuriame yra mažiau nei 60 mg redukuojančiųjų cukrų, perskaičiuotų į gliukozės kiekį. Prireikus distiliuotu skiedžiama vandeniu iki 25 ml ir redukuojančiųjų cukrų kiekis nustatomas *Luff-Schoorl* metodu. Rezultatas išreiškiamas gliukozės procentiniu kiekiu arba, jei tinka, sacharozės kiekiu, gautą rezultatą padauginus iš faktoriaus 0,95.

5.4. Titravimas *Luff-Schoorl* metodu

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

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

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

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

7. Specialiosios procedūros

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

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

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

8. Pastabos

- 8.1. Siekiant išvengti putojimo, prieš virinant su *Luff-Schoorl* reagentu įpilama (nepaisant tūrio) apie 1 ml 3-metilbutan-1-olio (3.14 punktas).
- 8.2. Suminio invertuotų cukrų kiekio, perskaičiuoto į gliukozės kiekį, ir redukuojančiųjų cukrų kiekio, perskaičiuoto į gliukozės kiekį, skirtumą padauginus iš 0,95 gaunamas sacharozės kiekis procentais.
- 8.3. Norint nustatyti redukuojančiųjų cukrų, išskyrus laktozę, kiekį, galima taikyti du metodus.

- 8.3.1. Skačiuojant apytiksliai, kitu analizės metodu nustatytas laktozės kiekis dauginamas iš 0,675 ir gautas rezultatas atimamas iš redukuojančiųjų cukrų kiekio.
- 8.3.2. Redukuojančių cukrų, išskyrus laktozę, kiekį skaičiuojant tiksliai, tas pats ėminys turi būti naudojamas dviem galutiniams nustatymams. Viena analizė atliekama su alikvotine dalimi tirpalo, gauto pagal 5.1 punktą, kita – su alikvotine dalimi tirpalo, gauto nustatant laktozę pagal šiam tikslui nustatytą metodą (atlikus kitų cukrų fermentaciją ir skaidrinimą).

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

Pavyzdys

Du kiekvienam nustatymui paimti tūriai atitinka 250 mg ėminį.

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

Skirtumas yra 16,6 mg gliukozės.

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

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

Verčių lentelė, naudojant 25 ml Luff-Schoorl reagento

Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l tūris ml, dviejų minučių trukmės šildymas, dešimties minučių trukmės virimas

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Gliukozė, fruktozė, invertuoti cukrūs C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktozė C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	skirtumas	mg	skirtumas	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. LAKTOZĖS KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

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

2. Metodas

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

3. Reagentai

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

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

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

3.4. *Luff-Schoorl* reagentas:

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

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

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

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

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

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

3.7. Sieros rūgšties 3 mol/l tirpalas.

3.8. Natrio tiosulfato 0,1 mol/l tirpalas.

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

4. Aparatūra

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

5. Procedūra

1 g ėminio pasverama 1 mg tikslumu ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Įpilama 25–30 ml vandens. Kolba 30 minučių laikoma ant verdančio vandens vonios ir po to aušinama iki maždaug 35 °C temperatūros. Įpilama apie 5 ml mielių suspensijos (3.1 punktas) ir sumaišoma. Kolba laikoma dvi valandas vandens vonioje 38–40 °C temperatūroje. Atvėsinama iki maždaug 20 °C temperatūros.

Įpilama 2,5 ml *Carrez I* tirpalo (3.2 punktas) ir trisdešimt sekundžių maišoma, tada įpilama 2,5 ml *Carrez II* tirpalo (3.3 punktas) ir vėl maišoma trisdešimt sekundžių. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml, sumaišoma ir filtruojama. Ne daugiau nei 25 ml šio tirpalo, kuriame turėtų būti 40–80 mg laktozės, pipete paimama į 300 ml Erlenmejerio kolbą. Prireikus iki 25 ml skiedžiama vandeniu.

Tokiu pačiu būdu atliekamas tuščiasis bandymas su 5 ml mielių suspensijos (3.1 punktas). Laktozės kiekis *Luff-Schoorl* metodu nustatomas taip: įpilama lygiai 25 ml *Luff-Schoorl* reagento (3.4 punktas) ir įdedamos dvi pemzos (3.5 punktas) granulės. Tirpalas maišomas laikant kolbą rankoje ir tuo pat metu šildant virš vidutinės atviros liepsnos, kad tirpalas užvirtų maždaug per dvi minutes. Erlenmejerio kolba iš karto statoma ant asbestu padengto

vielos tinkelio su maždaug 6 cm skersmens skyje, po kuria dega liepsna. Liepsna reguliuojama taip, kad būtų šildomas tik Erlenmejerio kolbos dugnas. Prie Erlenmejerio kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius. Virinama lygiai dešimt minučių. Iš karto po to kolba atvėsinama šaltame vandenyje ir maždaug po penkių minučių titruojama taip:

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

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

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

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

7. Pastaba

1. Jei produktuose yra daugiau nei 40 % fermentuojamo cukraus, naudojama daugiau nei 5 ml mielių suspensijos (3.1 punktas).
2. Pašaruose su sumažintu laktozės kiekiu (pvz., piene katėms) laktozė paverčiama fruktoze, o ji per 2 val. nevisiškai fermentuojama, todėl gaunami didesni arba klaidingai teigiami rezultatai (nes fruktozės likučiai lieka ekstrakto).

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

Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l tūris ml, dviejų minučių trukmės šildymas, dešimties minučių trukmės virimas

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

K. KRAKMOLO KIEKIO NUSTATYMAS

POLIARIMETRINIS METODAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti krakmolo ir didelės molekulinės masės krakmolo skilimo produktų koncentraciją pašaruose, siekiant patikrinti atitiktį nurodomai energinei vertei (VII priedo nuostatomis) ir Reglamentui (EB) Nr. 767/2009.

Šis metodas naudotinas krakmolo kiekiui nustatyti, siekiant apskaičiuoti pašarų energetinę vertę.

Kai krakmolo kiekis turi būti nustatomas kitais tikslais, galima naudoti kitus analizės metodus.

2. **Metodas**

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

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

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

3. **Reagentai**

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

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

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

3.3. Carrez I tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.4. Carrez II tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

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

4. **Aparatūra**

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

4.2. Poliarimetras arba sacharimetras.

5. **Procedūra**

5.1. *Ėminio ruošimas*

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

5.2. Suminio poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo (P ar S) nustatymas (žr. 7.1 punkto pastabą)

1 mg tikslumu pasverama 2,5 g sutrupinto ėminio ir suberiama į 100 ml matavimo kolbą. Įpilama 25 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.2 punktas), purtoma, kad tiriamasis ėminys tolygiai pasiskirstytų, ir dar įpilama 25 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.2 punktas). Kolba panardinama į verdančio vandens vonią, pirmąsias tris minutes stipriai ir visą laiką kratoma, kad nesusidarytų aglomeratų. Vandens vonioje turi būti pakankamai daug, kad panardinus į ją matavimo kolbą, jis nenustotų viręs. Purtomos kolbos negalima išimti iš vonios. Lygiai po 15 min. kolba išimama iš vonios, įpilama 30 ml šalto vandens ir iš karto atvėsinama iki 20 °C.

Įpilama 5 ml Carrez I tirpalo (3.3 punktas) ir purtoma maždaug 30 s. Įpilama 5 ml Carrez II tirpalo (3.4 punktas) ir purtoma dar maždaug 30 s. Tirpalas skiedžiamas vandeniu iki žymės, maišomas ir filtruojamas. Jei filtratas nėra visiškai skaidrus (tai pasitaiko retai), nustatymas kartojamas naudojant daugiau Carrez I ir II tirpalų, pvz., 10 ml.

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

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

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

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

Skaidrinama, naudojant Carrez I (3.3 punktas) ir II (3.4 punktas) tirpalus, skiedžiama iki žymės vandeniu, sumaišoma, filtruojama ir matuojamas poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, kaip nurodyta 5.2 punkto antroje ir trečioje pastraipoje.

6. Rezultatų apskaičiavimas

Krakmolo kiekis (%) ėminyje apskaičiuojamas taip:

6.1. Matavimas poliarimetru

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

P = suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas laipsniais

P' = 40 % (V/V) etanolyje tirpių medžiagų tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas laipsniais;

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

+ 185,9 °: ryžių krakmolo

+ 185,7 °: bulvių krakmolo

+ 184,6 °: kukurūzų krakmolo

+ 182,7 °: kviečių krakmolo

+ 181,5 °: miežių krakmolo

+ 181,3 °: avižų krakmolo

+ 184,0 °: kitų rūšių krakmolo, taip pat krakmolo mišinių kombinuotuose pašaruose

6.2. *Matavimas sacharimetru*

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

S = suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas sacharimetro laipsniais

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

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

16,29 g prancūziškų sacharimetų

26,00 g vokiškų sacharimetų

20,00 g kitų sacharimetų

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

6.3. *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,4 absoliučiąja verte, kai krakmolo yra mažiau nei 40 %, ir 1 % santykine verte, kai krakmolo yra 40 % arba daugiau.

7. **Pastabos**

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

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

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

- (cukrinių) runkelių produktai, pvz., (cukrinių) runkelių išspaudos, (cukrinių) runkelių melasa, (cukrinių) runkelių išspaudos su melasa, (cukrinių) runkelių žlaugtai, (runkelių) cukrus,
- citrusinių vaisių minkštimas,
- sėmenys, sėmenų išspaudos, ekstrahuoti sėmenys,
- rapsai, rapsų išspaudos, rapsų rupiniai, rapsų lukštai,
- saulėgrąžos, išlukštentų saulėgrąžų rupiniai, aplukštentų saulėgrąžų rupiniai,
- kokosų išspaudos, kokosų rupiniai,
- bulvių tarkiai,
- dehidratuotos mielės,
- produktai, kurių sudėtyje yra daug inulino (pvz., bulvinių saulėgrąžų trupiniai ir miltai),
- spirgai,
- sojų produktai.

Tokiais atvejais gali būti taikomas Komisijos reglamente (EB) Nr. 121/2008 ⁽⁷⁾ nustatytas analizės metodas. Šis metodas taip pat gali būti taikomas pašarams, kuriuose yra mažiau kaip 1 % krakmolo.

(⁷) 2008 m. vasario 11 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 121/2008, nustatantis tyrimo metodą krakmolo kiekiui produktuose, naudojamuose gyvūnų pašarams, nustatyti (KN kodas 2309) (OL L 37, 2008 2 12, p. 3).

L. ŽALIŲ PELENŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti žalių pelenų kiekį pašaruose.

2. **Metodas**

Ėminys sudeginamas 550 °C temperatūroje; likutis pasveriamas.

3. **Reagentai**

Amonio nitrato 20 % (m/V) tirpalas.

4. **Aparatūra**

4.1. Kaitlentė.

4.2. Elektrinė mufelinė krosnis su šilumine rele.

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

5. **Procedūra**

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

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

5.2. Tiglis dedamas į reguliuojamos temperatūros mufelinę krosnį, nustatytą 550 °C. Kaitinama 3 valandas. Tiglis dedamas į eksikatorių atvėsti ir iš karto sveriamas. Kaitinama dar 30 min, siekiant užtikrinti, kad pelenų masė nekinta (paėliui sveriant du kartus, masės sumažėjimas turi neviršyti 1 mg).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Likučio masė apskaičiuojama, atimant tiglio masę.

Rezultatas išreiškiamas ėminio masės procentais.

7. **Pastabos**7.1. *Medžiagų, kurias sunku paversti pelenais*, pelenai iš pradžių turi būti deginami ne trumpiau kaip tris valandas, atvėsunami ir į juos įlašinami keli lašai 20 % amonio nitrato tirpalo arba vandens (lašinama atsargiai, kad pelenai neišsisklaidytų arba nesusoktų į gabalus). Išdžiovinus, toliau kaitinama krosnyje. Prireikus veiksmas kartojamas tol, kol medžiaga visiškai virsta pelenais.7.2. Jei *medžiagos atsparios apdorojimui*, aprašytam 7.1 punkte, atliekami šie veiksmai: po trijų valandų deginimo, pelenai supilami į šiltą vandenį ir filtruojami per mažą bepelenį filtrą. Filtras su turiniu sudeginamas prieš tai naudotame tiglyje. Į atvėsintą tigli supilamas filtratas, tirpalas išgarinamas iki sauso likučio, likutis iškaitinamas ir pasveriamas.7.3. Analizuojant *aliejus ir riebalus*, tinkamo dydžio tiglyje tiksliai pasveriamas 25 g ėminys. Ėminys anglinamas padegant jį bepelenio filtravimo popieriaus juoste. Sudeginus likutis sudrėkinamas kiek įmanoma mažesniu kiekiu vandens. Likutis džiovinamas ir iškaitinamas, kaip aprašyta 5 punkte.

M. VANDENILIO CHLORIDO RŪGŠTYJE NETIRPIŲ PELENŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

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

- 1.1. *A metodas.* Taikomas organinėms pašarinėms žaliavoms ir daugumai kombinuotųjų pašarų.
- 1.2. *B metodas.* Taikomas neorganiniams junginiams ir mišiniams, taip pat kombinuotiesiems pašarams, kuriuose A metodu nustatytas vandenilio chlorido rūgštyje netirpių medžiagų kiekis yra didesnis nei 1 %.

2. **Metodas**

- 2.1. *A metodas.* Ėminys paverčiamas pelenais, pelenai virinami vandenilio chlorido rūgštyje, neištirpusi dalis filtruojama ir sveriamas.
- 2.2. *B metodas.* Ėminys apdorojamas vandenilio chlorido rūgštimi. Tirpalas filtruojamas, likutis paverčiamas pelenais, kurie apdorojami pagal A metodą.

3. **Reagentai**

- 3.1. Vandenilio chlorido rūgštis 3 mol/l.
- 3.2. Trichloracto rūgštis, 20 % (m/V) tirpalas.
- 3.3. Trichloracto rūgštis, 1 % (m/V) tirpalas.

4. **Aparatūra**

- 4.1. Kaitlentė.
- 4.2. Elektrinė mufelinė krosnis su šilumine rele.
- 4.3. Kvarciniai, porcelianiniai arba platininiai deginimo tigliai, stačiakampiai (maždaug 60 × 40 × 25 mm) arba apvalieji (skersmuo: 60–75 mm, aukštis: 20–40 mm).
- 4.4. Bepeleniai filtrai.

5. **Procedūra**

5.1. *A metodas*

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

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

5.2. *B metodas*

5 g ėminio pasveriamas 1 mg tikslumu ir supilama į 250–400 ml cheminę stiklinę. Įpilama 25 ml vandens ir 25 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1 punktas), sumaišoma ir palaukiama, kol nustoja skirtis burbuliukai. Įpilama dar 50 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1 punktas). Palaukiama dar galimo dujų skyrimosi pabaigos, cheminė stiklinė statoma į verdančio vandens vonią ir laikoma joje trisdešimt minučių, prireikus ir ilgiau, kad visiškai būtų hidrolizuotas krakmolai, kurio galėjo būti ėminyje. Šiltas tirpalas filtruojamas per bepelenį filtrą, likutis plaunamas 50 ml šilto vandens (žr. 7 punkto pastabą). Filtras su likučiu dedamas į deginimo tigli, džiovinamas ir sudeginamas iki pelenų ne žemesnėje nei 550 °C, bet ne aukštesnėje nei 700 °C temperatūroje. Pelenai supilami į 250–400 ml cheminę stiklinę, naudojant 75 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1 punktas); tęsiama, kaip nurodyta 5.1 punkto antroje pastraipoje.

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

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

7. Pastaba

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

N. SUMINIO FOSFORO KIEKIO NUSTATYMAS

Suminis fosforo kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standartu EN 15510 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kalcio, natrio, fosforo, magnio, kalio, geležies, cinko, vario, mangano, kobalto, molibdeno ir švino nustatymas induktyviai susietos plazmos atominės emisinės spektroskopijos metodu (ICP-AES)“, arba
- taikant analizės metodą, nustatytą standartu EN 15621 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kalcio, natrio, fosforo, magnio, kalio, sieros, geležies, cinko, vario, mangano ir kobalto nustatymas induktyviai susietos plazmos atominės emisinės spektrometrijos metodu (ICP-AES), mineralizavus aukštame slėgyje“, arba
- toliau aprašytu fotometriniu metodu.

FOTOMETRINIS METODAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

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

2. Metodas

Ėminys mineralizuojamas sausuoju deginimu (organinių pašarų) arba taikant šlapiąjį skaidymą rūgštyje (mineralinių junginių ir skystųjų pašarų) ir įdedamas į rūgštis tirpalą. Tirpalas veikiamas molibdovanadato reagentu. Taip susidariusio geltono tirpalo absorbcija matuojama spektrofotometru esant 430 nm bangos ilgiui.

3. Reagentai

- 3.1. Kalcio karbonatas.
- 3.2. Vandenilio chlorido rūgštis, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (maždaug 6 mol/l).
- 3.3. Nitrato rūgštis, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4. Nitrato rūgštis, $\rho_{20} = 1,38\text{--}1,42$ g/ml.
- 3.5. Sieros rūgštis, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6. Molibdovanadato reagentas: 1 litro matavimo kolboje sumaišoma 200 ml amonio heptamolibdato tirpalo (3.6.1 punktas), 200 ml amonio monovanadato tirpalo (3.6.2 punktas) ir 134 ml nitrato rūgštis (3.4 punktas). Skiedžiama vandeniu iki žymės.
- 3.6.1. Amonio heptamolibdato tirpalas: karštame vandenyje ištirpinama 100 g amonio heptamolibdato tetrahidrato $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Įpilama 10 ml amoniako (tankis 0,91 kg/l) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.6.2. Amonio monovanadato tirpalas: 2,35 g amonio monovanadato NH_4VO_3 ištirpinama 400 ml karšto vandens. Nuolat maišant lėtai įpilama 20 ml praskiestos nitrato rūgštis (7 ml HNO_3 (3.4 punktas) ir 13 ml H_2O) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.7. Standartinis fosforo tirpalas (1 mg/ml): vandenyje ištirpinama 4,387 g kalio dihidrofosfato KH_2PO_4 . Skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

4. Aparatūra

- 4.1. Kvarciniai, porcelianiniai arba platininiai deginimo tigliai.
- 4.2. Elektrinė mufelinė krosnis su šilumine rele, nustatyta 550 °C temperatūrai.
- 4.3. 250 ml Kjeldalio kolba.
- 4.4. Matavimo kolbos ir tikslios pipetės.
- 4.5. Spektrofotometras.
- 4.6. Maždaug 16 mm skersmens mėgintuvėliai su 14,5 mm skersmens kamščiais; talpa: 25–30 ml.

5. Procedūra

5.1. Tirpalo ruošimas

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

5.1.1. Įprastinė procedūra

Pasveriamas 1 g arba daugiau ėminio 1 mg tikslumu. Tiriamasis ėminys dedamas į Kjeldalio kolbą, įpilama 20 ml sieros rūgšties (3.5 punktas), kolba purtoma, kad medžiaga visiškai susimaišytų su rūgštimi ir nepriliptų ant kolbos sienelių, pakaitinama iki virimo ir virinama 10 min. Kolba paliekama šiek tiek atvėsti, įpilama 2 ml nitrato rūgšties (3.4 punktas), nestipriai pakaitinama, šiek tiek atvėsinama, įpilamas dar nedidelis kiekis nitrato rūgšties (3.4 punktas) ir vėl užvirinama. Procedūra kartojama tol, kol gaunamas bespalvis tirpalas. Atvėsinama, įpilama truputį vandens, skystis supilamas į 500 ml matavimo kolbą, Kjeldalio kolbą plaunant karštu vandeniu. Kolba paliekama atvėsti, skiedžiama vandeniu iki žymės, sumaišoma ir filtruojama.

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

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

5.2. Spalvos gavimas ir absorbcijos matavimas

Pagal 5.1.1 arba 5.1.2 punktą gauto filtrato alikvotinė dalis skiedžiama taip, kad gauta fosforo koncentracija būtų ne didesnė nei 40 µg/ml. Į mėgintuvėlį (4.6 punktas) įpilama 10 ml šio tirpalo ir 10 ml molibdovanadato reagento (3.6 punktas). Tirpalai sumaišomi ir paliekami stovėti bent 10 min. 20 °C temperatūroje. Spektrofotometru matuojama absorbcija, kai bangos ilgis 430 nm, ir palyginamuoju tirpalu naudojant tirpalą, gautą įpylus 10 ml molibdovanadato reagento (3.6 punktas) į 10 ml vandens.

5.3. Kalibravimo kreivė

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

6. Rezultatų apskaičiavimas

Fosforo kiekis tiriamajame ėminyje nustatomas pagal kalibravimo kreivę.

Rezultatas išreiškiamas ėminio masės procentais.

Pakartojamumas

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

- 3 % didžiausio rezultato vertės, kai fosforo kiekis mažesnis nei 5 %,
- 0,15 % absoliučiąja verte, kai fosforo kiekis 5 % arba didesnis.

O. CHLORIDŲ CHLORO KIEKIO NUSTATYMAS

1. Tikslas ir taikymo sritis

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

2. Metodas

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

3. Reagentai

- 3.1. Amonio tiocianato tirpalas, 0,1 mol/l.
- 3.2. Sidabro nitrato tirpalas, 0,1 mol/l.
- 3.3. Sotusis amonio-geležies (III) sulfato $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ tirpalas.
- 3.4. Nitrato rūgštis, tankis: 1,38 g/ml.
- 3.5. Dietileteris.
- 3.6. Acetonas.
- 3.7. *Carrez I* tirpalas: vandenyje ištirpinama 21,9 g cinko acetato $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ir 3 g ledinės acto rūgšties. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.8. *Carrez II* tirpalas: vandenyje ištirpinama 10,6 g kalio heksacianoferato (II) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.
- 3.9. Aktyviosios anglis, neturinčios chloridų ir jų neabsorbuojančios.

4. Aparatūra

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

5. Procedūra

5.1. Tirpalo ruošimas

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

Kartu atliekamas *tuščiasis bandymas*, nededant analizuotino ėminio.

5.1.1. Organinių medžiagų neturintys ėminiai

1 mg tikslumu pasveriami ne daugiau nei 10 g ėminio, kuriame chloro chloridų pavidalu būtų ne daugiau nei 3 g. 400 ml vandens įpilama į 500 ml matavimo kolbą maždaug 20 °C temperatūroje. Trisdešimt minučių maišoma vartytuve, skiedžiama iki žymės, sumaišoma ir filtruojama.

5.1.2. Ėminiai, kuriuose yra organinių medžiagų, išskyrus 5.1.3 punkte išvardytus produktus

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

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

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

5.2. Titravimas

Pipete į Erlenmejerio kolbą paimama 25–100 ml (pagal numatomą chlorido kiekį) tirpalo, paruošto pagal 5.1.1, 5.1.2 arba 5.1.3 punktą. Paimtoje alikvotinėje tirpalo dalyje turi būti ne daugiau nei 150 mg chloro (Cl). Prireikus tirpalas skiedžiamas ne mažiau nei 50 ml vandens, įpilama 5 ml nitrato rūgšties (3.4 punktas), 2 ml sočiojo amonio-geležies (III) sulfato tirpalo (3.3 punktas) ir du lašai amonio tiocianato tirpalo (3.1 punktas), lašinamo iš biuretės, pripildytos iki nulinės žymės. Iš biuretės įpilama tiek sidabro nitrato tirpalo (3.2 punktas), kad susidarytų 5 ml perteklius. Įpilama 5 ml dietileterio (3.5 punktas) ir stipriai purtoma, kad nuosėdos koaguliuotų. Sidabro nitrato perteklius titruojamas amonio tiocianato tirpalu (3.1 punktas) tol, kol atsiradusi raudonai ruda spalva neišnyksta per vieną minutę.

6. Rezultatų apskaičiavimas

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

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

kurioje:

V_1 = įpilto 0,1 mol/l sidabro nitrato tirpalo tūris ml;

V_2 = analizei suvartoto 0,1 mol/l amonio tiocianato tirpalo tūris ml;

m = ėminio svoris g alikvotinėje dalyje.

Jei tuščiasis bandymas rodo, kad 0,1 mol/l sidabro nitrato tirpalo buvo sunaudota, ši vertė atimama iš tūrio ($V_1 - V_2$).

7. Pastabos

7.1. Titravimą taip pat galima atlikti potenciometriškai arba amperometriškai.

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

7.3. Analizuojant žuvų miltus, chloridus galima titruoti Mohro metodu.“

IV PRIEDAS

„IV PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI LEIDŽIAMŲ PAŠARŲ PRIEDŲ KONCENTRACIJAI KONTROLIUOTI

A. VITAMINO A KIEKIO NUSTATYMAS

Vitamino A kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17547 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Vitaminų A, E ir D ⁽¹⁾ kiekio nustatymas. Gryninimo atliekant kietosios fazės ekstrahavimą ir efektyviosios skysčių chromatografijos metodas“, arba
- atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (RP-HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį arba fluorescencinį detektorių, kaip toliau aprašyta 1–9 dalyse.

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti vitamino A (retinolio) koncentraciją pašaruose. Vitaminą A sudaro visas-*trans*-retinolis ir jo *cis*-izomerai, kurie nustatomi šiuo metodu. Vitamino A kiekis išreiškiamas tarptautiniais vienetais (TV) vienam kg. Vienas TV atitinka 0,300 µg viso-*trans*-vitamino A ar 0,344 µg viso-*trans*-vitamino A acetato arba 0,550 µg viso-*trans*-vitamino A palmitato aktyvumą.

Kiekybinio nustatymo riba – 2 000 TV vitamino A kilograme.

2. Metodas

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

3. Reagentai

- 3.1. Etanolis, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Petroleteris, virimo temperatūros intervalas – 40–60 °C.
- 3.3. Metanolis.
- 3.4. Kalio hidroksido tirpalas, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.5. Natrio askorbato tirpalas, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (žr. 7.7 punkto pastabas).
- 3.6. Natrio sulfidas, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).
- 3.6.1. Natrio sulfido tirpalas glicerolyje, $c = 0,5 \text{ mol/l}$, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (kai $x = 9$) (žr. 7.8 punkto pastabas).
- 3.7. Fenoltaleino tirpalas etanolyje (3.1 punktas), $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.8. 2-propanolis.
- 3.9. HPLC judančioji fazė: metanolio (3.3 punktas) ir vandens mišinys, pvz., 980 + 20 (V + V). Tikslus santykis nustatomas pagal naudojamos kolonėlės charakteristikas.
- 3.10. Azotas, be deguonies.

⁽¹⁾ Standarte EN 17547 nustatytas analizės metodas nurodytas kaip alternatyvus metodas, kurį oficialios kontrolės tikslais nustatant vitaminus A ir E galima taikyti vietoj šio priedo A dalyje aprašyto metodo vitaminui A nustatyti ir šio priedo B dalyje – vitaminui E nustatyti.

- 3.11. Viso-*trans*-vitamino A acetatas, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo, pvz., $2,80 \times 10^6$ TV/g.
- 3.11.1. Viso-*trans*-vitamino A acetato pradinis tirpalas: į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasverama 50 mg vitamino A acetato (3.11 punktas). Ištirpinama 2-propanolyje (3.8 punktas) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. Šio tirpalo vardinė koncentracija yra lygi 1 400 TV vitamino A viename ml. Tikslus kiekis nustatomas pagal 5.6.3.1 punktą.
- 3.12. Viso-*trans*-vitamino A palmitatas, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo, pvz., $1,80 \times 10^6$ TV/g.
- 3.12.1. Viso-*trans*-vitamino A palmitato pradinis tirpalas: į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasverama 80 mg vitamino A palmitato (3.12 punktas). Ištirpinama 2-propanolyje (3.8 punktas) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. Šio tirpalo vardinė koncentracija yra lygi 1 400 TV vitamino A viename ml. Tikslus kiekis nustatomas pagal 5.6.3.2 punktą.
- 3.13. 2,6-di-*tret*-butil-4-metilfenolis (BHT) (žr. 7.5 punkto pastabas).
4. **Aparatūra**
- 4.1. Vakuuminis sukamasis garintuvas.
- 4.2. Gintaro spalvos stiklo indai.
- 4.2.1. Plokščiadugnės arba kūginės kolbos, 500 ml, su šlifo mova.
- 4.2.2. Matavimo kolbos su šlifo kamščiais, siaurakaklės, 10, 25, 100 ir 500 ml.
- 4.2.3. Kūginiai dalijamieji piltuvai, 1 000 ml, su šlifo kamščiais.
- 4.2.4. Kriaušės formos kolbos, 250 ml, su šlifo mova.
- 4.3. Allihn kondensatorius, apvalkalo ilgis 300 mm, su šlifo jungtimi, su dujų tiekimo vamzdžio adapteriu.
- 4.4. Gofruotasis filtravimo popierius fazėms atskirti, skersmuo 185 mm (pvz., Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. HPLC įranga su įpurškimo sistema.
- 4.5.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė, 250 mm × 4 mm, C18, 5 ar 10 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė: (veikimo kriterijus: tik viena visų retinolio izomerų smailė HPLC sąlygomis).
- 4.5.2. Reguliuojamo bangos ilgio fluorescencinis arba ultravioletinis detektorius.
- 4.6. Spektrofotometras ir 10 mm kvarco kiuvetės.
- 4.7. Vandens vonia ir magnetinė maišyklė.
- 4.8. Ekstrahavimo aparatas (žr. 1 paveikslą), kurį sudaro:
- 4.8.1. 1 l talpos stiklinis cilindras su šlifo mova ir kamščiu;
- 4.8.2. šlifo įmova su atšaka ir reguliuojamo ilgio vamzdžiu, einančiu per centrą. Reguliuojamo ilgio vamzdžio apatinis galas yra U formos, viršutinis – siaurėjančio antgalio formos, kad cilindre esančio tirpalo viršutinis sluoksnis galėtų būti supiltas į dalijamąjį piltuvą.

