I

(Акти, прийняті відповідно до Договору про створення Європейського Співтовариства / Договору про заснування Європейського співтовариства з атомної енергії, публікації якого є обов'язковими для виконання)

Постанови

ПОСТАНОВА КОМІСІЇ (ЄС) № 152/2009
від 27 січня 2009 року,
що встановлює методи відбору проб та аналізу для офіційного контролю кормів
(Текст, погоджений з ЄЕЗ)

КОМІСІЯ ЄВРОПЕЙСЬКИХ СПІВТОВАРИСТВ

Враховуючи положення Договору про створення Європейського Співтовариства,

Враховуючи Регламент (ЄС) № 882/2004 Європейського Парламенту та Ради від 29 квітня 2004 року про офіційний контроль з метою забезпечення перевірки відповідності законодавству щодо кормів та харчових продуктів, правилам стосовно здоров'я та захист тварин (1), і, зокрема, пункти 4(a), (b) і (c) статті 11,

Беручи до уваги наступне:

(1) Для реалізації Директиви 70/373/ЄЕС були прийняті наступні законодавчі акти, що залишаються чинними відповідно до пункту 2 статті 61 Постанови (ЄС) № 882/2004:

— Перша Директива Комісії 71/250/ЄЕС від 15 червня 1971, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([2]),

— Друга Директива Комісії 71/393/ЄЕС від 18 листопада 1971 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([3]),

— Третя Директива Комісії 72/199/ЄЕС від 27 квітня 1972 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([4]),

— Четверта Директива Комісії 73/46/ЄЕС від 5 грудня 1972 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([5]),

— Перша Директива Комісії 76/371/ЄЕС від 1 березня 1976 року, що встановлює методи відбору проб Співтовариства для офіційного контролю кормів ([6]),

— Сьома Директива Комісії 76/372/ЄЕС від 1 березня 1976 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([7]),

— Восьма Директива Комісії 78/633/ЄЕС від 15 червня 1978 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([8]),

— Дев'ята Директива Комісії 81/715/ЄЕС від 31 липня 1981 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([9]),

— Десята Директива Комісії 84/425/ЄЕС від 25 липня 1984 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([10]),

— Директива Комісії 86/174/ЄЕС від 9 квітня 1986 року, що встановлює метод розрахунку енергетичної цінності корму для свійської птиці ([11]),

([1]) OJ L 165, 30.4.2004, с. 1, виправлена OJ L 191, 28.5.2004, с. 1.
([2]) OJ L 155, 12.7.1971, с. 13.
([3]) OJ L 279, 20.12.1971, с. 7.
([4]) OJ L 123, 29.5.1972, с. 6.
([5]) OJ L 83, 30.3.1973, с. 21.
([6]) OJ L 102, 15.4.1976, с. 1.
([7]) OJ L 102, 15.4.1976, с. 8.
([8]) OJ L 206, 29.7.1978, с. 43.
([9]) OJ L 257, 10.9.1981, с. 38.
([10]) OJ L 238, 6.9.1984, с. 34.
([11]) OJ L 130, 16.5.1986, с. 53.

— Одинадцята Директива Комісії 93/70/ЄЕС від 28 червня 1993 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([1]),

Дванадцята Директива Комісії 93/117/ЄС від 17 грудня 1993 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для офіційного контролю кормів ([2]),

— Директива Комісії 98/64/ЄС від 3 вересня 1998 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для