5. Procedūra

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

5.1. Ėminio ruošimas

Ėminys susmulkinamas, kad jį būtų galima sijoti per 1 mm akučių sieta, vengiant šilumos susidarymo. Turi būti smulkinama prieš pat svėrimą ir muilinimą, kad nebūtų vitamino A nuostolių. Jei dalelių dydis pasiskirstęs pakankamai (pvz., premiksai ir pašarų priedai), ėminys (-iai) nesmulkinamas (-i).

5.2. Muilinimas

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

5.3. Ekstrahavimas

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

5.3.1. Ekstrahavimas naudojant dalijamąjį piltuvą (4.2.3 punktas)

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

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

5.3.2. Ekstrahavimas naudojant ekstrahavimo aparatą (4.8 punktas)

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

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

5.4. Ėminio tirpalo ruošimas HPLC analizei

Į 250 ml kriaušės formos kolbą (4.2.4 punktas) pipete paimama alikvotinė petroleterio tirpalo (5.3.1 arba 5.3.2 punktas) dalis. Sukamajame garintuve (4.1 punktas) esant sumažintam slėgiui tirpiklis išgarinamas beveik iki sauso likučio, kai vonios temperatūra ne aukštesnė nei 40 °C. Įleidžiant azoto (3.10 punktas), slėgis didinamas iki atmosferos slėgio, kolba nuimama nuo sukamojo garintuvo. Likęs tirpiklis pašalinamas azoto srove (3.10 punktas) ir likutis iš karto tirpinamas žinomame tūryje (10–100 ml) metanolio (3.3 punktas) (vitamino A koncentracija turi būti 5 TV/ml–30 TV/ml intervale).

5.5. Nustatymas HPLC metodu

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

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

HPLC sąlygos

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

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

5.6. Kalibravimas

5.6.1. Darbinių standartinių tirpalų ruošimas

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

Į 20 ml matavimo kolbą pipete paimama 2,0 ml šio darbinio standartinio tirpalo, skiedžiama iki žymės metanolio (3.3 punktas) ir sumaišoma. Šio praskiesto darbinio standartinio tirpalo vardinė koncentracija yra lygi 56 TV vitamino A viename ml.

5.6.2. Kalibravimo tirpalų ruošimas ir kalibravimo kreivės gavimas

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

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

5.6.3. Standartinių tirpalų standartizavimas UV

5.6.3.1. Vitamino A acetato pradinis tirpalas

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

Vitamino A kiekio apskaičiavimas:

$$\text{Vitamino A TV/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ vitamino A acetato} = 1530, \text{ esant } 326 \text{ nm, } 2 - \text{propanolyje})$$

5.6.3.2. Vitamino A palmitato pradinis tirpalas

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

Vitamino A kiekio apskaičiavimas:

$$\text{Vitamino A TV/ml} = E_{326} \times 19,0$$

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

5.6.3.3. Vitamino A darbinis standartinis tirpalas

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

Vitamino A kiekio apskaičiavimas:

$$\text{Vitamino A TV/ml} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ vitamino A alkoholio} = 1821, \text{ esant } 325 \text{ nm, } 2 - \text{propanolyje})$$

6. Rezultatų apskaičiavimas

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

Vitamino A kiekis ėminyje TV/kg apskaičiuojamas pagal šią formulę:

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

kurioje:

c = vitamino A koncentracija ėminio tirpale (5.4 punktas) TV/ml;

V_1 = ėminio tirpalo (5.4 punktas) tūris ml;

V₂ = alikvotinės tirpalo (5.4 punktas) dalies tūris ml;
m = tiriamosios dalies svoris g.

7. Pastabos

- 7.1. Jei ėminių vitamino A koncentracija yra maža, gali būti naudinga sujungti dviejų po muilinimo gautų įkrovų (pasvertas kiekis: 25 g) petroleterio ekstraktus į vieną ėminio tirpalą, skirtą nustatymui HPLC metodu.
- 7.2. Analizei paimtame ėminyje riebalų ne daugiau nei 2 g.
- 7.3. Jei fazės neatsiskiria, emulsijai suardyti įpilama maždaug 10 ml etanolio (3.1 punktas).
- 7.4. Jei tai menkės kepenų aliejus ir kiti gryniesi riebalai, muilinimo trukmė prailginama iki 45–60 min.
- 7.5. Vietoje BHT galima naudoti hidrochinoną.
- 7.6. Naudojant tiesioginių fazių kolonėlę įmanomas retinolio izomerų atskyrimas. Bet tuo atveju atliekant apskaičiavimus visų cis- ir trans-izomerų smailių aukščiai (plotai) sudedami.
- 7.7. Vietoje natrio askorbato tirpalo galima naudoti maždaug 150 mg askorbo rūgšties.
- 7.8. Vietoje natrio sulfido tirpalo galima naudoti maždaug 50 mg EDTA.
- 7.9. Analizuojant vitaminą A pieno pakaitaluose, ypač reikia kreipti dėmesį į:
 - muilinimą (5.2 punktas): dėl ėminyje esančio riebalų kiekio gali tekti naudoti didesnę kalio hidroksido tirpalo (3.4 punktas) tūrį;
 - ekstrahavimą (5.3 punktas): dėl emulsijų buvimo gali tekti keisti vandens ir etanolio santykį 2:1.

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

8. Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 15 % didžiausiojo rezultato vertės.

9. Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai ⁽²⁾

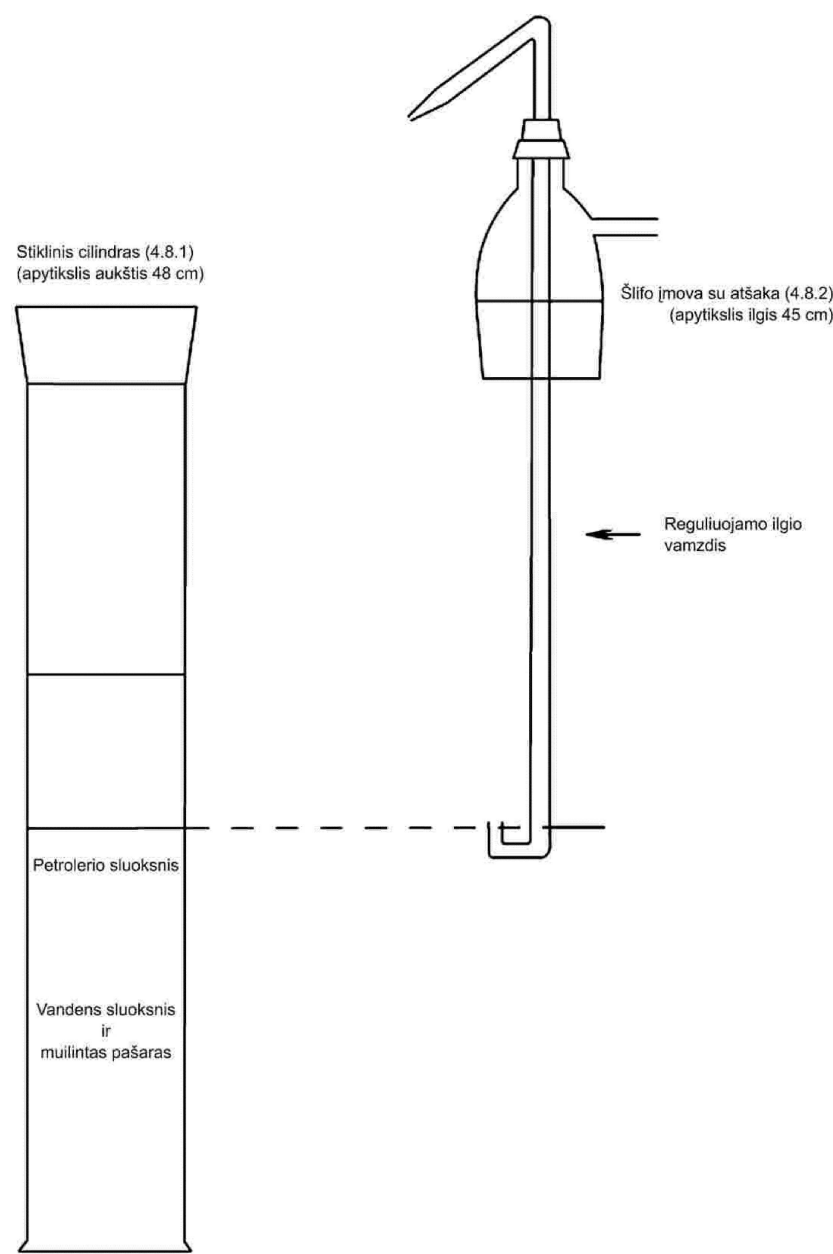
	Premiksas	Pašaras su premiksu	Mineralų koncentratas	Baltyminis pašaras	Paršelių pašaras
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
vidurkis [TV/kg]	17,02 × 106	1,21 × 106	537 100	151 800	18 070
[TV/kg]	0,51 × 106	0,039 × 106	22 080	12 280	682
r [TV/kg]	1,43 × 106	0,109 × 106	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [TV/kg]	1,36 × 106	0,069 × 106	46 300	23 060	3 614
R [TV/kg]	3,81 × 106	0,193 × 106	129 640	64 568	10 119

⁽²⁾ Atliko asociacijos Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten (VDLUFA) pašarų darbo grupė.

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
L –	laboratorijų skaičius				
n –	atskirų verčių skaičius				
sr –	pakartojamumo standartinis nuokrypis				
sR –	atkuriamumo standartinis nuokrypis				
r –	pakartojamumas				
R –	atkuriamumas				
CVr –	pakartojamumo variacijos koeficientas				
CVR –	atkuriamumo variacijos koeficientas				

1 paveikslas

Ekstrahavimo aparatą (4.8 punktas)



B. VITAMINO E KIEKIO NUSTATYMAS

Vitamino E kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standartu EN 17547 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Vitaminų A, E ir D ⁽³⁾ kiekio nustatymas. Gryninimo atliekant kietosios fazės ekstrahavimą ir efektyviosios skysčių chromatografijos metodas“, arba
- atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (RP-HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį arba fluorescencinį detektorių, kaip toliau aprašyta 1–9 dalyse.

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti vitamino E koncentraciją pašaruose. Vitamino E kiekis išreiškiamas mg DL- α -tokoferolio acetato vienam kg pašaro. 1 mg DL- α -tokoferolio acetato atitinka 0,91 mg DL- α -tokoferolio (vitamino E).

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

2. **Metodas**

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

3. **Reagentai**

- 3.1. Etanolis, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Petroleteris, virimo temperatūros intervalas – 40–60 °C.
- 3.3. Metanolis.
- 3.4. Kalio hidroksido tirpalas, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.5. Natrio askorbato tirpalas, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (žr. 7.7 punkto pastabas).
- 3.6. Natrio sulfidas, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7\text{--}9$).
- 3.6.1. Natrio sulfido tirpalas glicerolyje, $c = 0,5 \text{ mol/l}$, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (kai $x = 9$) (žr. 7.8 punkto pastabas).
- 3.7. Fenoltaleino tirpalas etanolyje (3.1 punktas), $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.8. HPLC judančioji fazė: metanolio (3.3 punktas) ir vandens mišinys, pvz., 980 + 20 (V + V). Tikslus santykis nustatomas pagal naudojamos kolonėlės charakteristikas.
- 3.9. Azotas, be deguonies.
- 3.10. DL- α -tokoferolio acetatas, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo.
- 3.10.1. DL- α -tokoferolio acetato pradinis tirpalas: 100 mg DL- α -tokoferolio acetato (3.10 punktas) pasveriamas 0,1 mg tikslumu ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Ištirpinama etanolyje (3.1 punktas) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. 1 ml šio tirpalo yra 1 mg DL- α -tokoferolio acetato (apie UV kontrolę žr. 5.6.1.3 punktą, apie stabilizavimą – 7.4 punkto pastabas).

⁽³⁾ Standarte EN 17547 nustatytas analizės metodas nurodytas kaip alternatyvus metodas, kurį oficialios kontrolės tikslais nustatant vitaminus A ir E galima taikyti vietoj šio priedo A dalyje aprašyto metodo vitaminui A nustatyti ir šio priedo B dalyje – vitaminui E nustatyti.

- 3.11. DL- α -tokoferolis, ypač grynas, sertifikuoto aktyvumo.
- 3.11.1. DL- α -tokoferolio pradinis tirpalas: 100 mg DL- α -tokoferolio (3.11 punktas) pasveriami 0,1 mg tikslumu ir supilama į 100 ml matavimo kolbą. Ištirpinama etanolyje (3.1 punktas) ir tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės. 1 ml šio tirpalo yra 1 mg DL- α -tokoferolio acetato (apie UV kontrolę žr. 5.6.2.3 punktą; apie stabilizavimą – 7.4 punkto pastabas).

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

4. Aparatūra

- 4.1. Sukamasis garintuvas.
- 4.2. Gintaro spalvos stiklo indai.
- 4.2.1. Plokščiadugnės arba kūginės kolbos, 500 ml, su šlifo mova.
- 4.2.2. Matavimo kolbos su šlifo kamščiais, siaurakaklės, 10, 25, 100 ir 500 ml.
- 4.2.3. Kūginiai dalijamieji piltuvai, 1 000 ml, su šlifo kamščiais.
- 4.2.4. Kriaušės formos kolbos, 250 ml, su šlifo mova.
- 4.3. Allihn kondensatorius, apvalkalo ilgis 300 mm, su šlifo jungtimi, su dujų tiekimo vamzdžio adapteriu.
- 4.4. Gofruotasis filtravimo popierius fazėms atskirti, skersmuo 185 mm (pvz., Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. HPLC įranga su įpurškimo sistema.
- 4.5.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 ar 10 μm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.
- 4.5.2. Reguliuojamo bangos ilgio fluorescencinis arba ultravioletinis detektorius.
- 4.6. Spektrofotometras ir 10 mm kvarco kiuvetės.
- 4.7. Vandens vonia ir magnetinė maišyklė.
- 4.8. Ekstrahavimo aparatas (žr. 1 paveikslą), kurį sudaro:
- 4.8.1. 1 l talpos stiklinis cilindras su šlifo mova ir kamščiu;
- 4.8.2. šlifo įmova su atšaka ir reguliuojamo ilgio vamzdžiu, einančiu per centrą. Reguliuojamo ilgio vamzdžio apatinis galas yra U formos, viršutinis – siaurėjančio antgalio formos, kad cilindre esančio tirpalo viršutinis sluoksnis galėtų būti supiltas į dalijamąjį piltuvą.

5. Procedūra

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

5.1. Ėminio ruošimas

Ėminys susmulkinamas, kad jį būtų galima sijoti per 1 mm akučių sieta, vengiant šilumos susidarymo. Turi būti smulkinama prieš pat svėrimą ir muilinimą, kad nebūtų vitamino E nuostolių.

5.2. Muilinimas

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

5.3. Ekstrahavimas

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

5.3.1. Ekstrahavimas naudojant dalijamąjį piltuvą (4.2.3 punktas)

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

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

5.3.2. Ekstrahavimas naudojant ekstrahavimo aparatą (4.8 punktas)

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

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

5.4. Ėminio tirpalo ruošimas HPLC analizei

Į 250 ml kriaušės formos kolbą (4.2.4 punktas) pipete paimama alikvotinė petroleterio tirpalo (5.3.1 arba 5.3.2 punktas) dalis. Sukamajame garintuve (4.1 punktas) esant sumažintam slėgiui tirpiklis išgarinamas beveik iki sauso likučio, kai vonios temperatūra ne aukštesnė nei 40 °C. Įleidžiant azoto (3.9 punktas), slėgis didinamas iki atmosferos slėgio, kolba nuimama nuo sukamojo garintuvo. Likęs tirpiklis pašalinamas azoto srove (3.9 punktas) ir likutis iš karto tirpinamas žinomame tūryje (10–100 ml) metanolio (3.3 punktas) (DL- α -tokoferolio koncentracija turi būti 5–30 µg/ml intervale).

5.5. Nustatymas HPLC metodu

Vitaminas E atskiriamas C₁₈ atvirkštinių fazių kolonėlėje (4.5.1 punktas), koncentracija matuojama naudojant fluorescencinį detektorių (sužadinimas: 295 nm, emisija: 330 nm) ar ultravioletinį detektorių (292 nm) (4.5.2 punktas).

Alikvotinė metanolinio tirpalo, gauto pagal 5.4 punktą, dalis (pvz., 20 µl) įpurškiama ir plaunama judančiąja faze (3.8 punktas). Apskaičiuojamas kelių to paties ėminio įpurkštų tirpalų vidutinis smailių aukštis (plotas) ir kelių įpurkštų kalibravimo tirpalų (5.6.2 punktas) vidutiniai smailių aukščiai (plotai).

HPLC sąlygos

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

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.5.1 punktas):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
Judančioji fazė (3.8 punktas):	metanolio (3.3 punktas) ir vandens mišinys, pvz., 980 + 20 (V + V)
Srautas:	1–2 ml/min
Detektorius (4.5.2 punktas):	fluorescencinis detektorius (sužadinimas: 295 nm/ emisija: 330 nm) arba ultravioletinis detektorius (292 nm)

5.6. Kalibravimas (DL-α-tokoferolio acetato ar DL-α-tokoferolio)

5.6.1. DL-α-tokoferolio acetato etalonas

5.6.1.1. Darbinio standartinio tirpalo ruošimas

Į 500 ml plokščiadugnę ar kūginę kolbą (4.2.1 punktas) pipete paimama 25 ml DL-α-tokoferolio acetato pradinio tirpalo (3.10.1 punktas) ir hidrolizuojama, kaip aprašyta 5.2 punkte. Vėliau ekstrahuojama petroleteriu (3.2 punktas) pagal 5.3 punktą ir skiedžiama petroleteriu iki 500 ml. 25 ml šio ekstrakto garinama sukamajame garintuve (žr. 5.4 punktą) beveik iki sauso likučio, likęs tirpiklis pašalinamas azoto srove (3.9 punktas) ir likutis ištirpinamas 25,0 ml metanolio (3.3 punktas). Šio tirpalo vardinė koncentracija yra 45,5 µg DL-α-tokoferolio viename ml, tai atitinka 50 µg DL-α-tokoferolio acetato viename ml. Darbinis standartinis tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.

5.6.1.2. Kalibravimo tirpalų ruošimas ir kalibravimo kreivės gavimas

Į keletą 20 ml tūrio matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 4,0 ir 10,0 ml darbinio standartinio tirpalo, skiedžiama iki žymės metanolio (3.3 punktas) ir sumaišoma. Šių tirpalų vardinė koncentracija yra 2,5, 5,0, 10,0 ir 25,0 µg/ml DL-α-tokoferolio acetato, t. y. 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml ir 22,8 µg/ml DL-α-tokoferolio.

Kelis kartus įpurškiama 20 µl kiekvieno kalibravimo tirpalo ir nustatomi vidutiniai smailių aukščiai (plotai). Pagal vidutinius smailių aukščius (plotus) brėžiama kalibravimo kreivė.

5.6.1.3. DL-α-tokoferolio acetato pradinio tirpalo (3.10.1 punktas) standartizavimas UV

5,0 ml DL-α-tokoferolio acetato pradinio tirpalo (3.10.1 punktas) etanolio skiedžiama iki 25,0 ml ir spektrofotometru (4.6 punktas) matuojamas pagal etanolį (3.1 punktas) šio tirpalo ultravioletinis spektras 250–320 nm diapazone.

Absorbcijos maksimumas esant 284 nm bangos ilgiui atitinka:

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

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

5.6.2. DL-α-tokoferolio etalonas

5.6.2.1. Darbinio standartinio tirpalo ruošimas

Į 50 ml matavimo kolbą pipete paimama 2,0 ml DL-α-tokoferolio pradinio tirpalo (3.11.1 punktas), ištirpinama metanolyje (3.3 punktas) ir metanolio skiedžiama iki žymės. Šio tirpalo vardinė koncentracija yra 40 µg DL-α-tokoferolio viename ml, tai atitinka 44,0 µg DL-α-tokoferolio acetato viename ml. Darbinis standartinis tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.

5.6.2.2. Kalibravimo tirpalų ruošimas ir kalibravimo kreivės gavimas

Į keletą 20 ml tūrio matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 4,0 ir 10,0 ml darbinio standartinio tirpalo, skiedžiama iki žymės metanoliu (3.3 punktas) ir sumaišoma. Šių tirpalų vardinė koncentracija yra 2,0, 4,0, 8,0 ir 20,0 µg/ml DL-α-tokoferolio, t. y. 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml ir 22,0 µg/ml DL-α-tokoferolio acetato.

Kelis kartus įpurškiama 20 µl kiekvieno kalibravimo tirpalo ir nustatomi vidutiniai smailių aukščiai (plotai). Pagal vidutinius smailių aukščius (plotus) brėžiama kalibravimo kreivė.

5.6.2.3. DL-α-tokoferolio pradinio tirpalo (3.11.1 punktas) standartizavimas UV

2,0 ml DL-α-tokoferolio pradinio tirpalo (3.11.1 punktas) etanoliu skiedžiama iki 25,0 ml ir spektrofotometru (4.6 punktas) matuojamas pagal etanolį (3.1 punktas) šio tirpalo ultravioletinis spektras 250–320 nm diapazone. Absorbcijos maksimumas atitinka 292 nm:

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

Esant šiam praskiedimui, ekstinkcijos koeficiento vertė turi būti 0,6.

6. Rezultatų apskaičiavimas

Naudojant ėminio tirpalo vitamino E smailių vidutinį aukštį (plotą), pagal kalibravimo kreivę (5.6.1.2 arba 5.6.2.2 punktas) nustatoma ėminio tirpalo koncentracija µg/ml (apskaičiuota DL-α-tokoferolio acetatui).

Vitamino E kiekis ėminyje w, mg/kg, nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} [\text{mg/kg}]$$

kurioje:

- c = ėminio tirpalo (5.4 punktas) vitamino E (kaip DL-α-tokoferolio acetato) koncentracija µg/ml;
- V₁ = ėminio tirpalo (5.4 punktas) tūris ml;
- V₂ = alikvotinės tirpalo (5.4 punktas) dalies tūris ml;
- m = tiriamosios dalies svoris g.

7. Pastabos

- 7.1. Jei ėminių vitamino E koncentracija yra maža, gali būti naudinga sujungti dviejų po muilinimo gautų įkrovų (pasvertas kiekis – 25 g) petroleterio ekstraktus į vieną ėminio tirpalą, skirtą nustatymui HPLC metodu.
- 7.2. Analizei paimtame ėminyje riebalų ne daugiau nei 2 g.
- 7.3. Jei fazės neatsiskiria, emulsijai suardyti įpilama maždaug 10 ml etanolio (3.1 punktas).
- 7.4. Po DL-α-tokoferolio acetato ar DL-α-tokoferolio tirpalų spektrofotometrinių matavimų atitinkamai pagal 5.6.1.3 arba 5.6.2.3 punktą, į tirpalą (3.10.1 arba 3.10.2 punktas) įdedama maždaug 10 mg BHT (3.12 punktas) ir tirpalas laikomas šaldytuve (laikymo trukmė ne ilgesnė kaip keturios savaitės).
- 7.5. Vietoje BHT galima naudoti hidrochinoną.
- 7.6. Naudojant tiesioginių fazių kolonėlę, įmanoma atskirti α-, β-, γ- ir δ-tokoferolius.

- 7.7. Vietoje natrio askorbato tirpalo galima naudoti maždaug 150 mg askorbo rūgšties.
- 7.8. Vietoje natrio sulfido tirpalo galima naudoti maždaug 50 mg EDTA.
- 7.9. Vitamino E acetatas labai greitai hidrolizuoja šarminėje terpėje, taigi yra labai jautrus oksidavimui, ypač jei yra metalų pėdsakų, pvz., geležies arba vario. Dėl šios priežasties nustatant vitaminą E premiksuose, kai jo koncentracija didesnė nei 5 000 mg/kg, gali vykti jo skilimas. Todėl patvirtinimui reikia rekomenduoti HPLC metodą ir vitamino E preparato šlapiąjį skaidymą fermentais, netaikant šarminio muilinimo stadijos.
8. Pakartojamumas
- Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 15 % didžiausiojo rezultato vertės.
9. **Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai ⁽⁴⁾**

	Premiksas	Pašaras su premiksu	Mineralų koncentratas	Baltyminis pašaras	Paršelių pašaras
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
vidurkis [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L laboratorijų skaičius

n atskirų verčių skaičius

s_r pakartojamumo standartinis nuokrypis

s_R atkuriamumo standartinis nuokrypis

r pakartojamumas

R atkuriamumas

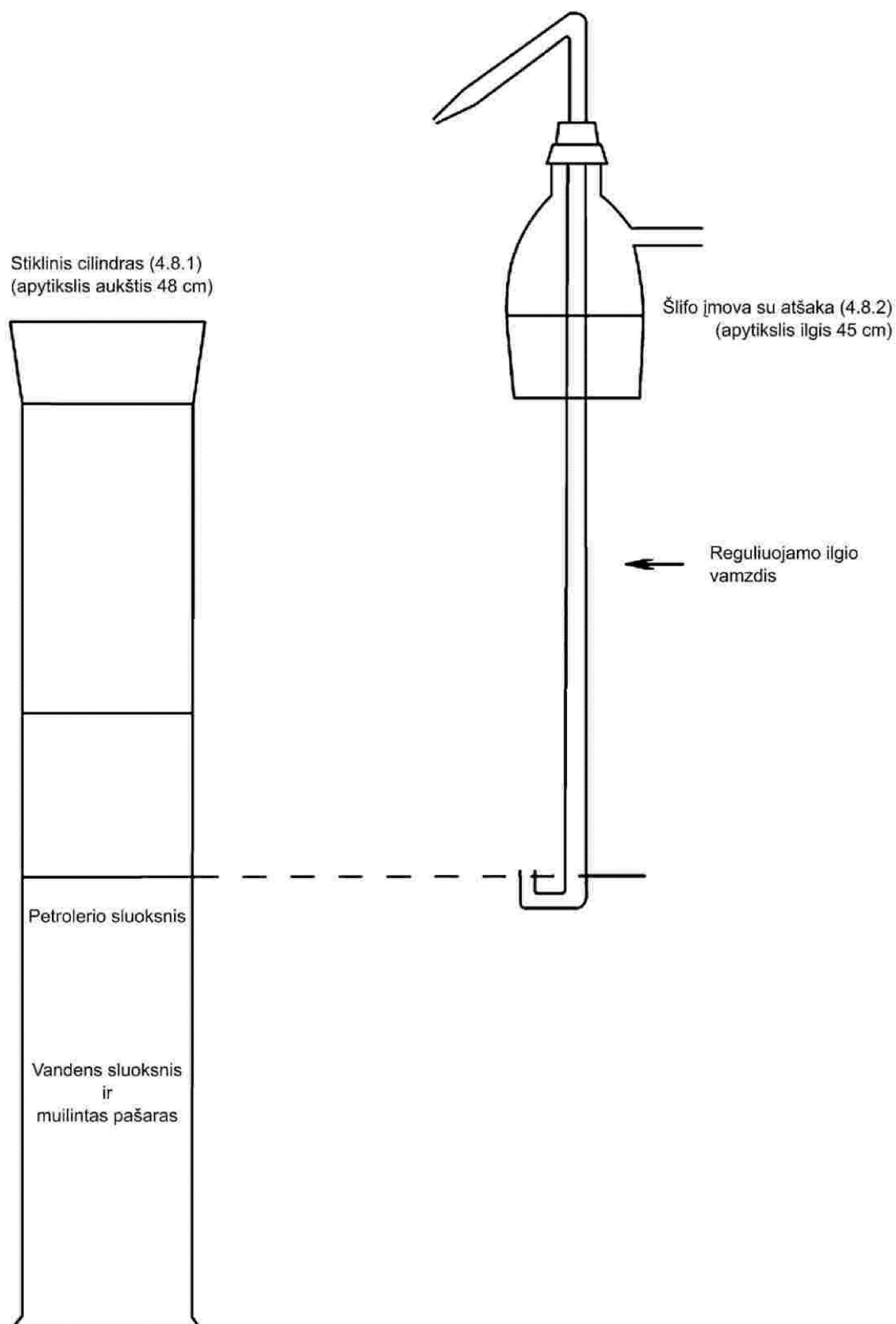
CV_r pakartojamumo variacijos koeficientas

CV_R atkuriamumo variacijos koeficientas

⁽⁴⁾ Atliko asociacijos *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten* (VDLUFA) pašarų darbo grupė.

2 paveikslas

ekstrahavimo aparatą (4.8 punktas)



C. MIKROELEMENTŲ GELEŽIES, VARIO, MANGANO IR CINKO KIEKIO NUSTATYMAS

Geležies, vario, mangano ir cinko kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 15510 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kalcio, natrio, fosforo, magnio, kalio, geležies, cinko, vario, mangano, kobalto, molibdeno ir švino nustatymas induktyviai susietos plazmos atominės emisinės spektroskopijos metodu (ICP-AES)“, arba
- taikant analizės metodą, nustatytą standartu EN 15621 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kalcio, natrio, fosforo, magnio, kalio, sieros, geležies, cinko, vario, mangano ir kobalto nustatymas induktyviai susietos plazmos atominės emisinės spektrometrijos metodu (ICP-AES), mineralizavus aukštame slėgyje, arba
- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17053 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Mikroelementų, sunkiųjų metalų ir kitų elementų nustatymas pašaruose taikant induktyviai susietos plazmos masių spektrometriją (ICP-MS) (daugialypis metodas)“, arba
- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN ISO 6869 „Pašarai. Kalcio, vario, geležies, magnio, mangano, kalio, natrio ir cinko kiekių nustatymas. Metodas, naudojant atominę absorbcinę spektrometriją“, arba
- liepsnos atominės absorbcijos spektrometrijos (FAAS) metodu, aprašytu 1–8 punktuose.

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti mikroelementų geležies, vario, mangano ir cinko kiekį pašaruose ^(*). Kiekybinio nustatymo riba:

- geležies (Fe): 20 mg/kg,
- vario (Cu): 10 mg/kg,
- mangano (Mn): 20 mg/kg,
- cinko (Zn): 20 mg/kg.

2. Metodas

Ėminys po organinės medžiagos (jei ji buvo) suskaidymo ištirpinamas vandenilio chlorido rūgštyje. Po atitinkamo praskiedimo geležis, varis, manganas ir cinkas nustatomi atominės absorbcijos spektrometrijos metodu.

3. Reagentai

Įvadinės pastabos

Reagentams ir analizei skirtiems tirpalams ruošti reikia naudoti vandenį, kuriame nebūtų nustatomų katijonų, todėl vanduo gaunamas du kartus distiliuojant distiliatoriuje iš borosilikatinio ar kvarcinio stiklo arba du kartus apdorojant jonitine derva.

Reagentai turėtų būti bent analiziškai grynai. Nustatomų elementų nebuvimas turi būti tikrinamas atliekant tuščiąjį bandymą. Prireikus reagentai turi būti papildomai gryninami.

Vietoje žemiau aprašomų standartinių tirpalų galima naudoti prekyboje esančius standartinius tirpalus, jei tik jie turi garantiją ir prieš naudojimą buvo patikrinti.

- 3.1. Vandenilio chlorido rūgštis (d:1,19 g/ml).
- 3.2. Vandenilio chlorido rūgštis (6 mol/l).
- 3.3. Vandenilio chlorido rūgštis (0,5 mol/l).
- 3.4. Vandenilio fluorida rūgštis 38–40 % (V/V) tirpalas, kuriame geležies (Fe) būtų mažiau nei 1 mg/l, o likučio po išgarinimo masė (sulfato pavidalu) mažesnė nei 10 mg/l.

(*) Šis metodas buvo patvirtintas atliekant jungtinių lyginamųjų įvairių pašarų matricų tyrimą. Papildomos informacijos ieškoti svetainėje <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

- 3.5. Sieros rūgštis (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Vandenilio peroksidas (maždaug 100 tūrių deguonies (30 % masės)).
- 3.7. Standartinis geležies tirpalas (1 000 µg Fe/ml) ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas: 1 g geležies vielos ištirpinama 200 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas), įpilama 16 ml vandenilio peroksido (3.6 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.7.1. Darbinis standartinis geležies tirpalas (100 µg Fe/ml) ruošiamas standartinį tirpalą (3.7 punktas) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.
- 3.8. Standartinis vario tirpalas (1 000 µg Cu/ml) ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas:
- 1 g vario miltelių užpilama 25 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas), įpilama 5 ml vandenilio peroksido (3.6 punktas) ir gautas tirpalas skiedžiamas vandeniu iki 1 litro.
- 3.8.1. Darbinis standartinis vario tirpalas (10 µg Cu/ml) ruošiamas standartinį tirpalą (3.8 punktas) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9 ir taip gautą tirpalą dar kartą skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.
- 3.9. Standartinis mangano tirpalas (1 000 µg Mn/ml) ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas:
- 1 g mangano miltelių tirpinama 25 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.9.1. Darbinis standartinis mangano tirpalas (10 µg Mn/ml) ruošiamas standartinį tirpalą (3.9 punktas) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9 ir taip gautą tirpalą dar kartą skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.
- 3.10. Standartinis cinko tirpalas (1 000 µg Zn/ml) ruošiamas, kaip nurodyta toliau, arba naudojamas lygiavertis prekyboje esantis tirpalas:
- 1 g cinko strypelio arba lapelių (a. g.) tirpinama 25 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.10.1. Darbinis standartinis cinko tirpalas (10 µg Zn/ml) ruošiamas standartinį tirpalą (3.10 punktas) skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9 ir taip gautą tirpalą dar kartą skiedžiant vandeniu santykiu 1: 9.
- 3.11. Lantano chlorido tirpalas: 12 g lantano oksido ištirpinama 150 ml vandens, įpilama 100 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 1 litro.

4. Aparatūra

- 4.1. Mufelinė krosnis su temperatūros regulatoriumi ir pageidautina su rašytuvu.
- 4.2. Stikliniai indai turi būti iš atsparaus borosilikatinio stiklo, rekomenduojama naudoti aparatūrą, kuri būtų skirta tik mikroelementams nustatyti.
- 4.3. Spektrofotometras atominei absorbcinei analizei atlikti, atitinkantis metodo jautrio ir glaudumo reikalavimus reikiamame koncentracijos intervale.

5. Procedūra ⁽⁶⁾

5.1. Ėminiai, kuriuose yra organinių medžiagų

5.1.1. Ėminio sudegimas ir analizei skirtas tirpalo ruošimas ⁽⁷⁾

- 5.1.1.1. 5–10 g ėminio, pasverto 0,2 mg tikslumu, įdedama į platininį arba kvarcinį tiglą (žr. b papunkčio pastabą), džiovinama 105 °C temperatūroje džiovintame spintoje, tada tiglis dedamas į šaltą mufelinę krosnį (4.1 punktas). Krosnis uždaryta (žr. c papunkčio pastabą) ir per maždaug 90 min. temperatūra laipsniškai pakeliama iki 450–475 °C. Tokioje temperatūroje tiglis laikomas 4–16 val. (pvz., per naktį), kad būtų pašalintos visos organinės medžiagos, krosnis atidaroma ir paliekama ataušti (žr. d papunkčio pastabą).

Pelenai sudrėkinami vandeniu ir supilami į 250 ml tūrio cheminę stiklinę. Tiglio turinys išplaunamas į cheminę stiklinę, tam sunaudojant iš viso maždaug 5 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1 punktas), kuri pilama lėtai ir atsargiai (dėl CO₂ susidarymo gali vykti audringa reakcija). Vandenilio chlorido rūgštis (3.1 punktas) į stiklinę lašinama maišant tirpalą tol, kol nustoja skirtis burbuliukai. Išgarinama iki sauso likučio, retkarčiais maišant stikline lazdele.

Į likutį įpilama 15 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas) ir apie 120 ml vandens. Maišoma stikline lazdele, kuri paliekama cheminėje stiklinėje, stiklinė uždengiama laikrodžio stiklu. Stiklinės turinys lėtai užverdama ir virinamas tol, kol galima pamatyti, kad daugiau pelenų nebeištirpsta. Filtruojama per bepelenį filtravimo popierių ir filtratas supilamas į 250 ml matavimo kolbą. Cheminė stiklinė ir filtras plaunami 5 ml karšto 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.2 punktas) ir du kartus verdančiu vandeniu. Matavimo kolbos turinys skiedžiamas vandeniu iki žymės (HCl koncentracija maždaug 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Jei likutis ant filtro yra juodas (anglis), filtras vėl dedamas į krosnį ir sudegamas 450–475 °C temperatūroje. Šis sudegimas, kuris trunka tik kelias valandas (tris–penkias valandas), yra baigtas, kai pelenai tampa balti arba beveik balti. Likutis tirpinamas maždaug 2 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.1 punktas), garinamas iki sauso likučio ir įpilama 5 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas). Pakaitinama, tirpalas filtruojamas į matavimo kolbą ir skiedžiamas vandeniu iki žymės (HCl koncentracija yra apie 0,5 mol/l).

Pastabos:

- a) Nustatant mikroelementų kiekį, svarbu visą laiką turėti omenyje užteršimo, ypač cinku, variu ir geležimi, pavojų. Dėl šios priežasties įrangoje, kuri naudojama ėminiams ruošti, šių metalų turi nebūti.

Bendram užteršimo pavojui sumažinti dirbama dulkių neturinėjoje aplinkoje su labai švaria įranga ir rūpestingai išplautais stikliniais indais. Cinko nustatymas yra ypač jautrus įvairių rūšių teršalams, pvz., teršalams ant stiklinių indų, reagentuose, dulkėms ir pan.

- b) Sudeginamo ėminio masė apskaičiuojama pagal apytikrą mikroelementų kiekį pašaruose, atsižvelgiant į naudojamo spektrofotometro jautrį. Tam tikriems pašarams, kuriuose mikroelementų mažai, gali prireikti 10–20 g masės ėminio ir gauti iš jo tik 100 ml tūrio galutinį tirpalą.

- c) Turi būti deginama uždarytoje krosnyje, nepučiant oro arba deguonies.

- d) Pirometro rodoma temperatūra neturi būti aukštesnė nei 475 °C.

⁽⁶⁾ Galima taikyti kitus šlapiojo skaidymo būdus, jei būtų įrodyta, kad gaunami panašūs rezultatai (pvz., šlapiasis skaidymas autoklave aukšto dažnio spinduliuote).

⁽⁷⁾ Žaliuose pašaruose (šviežiuose arba džiovintuose) gali būti didelis kiekis augalinio silicio dioksido, kuriame gali būti mikroelementų, todėl jis turi būti pašalintas. Todėl šių pašarų ėminiams turi būti taikoma ši pakeista procedūra. Veiksmas pagal 5.1.1.1 punktą atliekamas iki filtravimo. Filtravimo popierius su netirpiu likučiu du kartus plaunamas verdančiu vandeniu ir dedamas į kvarcinį arba platininį tiglą.

Filtras deginamas mufelinėje krosnyje (4.1 punktas) žemesnėje kaip 550 °C temperatūroje tol, kol visiškai išnyksta anglinė medžiaga. Paliekama ataušti, įlašinami keli lašai vandens, 10–15 ml vandenilio fluorida rūgšties (3.4 punktas) ir garinama iki sauso likučio maždaug 150 °C temperatūroje. Jei likutys dar lieka kažkiek silicio dioksido, likutis pakartotinai tirpinamas keliuose mililitruose vandenilio fluorida rūgšties (3.4 punktas) ir išgarinamas iki sauso likučio. Įlašinami penki lašai sieros rūgšties (3.5 punktas) ir kaitinama tol, kol nustoja skirtis balti dūmai. Įpylus 5 ml 6 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.2 punktas) ir apie 30 ml vandens, tirpalas pašildomas, filtruojamas į 250 ml matavimo kolbą ir skiedžiamas vandeniu iki žymės (HCl koncentracija apie 0,5 mol/l). Toliau nustatymas tęsiamas nuo 5.1.2 punkto.

5.1.2. Spektrofotometrinis nustatymas

5.1.2.1. Kalibravimo tirpalų ruošimas

Iš darbinių standartinių tirpalų, nurodytų 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 ir 3.10.1 punktuose, kiekvienam nustatomam elementui ruošiami keletas kalibravimo tirpalų, kurių kiekvieno HCl koncentracija yra apie 0,5 mol/l ir lantano chlorido koncentracija (geležies, mangano ir cinko atveju) atitinka 0,1 % (m/V) La koncentraciją.

Pasirenkama mikroelementų koncentracija turi atitikti naudojamo spektrofotometro jautrio ribas. Toliau kaip pavyzdys pateikiamose lentelėse rodoma kalibruoti naudojamų tirpalų sudėties tipiniai intervalai, tačiau, atsižvelgiant į naudojamo spektrofotometro tipą ir jautrį, gali tekti pasirinkti kitas koncentracijos vertes.

Geležis

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml darbinio standartinio tirpalo (3.7.1 punktas) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2 punktas)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 100 ml							

Varis

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml darbinio standartinio tirpalo (3.8.1 punktas) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2 punktas)	8	8	8	8	8	8	8

Manganas

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml darbinio standartinio tirpalo (3.9.1 punktas) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2 punktas)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 100 ml							

Cinkas

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml darbinio standartinio tirpalo (3.10.1 punktas) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2 punktas)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11 punktas) ir skiedžiama vandeniu iki 100 ml							

5.1.2.2. Tirpalo ruošimas analizei

Variui nustatyti pagal 5.1.1 punktą paruoštą tirpalą paprastai galima naudoti tiesiogiai. Jei reikia, kad jo koncentracija būtų kalibruoti naudojamų tirpalų koncentracijos verčių intervale, alikvotinė dalis gali būti paimta pipete į 100 ml matavimo kolbą ir skiedžiama iki žymės 0,5 mol/l vandenilio chlorido rūgšties tirpalu (3.3 punktas).

Geležiai, manganui ir cinkui nustatyti pagal 5.1.1 punktą paruošto tirpalo alikvotinė dalis paimama pipete į 100 ml matavimo kolbą, įpilama 10 ml lantano chlorido tirpalo (3.11 punktas) ir skiedžiama iki žymės 0,5 mol/l vandenilio chlorido rūgšties tirpalu (3.3 punktas). (Be to, žr. 8 punkto pastabą).

5.1.2.3. Tuščiasis bandymas

Tuščiąjį bandymą turi sudaryti visos nurodytos procedūros pakopos, išskyrus tai, kad nededama ėminio medžiagos. Kaip tuščiasis ėminys neturi būti naudojamas „0“ koncentracijos kalibravimo tirpalas.

5.1.2.4. Atominės absorbcijos matavimas

Matuojama kalibravimo tirpalų ir analizuojamo tirpalo atominė absorbcija, naudojant oro-acetilenos oksiduojančiąją liepsną, esant šiems bangų ilgiams:

Fe: 248,3 nm,

Cu: 324,8 nm,

Mn: 279,5 nm,

Zn: 213,8 nm.

Kiekvienas matavimas atliekamas keturis kartus.

5.2. Mineraliniai pašarai

Jei ėminyje nėra organinių medžiagų, sudeginimas iki pelenų prieš analizę nereikalingas. Daroma kaip aprašyta 5.1.1.1 punkte, pradedant nuo antrosios pastraipos. Galima praleisti išgarinimo su fluoro vandenilio rūgštimi pakopą.

6. Rezultatų apskaičiavimas

Naudojant kalibravimo kreivę, apskaičiuojama mikroelementų koncentracija analizuojamame tirpale ir rezultatas išreiškiamas mikroelemento mg kiekiu vienam ėminio kilogramui (milijonosiomis dalimis).

7. Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties analizę atliekančio asmens atliktų to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- 5 mg/kg, absoliučiąja verte, kai nustatomo mikroelemento kiekis ne didesnis nei 50 mg/kg,
- 10 % didžiausio rezultato, kai nustatomo mikroelemento kiekis yra 50–100 mg/kg,
- 10 mg/kg, absoliučiąja verte, kai nustatomo mikroelemento kiekis yra 100–200 mg/kg,
- 5 % didžiausio rezultato, kai nustatomo mikroelemento kiekis yra didesnis nei 200 mg/kg.

8. Pastaba

Dideli fosfatų kiekiai gali trukdyti nustatyti geležį, manganą ir cinką. Tokie trukdžiai turi būti pašalinti, įpilant lantano chlorido tirpalo (3.11 punktas). Tačiau, jei ėminyje masių santykis $(Ca + mg)/P > 2$, lantano chlorido tirpalo (3.11 punktas) į analizės tirpalą ir kalibravimo tirpalus galima nepilti.

D. HALOFUGINONO KIEKIO NUSTATYMAS

DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-ono hidrobromidas

Halofuginono kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba
- atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį detektorių, kaip toliau aprašyta 1–8 dalyse.

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti halofuginono koncentraciją pašaruose. Kiekybinio nustatymo riba – 1 mg/kg.

2. **Metodas**

Apdorotas karštu vandeniu halofuginonas ekstrahuojamas kaip laisvoji bazė į etilacetatą ir po to atskiriamas kaip vandenilio chloridas į vandeninį rūgšties tirpalą. Ekstraktas gryninamas, taikant jonų mainų chromatografiją. Halofuginono kiekis nustatomas atvirkštinės fazės efektyviąją skysčių chromatografija (HPLC), naudojant ultravioletinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1. Acetonitrilas, HPLC grynumo.

3.2. Amberlito XAD-2 derva.

3.3. Amonio acetatas.

3.4. Etilacetatas.

3.5. Acto rūgštis, ledinė.

3.6. Halofuginono standartinė medžiaga (DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-ono hidrobromidas, E 764).

3.6.1. Halofuginono pradinis standartinis tirpalas, 100 µg/ml.

Į 500 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasverama 50 mg halofuginono (3.6 punktas), ištirpinama amonio acetato buferiniame tirpale (3.18 punktas), iki žymės skiedžiama buferiniu tirpalu ir sumaišoma. Šis tirpalas lieka stabilus tris savaites 5 °C temperatūroje, jei laikomas tamsioje.

3.6.2. Kalibravimo tirpalai.

Į keletą 100 ml matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ir 6,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.6.1 punktas). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.21 punktas) ir sumaišoma. Šių tirpalų halofuginono koncentracija yra atitinkamai 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ir 6,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.7. Vandenilio chlorido rūgštis (ρ_{20} maždaug 1,16 g/ml).

3.8. Metanolis.

3.9. Sidabro nitratas.

3.10. Natrio askorbatas.

3.11. Natrio karbonatas.

3.12. Natrio chloridas.

- 3.13. EDTA (etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska).
- 3.14. Vanduo, HPLC grynumo.
- 3.15. Natrio karbonato tirpalas, $c = 10 \text{ g/100 ml}$.
- 3.16. Natrio karbonato tirpalas sočiajame natrio chlorido tirpale, $c = 5 \text{ g/100 ml}$.
Vandenyje ištirpinama 50 g natrio karbonato (3.11 punktas), skiedžiama iki 1 litro ir dedama natrio chlorido (3.12 punktas) tiek, kad gaunamas sotus tirpalas.
- 3.17. Vandenilio chlorido rūgštis, maždaug $0,1 \text{ mol/l}$.
10 ml HCl (3.7 punktas) skiedžiama vandeniu iki 1 litro.
- 3.18. Amonio acetato buferinis tirpalas, maždaug $0,25 \text{ mol/l}$.
Vandenyje (3.14 punktas) ištirpinama 19,3 g amonio acetato (3.3 punktas), 30 ml acto rūgšties (3.5 punktas) ir skiedžiama iki 1 litro.
- 3.19. Amberlito XAD-2 dervos ruošimas.
Reikiamas kiekis amberlito (3.2 punktas) plaunamas vandeniu tol, kol pašalinami visi chlorido jonai, kaip rodo bandymas su sidabro nitrato tirpalu (3.20 punktas), atliekamas su išpilama vandenine faze. Derva plaunama 50 ml metanolio (3.8 punktas), metanolis išpilamas ir derva laikoma ant jos užpylus švaraus metanolio.
- 3.20. Sidabro nitrato tirpalas, maždaug $0,1 \text{ mol/l}$.
 $0,17 \text{ g}$ sidabro nitrato (3.9 punktas) ištirpinama 10 ml vandens.
- 3.21. HPLC judančioji fazė.
500 ml acetonitrilo (3.1 punktas) maišoma su 300 ml amonio acetato buferiniu tirpalu (3.18 punktas) ir 1 200 ml vandens (3.14 punktas). Acto rūgštimi (3.5 punktas) nustatoma pH 4,3. Tirpalas filtruojamas per $0,22 \mu\text{m}$ filtrą (4.8 punktas) ir degazuojamas (pvz., 10 min. ultragarsu). Šis tirpalas stabilus vieną mėnesį, jei laikomas uždareme inde ir tamsoje.

4. Aparatūra

- 4.1. Ultragarso vonia.
- 4.2. Sukamasis garintuvas.
- 4.3. Centrifuga.
- 4.4. HPLC įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu detektoriumi arba diodų matricos detektoriumi.
- 4.4.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė, $300 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, C_{18} , $10 \mu\text{m}$ įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.
- 4.5. Stiklinė kolonėlė ($300 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) su sukepinto stiklo filtru ir čiaupu.
- 4.6. Stiklo pluošto filtrai, skersmuo 150 mm .
- 4.7. Membraninis filtras ($0,45 \mu\text{m}$).
- 4.8. Membraninis filtras ($0,22 \mu\text{m}$).

5. Procedūra

Pastaba: Halofuginonas kaip laisvoji bazė yra nepatvarus šarminiuose ir etilacetato tirpaluose, todėl etilacetate laikomas ne ilgiau nei 30 min.

- 5.1. Bendrosios nuostatos
- 5.1.1. Siekiant patikrinti, ar nėra halofuginono arba trukdančiųjų medžiagų, atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė.

- 5.1.2. Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant halofuginono, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. 3 mg/kg koncentracijai gauti į 10 g pašaro tuščiojo ėminio reikia įpilti 300 µl pradinio standartinio tirpalo (3.6.1 punktas), sumaišyti ir prieš ekstrahavimą (5.2 punktas) palaukti 10 min.

Pastaba: Šiame metode pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptikta halofuginono.

5.2. Ekstrahavimas

Į 200 ml centrifugos mėgintuvėlį 0,1 g tikslumu pasveriamą 10 g paruošto ėminio, įdedama 0,5 g natrio askorbato (3.10 punktas), 0,5 g EDTA (3.13 punktas), 20 ml vandens ir sumaišoma. Mėgintuvėlis įdedamas 5 min. į vandens vonią (80 °C). Atvėsinus iki kambario temperatūros, įpilama 20 ml natrio karbonato tirpalo (3.15 punktas) ir sumaišoma. Tuoj pat įpilama 100 ml etilacetato (3.4 punktas) ir 15 s stipriai purtoma ranka. Atkimštas mėgintuvėlis dedamas trims minutėms į ultragarso vonią (4.1 punktas). Centrifuguojama 2 min. ir etilacetato fazė per stiklo pluošto filtrą (4.6 punktas) nupilama į 500 ml dalijamąjį piltuvą. Kartojamas ėminio ekstrahavimas dar su 100 ml etilacetato. Sujungti ekstraktai vieną minutę plaunami 50 ml natrio chloridu prisotintu natrio karbonato tirpalu (3.16 punktas), vandeninis sluoksnis išpilamas.

Organinis sluoksnis 1 min. ekstrahuojamas 50 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalu (3.17 punktas). Apatinis rūgšties sluoksnis išleidžiamas į 250 ml dalijamąjį piltuvą. Organinis sluoksnis dar kartą 1,5 min. ekstrahuojamas kita 50 ml vandenilio chlorido rūgšties porcija ir gautas ekstraktas sujungiamas su pirmuoju ekstraktu. Abu sujungti rūgšties ekstraktai maždaug 10 s plaunami 10 ml etilacetatu (3.4 punktas), atliekant sukamuosius judesius.

Visas vandeninis sluoksnis kiekybiškai supilamas į 250 ml talpos apvaliadugnę kolbą, organinė fazė išpilama. Visas likęs etilacetatas pašalinamas iš rūgšties tirpalo garinant sukamajame garintuve (4.2 punktas). Vandens vonios temperatūra neturi būti aukštesnė nei 40 °C. Esant maždaug 25 milibarų vakuumui, visas likęs etilacetatas turėtų būti pašalintas per 5 min., kai temperatūra 38 °C.

5.3. Gryninimas

5.3.1. Amberlito kolonėlės ruošimas

XAD-2 kolonėlė ruošiamą kiekvienam ėminio ekstraktui. 10 g paruošto amberlito (3.19 punktas) supilama į stiklinę kolonėlę (4.5 punktas) su metanolio (3.8 punktas). Ant dervos sluoksnio uždedamas nedidelis stiklo vatos kamštis. Metanolis išleidžiamas iš kolonėlės ir derva plaunama 100 ml vandens, paliekant jo tiek, kad skystis apsemtų dervos paviršių. Prieš naudojimą kolonėlė 10 min. paliekama pusiausvyrai nusistovėti. Niekuomet neleidžiama skysčiui visiškai ištekti iš kolonėlės.

5.3.2. Ėminio gryninimas

Visas ekstraktas (5.2 punktas) kiekybiškai supilamas ant paruoštos amberlito kolonėlės (5.3.1 punktas) viršaus ir plaunama, išpilant eliuatą. Eliuavimo srautas neturi būti didesnis nei 20 ml/min. Apvaliadugnė kolba plaunama 20 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo (3.17 punktas) ir šiuo tirpalu plaunama dervos kolonėlė. Rūgšties tirpalo likutis išpučiamas oro srautu. Plovimo tirpalai išpilami. Į kolonėlę įpilama 100 ml metanolio (3.8 punktas) ir į 250 ml apvaliadugnę kolbą ir surenkama 5–10 ml eliuato. Likęs metanolis 10 min. laikomas pusiausvyrai su derva nusistovėti ir eliuavimas tęsiamas esant ne didesniai nei 20 ml/min. srautui, surenkant eliuatą į tą pačią kolbą. Metanolis išgarinamas sukamajame garintuve (4.2 punktas). Vandens vonios temperatūra neturi būti aukštesnė nei 40 °C. Plaunant judančiąja faze (3.21 punktas), likutis kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Skiedžiama judančiąja faze iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė dalis filtruojama per membraninį filtrą (4.7 punktas). Šis tirpalas naudojamas HPLC nustatymui (5.4 punktas).

5.4. HPLC nustatymas

5.4.1. Parametrai

Rekomenduojamos toliau nurodytos sąlygos; gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1 punktas).

HPLC judančioji fazė (3.21 punktas).

Srautas: 1,5–2 ml/min.

Detektoriaus bangos ilgis: 243 nm.

Įpurškiamas tūris: 40–100 µl.

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 3,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.6.2 punktas) tol, kol nustoja keistis smailės aukštis (arba plotas) ir sulaikymo trukmė.

5.4.2. Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.6.2 punktas) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių arba plotų vidurkiai, o abscisių ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.4.3. Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.3.2 punktas), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas halofuginono smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. Rezultatų apskaičiavimas

Ėminio tirpalo koncentracija µg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo halofuginono smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.4.2 punktas).

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

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

kurioje:

c: halofuginono koncentracija ėminio tirpale µg/ml;

m: tiriamosios dalies svoris gramais.

7. Rezultatų patvirtinimas

7.1. Tapatumas

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorius, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto ir 6,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.6.2 punktas) spektrai.

7.1.1. Kochromatografija

Ėminio ekstrakto tirpalo koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.6.2 punktas) tūrį. Pridėto halofuginono kiekis turi atitikti ėminio ekstrakto nustatytą halofuginono kiekį.

Turi padidėti tik halofuginono smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos maksimalaus aukščio pusaukštyje turi atitikti pradinį plotį ± 10 % tikslumu.

7.1.2. Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

- ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;

- b) nuo 225 nm iki 300 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis nei 15 % etalono analizės absorbcijos vertės;
- c) nuo 225 nm iki 300 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis nei 15 % smailės viršūnę atitinkančios absorbcijos vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analizės buvimas nepatvirtinamas.

7.2. Pakartojamumas

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 0,5 mg/kg, kai halofuginono yra iki 3 mg/kg.

7.3. Išgavos dydis

Išgavos dydis, gautas tuščiajam ėminiui su analizės priedu, yra ne mažesnis nei 80 %.

8. Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai

Buvo atliktas jungtinis lyginamasis tyrimas ⁽⁸⁾, per kurį aštuonios laboratorijos analizavo tris ėminius.

Rezultatai

	A ėminys (tuščiasis) Kaip gautas	B ėminys (miltai)		C ėminys (granulės)	
		Kaip gautas	Po dviejų mėnesių	Kaip gautas	Po dviejų mėnesių
Vidurkis [mg/kg]	NA	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
Išgav. [%]		86	74	88	75
NA	neaptikta				
S _R	atkuriamumo standartinis nuokrypis				
CV _R	atkuriamumo variacijos koeficientas (%)				
Išgav.	išgavos dydis %				

E. ROBENIDINO KIEKIO NUSTATYMAS

1,3-bi[(4-chlorbenziliden)amino]guanidino hidrochloridas

Robenidino kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba
- atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį detektorių, kaip toliau aprašyta 1–8 dalyse.

⁽⁸⁾ „The Analyst“ 108, 1983, p. 1252–1256.

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti robenidino koncentraciją pašaruose. Kiekybinio nustatymo riba – 5 mg/kg.

2. Metodas

Ėminys ekstrahuojamas parūgštintu metanolio. Ekstraktas džiovinamas, alikvotinė ekstrakto dalis gryninama, naudojant kolonėlę su aliuminio oksidu. Robenidinas iš kolonėlės plaunamas metanolio, koncentruojamas ir judančiojoje fazėje skiedžiamas iki reikiamo tūrio. Robenidino kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu naudojant ultravioletinį detektorių.

3. Reagentai**3.1. Metanolis.****3.2. Parūgštintas metanolis**

4,0 ml vandenilio chlorido rūgšties ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$) įpilama į 500 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės metanolio (3.1 punktą) ir sumaišoma. Tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.3. Acetonitrilas, HPLC grynumo.**3.4. Molekulinis sietas**

3A tipo, 8–12 mešų granulės (1,6–2,5 mm granulės, kristalinis aliumosilikatas, akučių skersmuo 0,3 mm).

3.5. Aliuminio oksidas, I laipsnio rūgštinio aktyvumo, skirtas chromatografijai kolonėlėje

100 g aliuminio oksido supilama į tinkamą indą ir įpilama 2 ml vandens. Indas užkemšamas ir purtomas maždaug 20 min. Laikoma gerai uždarytame inde.

3.6. Kalio dihidrofosfato tirpalas, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

3,40 g kalio dihidrofosfato ištirpinama vandenyje (HPLC grynumo), skiedžiama 1 000 ml matavimo kolboje iki žymės ir sumaišoma.

3.7. Dinatrio hidrofosfato tirpalas, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

3,55 g bevandenio dinatrio hidrofosfato (arba 4,45 g dihidrato, arba 8,95 g dodekahidrato) ištirpinama vandenyje (HPLC grynumo), skiedžiama 1 litro matavimo kolboje iki žymės ir sumaišoma.

3.8. HPLC judančioji fazė

Sumaišomi šie reagentai:

650 ml acetonitrilo (3.3 punktą),

250 ml vandens (HPLC grynumo),

50 ml kalio dihidrofosfato tirpalo (3.6 punktą),

50 ml dinatrio hidrofosfato tirpalo (3.7 punktą).

Filtruojama per 0,22 μm aktyvumo filtrą (4.6 punktą), tirpalas degazuojamas (pvz., 10 min. veikiant ultragarsu).

3.9. Standartinė medžiaga

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

3.9.1. Robenidino pradinis standartinis tirpalas, 300 $\mu\text{g/ml}$

0,1 mg tikslumu pasveriama 30 mg robenidino standartinės medžiagos (3.9 punktą). 100 ml matavimo kolboje ištirpinama parūgštintame metanolyje (3.2 punktą), tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma tamsioje vietoje.

3.9.2. Robenidino tarpinis standartinis tirpalas: 12 µg/ml

10 ml pradinio tirpalo (3.9.1 punktas) įpilama į 250 ml matavimo kolbą, skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.8 punktas) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma tamsioje vietoje.

3.9.3. Kalibravimo tirpalai

Į keletą 50 ml matavimo kolbų įpilama 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ir 25,0 ml tarpinio standartinio tirpalo (3.9.2 punktas). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.8 punktas) ir sumaišoma. Šių tirpalų koncentracija atitinkamai yra 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 ir 6,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.10. Vanduo, HPLC grynumo

4. **Aparatūra**

4.1. Stiklinė kolonėlė.

Pagaminta iš gintaro spalvos stiklo, yra su čiaupu ir maždaug 150 ml talpos, vidinis skersmuo 10–15 mm, ilgis 250 mm.

4.2. Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.

4.3. Sukamasis garintuvas.

4.4. HPLC įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu detektoriumi arba diodinės matricos detektoriumi, veikiančiu 250–400 nm bangų ilgio intervale.

4.4.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė: 300 mm × 4 mm, C₁₈ 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.

4.5. Stiklo pluošto filtravimo popierius (Whatman GF/A arba lygiavertis).

4.6. Membraninis filtras (0,22 µm).

4.7. Membraninis filtras (0,45 µm).

5. **Procedūra**

Pastaba: Robenidinas yra jautrus šviesai. Atliekant visus veiksmus naudojami gintaro spalvos stiklo indai.

5.1. *Bendrosios nuostatos*

5.1.1. Siekiant patikrinti, ar nėra robenidino arba trukdančiųjų medžiagų, atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė.

5.1.2. Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį (5.1.1 punktas), į jį pridedant robenidino, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. 60 mg/kg koncentracijai gauti, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 3,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.9.1 punktas). Azoto srovėje tirpalas garinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 15 g pašaro tuščiojo ėminio, sumaišoma ir prieš ekstrahavimą (5.2 punktas) palaukiama 10 min.

Pastaba: Taikant šį metodą pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptinkama robenidino.

5.2. *Ekstrahavimas*

0,01 g tikslumu pasveriami maždaug 15 g paruošto ėminio. Ėminys supilamas į 250 ml kūginę kolbą, į ją įpilama 100 ml parūgštinto metanolio (3.2 punktas), kolba užkemšama ir vieną valandą kratoma ant purtyklės (4.2 punktas). Tirpalas filtruojamas per stiklo pluošto filtravimo popierių (4.5 punktas), visas filtratas surenkamas į 150 ml kūginę kolbą. Pridedama 7,5 g molekulinio sieto (3.4 punktas), kolba užkemšama ir purtoma penkias minutes. Iš karto filtruojama per stiklo pluošto filtravimo popierių. Toliau atliekamas gryninimas (5.3 punktas).

5.3. Gryninimas

5.3.1. Aliuminio oksido kolonėlės ruošimas

Į stiklinės kolonėlės (4.1 punktas) apačią įkišamas mažas stiklo vatos kamštis, kuris stikline lazdele sutankinamas. Pasveriamas 11,0 g paruošto aliuminio oksido (3.5 punktas) ir supilama į kolonėlę. Siekiama, kad pilant sąlytis su oru būtų kuo mažesnis. Švelniai tapšnojama per užpildomos kolonėlės apačią, kad aliuminio oksidas suslūgtų.

5.3.2. Ėminio gryninimas

Į kolonėlę pipete įpilama 5,0 ml pagal 5.2 punktą paruošto ėminio ekstrakto. Pipetės galiukas laikomas prie kolonėlės sienelės ir leidžiama tirpalui susigerti į aliuminio oksidą. Robenidinas iš kolonėlės išplaunamas 100 ml metanolio (3.1 punktas), esant 2–3 ml/min. srautui, eliuatas surenkamas į 250 ml apvaliadugnę kolbą. Metanolinis tirpalas išgarinamas iki sauso likučio sukamajame garintuve (4.3 punktas) esant sumažintam slėgiui, kai temperatūra 40 °C. Likutis ištirpinamas 3–4 ml judančiosios fazės (3.8 punktas) ir kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Apvaliadugnė kolba kelis kartus plaunama 1–2 ml judančiosios fazės ir šie plovimo tirpalai supilami į matavimo kolbą. Tuo pačiu tirpikliu skiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per 0,45 µm filtrą (4.7 punktas). Tirpalas naudojamas analizei HPLC metodu (5.4 punktas).

5.4. HPLC nustatymas

5.4.1. Parametrai

Rekomenduojamos toliau nurodytos sąlygos; gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1 punktas).

HPLC judančioji fazė (3.8 punktas).

Srautas: 1,5–2 ml/min.

Detektoriaus bangos ilgis: 317 nm.

Įpurškiamas tūris: 20–50 µl.

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 3,6 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.9.3 punktas) tol, kol nustoja keistis smailių aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.4.2. Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.9.3 punktas) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių arba plotų vidurkiai, o abscisų ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.4.3. Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.3.2 punktas), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas robenidino smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. Rezultatų apskaičiavimas

Ėminio tirpalo koncentracija µg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo robenidino smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.4.2 punktas).

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

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

kurioje:

c = robenidino koncentracija ėminio tirpale µg/ml;

m = tiriamosios dalies svoris gramais.

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1. *Tapatumas*

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto ir 6,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.9.3 punktas) spektrai.

7.1.1. Kochromatografija

Ėminio ekstrakto tirpalo koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.9.3 punktas) tūrį. Pridėto robenidino kiekis turi atitikti ėminio ekstrakto nustatytą robenidino kiekį.

Padidinamas tik robenidino smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos maksimalaus aukščio pusaukštyje maždaug 10 % tikslumu turi atitikti smailės pradinį plotį.

7.1.2. Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

- a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų maždaug 2 nm;
- b) nuo 250 nm iki 400 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis nei 15 % etalono analitės absorbcijos vertės;
- c) nuo 250 nm iki 400 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis nei 15 % smailės viršūnę atitinkančios absorbcijos vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2. *Pakartojamumas*

Dviejų lygiagrečių to paties ėminio nustatymų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei 10 % didžiausio rezultato, gauto didesniam nei 15 mg/kg robenidino kiekiui.

7.3. *Išgavos dydis*

Išgavos dydis, gautas tuščiajam ėminiui su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 85 %.

8. **Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai**

Buvo atliktas ES jungtinis lyginamasis tyrimas, per kurį dvylikoje laboratorijų buvo analizuojami keturi paukščių ir triušių pašaro miltų arba granulių pavidalu ėminiai. Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas du kartus. Rezultatai pateikiami šioje lentelėje:

	Paukščiai		Triušiai	
	Miltai	Granulės	Miltai	Granulės
Vidurkis [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s _r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66

CV _r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S _R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV _R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Išgavos dydis [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r pakartojamumo standartinis nuokrypis

CV_r pakartojamumo variacijos koeficientas %

S_R atkuriamumo standartinis nuokrypis

CV_R atkuriamumo variacijos koeficientas %

F. DIKLAZURILO KIEKIO NUSTATYMAS

(+)-4-chlorfenil[2,6-dichlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil]acetoni-trilas

Diklazurilo kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba —
- trigubo gradiento atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį detektorių, kaip toliau aprašyta 1–9 dalyse.

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti diklazurilo koncentraciją pašaruose ir premiksuose (*). Aptikimo riba – 0,1 mg/kg, ribinė nustatymo vertė – 0,5 mg/kg. Galima pasiekti žemesnės kiekybinio įvertinimo ribas, tačiau tai turi patvirtinti naudotojas.

2. Metodas

Pridėjus vidinio etalono, ėminys ekstrahuojamas parūgštintu metanoliu. Jei tai pašarai, ekstrakto alikvotinė dalis gryninama C18 kietosios fazės ekstrahavimo kolonėle. Iš kolonėlės diklazurilas išplaunamas parūgštinto metanolio ir vandens mišiniu. Eliuatą išgarinus, likutis ištirpinamas DMF ir vandens mišinyje. Jei tai premiksai, ekstraktas išgarinamas ir likutis ištirpinamas DMF ir vandens mišinyje. Diklazurilo kiekis nustatomas atvirkštinių fazių trigubo gradiento efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), naudojant ultravioletinį detektorių.

3. Reagentai

- 3.1. Vanduo, HPLC grynumo.
- 3.2. Amonio acetatas.
- 3.3. Tetrabutilamonio hidrosulfatas (TBHS).
- 3.4. Acetonitrilas, HPLC grynumo.
- 3.5. Metanolis, HPLC grynumo.
- 3.6. N, N-dimetilformamidas (DMF).
- 3.7. Vandenilio chlorido rūgštis, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8. Standartinė medžiaga: garantuoto grynumo diklazurilas:
(+)-4-chlorfenil[2,6-dichlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil]acetoni-trilas.

(*) Šis metodas taip pat gali būti taikomas diklazurilo kiekiui pašarinėse žaliavose nustatyti.

3.8.1. Diklazurilo pradinis standartinis tirpalas, 500 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamą 25 mg diklazurilo standartinės cheminės medžiagos (3.8 punktas). Ištirpinama DMF (3.6 punktas), skiedžiama DMF (3.6 punktas) iki žymės ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama gintaro spalvos stiklo kolba, ir dedama į šaldytuvą. Esant $\leq 4^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį⁽¹⁰⁾.

3.8.2. Diklazurilo standartinis tirpalas, 50 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą įpilama 5,00 ml pradinio standartinio tirpalo (3.8.1 punktas), skiedžiama iki žymės DMF (3.6 punktas) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama gintaro spalvos stiklo kolba, ir dedama į šaldytuvą. Esant $\leq 4^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.9. Vidinio etalono medžiaga:

2,6-dichlor- α -(4-chlorfenil)-4-(4,5-dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2(3H)-il)- α -metilbenzenacetoni-trilas (metildiklazurilis).

3.9.1. Pradinis vidinio etalono tirpalas, 500 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamą 25 mg vidinio etalono cheminės medžiagos (3.9 punktas). Ištirpinama DMF (3.6 punktas), skiedžiama DMF (3.6 punktas) iki žymės ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama gintaro spalvos stiklo kolba, ir dedama į šaldytuvą. Esant $\leq 4^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.9.2. Vidinio etalono tirpalas, 50 µg/ml

Į 50 ml matavimo kolbą įpilama 5,00 ml pradinio vidinio etalono tirpalo (3.9.1 punktas), skiedžiama iki žymės DMF (3.6 punktas) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama gintaro spalvos stiklo kolba, ir dedama į šaldytuvą. Esant $\leq 4^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.9.3. Premiksų vidinio etalono tirpalas, p/1 000 mg/ml (p – diklazurilo vardinė koncentracija premikse, mg/kg)

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamą p/10 mg vidinio etalono, ultragarso vonioje (4.7 punktas) jis ištirpinamas DMF (3.6 punktas), skiedžiama iki žymės DMF ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija, arba naudojama gintaro spalvos stiklo kolba, ir padedama į šaldytuvą. Esant $\leq 4^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, tirpalas stabilus vieną mėnesį.

3.10. Kalibravimo tirpalai

3.10.1. Kalibravimo tirpalas, 1 µg/ml (diklazurilas)

Į 50 ml matavimo kolbą pipete įpilama 1,00 ml diklazurilo standartinio tirpalo (3.8.2 punktas) ir 2,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2 punktas). Įpilama 17 ml DMF (3.6 punktas), skiedžiama vandeniu (3.1 punktas) iki žymės ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.10.2. Kalibravimo tirpalas, 2 µg/ml (diklazurilas)

Į 50 ml matavimo kolbą pipete įpilama 2,00 ml diklazurilo standartinio tirpalo (3.8.2 punktas) ir 2,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2 punktas). Įpilama 16 ml DMF (3.6 punktas), skiedžiama vandeniu (3.1 punktas) iki žymės ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.10.3. Kalibravimo tirpalas, 3 µg/ml (diklazurilas)

Į 50 ml matavimo kolbą pipete įpilama 3,00 ml diklazurilo standartinio tirpalo (3.8.2 punktas) ir 2,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2 punktas). Įpilama 15 ml DMF (3.6 punktas), skiedžiama vandeniu (3.1 punktas) iki žymės ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

⁽¹⁰⁾ Ilgesnis stabilumas (iki 1 metų) įmanomas, tačiau jį turi patvirtinti atskira laboratorija.

3.10.4. Kalibravimo tirpalas, 4 µg/ml (diklazurilas)

Į 50 ml matavimo kolbą pipete įpilama 4,00 ml diklazurilo standartinio tirpalo (3.8.2 punktas) ir 2,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2 punktas). Įpilama 14 ml DMF (3.6 punktas), skiedžiama vandeniu (3.1 punktas) iki žymės ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.10.5. Kalibravimo tirpalas, 5 µg/ml (diklazurilas)

Į 50 ml matavimo kolbą pipete įpilama 5,00 ml diklazurilo standartinio tirpalo (3.8.2 punktas) ir 2,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2 punktas). Įpilama 13 ml DMF (3.6 punktas), skiedžiama vandeniu (3.1 punktas) iki žymės ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

Pastaba: Pagal taikomą protokolą kalibravimo tirpalai (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ir 3.10.5 punktai) apima 0,5–2,5 mg/kg diklazurilo koncentraciją pašare.

3.11. C₁₈ kietosios fazės ekstrahavimo kolonėlė, pvz., Bond Elut, dydis: 20 cm³, sorbento svoris: 5 000 mg (paruošus pagal tiekėjo rekomendacijas).

3.12. Ekstrahavimo tirpiklis: parūgštintas metanolis

Į 1 000 ml metanolio (3.5 punktas) pipete įpilama 5,0 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.7 punktas) ir sumaišoma.

3.13. HPLC judančioji fazė

3.13.1. Eliuentas A: amonio acetato ir tetrabutilamonio hidrosulfato mišinio tirpalas.

5 g amonio acetato (3.2 punktas) ir 3,4 g TBHS (3.3 punktas) ištirpinama 1 000 ml vandens (3.1 punktas) ir sumaišoma.

3.13.2. Eliuentas B: acetonitrilas (3.4 punktas).

3.13.3. Eliuentas C: metanolis (3.5 punktas).

4. **Aparatūra**

4.1. Mechaninė purtyklė.

4.2. Įranga trigubo gradiento HPLC.

4.2.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė, Hypersil ODS, 3 µm dalelių įkrova, 100 mm × 4,6 mm, arba lygiavertė kolonėlė.

4.2.2. Reguliuojamo bangos ilgio ultravioletinis detektorius arba diodų matricos detektorius.

4.3. Sukamasis garintuvas.

4.4. Membraninis filtras (pvz., chemiškai atsparus nailonas), 0,45 µm.

4.5. Vienkartinis švirkštas, 5 ml.

4.6. Vakuumavimo sistema.

4.7. Ultragarso vonia.

5. **Procedūra**

5.1. *Bendrosios nuostatos*

5.1.1. Pašaro tuščiasis ėminys

Siekiant patikrinti, ar nėra diklazurilo ir trukdančių cheminių medžiagų, atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė. Taikant šį metodą pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptinkama diklazurilo arba trukdančių medžiagų.

5.1.2. Išgavos dydžio nustatymo bandymas

Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant diklazurilo, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. 1 mg/kg koncentracijai gauti, į 50 g pašaro tuščiojo ėminio įpilama 0,1 ml pradinio standartinio tirpalo (3.8.1 punktas), gerai sumaišoma, paliekama 10 min. ir prieš atliekant kitą pakopą (5.2 punktas) kelis kartus sumaišoma.

Jei nėra pašaro tuščiojo ėminio, kuris būtų panašus į ėminio pašarą (žr. 5.1.1 punktą), išgavos dydį galima nustatyti, taikant etalono pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą ėminį pridedamas diklazurilo kiekis, maždaug atitinkantis diklazurilo kiekį ėminyje. Šis ėminys analizuojamas kartu su ėminiu be pridėto diklazurilo ir išgavos dydis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2. Ekstrahavimas

5.2.1. Kombinuotieji pašarai

0,01 g tikslumu pasveriamas maždaug 50 g ėminio. Ėminys supilamas į 500 ml kūginę kolbą, įpilama 1,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.2 punktas), 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12 punktas) ir kolba užkemšama. Mišinys purtomas ant purtyklės (4.1 punktas) per naktį. Paliekamas 10 min. nusistovėti. Į tinkamą stiklinį indą paimama tirpalo virš nuosėdų alikvotinė 20 ml dalis ir skiedžiama 20 ml vandens (3.1 punktas). Šis tirpalas supilamas į ekstrahavimo kolonėlę (3.11 punktas) ir siurbiamas, prijungus vakuumą (4.6 punktas). Kolonėlė plaunama 25 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12 punktas) ir vandens (3.1 punktas) mišinio, 65 + 35 (V + V). Surinktos frakcijos išpilamos ir junginiai išplaunami 25 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12 punktas) ir vandens mišinio, 80 + 20 (V + V). Ši frakcija garinama beveik iki sauso likučio sukamajame garintuve (4.3 punktas) esant 60 °C. Likutis ištirpinamas 1,0 ml DMF (3.6 punktas), įpilama 1,5 ml vandens (3.1 punktas) ir sumaišoma. Filtruojama per membraninį filtrą (4.4 punktas), sumontuotą ant vienkartinio švirkšto (4.5 punktas). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3 punktas).

5.2.2. Premiksai

Maždaug 1 g ėminio pasveriamas 0,001 g tikslumu. Ėminys supilamas į 500 ml kūginę kolbą, įpilama 1,00 ml vidinio etalono tirpalo (3.9.3 punktas), 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.12 punktas) ir kolba užkemšama. Mišinys purtomas ant purtyklės (4.1 punktas) per naktį. Paliekamas 10 min. nusistovėti. Į tinkamo tūrio apvaliadugnę kolbą paimama alikvotinė tirpalo virš nuosėdų dalis 10 000/p ml (p – vardinė diklazurilo koncentracija premikse, mg/kg). Garinama 60 °C temperatūroje beveik iki sauso likučio sukamajame garintuve (4.3 punktas), esant sumažintam slėgiui. Likutis ištirpinamas 10,0 ml DMF (3.6 punktas), įpilama 15,0 ml vandens (3.1 punktas) ir sumaišoma. Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3 punktas).

5.3. HPLC nustatymas

5.3.1. Parametrai

Rekomenduojamos toliau nurodytos sąlygos; gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai arba geresni rezultatai.

- Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.2.1 punktas): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.
- Judančioji fazė:
 - eliuentas A (3.13.1 punktas): vandeninis amonio acetato ir tetrabutilamonio hidrosulfato mišinio tirpalas,
 - eliuentas B (3.13.2 punktas): acetonitrilas,
 - eliuentas C (3.13.3 punktas): metanolis.
- Eliavimo būdas: tiesinis gradientas:
 - pradinės sąlygos: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V),
 - po 10 min. gradientinis eliuavimas 30 min., kol: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V),
 - 10 min. plovimas eliuentu B.
- Srautas: 1,5–2 ml/min.

- Įpurškiamas tūris: 20 µl.
- Detektoriaus bangos ilgis: 280 nm.

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant kalibravimo tirpalo (3.10.2 punktas), kuriame yra 2 µg/ml diklazurilo ir vidinio etalono, tol, kol nustoja keistis smailės aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.3.2. Kalibravimo tirpalų chromatografinė analizė

Du kartus įpurškiama po 20 µl kalibravimo tirpalų (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ir 3.10.5 punktai), nustatomos ir integruojamos diklazurilo bei vidinio etalono smailės, tada, remiantis diklazurilo vidutinio smailės aukščio (ploto) ir vidinio etalono vidutinio smailės aukščio (ploto) santykiu, brėžiama kalibravimo kreivė, lyginant su diklazurilo koncentracija kalibravimo tirpaluose (µg/ml).

5.3.3. Ėminio tirpalų chromatografinė analizė

Du kartus įpurškiama 20 µl ėminio tirpalo (5.2.1 arba 5.2.2 punktas) ir nustatomas diklazurilo bei vidinio etalono smailių vidutinis smailės aukštis (plotas).

6. Rezultatų apskaičiavimas

6.1. Kombinuotieji pašarai

Diklazurilo kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ arba } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

kurioje:

- aukštis(d,s) – ėminio tirpalo (5.2.1 punktas) diklazurilo smailės aukštis;
- plotas(d,s) – ėminio tirpalo (5.2.1 punktas) diklazurilo smailės plotas;
- aukštis(i,s) – ėminio tirpalo (5.2.1 punktas) vidinio etalono smailės aukštis;
- plotas(i,s) – ėminio tirpalo (5.2.1 punktas) vidinio etalono smailės plotas;
- b – kalibravimo kreivės atkarpa, nubrėžta pagal kalibravimo tirpalus (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ir 3.10.5 punktai) pagal 5.3.2 punktą;
- a – kalibravimo kreivės nuolydis, nubrėžtas pagal kalibravimo tirpalus (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ir 3.10.5 punktai) pagal 5.3.2 punktą;
- m – tiriamosios dalies masė gramais;
- V – galutinis ėminio ekstrakto tūris mililitrais, pakartotinai ištirpinus pagal 5.2.1 punktą (t. y. 2,5 ml).

6.2. Premiksai

Diklazurilo kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ arba } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

kurioje:

- aukštis(d,s) – ėminio tirpalo (5.2.2 punktas) diklazurilo smailės aukštis;
- plotas(d,s) – ėminio tirpalo (5.2.2 punktas) diklazurilo smailės plotas;
- aukštis(i,s) – ėminio tirpalo (5.2.2 punktas) vidinio etalono smailės aukštis;
- plotas(i,s) – ėminio tirpalo (5.2.2 punktas) vidinio etalono smailės plotas;

- b – kalibravimo kreivės atkarpa, nubrėžta pagal kalibravimo tirpalus (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ir 3.10.5 punktai) pagal 5.3.2 punktą;
- a – kalibravimo kreivės nuolydis, nubrėžtas pagal kalibravimo tirpalus (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 ir 3.10.5 punktai) pagal 5.3.2 punktą;
- m – tiriamosios dalies masė gramais;
- V – galutinis ėminio ekstrakto tūris mililitrais, pakartotinai ištirpinus pagal 5.2.2 punktą (t. y. 25 ml);
- p – vardinė diklazurilo koncentracija premikse mg/kg.

7. Rezultatų patvirtinimas

7.1. Tapatumas

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto (5.2.1 arba 5.2.2 punktas) ir kalibravimo tirpalo (3.10.2 punktas) spektrai.

7.1.1. Kochromatografija

Ėminio ekstrakto (5.2.1 arba 5.2.2 punktas) koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.10.2 punktas) tūrį. Pridėto diklazurilo kiekis turi atitikti ėminio ekstrakto nustatytą diklazurilo kiekį.

Padidinamas tik diklazurilo ir vidinio etalono smailių aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Diklazurilo arba vidinio etalono smailių plotis jų pusaukštyje turi atitikti ėminio be pridėto diklazurilo ekstrakto smailių plotį $\pm 10\%$ tikslumu.

7.1.2. Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

- a) ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;
- b) nuo 230 nm iki 320 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis kaip 15 % etalono analitės absorbcijos vertės;
- c) nuo 230 nm iki 320 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis kaip 15 % smailės viršūnę atitinkančios absorbcijos vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2. Pakartojamumas

Dviejų nepriklausomų poėminių matavimų rezultatų skirtumas neturi būti didesnis nei:

- 30 % didesnės vertės, jei diklazurilo kiekis 0,5–2,5 mg/kg;
- 0,75 mg/kg, jei diklazurilo kiekis 2,5–5 mg/kg;
- 15 % didesnės vertės, jei diklazurilo kiekis didesnis nei 5 mg/kg.

7.3. Išgavos dydis

Išgavos dydis, gautas (tuščiajam ėminiui) su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 80 %.

8. Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai

Buvo surengti du jungtiniai lyginamieji tyrimai. Per pirmąjį tyrimą, kurį 1994 m. atliko kita laboratorijų grupė, buvo ištirti du premiksai (O 100, A 100) ir trys naminių paukščių lesalo papildų ėminiai (L1, Z1, K1). Vienas premikso ėminys sumaišytas su organine matrica (O 100), kitas – su neorganine matrica (A 100). Teorinė diklazurilo koncentracija – 100 mg/kg. Laboratorijoms buvo nurodyta kiekvieną ėminį analizuoti vieną arba du kartus. (Išsamesnė informacija apie pirmąjį jungtinį lyginamąjį tyrimą yra pateikta *Journal of AOAC International*, 77 tomas, Nr. 6, 1994 m., p. 1359–1361).

Per antrąjį jungtinį lyginamąjį tyrimą buvo ištirti trys naminių paukščių kombinuotojo lesalo ėminiai, kuriuose diklazurilo koncentracija buvo 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) ir pašaro tuščiasis ėminys (MAT 3). Išsami informacija apie antrąjį jungtinį lyginamąjį tyrimą yra pateikta *JRC Technical report* (2016 m.) ir *Journal of AOAC International*, 102 tomas, Nr. 2, 2019 m., p. 646–652. Abiejų jungtinių lyginamųjų tyrimų rezultatai pateikti lentelėje.

	1A 100 ėminys	2O 100 ėminys	3 L1 ėminys	4 Z1 ėminys	5 K1 ėminys	6 ėminys MAT 1	7 ėminys MAT 2	8 ėminys MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Vidurkis (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	—
Vardinis kiekis (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Nuoroda (*)	Pirmasis 1 994 m. tyrimas	Pirmasis 1 994 m. tyrimas	Pirmasis 1 994 m. tyrimas	Pirmasis 1 994 m. tyrimas	Pirmasis 1 994 m. tyrimas	Antrasis 2 015 m. tyrimas	Antrasis 2 015 m. tyrimas	Antrasis 2 015 m. tyrimas

- L laboratorijų skaičius
n atskirų verčių skaičius
S_r pakartojamumo standartinis nuokrypis
CV_r pakartojamumo variacijos koeficientas
S_R atkuriamumo standartinis nuokrypis
CV_R atkuriamumo variacijos koeficientas
LOQ kiekybinio nustatymo riba

(*) Pirmasis 1994 m. tyrimas: *Journal of AOAC International*, 77 tomas, Nr. 6, 1994 m., p. 1359–1361; Antrasis 2015 m. tyrimas: JRC techninė ataskaita „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study“ (2016 m.).

9. Bendrosios pastabos

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

Analizuojant diklazurilą kombinuotuosiuose pašaruose, kuriuose yra daug riebalų (šiuo tikslu daugiau kaip 12 % riebalų), analizės metodą galima pakeisti kitais HPLC pagrįstais metodais, pvz., efektyviąja skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS) pagrįstu metodu, jei alternatyvaus metodo veiksmingumo parametrai (išgavos dydis, glaudumas pakartojamumo ir atkuriamumo sąlygomis) yra lygiaverčiai.

G. NATRIO LAZALOCIDO KIEKIO NUSTATYMAS

Polieterio monokarboksirūgšties natrio druska, gauta iš Streptomyces lasaliensis

Natrio lazalocido kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba—
- atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant fluorescencinį detektorių, kaip toliau aprašyta 1–8 dalyse.

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti natrio lazalocido koncentraciją pašaruose. Aptikimo riba – 5 mg/kg, kiekybinio nustatymo riba – 10 mg/kg.

2. **Metodas**

Natrio lazalocido druska ekstrahuojama iš ėminio parūgštintu metanolio ir jos kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu naudojant fluorescencinį detektorių.

3. **Reagentai**

3.1. Kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4).

3.2. Ortofosforo rūgštis, (m/m) = 85 %.

3.3. Ortofosforo rūgšties tirpalas, c = 20 %.

23,5 ml ortofosforo rūgšties (3.2 punktas) skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

3.4. 6-metil-2-heptilaminas (1,5-dimetilheksilaminas), (m/m) = 99 %.

3.5. Metanolis, HPLC grynumo.

3.6. Vandenilio chlorido rūgštis, tankis = 1,19 g/ml.

3.7. Fosfatinis buferinis tirpalas, c = 0,01 mol/l

500 ml vandens (3.11 punktas) ištirpinama 1,36 g KH_2PO_4 (3.1 punktas), įpilama 3,5 ml ortofosforo rūgšties (3.2 punktas) ir 10,0 ml 6-metil-2-heptilamino (3.4 punktas). Ortofosforo rūgštimi (3.3 punktas) nustatoma tirpalo pH 4,0, skiedžiama vandeniu (3.11 punktas) iki 1 000 ml.

3.8. Parūgštintas metanolis

Į 1 000 ml matavimo kolbą įpilama 5,0 ml vandenilio chlorido rūgšties (3.6 punktas), skiedžiama metanolio (3.5 punktas) iki žymos ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.9. HPLC judančioji fazė, fosfatinio buferinio tirpalo ir metanolio mišinys 5 + 95 (V + V)

5 ml fosfatinio buferinio tirpalo (3.7 punktas) sumaišoma su 95 ml metanolio (3.5 punktas).

3.10. Garantuoto grynumo natrio lazalocido standartinė medžiaga, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (polieterio monokarboksirūgšties natrio druska, gauta iš *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Natrio lazalocido pradinis standartinis tirpalas, 500 µg/ml

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriamą 50 mg natrio lazalocido (3.10 punktas), ištirpinama parūgštintame metanolyje (3.8 punktas), iki žymos skiedžiama tuo pačiu tirpikliu ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.10.2. Natrio lazalocido tarpinis standartinis tirpalas, 50 µg/ml

Į 100 ml matavimo kolbą pipete paimama 10 ml natrio lazalocido pradinio standartinio tirpalo (3.10.1 punktas), iki žymos skiedžiama parūgštintu metanolio (3.8 punktas) ir sumaišoma. Šis tirpalas turi būti ruošiamas prieš pat naudojimą.

3.10.3. Kalibravimo tirpalai

Į keletą 50 ml matavimo kolbų įpilama 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ir 10,0 ml tarpinio standartinio tirpalo (3.10.2 punktas). Skiedžiama iki žymės parūgštintu metanolio (3.8 punktas) ir sumaišoma. Natrio lazalocido koncentracija šiuose tirpaluose yra atitinkamai 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ir 10,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.11. Vanduo, HPLC grynumo.

4. Aparatūra

4.1. Ultragarso vonia (arba purtoma vandens vonia) su temperatūros reguliavimu.

4.2. Membraninis filtras, 0,45 µm.

4.3. HPLC įranga su įpurškimo sistema, kuria būtų galima įpurkšti 20 µl tūrį.

4.3.1. Atvirkštinių fazių skysčių chromatografijos kolonėlė, 125 mm × 4 mm, C₁₈, 5 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.

4.3.2. Reguliuojamo sužadavimo ir emisijos bangų ilgio fluorescencinis detektorius.

5. Procedūra

5.1. Bendrosios nuostatos

5.1.1. Pašaro tuščiasis ėminys

Norint nustatyti išgavos dydį (5.1.2 punktas), analizuojamas pašaro tuščiasis ėminys, siekiant patikrinti, ar jame nėra natrio lazalocido ir trukdančių cheminių medžiagų. Taikant šį metodą pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir atliekant analizę jame neaptinkama natrio lazalocido arba trukdančių medžiagų.

5.1.2. Išgavos dydžio nustatymo bandymas

Analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant natrio lazalocido, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje, nustatomas išgavos dydis. Norint gauti 100 mg/kg koncentraciją, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 10,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.10.1 punktas) ir tirpalas išgarinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 50 g pašaro tuščiojo ėminio, gerai sumaišoma ir paliekama 10 min. Prieš ekstrahavimą (5.2 punktas) dar keletą kartų maišoma.

Jei nėra pašaro tuščiojo ėminio, kuris būtų panašus į ėminio pašarą (žr. 5.1.1 punktą), išgavos dydį galima nustatyti, taikant etalono pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą ėminį pridedamas natrio lazalocido kiekis, maždaug atitinkantis natrio lazalocido kiekį ėminyje. Šis ėminys analizuojamas kartu su ėminiu be pridėto natrio lazalocido ir išgavos dydis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2. Ekstrahavimas

5.2.1. Pašarai

Į užkemšamą 250 ml kūginę kolbą 0,01 g tikslumu pasverama 5–10 g ėminio. Įpilama 100 ml parūgštinto metanolio (3.8 punktas). Kolba užkemšama ir sukama, kad ėminys galėtų susimaišyti. Kolba 20 min. dedama į ultragarso vonią (4.1 punktas), kurioje yra maždaug 40 °C temperatūra, tada išimama ir atvėsinama iki kambario temperatūros. Kolba paliekama maždaug 1 val., kad nusėstų suspenduotos medžiagos. Alikvotinė ekstrakto dalis filtruojama į tinkamą indą per 0,45 µm membraninį filtrą (4.2 punktas). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3 punktas).

5.2.2. Premiksai

Į 250 ml matavimo kolbą 0,001 g tikslumu pasverama apie 2 g nesmulkinto premikso. Įpilama 100 ml parūgštinto metanolio (3.8 punktas). Kolba sukama, kad ėminys galėtų susimaišyti. Kolba 20 min. dedama į ultragarso vonią (4.1 punktas), kurioje yra maždaug 40 °C temperatūra, tada išimama ir atvėsinama iki kambario temperatūros. Iki žymos skiedžiama parūgštintu metanolio (3.8 punktas) ir gerai sumaišoma. Kolba paliekama maždaug 1 val., kad nusėstų suspenduotos medžiagos, tada alikvotinė ekstrakto dalis filtruojama per 0,45 µm membraninį filtrą (4.2 punktas). Tinkamas skaidraus filtrato tūris skiedžiamas parūgštintu metanolio (3.8 punktas), kad natrio lazalocido koncentracija galutiniame bandymo tirpale būtų apie 4 µg/ml. Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3 punktas).

5.3. HPLC nustatymas

5.3.1. Parametrai

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

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.3.1 punktas):	125 mm × 4 mm, atvirkštinių fazių, C ₁₈ , 5 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
udančioji fazė (3.9 punktas):	fosfatinio buferinio tirpalo (3.7 punktas) ir metanolio (3.5 punktas) mišinys, 5 + 95 (V + V)
Srautas:	1,2 ml/min
Detektoriaus bangų ilgiai:	sužadinimas: 310 nm emisija: 419 nm
Įpurškiamas tūris:	20 µl

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 4,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.10.3 punktas) tol, kol nustoją keistis smailės aukščio (arba ploto) ir sulaukymo trukmės vertės.

5.3.2. Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.10.3 punktas) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių (arba plotų) vidurkiai, o absčių ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.3.3. Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiama ėminio ekstrakto tirpalo, gauto pagal 5.2.1 arba 5.2.2 punktą, kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalų tūrį, ir nustatomas natrio lazalocido smailių vidutiniai smailės aukščiai (plotai).

6. Rezultatų apskaičiavimas

Natrio lazalocido koncentracija (µg/ml) nustatoma pagal įpurkšto ėminio tirpalo (5.3.3 punktas) smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę.

6.1. Pašarai

Natrio lazalocido kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

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

kurioje:

c = natrio lazalocido koncentracija ėminio tirpale (5.2.1 punktas) µg/ml;

V₁ = ėminio ekstrakto pagal 5.2.1 tūris ml (t. y. 100);

m = tiriamosios dalies svoris g.

6.2. Premiksai

Natrio lazalocido kiekis w (mg/kg) ėminyje nustatomas pagal šią formulę:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

kurioje:

- c = natrio lazalocido koncentracija ėminio tirpale (5.2.2 punktas) $\mu\text{g/ml}$;
- V_2 = ėminio ekstrakto pagal 5.2.2 punktą tūris ml (t. y. 250);
- f = praskiedimo faktorius pagal 5.2.2 punktą;
- m = tiriamosios dalies svoris g.

7. Rezultatų patvirtinimas

7.1. Tapatumas

Spektrofluorimetrija pagrįsti metodai mažiau jautrūs trukdžiams palyginti su metodais, kuriuose naudojamas ultravioletinis detektorius. Analitės tapatumas gali būti patvirtintas kochromatografijos metodu.

7.1.1. Kochromatografija

Ėminio ekstrakto (5.2.1 arba 5.2.2 punktas) koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.10.3 punktas) tūrį. Pridėto natrio lazalocido kiekis turi atitikti ėminio ekstrakto nustatytą natrio lazalocido kiekį. Padidinamas tik natrio lazalocido smailių aukštis, atsižvelgiant į pridėtą natrio lazalocido kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje turi atitikti ėminio be pridėto natrio lazalocido ekstrakto smailių plotį $\pm 10\%$ tikslumu.

7.2. Pakartojamumas

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

- 15 % didesnės vertės, jei natrio lazalocido kiekis 30–100 mg/kg;
- 15 mg/kg, jei natrio lazalocido kiekis 100–200 mg/kg;
- 7,5 % didesnės vertės, jei natrio lazalocido kiekis didesnis nei 200 mg/kg.

7.3. Išgavos dydis

Išgavos dydis, gautas (tuščiajam ėminiui) su analitės priedu, yra ne mažesnis kaip 80 %. Išgavos dydis, gautas premiksams su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

8. Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai

Buvo atliktas jungtinis lyginamasis tyrimas (*), per kurį dvylika laboratorijų analizavo dviejų rūšių premiksus (1 ir 2 ėminiai) ir penkių rūšių pašarą (3–7 ėminiai). Kiekvienas ėminys buvo analizuojamas du kartus. Rezultatai pateikiami šioje lentelėje:

	1 ėminys Premiksas viščiukams	2 ėminys Premiksas kalakutams	3 ėminys Granuliuo- tas lesalas kalakutams	4 ėminys Trupininis lesalas viščiukams	5 ėminys Lesalas kalakutams	6 ėminys Lesalas naminiams paukš- čiams A	7 ėminys Lesalas naminiams paukščiams B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Vidurkis [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6

s _r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV _r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s _R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV _R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Vardinis kiekis [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (')	35 (')
L	laboratorių skaičius						
n	atskirų rezultatų skaičius						
s _r	pakartojamumo standartinis nuokrypis						
s _R	atkuriamumo standartinis nuokrypis						
CV _r	pakartojamumo variacijos koeficientas %						
CV _R	atkuriamumo variacijos koeficientas %						
(*)	Analyst, 1995 m., 120, p. 2175–2180.						
(**)	Gamintojo nurodytas kiekis.						
(')	Laboratorijoje paruoštas pašaras.						

H. AMPROLIUMO VANDENILIO CHLORIDO KIEKIO NUSTATYMAS

1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinio chlorido monohidrochloridas

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu galima nustatyti amproliumo koncentraciją pašaruose. Aptikimo riba – 1 mg/kg, kiekybinio nustatymo riba – 5 mg/kg.

2. Metodas

Ėminys ekstrahuojamas metanolio ir vandens mišiniu. Ekstraktas skiedžiamas judančiąja faze, filtruojamas per membraninį filtrą ir amproliumo kiekis nustatomas katijonų mainų efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, naudojant ultravioletinį detektorių.

3. Reagentai

3.1. Metanolis.

3.2. Acetonitrilas, HPLC grynumo.

3.3. Vanduo, HPLC grynumo.

3.4. Natrio dihidrofosfato tirpalas, c = 0,1 mol/l

Vandenyje (3.3 punktas) ištirpinama 13,80 g natrio dihidrofosfato monohidrato, 1 000 ml matavimo kolboje skiedžiama vandeniu iki žymės (3.3 punktas) ir sumaišoma.

3.5. Natrio perchlorato tirpalas, c = 1,6 mol/l

Vandenyje (3.3 punktas) ištirpinama 224,74 g natrio perchlorato monohidrato, 1 000 ml matavimo kolboje skiedžiama vandeniu iki žymės (3.3 punktas) ir sumaišoma.

3.6. HPLC judančioji fazė (žr. 9.1 punkto pastabą).

Acetonitrilo (3.2 punktas), natrio dihidrofosfato tirpalo (3.4 punktas) ir natrio perchlorato tirpalo (3.5 punktas) mišinys, 450 + 450 + 100 (V + V + V). Prieš naudojimą tirpalas filtruojamas per 0,22 µm membraninį filtrą (4.3 punktas) ir bent 15 min. degazuojamas (pvz., ultragarso vonioje (4.4 punktas)).

3.7. Standartinė medžiaga: grynas amproliumas, 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinio chloridas, E 750 (žr. 9.2 punktą).

3.7.1. Amproliumo pradinis standartinis tirpalas, 500 µg/ml.

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

3.7.2. Amproliumo tarpinis standartinis tirpalas, 50 µg/ml

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

3.7.3. Kalibravimo tirpalai

Į 50 ml matavimo kolbas įpilama 0,5, 1,0 ir 2,0 ml tarpinio standartinio tirpalo (3.7.2 punktas). Skiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.6 punktas) ir sumaišoma. Šie tirpalai atitinka 0,5, 1,0 ir 2,0 µg/ml amproliumo. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

3.8. Ekstrahavimo tirpiklis

Metanolio (3.1 punktas) ir vandens mišinys 2 + 1 (V + V).

4. **Aparatūra**

4.1. HPLC įranga su įpurškimo sistema, kuria būtų galima įpurkšti 100 µl tūrį.

4.1.1. Skysčių chromatografijos kolonėlė 125 mm × 4 mm, katijonitas Nucleosil 10 SA, 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė.

4.1.2. Reguliuojamo bangos ilgio ultravioletinis detektorius arba diodų matricos detektorius.

4.2. Membraninis filtras, medžiaga – PTFE, 0,45 µm.

4.3. Membraninis filtras (0,22 µm).

4.4. Ultragarso vonia.

4.5. Mechaninė purtyklė arba magnetinė maišyklė.

5. **Procedūra**

5.1. *Bendrosios nuostatos*

5.1.1. Pašaro tuščiasis ėminys

Norint nustatyti išgavos dydį (5.1.2 punktas) atliekama pašaro tuščiojo ėminio analizė, siekiant patikrinti, ar nėra amproliumo arba trukdančiųjų medžiagų. Pašaro tuščiasis ėminys atitinka ėminio tipą ir jame neturi būti aptikta amproliumo arba trukdančiųjų medžiagų.

5.1.2. Išgavos dydžio nustatymo bandymas

Išgavos dydis nustatomas analizuojant pašaro tuščiąjį ėminį, į jį pridedant amproliumo, kurio kiekis būtų panašus į kiekį ėminyje. 100 mg/kg koncentracijai gauti, į 250 ml kūginę kolbą įpilama 10,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.7.1 punktas) ir tirpalas garinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 50 g pašaro tuščiojo ėminio, gerai sumaišoma ir paliekama 10 min. Prieš ekstrahavimą (5.2 punktas) dar keletą kartų maišoma.

Jei nėra pašaro tuščiojo ėminio, kuris būtų panašus į ėminio pašarą (žr. 5.1.1 punktą), išgavos dydį galima nustatyti, taikant etalono pridėjimo metodą. Šiuo atveju į analizuojamą ėminį pridedamas amproliumo kiekis, maždaug atitinkantis amproliumo kiekį ėminyje. Šis ėminys analizuojamas kartu su ėminiu be pridėto amproliumo ir išgavos dydis gali būti apskaičiuotas iš skirtumo.

5.2. Ekstrahavimas

5.2.1. Premiksai (amproliumo kiekis < 1 %) ir pašarai

Atsižvelgiant į amproliumo kiekį, į 500 ml kūginę kolbą 0,01 g tikslumu pasverama 5–40 g ėminio ir įpilama 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.8 punktas). Kolba įdedama į ultragarso vonią (4.4 punktas) ir laikoma 15 min. Kolba išimama iš ultragarso vonios ir 1 val. purtoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.5 punktas). Alikvotinė ekstrakto dalis skiedžiama judančiąja faze (3.6 punktas), kad amproliumo koncentracija būtų 0,5–2 µg/ml, ir sumaišoma (žr. 9.3 punkto pastabą). 5–10 ml šio praskiesto tirpalo filtruojama per membraninį filtrą (4.2 punktas). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3 punktas).

5.2.2. Premiksai (amproliumo kiekis ≥ 1 %)

Atsižvelgiant į amproliumo kiekį, į 500 ml kūginę kolbą 0,001 g tikslumu pasverama 1–4 g ėminio ir įpilama 200 ml ekstrahavimo tirpiklio (3.8 punktas). Kolba įdedama į ultragarso vonią (4.4 punktas) ir laikoma 15 min. Kolba išimama iš ultragarso vonios ir 1 val. purtoma ant purtyklės arba maišoma magnetine maišykle (4.5 punktas). Alikvotinė ekstrakto dalis skiedžiama judančiąja faze (3.6 punktas), kad amproliumo koncentracija būtų 0,5–2 µg/ml, ir sumaišoma. 5–10 ml šio praskiesto tirpalo filtruojama per membraninį filtrą (4.2 punktas). Toliau analizuojama HPLC metodu (5.3 punktas).

5.3. HPLC nustatymas

5.3.1. Parametrai

Rekomenduojamos toliau nurodytos sąlygos; gali būti taikomos kitos sąlygos, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai.

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.1.1 punktas):	125 mm × 4 mm, katijonitas Nucleosil 10 SA, 5 arba 10 µm įkrova, arba lygiavertė kolonėlė
Judančioji fazė (3.6 punktas):	acetonitrilo (3.2 punktas), natrio dihidrofosfato tirpalo (3.4 punktas) ir natrio perchlorato tirpalo (3.5 punktas) mišinys, 450 + 450 + 100 (V + V + V)
Srautas:	0,7–1 ml/min
Detektoriaus bangos ilgis:	264 nm
Įpurškiamas tūris:	100 µl

Tikrinamas chromatografijos sistemos stabilumas, kelis kartus įpurškiant 1,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3 punktas) tol, kol nustoja keistis smailės aukščio ir sulaikymo trukmės vertės.

5.3.2. Kalibravimo kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.7.3 punktas) įpurškiamas kelis kartus ir matuojami kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Brėžiama kalibravimo kreivė, kurios ordinačių ašyje – kalibravimo tirpalų smailių aukščių (plotų) vidurkiai, o absčių ašyje – atitinkama koncentracija µg/ml.

5.3.3. Ėminio tirpalas

Kelis kartus įpurškiamas ėminio ekstraktas (5.2 punktas), kurio tūris atitinka kalibravimo tirpalo tūrį, ir matuojamas amproliumo smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. Rezultatų apskaičiavimas

Ėminio tirpalo koncentracija µg/ml nustatoma pagal ėminio tirpalo amproliumo smailių vidutinį aukštį (plotą) ir kalibravimo kreivę (5.3.2 punktas).

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

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

kurioje:

- V = ekstrakavimo tirpiklio (3.8 punktas) tūris ml pagal 5.2 punktą (t. y. 200 ml);
c = amproliumo koncentracija ėminio ekstrakte (5.2 punktas) µg/ml;
f = praskiedimo faktorius pagal 5.2 punktą;
m = tiriamosios dalies svoris g.

7. Rezultatų patvirtinimas

7.1. Tapatumas

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas taikant kochromatografiją arba naudojant diodų matricos detektorių, kuriuo lyginami ėminio ekstrakto (5.2 punktas) ir 2,0 µg/ml koncentracijos kalibravimo tirpalo (3.7.3 punktas) spektrai.

7.1.1. Kochromatografija

Ėminio ekstrakto (5.2 punktas) koncentracija padidinama, įpilant reikiamą kalibravimo tirpalo (3.7.3 punktas) tūrį. Pridėto amproliumo kiekis turi atitikti ėminio ekstrakto nustatytą amproliumo kiekį.

Padidindamas tik amproliumo smailės aukštis, įvertinant pridėtą kiekį ir ekstrakto praskiedimą. Smailės plotis jos pusaukštyje ± 10 % tikslumu turi atitikti ekstrakto be pridėto amproliumo smailės pradinį plotį.

7.1.2. Aptikimas naudojant diodų matricą

Rezultatai įvertinami pagal šiuos kriterijus:

- ėminio ir etalono spektrų didžiausios absorbcijos bangos ilgis, užrašomas kaip chromatogramos smailės viršūnės bangos ilgis, turi būti vienodas paklaidos ribose, kurias lemia aptikimo sistemos skiriamoji geba. Diodų matricos detektoriaus tipinė vertė būtų ± 2 nm;
- nuo 210 nm iki 320 nm ėminio ir etalono spektras, užrašytas apie chromatogramos smailės viršūnę, šioms spektro dalims turi nesiskirti 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir jokiame matavimo taške dviejų spektrų skirtumas nėra didesnis kaip 15 % etalono analitės absorbcijos vertės;
- nuo 210 nm iki 320 nm ėminio ekstraktui gautos smailės kylančios, viršūnės ir nusileidžiančios dalių spektrai šioms spektro dalims turi nesiskirti vienas nuo kito 10–100 % santykinės absorbcijos intervale. Šis kriterijus vykdomas, kai yra tie patys maksimumai ir visuose stebimuose taškuose spektrų skirtumas yra ne didesnis kaip 15 % smailės viršūnę atitinkančios absorbcijos vertės.

Jei vienas iš šių kriterijų nevykdomas, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2. Pakartojamumas

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

- 15 % didesnės vertės, jei amproliumo kiekis 25–500 mg/kg;
- 75 mg/kg, jei amproliumo kiekis 500–1 000 mg/kg;
- 7,5 % didesnės vertės, jei amproliumo kiekis didesnis nei 1 000 mg/kg.

7.3. Išgavos dydis

Išgavos dydis, gautas (tuščiajam ėminiui) su analitės priedu, yra ne mažesnis nei 90 %.

8. Jungtinio lyginamojo tyrimo rezultatai

Buvo atliktas jungtinis lyginamasis tyrimas, per kurį buvo analizuojamas trijų rūšių naminių paukščių pašaras (1–3 ėminiai), vienas mineralinis pašaras (4 ėminys) ir vienas premiksas (5 ėminys). Rezultatai pateikiami šioje lentelėje:

	1 ėminys (pašaro tuščiasis ėminys)	2 ėminys	3 ėminys	4 ėminys	5 ėminys
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
vidurkis [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
vardinis kiekis [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000
L	laboratorių skaičius				
n	atskirų verčių skaičius				
s _r	pakartojamumo standartinis nuokrypis				
CV _r	pakartojamumo variacijos koeficientas				
s _R	atkuriamumo standartinis nuokrypis				
CV _R	atkuriamumo variacijos koeficientas				

9. Pastabos

- 9.1. Jei ėminyje yra tiamino, chromatogramoje prieš pat amproliumo smailę atsiranda tiamino smailė. Taikant šį metodą, amproliumas ir tiaminas turi būti atskirti. Jei amproliumas ir tiaminas neatsiskiria šiam metodui naudojamose kolonėlėse (4.1.1 punktas), iki 50 % acetonitrilo, sudarančio judančiąją fazę (3.6 punktas), pakeičiama metanolio.
- 9.2. Pagal Didžiosios Britanijos farmakopėją, amproliumo tirpalo (c = 0,02 mol/l) vandenilio chlorido rūgštyje (c = 0,1 mol/l) spektras turi maksimumus, atitinkančius 246 nm ir 262 nm. Absorbicija turi būti apie 0,84 esant 246 nm, ir 0,80 esant 262 nm.
- 9.3. Ekstraktas visuomet turi būti skiedžiamas judančiąja faze, nes kitaip amproliumo smailės sulaikymo trukmė gali stipriai pasikeisti dėl joninės jėgos pokyčio.

I. NARAZINO KIEKIO NUSTATYMAS

Narazino kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba —
- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN ISO 14183 „Pašarai. Monensino, narazino ir salinomicino kiekio nustatymas. Skysčių chromatografijos metodas, taikant pokolonėlinę derivatizaciją“.

J. NIKARBAZINO KIEKIO NUSTATYMAS

Nikarbazino kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 15782 „Pašarai. Nikarbazino nustatymas. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodas“.

K. DEKOKVINATO KIEKIO NUSTATYMAS

Dekokvinato kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba—
- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 16162 „Pašarai. Dekokvinato nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, taikant fluorescencinį aptikimą“.

L. MONENZINO KIEKIO NUSTATYMAS

Monenzino kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba—
- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN ISO 14183 „Pašarai. Monenzino, narazino ir salinomicino kiekio nustatymas. Skysčių chromatografijos metodas, taikant pokolonėlinę derivatizaciją“.

M. SALINOMICINO KIEKIO NUSTATYMAS

Salinomicino kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba—
- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN ISO 14183 „Pašarai. Monensino, narazino ir salinomicino kiekio nustatymas. Skysčių chromatografijos metodas, taikant pokolonėlinę derivatizaciją“.

N. SEMDURAMICINO KIEKIO NUSTATYMAS

Semduramicino kiekis nustatomas:

- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 17299 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Leidžiamų kokcidiostatų, kurie yra priedų koncentracijos ir 1 % bei 3 % koncentracijos dėl kryžminės pernašos, ir mažesnės nei priedų koncentracijos neregistruotų kokcidiostatų bei antibiotiko paieška ir nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir dvigubąją masių spektrometriją (LC-MS/MS)“, arba —
- taikant analizės metodą, nustatytą standarte EN 16158 „Pašarai. Semduramicino kiekio nustatymas. Skysčių chromatografijos metodas, naudojant analizinį medžio būdą“.

O. EN STANDARTAI

Taikant Reglamento (ES) 2017/625 34 straipsnio 2 dalies a punktą, yra svarbūs šie EN standartai:

EN ISO 30024 „Pašarai. Fitazės aktyvumo nustatymas“.

EN 17050 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Jodo nustatymas pašaruose taikant induktyviai susietos plazmos masių spektrometriją (ICP-MS)“.

EN 17550 „Pašarai. Karotenoidų nustatymas kombinuotuosiuose pašaruose ir premiksuose taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir ultravioletinį aptikimą (HPLC-UV)“.

EN 15784 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kaip pašaro priedas naudojamų bacilų porūšių aptikimas ir skaičiavimas“.

EN 15785 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Bifidobakterijų porūšių atskyrimas ir skaičiavimas“.

EN 15786 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kaip pašaro priedas naudojamų pediokokų porūšių aptikimas ir skaičiavimas“.

EN 15787 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kaip pašaro priedas naudojamų laktobacilų porūšių aptikimas ir skaičiavimas“.

EN 15788 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kaip pašaro priedas naudojamų enterokokų (*E. faecium*) porūšių aptikimas ir skaičiavimas“.

EN 15789 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kaip pašaro priedas naudojamų alaus mielių (*Saccharomyces cerevisiae*) aptikimas ir skaičiavimas“.

EN 15510 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kalcio, natrio, fosforo, magnio, kalio, geležies, cinko, vario, mangano, kobalto, molibdeno ir švino nustatymas induktyviai susietos plazmos atominės emisinės spektroskopijos metodu (ICP-AES)“.

EN 15621 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kalcio, natrio, fosforo, magnio, kalio, sieros, geležies, cinko, vario, mangano ir kobalto nustatymas induktyviai susietos plazmos atominės emisinės spektrometrijos metodu (ICP-AES), mineralizavus aukštame slėgyje“.

EN 16159 „Pašarai. Seleno nustatymas atominės absorbcinės spektrometrijos metodu generuojant hidridą (HGAAS), atlikus mikrobanginę hidrolizę (šlapiam skaidymui naudojant 65 % nitrato rūgštį ir 30 % vandenilio peroksidą)“.

EN 17053 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Mikroelementų, sunkiųjų metalų ir kitų elementų nustatymas pašaruose taikant induktyviai susietos plazmos masių spektrometriją (ICP-MS) (daugialypis metodas)“.

V PRIEDAS

„V PRIEDAS

ANALIZĖS METODAI NEPAGEIDAJAMOMS MEDŽIAGOMS PAŠARUOSE KONTROLIUOTI

A. DIOKsinŲ (PCDD/PCDF) IR PCB KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS

I SKYRIUS

ĖMINIŲ ĖMIMO METODAI IR ANALIZĖS REZULTATŲ AIŠKINIMAS

1. Taikymo sritis ir apibrėžtys

Ėminiai, skirti polichlorintų dibenzo-p-dioksinų (PCDD), polichlorintų dibenzofuranų (PCDF), dioksinų tipo polichlorintų bifenilų (PCB) ⁽¹⁾ ir ne dioksinų tipo PCB koncentracijai pašaruose oficialiai kontroliuoti, imami vadovaujantis I priedo nuostatomis. Pašaruose tolygiai pasiskirsčiusių medžiagų arba produktų kontrolei taikomi kiekybiniai reikalavimai, kaip nustatyta I priedo 5.1 punkte. Laikoma, kad tokiais metodais paimti jungtiniai ėminiai yra reprezentatyvieji partijų arba jų dalių, iš kurių jie paimti, ėminiai. Ar jie atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją, nustatytą Direktyva 2002/32/EB, vertinama pagal laboratoriniuose ėminiuose nustatytą koncentraciją.

Šioje dalyje vartojamų terminų apibrėžtys nustatytos Komisijos įgyvendinimo reglamento (ES) 2021/808 ⁽²⁾ I priede.

Be tų terminų apibrėžčių šioje dalyje vartojamos toliau išvardytos apibrėžtys.

⁽¹⁾ PCDD, PCDF ir dioksinų tipo PCB TEF (toksiškumo ekvivalento faktorių) lentelė. PSO TEF, skirti žmonėms keliamai rizikai vertinti, pagrįsti Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) tarptautinės cheminės saugos programos (IPCS) specialistų posėdžio, surengto 2005 m. birželio mėn. Ženevoje, išvadomis (Martin van den Berg et al., *The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds*. *Toxicological Sciences* 93(2), 223–241 (2006 m.)).

Giminingas junginys	TEF vertė	Giminingas junginys	TEF vertė
Dibenzo-p-dioksinai (PCDD) ir dibenzo-p-furanai (PCDF)		Dioksinų tipo PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Ne orto PCB + mono-orto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Vartojamos santrumpos: T – tetra, Pe – penta, Hx – hekso, Hp – hepta, O – okta, CDD – chlordibenzodioksinas, CDF – chlordibenzofuranas, CB – chlorbifenilas.

⁽²⁾ 2021 m. kovo 22 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2021/808 dėl maistiniams gyvūnams skiriamų farmakologiškai aktyvių medžiagų liekanų analizės metodų veiksmingumo bei rezultatų aiškinimo ir dėl mėginių ėmimo metodų, kuriuo panaikinami sprendimai 2002/657/EB ir 98/179/EB (OL L 180, 2021 5 21, p. 84).

Atrankiniai metodai – metodai, naudojami atrinkti tuos ėminius, kuriuose PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracija viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygi, kurį pasiekus imamasi priemonių. Jie leidžia pasiekti didelį ekonominį efektyvumą ir našumą ir taip padidinti tikimybę aptikti naujus aktyvius cheminės medžiagos ekspozicijos ir rizikos vartotojų sveikatai šaltinius. Atrankiniai metodai grindžiami bioanalitiniais arba GC-MS metodais. Siekiant nustatyti atitiktį didžiausiai leidžiamajai koncentracijai tikrinami ribinė vertę viršijantys ėminių tyrimo rezultatai – atliekama išsami pakartotinė pirminio ėminio analizė taikant patvirtinamąjį metodą.

Patvirtinamieji metodai – metodai, suteikiantys visą informaciją arba papildomos informacijos, kuri leidžia vienareikšmiškai identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB, kurių kiekis atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba, kai reikia, lygi, kurį pasiekus imamasi priemonių. Taikant šiuos metodus naudojama dujų chromatografija ir didelės skynos masių spektrometrija (GC-HRMS) arba dujų chromatografija ir dviguboji masių spektrometrija (GC-MS/MS).

2. Partijos arba jos dalies atitiktis didžiausiai leidžiamajai koncentracijai

2.1. Ne dioksinų tipo PCB

Partija arba jos dalis atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją, jeigu, atsižvelgiant į išplėstinę matavimo neapibrėžtį, PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 ir PCB 180 (toliau – ne dioksinų tipo PCB) sumos analizės rezultatai neviršija didžiausios leidžiamosios koncentracijos, nustatytos Direktyva 2002/32/EB ⁽³⁾ Partija arba jos dalis neatitinka Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios koncentracijos, jeigu dviejų viršutinių ribinių ⁽⁴⁾ analizės rezultatų vidurkis, atlikus kartotinę analizę ⁽⁵⁾, atsižvelgiant į išplėstinę matavimo neapibrėžtį, be pagrįstos abejonės viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją, t. y. atitiktčiai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija, atėmus išplėstinę matavimo neapibrėžtį.

Išplėstinę matavimo neapibrėžtis apskaičiuojama taikant aprėpties faktorių 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasiklovimo lygmuo. Partija arba jos dalis neatitinka reikalavimų, jei išmatuotų verčių vidurkis, atėmus vidurkio išplėstinę neapibrėžtį, yra didesnis už didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

Ankstesnėse šio punkto pastraipose nurodytos taisyklės taikomos analizės rezultatui, kuris gaunamas tiriant oficialiai kontrolei skirtą ėminį. Jeigu analizė atliekama siekiant gauti antrojo eksperto nuomonę arba informacijos tikslais, taikomos nacionalinės taisyklės.

2.2. Dėl PCDD/F ir dioksinų tipo PCB

Partija arba jos dalis atitinka didžiausią leidžiamąją koncentraciją, jeigu pavienės analizės rezultatas:

- gautas taikant atrankinį metodą, kai klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis mažesnė nei 5 %, rodo, kad, koncentracija neviršija atitinkamos Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios PCDD/F koncentracijos ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracijos,
- gautas taikant patvirtinamąjį metodą, neviršija atitinkamos Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios PCDD/F koncentracijos ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracijos, atsižvelgiant į išplėstinę matavimo neapibrėžtį.

⁽³⁾ Kai taikoma, turėtų būti vadovaujama dokumente „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) nurodytais principais.

⁽⁴⁾ Vartojant sampratą „viršutinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto giminingo junginio indėlis turi būti prilyginamas kiekybinio nustatymo ribai. Vartojant sampratą „apatinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto giminingo junginio indėlis turi būti prilyginamas nulinę ribai. Vartojant sampratą „vidurinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto giminingo junginio indėlis turi būti prilyginamas pusei kiekybinio nustatymo ribos.

⁽⁵⁾ Kartotinė analizė – atskira tiriamųjų analizių analizė naudojant to paties homogenizuoto ėminio antrą alikvotinę dalį. Paprastai kartotinei analizei taikomi reikalavimai, nustatyti II priedo C skyriaus 3 punkte. Tačiau taikant metodus, naudojant vidinį etaloną su žymėjais ¹³C atomais atitinkamoms analitėms, kartotinė analizė būtina tik tuomet, jeigu pirmojo nustatymo rezultatas neatitinka didžiausios leidžiamosios koncentracijos. Kartotinė analizė yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinės tarpusavio taršos arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Jeigu analizė atliekama nustačius atsitiktinę taršą ir galima atsekti, kad analizei paimti ėminiai yra susiję su tarša, o nustatyta koncentracija yra daug didesnė nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, to nereikia patvirtinti atliekant kartotinę analizę.

Atliekant atrankinius tyrimus nustatoma ribinė vertė, siekiant priimti sprendimą dėl ėminių atitikties atitinkamai nustatyti PCDD/F arba PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos didžiausiai leidžiamajai koncentracijai.

Partija arba jos dalis neatitinka Direktyva 2002/32/EB nustatytos didžiausios leidžiamosios koncentracijos, jeigu, taikant patvirtinamąjį metodą dviejų viršutinių ribinių ⁽⁶⁾ analizės rezultatų vidurkis, atlikus kartotinę analizę ⁽⁷⁾, atsižvelgiant į išplėstinę matavimo neapibrėžtį, be pagrįstos abejonės viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją, t. y. atitiktčiai įvertinti naudojama analizuojant gauta koncentracija, atėmus išplėstinę matavimo neapibrėžtį.

Išplėstinę matavimo neapibrėžtis apskaičiuojama taikant aprėpties faktorių 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasiklivimo lygmuo. Partija arba jos dalis neatitinka reikalavimų, jei išmatuotų verčių vidurkis, atėmus vidurkio išplėstinę neapibrėžtį, yra didesnis už didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

Siekiant nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumą naudojama PCDD/F ir dioksinų tipo PCB atskirų analizės rezultatų išplėstosios neapibrėžties suma.

Ankstesnėse šio punkto pastraipose nurodytos taisyklės taikomos analizės rezultatui, kuris gaunamas tiriant oficialiai kontrolei skirtą ėminį. Jeigu analizė atliekama atsiliepimo į ieškinį arba informacijos tikslais, taikomos nacionalinės taisyklės.

3. **Rezultatai, viršijantys direktyvos 2002/32/EB II priede nustatytą lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių**

Lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, taikymas padeda atrinkti ėminius tais atvejais, kai svarbu nustatyti taršos šaltinį ir imtis priemonių sumažinti ar pašalinti taršą. Taikant atrankinius metodus nustatomos atitinkamos ribinės tų ėminių atrankos vertės. Jeigu taršos šaltiniui nustatyti ir taršai sumažinti ar pašalinti reikia didelių pastangų, tikslinga patvirtinti lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijimą kartotinė analizė, taikant patvirtinamąjį metodą ir atsižvelgiant į išplėstinę matavimo neapibrėžtį ⁽⁸⁾.

II SKYRIUS

ĖMINIŲ RUOŠIMAS IR REIKALAVIMAI, KELIAMSI ANALIZĖS METODAMS, KURIE TAIKOMI VYKDANT OFICIALIĄ DIOKsinŲ (PCDD/F) IR DIOKsinŲ TIPO PCB KONCENTRACIJOS PAŠARUOSE KONTROLĘ

1. **Taikymo sritis**

Šiame skyriuje nustatyti reikalavimai taikomi, kai pašarai tiriami vykdant oficialią 2,3,7,8 padėtyse pakeistų PCDD/F ir dioksinų tipo PCB kontrolę ir atsižvelgiant į ėminių ruošimo ir analizės reikalavimus, taikomus kitais reguliavimo tikslais, įskaitant pašarų ūkio subjekto atliekamą kontrolę, kuria siekiama užtikrinti atitiktį Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 183/2005 ⁽⁹⁾ nuostatomis.

PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracijos pašaruose stebėsena gali būti atliekama taikant dviejų skirtingų tipų analizės metodus:

⁽⁶⁾ Vartojant sampratą „viršutinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto giminingo junginio indėlis į toksiškumo ekvivalentą (toliau – TEQ) turi būti prilyginamas kiekybinio nustatymo ribai. Vartojant sampratą „apatinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto giminingo junginio indėlis į TEQ turi būti prilyginamas nulinei ribai. Vartojant sampratą „vidurinė ribinė koncentracija“, kiekvieno kiekybiškai nenustatyto giminingo junginio indėlis į TEQ turi būti prilyginamas pusei kiekybinio nustatymo ribos.

⁽⁷⁾ Paprastai kartotinei analizei taikomi reikalavimai, nustatyti II priedo C skyriaus 3 punkte. Tačiau taikant patvirtinamuosius metodus, naudojant vidinį etaloną su žymėtais ¹³C atomais atitinkamoms analitėms, kartotinė analizė būtina tik tuomet, jeigu pirmojo nustatymo rezultatas neatitinka didžiausios leidžiamosios koncentracijos. Kartotinė analizė yra būtina tam, kad būtų pašalinta ėminių vidinės tarpusavio taršos arba atsitiktinio sumaišymo galimybė. Jeigu analizė atliekama nustačius atsitiktinę taršą ir galima atsekti, kad analizei paimti ėminiai yra susiję su tarša, o nustatyta koncentracija yra daug didesnė nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, to nereikia patvirtinti atliekant kartotinę analizę.

⁽⁸⁾ Kartotinės analizės, atliekamos vykdant lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, kontrolę, paaiškinimas ir reikalavimai yra identiški nurodytiesiems 5 išnašoje ir taikomiems didžiausios leidžiamosios koncentracijos kontrolės atveju.

⁽⁹⁾ 2005 m. sausio 12 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 183/2005, nustatantis pašarų higienos reikalavimus (OL L 35, 2005 2 8, p. 1).

a) *Atrankiniai metodai*

Atrankinių metodų tikslas – atrinkti tuos ėminius, kuriuose PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracija viršija didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių. Atrankiniais metodais sudaromos sąlygos pasiekti didelį ekonominį efektyvumą ir našumą ir taip padidinti tikimybę aptikti naujus aktyvius cheminės medžiagos ekspozicijos ir rizikos vartotojų sveikatai šaltinius. Juos taikant siekiama išvengti klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų. Jiems galima priskirti bioanalitinius metodus ir GC-MS metodus.

Taikant atrankinius metodus analizės rezultatas palyginamas su ribine verte ir gaunamas teigiamas arba neigiamas atsakymas dėl galimo didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijimo. PCDD/F koncentracija ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracija ėminiuose, kuriuose ji, kaip įtariama, neatitinka didžiausios leidžiamosios koncentracijos, nustatoma (patvirtinama) taikant patvirtinamąjį metodą.

Be to, atrankiniai metodai gali parodyti, kokia yra PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracija ėminyje. Taikant bioanalitinius atrankinius metodus rezultatas išreiškiamas bioanalitiniais ekvivalentais (BEQ), o taikant fizikinius cheminius GC-MS metodus – toksiškumo ekvivalentais (TEQ). Skaičiais išreikšti atrankinių metodų rezultatai yra tinkami siekiant įrodyti atitiktį ar įtariamą neatitiktį arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijimą ir parodyti koncentracijos ribas, jeigu reikėtų toliau taikyti patvirtinamuosius metodus. Jie netinkami tokiems tikslams kaip, pavyzdžiui, foninio lygio koncentracijos ir suvartojimo įvertinimas, koncentracijos pokyčio per tam tikrą laiką stebėseną arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, ir didžiausios leidžiamosios koncentracijos pakartotinis įvertinimas.

b) *Patvirtinamieji metodai*

Patvirtinamieji metodai leidžia vienareikšmiškai identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ėminyje ir suteikia visą atskirų giminingų junginių lygmens informaciją. Todėl tuos metodus galima taikyti kontroliuojant didžiausią leidžiamąją koncentraciją ir lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, taip pat siekiant patvirtinti rezultatus, gautus taikant atrankinius metodus. Be to, jų rezultatai gali būti naudojami kitiems tikslams, pavyzdžiui, siekiant nustatyti mažą foninio lygio koncentraciją atliekant pašarų stebėseną, stebint pokyčius per tam tikrą laiką, vertinant ekspoziciją ir kuriant duomenų bazę, kad būtų galima iš naujo įvertinti lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, ir didžiausią leidžiamąją koncentraciją. Jie taip pat svarbūs nustatant giminingų junginių struktūras, kad būtų galima identifikuoti galimus taršos šaltinius. Taikant šiuos metodus naudojama GC-HRMS. Siekiant patvirtinti atitiktį arba neatitiktį didžiausiai leidžiamajai koncentracijai, taip pat gali būti naudojama GC-MS/MS.

2. **Pagrindiniai faktai**

Apskaičiuojant TEQ koncentracijos vertes, atskirų medžiagų koncentracijos konkrečiame ėminyje vertės dauginamos iš jų atitinkamo toksiškumo ekvivalento faktoriaus (TEF) (žr. I skyriaus 1 išnašą), gautos sandaugos sudedamos ir gaunama suminė dioksinų tipo junginių koncentracija, išreikšta TEQ.

Šioje A dalyje priimtina specifinė atskiros giminingo junginio kiekybinio nustatymo riba – mažiausioji analitės koncentracija, kuri gali būti statistškai patikimai išmatuota pagal nustatymo kriterijus, aprašytus tarptautiniu mastu pripažintuose standartuose, pvz., standarte EN 16215:2012 „Pašarai. Dioksinų ir dioksinų tipo polichlorbifenilų (PCB) bei polichlorbifenilų indikatorių nustatymas, taikant dujų chromatografiją ir didelės skyros masių spektrometriją (GC-HRMS)“ ir (arba) EPA 1613 ir 1668 metoduose (nauja redakcija).

Atskiros giminingo junginio kiekybinio nustatymo riba gali būti nustatoma kaip:

- a) ėminio ekstrakto analitės koncentracija, kuriai esant gaunamas prietaiso atsakas dviem skirtingiems kontroliuojamiems jonams, kai mažesnio intensyvumo neapdorotų duomenų signalo S/T (signalas ir triukšmas) santykis yra 3:1; arba
- b) jeigu dėl techninių priežasčių negalima gauti patikimų signalo ir triukšmo skaičiavimo rezultatų, žemiausias koncentracijos taškas kalibravimo kreivėje, kuriame gaunamas priimtinas ($\leq 30\%$) ir pastovus (matuojama bent analitinės ėminių serijos pradžioje ir pabaigoje) nuokrypis, palyginti su vidutiniu santykinio atsako koeficientu, apskaičiuotu visiems taškams kalibravimo kreivėje kiekvienoje ėminių serijoje. Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) apskaičiuojama remiantis žemiausiu koncentracijos tašku, atsižvelgiant į vidinių etalonų išgavą ir ėminio kiekį.

Taikant bioanalitinius atrankinius metodus, gauti rezultatai rodys ⁽¹⁰⁾ ne giminingo junginio, o TEQ lygį, ir bus išreikšti BEQ, atsižvelgiant į tai, kad ne visi ėminio ekstrakto junginiai, prisidedantys prie bandymo atsako gavimo, gali tenkinti ar atitikti visus TEQ principo reikalavimus.

Atrankiniai ir patvirtinamieji metodai gali būti taikomi tik atliekant tam tikros matricos kontrolę, jeigu metodai yra pakankamai tiksūs, kad būtų galima patikimai nustatyti lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, arba didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

3. Kokybės užtikrinimo reikalavimai

- 3.1. Kiekvienu ėminių ėmimo ir ėminių analizės procedūros etapu imamasi priemonių kryžminei taršai išvengti.
- 3.2. Ėminiai saugomi ir vežami stiklinėse, aliumininėse, polipropileno arba polietileno talpose, pritaikytose taip, kad saugojimas neturėtų poveikio PCDD/F ir dioksinų tipo PCB koncentracijai ėminiuose. Iš ėminių talpyklų pašalinami popieriaus dulkių pėdsakai.
- 3.3. Pašaro ėminiai saugomi ir vežami taip, kad nebūtų sugadinti.
- 3.4. Prireikus kiekvienas laboratorinis ėminys smulkiai susmulkinamas ir kruopščiai išmaišomas, kad homogenizavimo procesas atitiktų visus reikalavimus (pvz., susmulkinamas taip, kad prasisijotų pro 1 mm sietelį). Jei drėgnis yra pernelyg didelis, prieš juos smulkinant ėminiai išdžiovinami.
- 3.5. Patikrinama, ar reagentai, stikliniai indai ir įranga negali turėti įtakos TEQ ar BEQ pagrįstiems rezultatams.
- 3.6. Atliekamas tuščiasis tyrimas, atliekant visą analizę, tik be ėminio.
- 3.7. Taikant bioanalitinius metodus, patikrinama, ar nė viename analizei naudojamame stikliniame inde ir tirpikliuose nėra junginių, galinčių sutrukdyti aptikti tikslinius junginius, patenkančius į darbinę sritį. Stikliniai indai praskalaujami naudojant tirpiklius arba kaitinami tokioje temperatūroje, kad nuo paviršiaus būtų pašalinti PCDD/F, dioksinų tipo junginių ir trukdančiųjų junginių pėdsakai.
- 3.8. Ekstrahuojant naudojamo ėminio kiekis yra pakankamas, kad būtų paisoma reikalavimų, susijusių su pakankamai siaura darbine sritimi, įskaitant didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygį arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių.
- 3.9. Specialios nagrinėjamųjų produktų ėminių ruošimo procedūros turi atitikti tarptautiniu mastu pripažintas gaires, t. y. standartą EN ISO 6498.

4. Laboratorijoms taikomi reikalavimai

- 4.1. Vadovaujantis Reglamento (ES) 2017/625 nuostatomis, laboratorijos turi gauti patvirtintos institucijos, veikiančios pagal ISO vadovą 58, akreditaciją, kad būtų užtikrinta analizės kokybė. Laboratorijos turi būti akredituotos pagal standartą EN ISO/IEC 17025. Turėtų būti vadovaujama dokumente „Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis“ nurodytais principais ⁽¹¹⁾.
- 4.2. Laboratorijos atliekamų tyrimų ar bandymų kokybė turi būti įrodyta nuolat sėkmingai dalyvaujant tarplaboratoriniuose lyginamuosiuose PCDD/F ir dioksinų tipo PCB atitinkamose pašarų matricose ir koncentracijos lygio nustatymo tyrimuose.

⁽¹⁰⁾ Bioanalitiniai metodai netaikomi į TEF sistemą įtrauktiems giminingiems junginiams. Ėminio ekstrakto gali būti kitų struktūriškai giminingų aktyvuoto aromatinių angliavandenilių (Ah) receptoriaus junginių, prisidedančių prie bendro atsako. Todėl bioanalitiniai rezultatai negali būti laikomi įverčiais, o greičiau ėminio TEQ lygio indikacija.

⁽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_pcdd-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).

- 4.3. Įprastinės ėminių kontrolės tikslais atrankinius metodus taikančios laboratorijos glaudžiai bendradarbiauja su patvirtinamuosius metodus taikančiomis laboratorijomis, siekdamos užtikrinti kokybės kontrolę ir patvirtinti įtartinų ėminių analitinį rezultatą.

5. **Pagrindiniai reikalavimai, keliami dioksinų (PCDD/F) ir dioksinų tipo PCB analizei**

5.1. *Darbinės srities siaurumas ir kiekybinio nustatymo riba*

Dėl ypatingo kai kurių šių junginių toksiškumo turi būti įmanoma aptikti didesnės kaip vieno femtogramo (10^{-15} g) eilės PCDD/F kiekį. Daugumos giminingų PCB junginių kiekybinio nustatymo riba gali būti ir vieno nanogramo (10^{-9} g) eilės. Matuojant toksiškesnius dioksinų tipo PCB giminingus junginius (visų pirma pakeistuosius ne orto giminingus junginius), žemesnioji darbinės srities dalis turi atitikti žemesniąją pikogramo (10^{-12} g) eilę. Visų kitų giminingų PCB junginių kiekybinio nustatymo riba gali būti ir vieno nanogramo (10^{-9} g) eilės.

5.2. *Didelis atrankumas (specifiškumas)*

- 5.2.1. Reikia skirti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ir daugybę kitų kartu ekstrahuojamų ir galinčių trukdyti junginių, kurių koncentracija gali būti keliomis eilėmis didesnė nei tiriamų analizių. Taikant GC-MS metodus, būtina skirti įvairius giminingus junginius, pvz., toksiškus giminingus junginius (pvz., septyniolika 2,3,7,8 padėtyse pakeistų PCDD/F ir dvylika dioksinų tipo PCB) ir kitus giminingus junginius.

- 5.2.2. Bioanalitiniai metodai turi būti tokie, kad juos taikant būtų įmanoma aptikti tikslinius junginius kaip PCDD/F ir (arba) dioksinų tipo PCB sumą. Ėminio gryninimo tikslas – pašalinti junginius, dėl kurių gaunami klaidingi neatitikimo nustatymo rezultatai, arba junginius, dėl kurių gali būti ribojamas atsakas ir taip gaunami klaidingi atitikimo nustatymo rezultatai.

5.3. *Didelis tikslumas (teisingumas ir glaudumas, tikroji bioanalizės išgava)*

- 5.3.1. Taikant GC-MS metodus, apskaičiuojamas pagrįstas tikrosios koncentracijos ėminyje įvertis. Kad būtų galima išvengti ėminio analizės rezultato atmetimo, remiantis labai nepatikimai apskaičiuotu TEQ lygiu, būtinas didelis tikslumas. Tikslumas išreiškiamas kaip *teisingumas* (išmatuotos vidutinės analizės koncentracijos sertifikuotoje medžiagoje vertės ir analizės koncentracijos sertifikuotos vertės skirtumas, išreikštas šios vertės procentais) ir kaip *glaudumas* (RSD_R , variacijos koeficientas, kitaip santykinis standartinis nuokrypis, apskaičiuotas pagal atkuriamumo sąlygomis gautus rezultatus).

- 5.3.2. Taikant bioanalitinius metodus, nustatoma tikroji bioanalizės išgava. Tikroji bioanalizės išgava – BEQ lygis, apskaičiuotas remiantis TCDD arba PCB 126 kalibravimo kreive, atlikus tuščiojo ėminio pataisą, padalytas iš TEQ lygio, nustatyto patvirtinamuoju metodu. Ja stengiamasi patikslinti tokius veiksnius kaip PCDD/F ir dioksinų tipo junginių nuostoliai ekstrahavimo ir gryninimo etapais, kartu ekstrahuojami junginiai, padidinantys arba sumažinantys atsaką (agonistinis ir antagonistinis poveikis), kreivės atitikimo savybė arba TEF ir santykinio stiprumo (toliau – REP) verčių skirtumai. Tikroji bioanalizės išgava apskaičiuojama naudojant tinkamus kontrolinius ėminius su panašios struktūros giminingais junginiais, tiriamais dominančios koncentracijos lygmeniu.

5.4. *Patvirtinimas didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmeniu ir bendrosios kokybės kontrolės priemonės*

- 5.4.1. Atlikdamos patvirtinimą ir įprastinę analizę, laboratorijos įrodo metodo veiksmingumą didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmeniui tirti, pavyzdžiui, didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmenį padauginus iš 0,5, 1 ir 2, taikant priimtą kartotinės analizės variacijos koeficientą.

- 5.4.2. Turi būti taikomos vidaus kokybės kontrolės priemonės – nuolat atliekama tuščiųjų ėminių kontrolė, žymėtų ėminių įdėjimo bandymai arba kontrolinių ėminių (jei įmanoma, geriau naudoti sertifikuotą pamatinę medžiagą) analizė. Siekiant užtikrinti, kad analizė atitiktų veiksmingumo reikalavimus, turi būti registruojamos ir tikrinamos tuščiųjų ėminių kontrolės, žymėtų ėminių įdėjimo bandymų arba kontrolinių ėminių analizės kokybės kontrolės diagramos.

5.5. Kiekybinio nustatymo riba

5.5.1. Taikant bioanalitinį atrankinį metodą, nereikalaujama būtinai apibrėžti kiekybinio nustatymo ribą, tačiau turi būti įrodyta, kad taikant šį metodą įmanoma atskirti, kuri vertė yra tuščioji, o kuri – ribinė. Turi būti nustatytas registruojamasis lygis, kad būtų galima pranešti apie ėminius, kurių atveju atsakas neviršija nustatyto BEQ lygio. Kai atsakas nesiekia darbinės srities, registruojamasis lygis turi skirtis nuo tuščiųjų ėminių bent tris kartus. Todėl jis apskaičiuojamas pagal ėminius, kuriuose yra tikslinių junginių, kurių lygis maždaug atitinka mažiausią reikalaujamą lygį, o ne pagal S/T santykį arba tuščiojo bandymo vertę.

5.5.2. Taikant patvirtinamąjį metodą, kiekybinio nustatymo riba turi būti maždaug viena penktoji didžiausios leidžiamosios koncentracijos.

5.6. Analizės kriterijai

Siekiant gauti patikimus rezultatus, kai taikomi patvirtinamieji ar atrankiniai metodai, TEQ arba BEQ vertė didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu turi atitikti toliau nurodytus kriterijus, nesvarbu, ar ji apskaičiuojama kaip suminė PCDD/F ir dioksinų tipo PCB TEQ arba BEQ vertė (kaip PCDD/F ir dioksinų tipo PCB suma), ar kaip atskiros jų vertės.

	Atranka, taikant bioanalitinius arba fizikinius ir cheminius metodus	Patvirtinamieji metodai
Klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis (*)	< 5 %	
Teisingumas		– 20 % – + 20 %
Pakartojamumas (RSD _r)	< 20 %	
Tarpinis glaudumas (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Nustatant didžiausią leidžiamąją koncentraciją.

5.7. Atrankiniams metodams taikomi specialieji reikalavimai

5.7.1. Atrankos tikslais galima taikyti ir GC-MS, ir bioanalitinius metodus. Taikant GC-MS metodus, turi būti paisoma 6 punkto reikalavimų. Bioanalitiniams ląstelių metodams taikomi 7 punkte nustatyti specialieji reikalavimai.

5.7.2. Įprastinės ėminių kontrolės tikslais atrankinius metodus taikančios laboratorijos glaudžiai bendradarbiauja su patvirtinamuosius metodus taikančiomis laboratorijomis.

5.7.3. Atliekant įprastinę analizę, būtina patikrinti atrankinio metodo veiksmingumą; tai daroma taikant analizės kokybės kontrolę ir nuolat tikrinant metodo tinkamumą. Vykdoma tęstinė reikalavimus atitinkančių rezultatų kontrolės programa.

5.7.4. Galimo ląstelių atsako slopinimo ir citoksiškumo tikrinimas

20 % ėminio ekstraktų matuojama atliekant įprastinę atranką pridėjus didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, 2,3,7,8 eilės TCDD arba jų ne pridėjus, siekiant patikrinti, ar atsaką gali slopinti ėminio ekstrakto esančios jam galinčios trukdyti medžiagos. Išmatuota įdėtosios analizės koncentracija žymėtame ėminyje palyginama su nežymėto ekstrakto koncentracijos ir tirpalo, kuriuo žymimas ėminys, koncentracijos suma. Jeigu ši išmatuota koncentracija yra daugiau kaip 25 % mažesnė nei apskaičiuota (suminė) koncentracija, tai reiškia galimą signalo slopinimą ir kad turi būti atlikta atitinkamo ėminio patvirtinamoji analizė, taikant GC-HRMS. Rezultatai registruojami ir stebimi naudojant kokybės kontrolės diagramas.

5.7.5. Reikalavimus atitinkančių ėminių kokybės kontrolė

Priklausomai nuo ėminių matricos ir laboratorijos patirties, taikant GC/HRMS, patikrinama maždaug 2–10 % reikalavimus atitinkančių ėminių.

5.7.6. Klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies nustatymas pagal kokybės kontrolės duomenis

Atlikus ėminių atrankinį tyrimą, nustatoma didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršijanti arba jų neviršijanti klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis. Faktinė klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis turi būti mažesnė kaip 5 %. Kai po reikalavimus atitinkančių ėminių kokybės kontrolės gaunama mažiausiai 20 patvirtintų kiekvienos matricos (matricos grupės) rezultatų, išvados dėl klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies daromos iš šių duomenų. Žiedinės reakcijos tyrimo arba atsitiktinės taršos metu tirtų ėminių, kurių koncentracija yra, pvz., iki dviejų kartų didesnė nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, rezultatai taip pat gali būti įtraukti tarp tų mažiausiai 20 rezultatų, kuriais remiantis vertinama klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis. Ėminiai imami taip, kad būtų atsižvelgta į dažniausiai pasitaikančias giminingų junginių struktūras ir šaltinių įvairovę.

Nors atliekant atrankinius tyrimus reikėtų siekti nustatyti ėminius, viršijančius lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies nustatymo kriterijumi laikoma didžiausia leidžiamoji koncentracija, atsižvelgiant į patvirtinamojo metodo išplėstinę matavimo neapibrėžtį.

5.7.7. Po atrankinio tyrimo ėminiai, kurie gali neatitikti reikalavimų, turi būti visuomet tikrinami atliekant išsamią pakartotinę pirminio ėminio analizę patvirtinamuoju analizės metodu. Šiuos ėminius galima naudoti ir tada, kai vertinama klaidingų neatitikimo nustatymo rezultatų dalis. Taikant atrankinius metodus, klaidingų neatitikimo nustatymo rezultatų dalis – tie rezultatai, kurių atitiktis reikalavimams patvirtinama patvirtinamosios analizės būdu, nors ankstesnės atrankos metu ir nustatyta, kad ėminys gali neatitikti reikalavimų. Atrankinio metodo naudingumo vertinimas grindžiamas reikalavimų neatitinkančių klaidingų ėminių ir bendro patikrintų ėminių skaičiaus palyginimu. Minėta dalis turi būti pakankamai maža, kad atrankinis metodas pasiteisintų.

5.7.8. Atliekant patvirtinimą, kai taikomi bioanalitiniai metodai, turi būti įmanoma gauti pagrįstą TEQ lygį, apskaičiuotą ir išreikštą BEQ.

Taip pat ir tuo atveju, kai bioanalitiniai metodai taikomi pakartojamumo sąlygomis, RSD_r vienoje laboratorijoje paprastai bus mažesnis nei atkuriamumo sąlygomis (RSD_R).

6. **GC-MS metodams taikomi specialieji reikalavimai, kurių būtina laikytis atliekant atranką arba patvirtinimo tikslais**

6.1. *Priimtinas PSO-TEQ rezultatų viršutinės ir apatinės ribinės koncentracijos skirtumas*

Siekiant patvirtinti, kad viršyta didžiausia leidžiamoji koncentracija arba prireikus lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių, viršutinės ir apatinės ribinės koncentracijos skirtumas turi neviršyti 20 %.

6.2. *Išgavos kontrolė*

6.2.1. Siekiant patikrinti analizės pagrįstumą, prieš pat taikant analizės metodą, pvz., prieš ekstrahavimą, pridedama 2,3,7,8 pozicijose chlorintų PCDD/F vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais ir dioksinų tipo PCB vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais. Pridedama bent po vieną giminingą junginį, skirtą kiekvienai homologinei eilei nuo tetrachlorintų iki oktachlorintų PCDD/F ir bent po vieną giminingą junginį, skirtą kiekvienai dioksinų tipo PCB homologinei eilei (arba bent po vieną giminingą junginį, skirtą kiekvieno jono, atrinkto taikant masių spektrometriją, registravimo funkcijai atlikti, kad būtų galima stebėti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB). Taikant patvirtinamuosius metodus, naudojami visi 17 2,3,7,8 padėtyse pakeistų PCDD/F vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais ir visi 12 dioksinų tipo PCB vidinių etalonų su žymėtais ^{13}C atomais.

6.2.2. Taip pat nustatomi santykiniai atsako koeficientai, taikomi tiems giminingiems junginiams, kurių atveju į atitinkamus kalibravimo tirpalus nepridėta jokių žymėtų ^{13}C analogų.

6.2.3. Jeigu augaliniuose ir gyvūniniuose pašaruose yra mažiau kaip 10 % riebalų, vidinius etalonus būtina įdėti prieš ekstrahavimą. Jeigu gyvūniniuose pašaruose yra daugiau kaip 10 % riebalų, vidiniai etalonai įdedami prieš ekstrahuojant riebalus arba po to. Atliekamas atitinkamas ekstrahavimo efektyvumo patvirtinimas, atsižvelgiant į tai, kuriuo etapu buvo įdėta vidinių etalonų.

6.2.4. Prieš GC-MS analizę įdedamas vienas arba du (pakaitiniai) išgavos etalonai.

6.2.5. Būtina atlikti išgavos kontrolę. Taikant patvirtinamuosius metodus, atskirų vidinių etalonų išgavos vertės turi būti nuo 60 iki 120 %. Mažesnės ar didesnės atskirų giminingų junginių išgavos vertės, ypač kai kurių heptachlorintų ir oktachlorintų dibenzo-p-dioksinų ir dibenzofuranų, priimtinos su sąlyga, kad jų indėlis į TEQ vertę yra ne didesnis kaip 10 % suminės TEQ vertės (remiantis PCDD/F ir dioksinų tipo PCB suma). Taikant GC-MS atrankinius metodus, išgavos vertės turi būti nuo 30 iki 140 %.

6.3. *Trukdančiųjų medžiagų pašalinimas*

- PCDD/F nuo trukdančiųjų chlorintų junginių, tokių kaip ne dioksinų tipo PCB ir chlorinti difenileteriai, atskiriami taikant tinkamus chromatografijos metodus (pageidautina naudoti florisilio, aliuminio oksido ir (arba) anglies kolonėlę).
- Izomerų atskyrimas, taikant dujų chromatografiją, turi būti < 25 % nuo 1,2,3,4,7,8-HxCDF smailės iki 1,2,3,6,7,8-HxCDF smailės.

6.4. *Kalibravimas standartine kreive*

Kalibravimo kreivės intervalas turi atitikti atitinkamą didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, intervalą.

6.5. *Specialieji patvirtinamųjų metodų kriterijai*

- Taikant GC-HRMS

Atliekant HRMS skyra paprastai turi būti ne mažesnė nei 10 000 visame masės intervale esant 10 % įdubai.

Atitiktis kitiems nustatymo ir patvirtinimo kriterijams, aprašytiems tarptautiniu mastu pripažintuose standartuose, pvz., standarte EN 16215:2012 „Pašarai. Dioksinų ir dioksinų tipo polichlorbifenilų (PCB) bei polichlorbifenilų indikatorių nustatymas, taikant dujų chromatografiją ir didelės skyros masių spektrometriją (GC-HRMS)“ ir (arba) EPA 1613 ir 1668 metoduose (nauja redakcija).

- Taikant GC-MS/MS

Turi būti stebimi bent 2 konkretūs pradiniai jonai, kiekvienas su vienu konkrečiu atitinkamu tarpiniu antriniu jonu visose paženklintose ir nepaženklintose analitėse analizės taikymo srityje.

Didžiausia leidžiama ± 15 % dydžio santykinio jonų intensyvumo nuokrypa, taikoma pasirinktiems tarpiniams antriniamis jonams, palyginti su apskaičiuotomis arba išmatuotomis vertėmis (etalonų kalibravimo vidurkis) taikant vienodas MS/MS sąlygas, ypač susidūrimo energiją ir susidūrimo dujų slėgį, kiekvienam analitės pereinamajam etapui.

Kiekvieno kvadrupolio skyra turi būti lygi ar didesnė nei vieneto masės skyra (vieneto masės skyra – pakankama skyra, kad dvi smailės būtų atskirtos per vieną masės vienetą), siekiant kuo labiau sumažinti galimus trukdžius tiriamose analitėse.

Atitiktis kitiems kriterijams, aprašytiems tarptautiniu mastu pripažintuose standartuose, pvz., standarte EN 16215:2012 „Pašarai. Dioksinų ir dioksinų tipo polichlorbifenilų (PCB) bei polichlorbifenilų indikatorių nustatymas, taikant dujų chromatografiją ir didelės skyros masių spektrometriją (GC-HRMS)“ ir (arba) EPA 1613 ir 1668 metoduose (nauja redakcija), išskyrus reikalavimą taikyti GC-HRMS.

7. **Specialieji bioanalitinių metodų reikalavimai**

Bioanalitiniai metodai – biologinių principų taikymu pagrįsti metodai, pvz., ląstelių, juslių arba imuniniai tyrimai. Šiame punkte nustatomi bendrieji reikalavimai, taikomi bioanalitiniais metodams.

Taikant atrankinį metodą, iš esmės pripažįstama, kad ėminys atitinka reikalavimus arba kad jo atitiktis kelia įtarimų. Šiuo tikslu apskaičiuotas BEQ lygis palyginamas su ribine verte (žr. 7.3 punktą). Ribinės vertės nesiekiantys ėminiai pripažįstami atitinkančiais reikalavimus, o ją siekiančių arba viršijančių ėminių atitiktis pripažįstama keliančia įtarimų, todėl juos būtina ištirti taikant patvirtinamąjį metodą. Praktikoje BEQ lygis, atitinkantis du trečdalius didžiausios leidžiamosios koncentracijos, gali būti naudojamas kaip ribinė vertė, jeigu klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis yra mažesnė nei 5 % ir užtikrinama priimtina klaidingų neatitikimo nustatymo rezultatų dalis. PCDD/F ir PCDD/F bei dioksinų tipo PCB sumai nustačius skirtingą didžiausią leidžiamąją koncentraciją ir tikrinant ėminių atitiktį be frakcionavimo, būtina nustatyti atitinkamas ribines bioanalizės vertes, taikomas PCDD/F. Tikrinant ėminius, viršijančius lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, ribine verte gali būti laikoma atitinkama to lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, procentinė dalis.

Jei orientacinė koncentracija išreikšta BEQ, pateikiami ėminių, kurie patenka į darbinės srities dalį ir viršija registruojamąjį lygį (žr. 7.1.1 ir 7.1.6 punktus), rezultatai.

7.1. Bandymo atsako vertinimas

7.1.1. Bendrieji reikalavimai

- Kai koncentracija apskaičiuojama pagal TCDD kalibravimo kreivę, bus pastebimas didelis skirtumas tarp viršutinėje kreivės dalyje nurodytų koncentracijos verčių (didelis pokyčio koeficientas (CV)). Darbinė sritis – dalis, kurioje tas CV yra mažesnis nei 15 %. Apatinė darbinės srities dalis (registruojamasis lygis) padidinama bent tris kartus ir nustatoma virš procedūrinių tuščiųjų ėminių. Viršutinė darbinės srities dalis paprastai išreiškiama EC_{70} verte (70 % didžiausios efektyviosios koncentracijos), tačiau ji yra žemesnė, jeigu šioje srityje CV yra didesnis kaip 15 %. Darbinė sritis nustatoma atliekant patvirtinimą. Ribinės vertės (žr. 7.3 punktą) turi neabejotinai būti darbinės srities ribose.
- Lygiagrečiai triskart arba bent dukart tiriami standartiniai tirpalai ir ėminių ekstraktai. Atliekant kartotinius tyrimus, standartinio tirpalo arba kontrolinio ekstrakto tyrimas atliekamas 4–6 plokštelės akutėse, o atsakas arba koncentracija gaunami, kai CV yra mažesnis nei 15 % (įmanoma tik darbinės srities ribose).

7.1.2. Kalibravimas

7.1.2.1. Kalibravimas standartine kreive

- Koncentracija ėminiuose įvertinama lyginant bandymo atsaką ir TCDD (arba PCB 126 ar standartinio PCDD/PCDF ir dioksinų tipo PCB mišinio) kalibravimo kreivę, siekiant apskaičiuoti BEQ lygį ekstrakto, o vėliau ir ėminyje.
- Kalibravimo kreivės turi būti sudarytos iš 8–12 koncentracijos verčių (sugrupuotų bent po dvi), kad jų netrūktų apatinėje kreivės dalyje (darbinėje srityje). Ypač atkreipiamas dėmesys į tai, kad kreivė atitiktų darbinę sritį. Pati R^2 vertė neturi jokios arba beveik jokios reikšmės vertinant kreivių atitikimo savybę nelineinės regresijos būdu. Geresnis kreivių atitikimas pasiekiamas minimaliai sumažinus skirtumą tarp apskaičiuoto ir išmatuoto lygių kreivės darbinėje srityje, pvz., kuo labiau sumažinus kvadratu pakeltų liekanų sumą.
- Vėliau apskaičiuotoji koncentracija ėminio ekstrakto patikslinama atsižvelgiant į BEQ lygį, apskaičiuotą pagal matricą arba tuščiąjį tirpiklio ėminį (siekiant atsižvelgti į naudojamų tirpiklių ir cheminių medžiagų priemaišas) ir tikrąją išgavą (apskaičiuotą pagal BEQ lygį tinkamuose kontroliniuose ėminiuose su panašios struktūros giminingais junginiais, tiriamais didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu arba lygiu, kurį pasiekus imamas priemonių). Norint patikslinti išgavą, tikroji išgava turi neviršyti reikiamo intervalo (žr. 7.1.4 punktą). Tikslinant išgavą naudojami kontroliniai ėminiai turi atitikti 7.2 punkte nustatytus reikalavimus.

7.1.2.2. Kalibravimas naudojant kontrolinius ėminius

Kaip alternatyva gali būti naudojama kalibravimo kreivė, parengta bent iš keturių kontrolinių ėminių (žr. 7.2.4 punktą): viena tuščioji matrica ir trys kontroliniai ėminiai, didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu arba lygiu, kurį pasiekus imamas priemonių, padauginti iš 0,5, 1 ir 2, kurios nereikėtų tikslinti pagal tuščiąją vertę ir išgavą, jei kontrolinių ėminių matricos savybės atitinka nežinomų ėminių matricos savybes. Šiuo atveju du trečdalius didžiausios leidžiamosios koncentracijos atitinkantis bandymo atsakas (žr. 7.3 punktą) gali būti apskaičiuotas tiesiogiai pagal šiuos ėminius ir naudojamas kaip ribinė vertė. Tikrinant ėminius, viršijančius lygį, kurį pasiekus imamas priemonių, ribine verte gali būti laikoma to lygio, kurį pasiekus imamas priemonių, procentinė dalis.

7.1.3. Atskiras PCDD/F ir dioksinų tipo PCB nustatymas

Ekstraktai gali būti dalijami į frakcijas, kuriose yra PCDD/F ir dioksinų tipo PCB, kad būtų galima atskirai nustatyti PCDD/F ir dioksinų tipo PCB TEQ lygius (išreikštus BEQ). Frakcijos, kuriose yra dioksinų tipo PCB, rezultatams įvertinti geriausia naudoti standartinę PCB 126 kalibravimo kreivę.

7.1.4. Tikrosios bioanalizės išgavos vertės

Tikroji bioanalizės išgava apskaičiuojama analizuojant tinkamus kontrolinius ėminius su panašios struktūros giminingais junginiais, tiriamais didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu arba lygiu, kurį pasiekus imamasi priemonių, ir kurie, palyginti su TEQ lygiu, yra išreikšti kaip BEQ lygio procentinis dydis. Priklausomai nuo taikomos analizės tipo ir TEF ⁽¹³⁾, dėl TEF ir REP faktorių, taikomų dioksinų tipo PCB, skirtumų tikrosios dioksinų tipo PCB išgavos vertės, palyginti su PCDD/F, gali būti mažesnės. Todėl, kai PCDD/F ir dioksinų tipo PCB yra nustatomi atskirai, tikrosios bioanalizės išgavos vertės turi būti tokios: dioksinų tipo PCB – nuo 20 iki 60 %, PCDD/F – nuo 50 iki 130 % (intervalai, taikomi TCDD kalibravimo kreivei). Dioksinų tipo PCB indėlis į PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumą skirtingose matricose ir ėminiuose skiriasi, tad tuos intervalus atitinka PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos tikrosios bioanalizės išgavos vertės, kurios turi būti nuo 30 iki 130 %. Jeigu Sąjungos teisės aktuose būtų iš esmės keičiamos PCDD/F ir dioksinų tipo PCB TEF vertės, šiuos intervalus taip pat reiktų peržiūrėti.

7.1.5. Išgavos verčių kontrolė gryninant

Atliekant patvirtinimą patikrinama, ar gryninant nesumažėjo junginių. Turi būti išgrynintas (kai n yra bent 3) žymėtas tuščiasis ėminys, į kurį įdėta įvairių giminingų junginių mišinio, ir, taikant patvirtinamąjį metodą, turi būti patikrinta išgava ir kintamumas. Išgava turi būti nuo 60 iki 120 %, visų pirma tų giminingų junginių, kurių indėlis į TEQ lygį įvairiuose mišiniuose viršija 10 %

7.1.6. Registruojamasis lygis

Kai registruojami BEQ lygiai, registruojamasis lygis nustatomas pagal atitinkamų matricų ėminius, kuriuose yra tipiškos struktūros giminingų junginių, o ne pagal etalonų kalibravimo kreivę, nes apatinėje jos intervalo dalyje trūksta duomenų glaudumo. Atsižvelgiama į ekstrahavimo ir gryninimo poveikį. Registruojamasis lygis padidinamas bent tris kartus ir nustatomas virš procedūrinių tuščiųjų ėminių.

7.2. Kontrolinių ėminių naudojimas

7.2.1. Kontroliniai ėminiai išreiškia į didžiausios leidžiamosios koncentracijos ar lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, intervalą patenkančių PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ėminių matricą, giminingų junginių struktūrą ir koncentracijos verčių intervalus.

7.2.2. Į kiekvieną bandymų eilę įtraukiama didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygmeniu ar lygiu, kurį pasiekus imamasi priemonių, tiriami tuščioji matrica arba, jei neįmanoma, procedūrinis tuščiasis ėminys ir kontrolinis ėminys. Šie ėminiai ekstrahuojami ir tiriami tuo pat metu tapačiomis sąlygomis. Naudojant kontrolinį ėminį, palyginti su tuščiuoju ėminiu, turi būti gautas akivaizdžiai aukštesnės vertės atsakas, taip užtikrinant bandymo tinkamumą. Šiuos ėminius galima naudoti tuščiosios vertės ir išgavos tikslinimo tikslais.

7.2.3. Išgavos tikslinimo tikslais atrinkti kontroliniai ėminiai turi atitikti tiriamuosius ėminius, t. y. koncentracija neturi būti nepakankamai įvertinta dėl giminingų junginių struktūros.

7.2.4. Gali būti papildomai įtraukta iš 0,5 ir 2 padaugintų didžiausios leidžiamosios koncentracijos ar lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, kontrolinių ėminių, siekiant įrodyti, kad tiriamos koncentracijos verčių bandymas tinka didžiausiai leidžiamajai koncentracijai ar lygiui, kurį pasiekus imamasi priemonių, kontroliuoti. Šie ėminiai gali būti kartu naudojami apskaičiuojant BEQ lygį tiriamuosiuose ėminiuose (žr. 7.1.2.2 punktą).

7.3. Ribinių verčių nustatymas

Turi būti nustatomas BEQ išreikštų bioanalizės rezultatų ir TEQ išreikštų rezultatų, gautų taikant patvirtinamąjį metodą, ryšys, pavyzdžiui, atliekant kalibravimo matricomis bandymus, naudojant žymėtus pamatinius ėminius, kurių didžiausia leidžiamoji koncentracija padauginama iš 0, 0,5, 1 ir 2 ir kiekvienu lygiu atliekant šešis pakartojimus (n = 24). Remiantis šiuo ryšiu galima įvertinti pataisos koeficientus (tuščiąją vertę ir išgavą), tačiau jie turi būti patikrinti vadovaujantis 7.2.2 punktu.

⁽¹³⁾ Dabartiniai reikalavimai grindžiami TEF sistema, paskelbta leidinyje „Toxicol Sci“ (M. Van den Berg *et al*, 93 (2), 223–241 (2006 m.)).

Ribinės vertės nustatomos priimant sprendimus dėl ėminių atitikties didžiausiai leidžiamajai koncentracijai arba kontroliuojant lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, jei taikytina, atitinkamą didžiausią leidžiamąją koncentraciją arba lygį, kurį pasiekus imamasi priemonių, nustatant arba atskirai PCDD/F ir dioksinų tipo PCB, arba PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumai. Jos atitinka *apatinę* bioanalitinių rezultatų pasiskirstymo dalį (patikslinus pagal tuščiąją vertę ir išgavą), atitinkančią patvirtinamojo metodo sprendimo ribą, remiantis 95 % pasiklovimo lygmeniu, kai klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis yra mažesnė nei 5 % ir RSD_R yra mažesnis nei 25 %. Patvirtinamojo metodo sprendimo riba reiškia didžiausią leidžiamąją koncentraciją, atsižvelgiant į išplėstinę matavimo neapibrėžtį.

Ribinė vertė (išreikšta BEQ) gali būti apskaičiuota remiantis vienu iš 7.3.1, 7.3.2 ir 7.3.3 punktuose nustatytų būdų (žr. 1 pav.).

7.3.1. Apatinės 95 % prognozavimo intervalo srities taikymas patvirtinamojo metodo sprendimo ribai

$$\text{Ribinė vertė} = BEQ_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

čia:

BEQ_{DL}	BEQ, atitinkantis patvirtinamojo metodo sprendimo ribą, t. y. didžiausią leidžiamąją koncentraciją, atsižvelgiant į išplėstinę matavimo neapibrėžtį;
$s_{y,x}$	liekamasis standartinis nuokrypis;
$t_{\alpha, f=m-2}$	Stjudento faktorius ($\alpha = 5\%$, $f =$ laisvės laipsniai, vienaspusiai);
m	bendras kalibravimo taškų skaičius (j indeksas);
n	pakartojimų kiekvieni lygiu skaičius;
x_i	ėminio koncentracija (išreikšta TEQ) i kalibravimo taške, nustatyta patvirtinamuoju metodu;
$\bar{x}$	visų kalibruotų ėminių koncentracijos verčių (išreikštų TEQ) vidurkis;
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$	kvadratinė suminė vertė, $i =$ i kalibravimo taško indeksas.

7.3.2. Apskaičiavimas pagal bioanalitinius ėminių, užterštų ties patvirtinamojo metodo sprendimo riba, atitinkančią *apatinę* galinių duomenų pasiskirstymo atitinkamoje vidutinėje BEQ vertėje tašką, daugkartinės analizės ($n \geq 6$) rezultatus (patikslintus pagal tuščiąją vertę ir išgavą):

$$\text{ribinė vertė} = BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

čia:

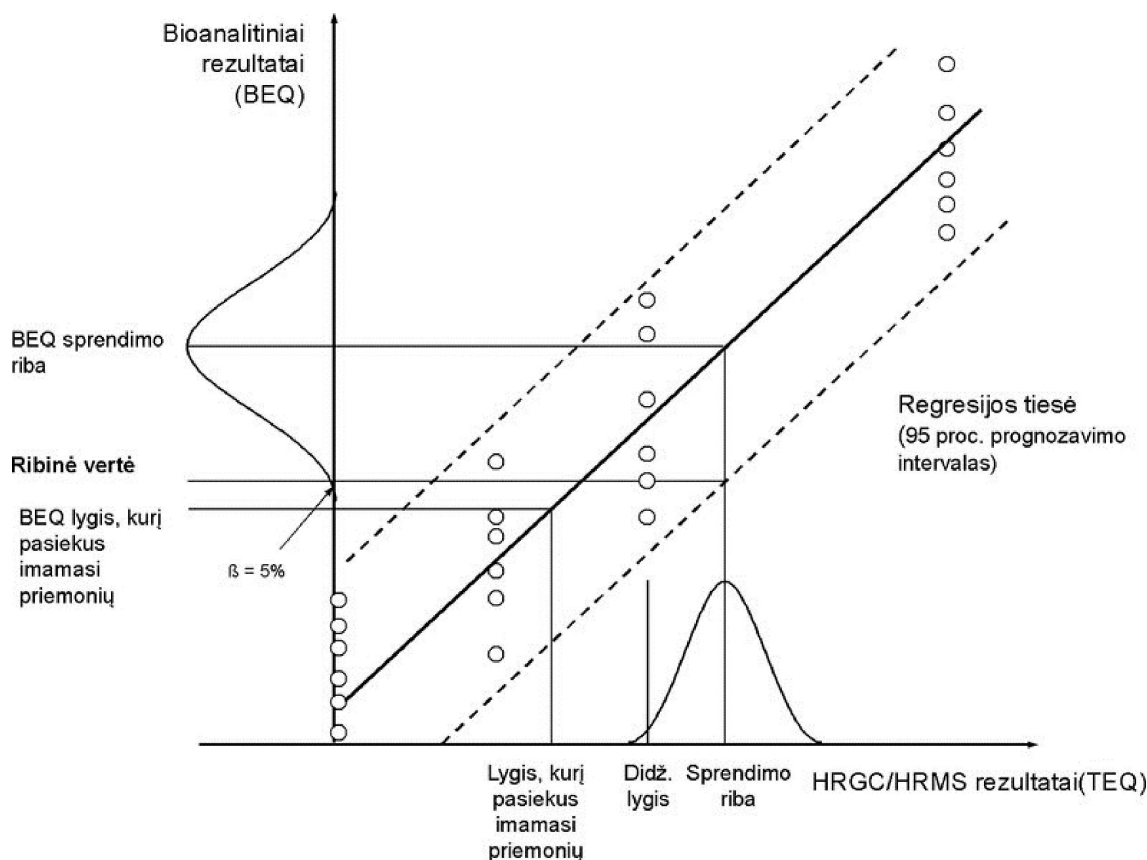
SD_R	bioanalizės rezultatų standartinis nuokrypis BEQ_{DL} taške, išmatuotas atkuriamumo vienoje laboratorijoje sąlygomis.
--------	---

7.3.3. Ėminių, užterštų esant dviem trečdaliams didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių, daugkartinės analizės ($n \geq 6$) bioanalitinių rezultatų (išreikštų BEQ ir patikslintų pagal tuščiąją vertę ir išgavą), kaip vidutinės vertės, apskaičiavimas, atsižvelgiant į pastabą, kad minėta koncentracija apytikriai atitiks pagal 7.3.1 arba 7.3.2 punktą nustatytą ribinę vertę:

ribinių verčių apskaičiavimas, remiantis 95 % pasiklovimo lygmeniu, darant prielaidą, kad klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalis yra mažesnė nei 5 %, o RSD_R yra mažesnis nei 25 %:

- 1) remiantis *apatine* 95 % prognozavimo intervalo sritimi ties patvirtinamojo metodo sprendimo riba;
- 2) remiantis ėminių, užterštų ties patvirtinamojo metodo sprendimo riba, atitinkančią *apatinę* galinių duomenų pasiskirstymo (1 paveiksle atvaizduota išlenkta kreivė) atitinkamoje vidutinėje BEQ vertėje tašką, daugkartinė analize ($n \geq 6$).

1 paveikslas



7.3.4. Ribinėms vertėms taikomi apribojimai

Pagal RSD_R , gautą atliekant patikrinimą ir naudojant ribotą skaičių ėminių, kurių matricos ir (arba) giminingų junginių struktūros skiriasi, apskaičiuotos BEQ pagrįstos ribinės vertės gali būti didesnės nei TEQ pagrįsta didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių, atsižvelgiant į didesnę glaudumą, skirtingai nei įprastinėmis sąlygomis, kai reikia kontroliuoti nežinomą galimų giminingų junginių struktūrų spektrą. Tokiais atvejais ribinės vertės apskaičiuojamos pagal $RSD_R = 25\%$, arba pasirenkama dvi trečiosios didžiausios leidžiamosios koncentracijos arba lygio, kurį pasiekus imamasi priemonių.

7.4. Veiksmingumo parametrai

- 7.4.1. Kadangi taikant bioanalitinius metodus negalima naudoti vidinių etalonų, turi būti atliekami bioanalitinių metodų pakartojamumo tyrimai, siekiant gauti informacijos apie standartinį nuokrypį per tos pačios eilės tyrimus ir tarp skirtingų eilių tyrimų. Pakartojamumas turi būti mažesnis nei 20 %, atkuriamumas vienoje laboratorijoje – mažesnis nei 25 %. Tai grindžiama apskaičiuota koncentracija, išreikšta BEQ ir patikslinta pagal tuščiąją vertę ir išgavą.
- 7.4.2. Atliekant patvirtinimą, įrodoma, kad bandymo galimybės leidžia atskirti tuščiąjį ėminį nuo ribinę vertę atitinkančios koncentracijos ir taip identifikuoti ėminius, viršijančius atitinkamą ribinę vertę (žr. 7.1.2 punktą).
- 7.4.3. Turi būti nustatyti tiksliniai junginiai, galimi trukdžiai ir didžiausia toleruotina tuščiojo ėminio koncentracija.
- 7.4.4. Atsako arba pagal jį, triskart nustačius ėminio ekstraktą, apskaičiuotos koncentracijos (įmanoma tik darbinės srities ribose) standartinio nuokrypio dydis negali viršyti 15 %.
- 7.4.5. Atliekant bioanalitinio metodo veiksmingumo per pastovų laiką vertinimą, naudojami nepatiksinti kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) rezultatai, išreikšti BEQ (tuščiasis ėminys ir didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių).

- 7.4.6. Turi būti registruojamos ir tikrinamos procedūrinių tuščiųjų ėminių ir kiekvieno tipo kontrolinių ėminių kokybės kontrolės diagramos, siekiant užtikrinti, kad analitinis efektyvumas atitiktų reikalavimus, visų pirma procedūriniais tuštiesiems ėminiams nustatyto mažiausio reikalaujamo atstumo nuo apatinės darbinės srities dalies ir kontrolinių ėminių atkuriamumo vienoje laboratorijoje. Procedūriniai tuštieji ėminiai kontroliuojami taip, kad būtų išvengta klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų, kai atliekamas atėmimo veiksmas.
- 7.4.7. Turi būti renkami rezultatai, gauti tiriant įtartinus ėminius ir 2–10 % reikalavimus atitinkančių ėminių (mažiausiai 20 ėminių vienai matricai) taikant patvirtinamuosius metodus; jie naudojami vertinant atrankinio metodo veiksmingumą ir BEQ bei TEQ ryšį. Ši duomenų bazė gali būti naudojama atliekant pakartotinį ribinių verčių, taikomų įprastiniams ėminiams, kai naudojamos patvirtintos matricos, vertinimą.
- 7.4.8. Metodo veiksmingumas gali būti įrodytas žiedinės reakcijos tyrimais. Ėminių žiedinės reakcijos tyrimų rezultatai, apimantys, pvz., 2 kartus didesnę koncentracijos verčių intervalą nei didžiausia leidžiamoji koncentracija, gali būti įtraukti į klaidingų atitikimo nustatymo rezultatų dalies vertinimą, jeigu pavyksta įrodyti, kad laboratorija yra tinkamai kvalifikuota. Ėminiai imami taip, kad būtų atsižvelgta į dažniausiai pasitaikančias giminingų junginių struktūras ir šaltinių įvairovę.
- 7.4.9. Atsitikus incidentui, ribinės vertės gali būti vertinamos pakartotinai, siekiant atsižvelgti į šio konkretaus incidento metu naudotas konkrečias matricas ir giminingų junginių struktūras.

8. Rezultatų ataskaita

8.1. Patvirtinamieji metodai

- 8.1.1. Į analizės rezultatus įtraukiama atskirų PCDD/F ir dioksinų tipo PCB giminingų junginių koncentracija, o TEQ verčių rezultatai pateikiami kaip apatinė ribinė, viršutinė ribinė ir vidutinė ribinė koncentracija, kad rezultatų ataskaitoje būtų kuo daugiau informacijos ir juos būtų galima aiškinti laikantis specialiųjų reikalavimų.
- 8.1.2. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ekstrahavimą.
- 8.1.3. Pateikiamos atskirų vidinių etalonų išgavos vertės, jei išgavos vertės neatitinka 6.2.5 punkte nurodyto intervalo, jei viršijama didžiausia leidžiamoji koncentracija (tokiu atveju vienos iš dviejų kartotinių analizių išgavos vertės) ir visais kitais atvejais, kai to prašoma.
- 8.1.4. Kadangi sprendžiant, ar ėminys atitinka reikalavimus, reikia atsižvelgti į išplėstinę matavimo neapibrėžtį, šį parametą reikia pateikti. Todėl analizės rezultatai ataskaitoje pateikiami kaip $x \pm U$; čia: x – analizės rezultatas, U – išplėstinė matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties faktorių 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasiklovimo lygmuo. Jeigu PCDD/F ir dioksinų tipo PCB nustatomi atskirai, kaip PCDD/F ir dioksinų tipo PCB suma turi būti naudojama atskirų PCDD/F ir dioksinų tipo PCB analizės rezultatų apskaičiuotoji išplėstinės neapibrėžties suma.
- 8.1.5. Rezultatai išreiškiami tais pačiais vienetais ir bent tuo pačiu reikšminių skaitmenų skaičiumi, kaip Direktyva 2002/32/EB nustatyta didžiausia leidžiamoji koncentracija.

8.2. Bioanalitiniai atrankiniai metodai

- 8.2.1. Atrankos rezultatas įvardijamas kaip atitinkantis reikalavimus arba įtariamas neatitinkąs reikalavimų (įtartinas).
- 8.2.2. Be to, gali būti nurodyta orientacinė PCDD/F ir (arba) dioksinų tipo PCB koncentracija, išreikšta BEQ, o ne TEQ.
- 8.2.3. Ėminiai, kurių atsakas mažesnis nei registruojamasis lygis, nurodomi kaip nesiekiantys registruojamojo lygio. Ėminiai, kurių atsakas didesnis nei darbinė sritis, pateikiami kaip viršijantys darbinę sritį, o lygis, atitinkantis viršutinę darbinės srities dalį, išreiškiamas BEQ.
- 8.2.4. Dėl kiekvieno ėminio matricos tipo ataskaitoje nurodoma didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamasi priemonių, kuriais grindžiamas vertinimas.

- 8.2.5. Ataskaitoje nurodomas atlikto bandymo tipas, pagrindinis bandymo principas ir kalibravimo rūšis.
- 8.2.6. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ekstrahavimą.
- 8.2.7. Jeigu įtariama, kad ėminiai neatitinka reikalavimų, ataskaitoje turi būti nurodyta, kokių veiksmų bus imtasi. Jeigu ėminiuose yra didelė PCDD/F koncentracija ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracija, ji turi būti nustatyta (patvirtinta) patvirtinamuoju metodu.
- 8.2.8. Neatitikimo nustatymo rezultatai pateikiami tik pagal patvirtinamąją analizę.
- 8.3. *Fizikiniai ir cheminiai atrankiniai metodai*
- 8.3.1. Atrankos rezultatas įvardijamas kaip atitinkantis reikalavimus arba įtariamas neatitinkąs reikalavimų (įtartinas).
- 8.3.2. Dėl kiekvieno ėminio matricos tipo ataskaitoje nurodoma didžiausia leidžiamoji koncentracija arba lygis, kurį pasiekus imamas priemonių, kuriais grindžiamas vertinimas.
- 8.3.3. Be to, gali būti nurodoma atskirų PCDD/F ir (arba) dioksinų tipo PCB giminingų junginių koncentracija, o TEQ verčių rezultatai pateikiami kaip apatinė ribinė, viršutinė ribinė ir vidutinė ribinė koncentracija. Rezultatai išreiškiami tais pačiais vienetais ir bent tuo pačiu reikšminių skaitmenų skaičiumi, kaip Direktyva 2002/32/EB nustatyta didžiausia leidžiamoji koncentracija.
- 8.3.4. Pateikiamos atskirų vidinių etalonų išgavos vertės, jei išgavos vertės neatitinka 6.2.5 punkte nurodyto intervalo, jei viršijama didžiausia leidžiamoji koncentracija (tokiu atveju vienos iš dviejų kartotinių analizių išgavos vertės) ir visais kitais atvejais, kai to prašoma.
- 8.3.5. Ataskaitoje nurodomas taikytas GC-MS metodas.
- 8.3.6. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCDD/F ir dioksinų tipo PCB ekstrahavimą.
- 8.3.7. Jeigu įtariama, kad ėminiai neatitinka reikalavimų, ataskaitoje turi būti nurodyta, kokių veiksmų bus imtasi. Jeigu ėminiuose yra didelė PCDD/F koncentracija ir PCDD/F ir dioksinų tipo PCB sumos koncentracija, ji turi būti nustatyta (patvirtinta) patvirtinamuoju metodu.
- 8.3.8. Dėl neatitikties gali būti nusprendžiama tik atlikus patvirtinamąją analizę.

III SKYRIUS

ĖMINIŲ RUOŠIMAS IR REIKALAVIMAI, KELIAMSI ANALIZĖS METODAMS, KURIE TAIKOMI VYKDANT OFICIALIĄ NE DIOKsinŲ TIPO PCB KONCENTRACIJOS PAŠARUOSE KONTROLĘ

1. **Taikymo sritis**

Šiame skyriuje nustatyti reikalavimai taikomi, kai pašarai tiriami vykdant oficialią ne dioksinų tipo PCB kontrolę ir atsižvelgiant į ėminių ruošimo ir analizės reikalavimus, taikomus kitais reguliavimo tikslais, įskaitant pašarų ūkio subjekto atliekamą kontrolę, kuria siekiama užtikrinti atitiktį Reglamento (EB) Nr. 183/2005 nuostatomis.

2. **Taikomi nustatymo metodai**

Dujų chromatografija su elektronų pagavos detekcija (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS arba lygiaverčiai metodai.

3. **Tiriamųjų analizių identifikavimas ir patvirtinimas**

- 3.1. Santykinė sulaikymo trukmė, atsižvelgiant į vidinius ar kontrolinius etalonus (priimtinas nuokrypis yra +/- 0,25 %).

- 3.2. Ne dioksinų tipo PCB atskyrimas nuo trukdančiųjų medžiagų, visų pirma nuo kartu išplaunamų PCB, taikant dujų chromatografiją, ypač jeigu ėminių koncentracija neviršija teisėtų ribų ir turi būti patvirtinta neatitiktis ⁽¹³⁾.

- 3.3. GC-MS metodams taikomi reikalavimai

Turi būti stebimi bent nurodytas skaičius molekulių jonų arba molekulių klasterio būdingų jonų:

- a) du konkretūs jonai, kai taikoma HRMS;
- b) trys konkretūs jonai, kai taikoma LRMS;
- c) du pradiniai jonai, kiekvienas su vienu konkrečiu atitinkamu tarpiniu antriniu jonu, kai taikoma dviguboji masių spektrometrija (MS-MS).

Didžiausios leidžiamosios nuokrypos, taikomos atrinktų masių fragmentų pertekliaus santykiams:

Santykinis pasirinktų masių fragmentų pertekliaus santykio nuokrypis nuo teorinio arba tikslinio jono (dažniausiai kontroliuojamo jono) ir identifikacinio (-ių) jono (-ų) kalibravimo etalono: $\pm 15\%$.

- 3.4. GC-ECD metodams taikomi reikalavimai

Didžiausią leidžiamąją koncentraciją viršijantys rezultatai patvirtinami naudojant dvi dujų chromatografijos kolonėles, kai nejudrios fazės yra skirtingo poliškumo.

4. **Metodo veiksmingumo įrodymas**

Metodo veiksmingumas patvirtinamas didžiausios leidžiamosios koncentracijos intervale (didžiausia leidžiamoji koncentracija, padauginta iš 0,5–2), taikant priimtina kartotinės analizės variacijos koeficientą (žr. 9 punkte nustatytus tarpinio glaudumo reikalavimus).

5. **Kiekybinio nustatymo riba**

Ne dioksinų tipo PCB kiekybinio nustatymo (LOQ) ⁽¹⁴⁾ suma neviršija trečdalia didžiausios leidžiamosios koncentracijos ⁽¹⁵⁾.

6. **Kokybės kontrolė**

Nuolatinė tuščiųjų ėminių kontrolė, žymėtų ėminių ir kokybės kontrolės ėminių analizė, dalyvavimas atitinkamos srities tarplaboratoriniuose tyrimuose su atitinkamomis matricomis.

7. **Išgavos kontrolė**

- 7.1. Turi būti naudojami tinkami vidiniai etalonai, kurių fizikinės ir cheminės savybės būtų palyginamos su tiriamosiomis analitėmis.

- 7.2. Vidinių etalonų įdėjimas

Įdėjimas į produktus (prieš ekstrahavimą ir gryninimą).

- 7.3. Reikalavimai metodams, kuriuos taikant naudojami visi šeši ne dioksinų tipo PCB giminingi junginiai su žymėtais izotopais:

- a) rezultatai patikslinami atsižvelgiant į vidinių etalonų išgavos vertes;
- b) vidinių etalonų su žymėtais izotopais išgavos vertės turi būti nuo 60 iki 120 %;
- c) mažesnės arba didesnės išgavos vertės priimtinos, jeigu atskiri giminingi junginiai sudaro mažiau nei 10 % ne dioksinų tipo PCB sumos.

⁽¹³⁾ Nustatyta, kad dažnai kartu išplaunami PCB 28 ir 31, PCB 52 ir 69, taip pat PCB 138, 163 ir 164. Be to, taikant GC-MS, atsižvelgiama į galimus didesnės eilės chlorintų giminingų junginių fragmentų trukdžius.

⁽¹⁴⁾ Kai taikoma, vadovaujama dokumente „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>) nurodytais principais..

⁽¹⁵⁾ Primitytinai rekomenduojama, kad tuščiosios reagento vertės indėlis į teršalo lygį ėminyje būtų mažesnis. Laboratorija privalo rūpintis, kad tuščiųjų verčių pokytis būtų kontroliuojamas, ypač kai tuščiosios vertės yra atimamos.

- 7.4. Reikalavimai metodams, kuriuos taikant naudojami ne visi šeši vidiniai etalonai su žymėtais izotopais arba naudojami kiti vidiniai etalonai:
- a) atliekama kiekvieno ėminio vidinio (-ių) etalono (-ų) išgavos kontrolė;
 - b) vidinio (-ių) etalono (-ų) išgavos vertės turi būti nuo 60 iki 120 %;
 - c) rezultatai patikslinami atsižvelgiant į vidinių etalonų išgavos vertes.
- 7.5. Nežymėtų giminingų junginių išgavos vertės tikrinamos naudojant žymėtus arba kokybės kontrolės ėminius, kurių koncentracijos vertės patenka į didžiausios leidžiamosios koncentracijos intervalą. Šių giminingų junginių išgavos vertės laikomos priimtinais, jeigu jos yra nuo 60 iki 120 %.

8. Laboratorijoms taikomi reikalavimai

Vadovaujantis Reglamento (ES) 2017/625 nuostatomis, laboratorijos turi gauti patvirtintos institucijos, veikiančios pagal ISO vadovą 58, akreditaciją, kad būtų užtikrinta analizės kokybė. Laboratorijos turi būti akredituotos pagal standartą EN ISO/IEC 17025. Be to, vadovaujamasi dokumente „Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCB analysis“ nurodytais principais ⁽¹⁶⁾.

9. Veiksmingumo parametrai Ne dioksinų tipo PCB sumai didžiausios leidžiamosios koncentracijos lygiu taikomi kriterijai

	Masės spektrometrija su izotopų skleidimu (*)	Kiti metodai
Teisingumas	– 20 – + 20 %	– 30 – + 30 %
Tarpinis glaudumas (RSD, %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Viršutinės ir apatinės ribinių koncentracijų apskaičiavimo skirtumas	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Taikomi visi šeši žymėti ¹³C analogai, kaip reikalaujama pagal vidinius etalonus.

10. Rezultatų ataskaita

- 10.1. Į analizės rezultatus įtraukiama atskirų ne dioksinų tipo PCB koncentracija ir tų PCB giminingų junginių suma, pateikiamos kaip apatinė ribinė, viršutinė ribinė ir vidutinė ribinė koncentracija, kad rezultatų ataskaitoje būtų kuo daugiau informacijos ir juos būtų galima aiškinti laikantis specialiųjų reikalavimų.
- 10.2. Ataskaitoje nurodomas metodas, taikytas atliekant PCB ekstrahavimą.
- 10.3. Turi būti pateiktos atskirų vidinių etalonų išgavos vertės, jei išgavos vertės neatitinka 7 punkte nurodyto intervalo, jei viršijama didžiausia leidžiamoji koncentracija ir visais kitais atvejais, kai to prašoma.
- 10.4. Kadangi sprendžiant, ar ėminys atitinka reikalavimus, reikia atsižvelgti į išplėstinę matavimo neapibrėžtį, ši parametrai taip pat reikia pateikti. Todėl analizės rezultatai ataskaitoje pateikiami kaip $x \pm U$; čia: x – analizės rezultatas, U – išplėstinė matavimo neapibrėžtis, taikant aprėpties faktorių 2, kuriuo užtikrinamas maždaug 95 % pasiklovimo lygmuo.
- 10.5. Rezultatai išreiškiami tais pačiais vienetais ir bent tuo pačiu reikšminių skaitmenų skaičiumi, kaip Direktyva 2002/32/EB nustatyta didžiausia leidžiamoji koncentracija.

⁽¹⁶⁾ Žr. 9 išnašą.

B. EN STANDARTAI

Taikant Reglamento (ES) 2017/625 34 straipsnio 2 dalies a punktą, yra svarbūs šie EN standartai:

EN 17194 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Deoksinivalenolio, aflatoksino B1, fumonizino B1 ir B2, T-2 ir HT-2 toksinų, zearalenono ir ochratoksino A nustatymas pašarinėse žaliavose ir kombinuotuosiuose pašaruose taikant skysčių chromatografiją ir dvigubą masių spektrometriją“.

EN 17270 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Teobromino nustatymas pašarinėse žaliavose ir kombinuotuosiuose pašaruose, įskaitant sudėtinę dalį iš kakavos, taikant skysčių chromatografiją“.

EN 17504 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Gosipolio nustatymas vilnamedžių sėklose ir pašaruose taikant skysčių chromatografiją ir dvigubą masių spektrometriją (LC-MS/MS)“.

EN 17362 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Pentachlorfenolio (PCP) nustatymas pašarinėse žaliavose ir kombinuotuosiuose pašaruose taikant skysčių chromatografiją ir dvigubą masių spektrometriją (LC-MS/MS)“.

EN 16279 „Pašarai. Fluorido kiekio nustatymas apdorojus vandenilio chlorido rūgštimi ir taikant jonų atrankiojo elektrodo (ISE) metodą“.

EN 17053 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Mikroelementų, sunkiųjų metalų ir kitų elementų nustatymas pašaruose taikant induktyviai susietos plazmos masių spektrometriją (ICP-MS) (daugialypis metodas)“.

EN 15550 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Kadmio ir švino nustatymas atominė absorbcine spektrometrija grafitinėje krosnelėje (GF-AAS), mineralizavus aukštame slėgyje“.

EN 16206 „Pašarai. Arseno nustatymas atominės absorbcinės spektrometrijos metodu generuojant hidridą (HGAAS), atlikus mikrobanginę slėginę hidrolizę (šlapiajam skaidymui naudojant 65 % nitrato rūgštį ir 30 % vandenilio peroksidą)“.

EN 16277 „Pašarai. Gyvsidabrio nustatymas naudojant šaltų garų atominę absorbcinę spektrometriją (CVAAS), atlikus mikrobanginę slėginę hidrolizę (ekstrahuojant 65 % nitrato rūgštimi ir 30 % vandenilio peroksidu)“.

EN 16278 „Pašarai. Neorganinio arseno nustatymas hidrido generavimo atominės absorbcinės spektrometrijos (HG-AAS) metodu, atlikus mikrobanginį kietosios fazės ekstrahavimą ir atskyrimą“.

EN 17374 „Pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Neorganinio arseno nustatymas pašaruose anijonų mainų efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) ir induktyviai susietos plazmos masių spektrometrijos (ICP-MS) metodu“.

VI PRIEDAS

„VII PRIEDAS

NAMINIŲ PAUKŠČIŲ KOMBINUOTŲJŲ PAŠARŲ ENERGINĖS VERTĖS APSKAIČIAVIMO METODAS**1. ENERGINĖS VERTĖS APSKAIČIAVIMO METODAS IR IŠRAIŠKA**

Naminių paukščių kombinuotųjų pašarų energinė vertė turi būti apskaičiuojama pagal toliau nurodytą formulę, atsižvelgiant į pašarų tam tikrų analizuojamų komponentų procentines dalis. Ši energinė vertė turi būti išreiškiama kaip medžiagų apykaitos energija (ME) megadžauliais (MJ) vienam kombinuotųjų pašarų kilogramui, darant pataisą azotui:

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

2. LEIDŽIAMOSIOS NUOKRYPOS, TAIKYTINOS NURODYTOMS ENERGINĖMS VERTĖMS

Jei oficialaus tikrinimo metu nustatoma tikrinimo rezultatų ir nurodytos energinės vertės neatitiktis (mažesnė arba didesnė pašarų energinė vertė), ME leidžiamoji nuokrypa yra 0,4 MJ/kg.

3. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

Pritaikius anksčiau nurodytą formulę, gautas rezultatas turi būti pateikiamas vieno ženklo po kablelio tikslumu.

4. ĖMINIŲ ĖMIMO IR ANALIZĖS METODAI

Apskaičiavimo metode nurodytas kombinuotųjų pašarų ėminių ėmimas ir analizuojamų komponentų kiekio nustatymas turi būti atliekamas pagal Sąjungos ėminių ėmimo metodus ir analizės metodus, taikomus atliekant kombinuotųjų pašarų oficialią kontrolę.

Būtina taikyti:

- nustatant žalių riebalų kiekį: III priedo G dalyje pateikto žalių aliejų ir riebalų nustatymo metodo B procedūrą;
- nustatant krakmolo kiekį: III priedo K dalyje pateiktą poliarimetrinį metodą.

ŠUNŲ IR KAČIŲ PAŠARINIŲ ŽALIAVŲ IR KOMBINUOTŲJŲ PAŠARŲ ENERGINĖS VERTĖS APSKAIČIAVIMO METODAS

Šunų ir kačių pašarinių žaliavų ir kombinuotųjų pašarų energinė vertė turi būti apskaičiuojama pagal standartą EN ISO 16967 Gyvūnų pašarai. Ėminių ėmimo ir analizės metodai. Prognozinės lygtys metabolizuojamajai energijai pašarinėse žaliavose ir kombinuotuosiuose pašaruose (gyvūnų augintinių ėdale), skirtuose katėms ir šunims, įskaitant dietinį ėdalą, nustatyti.“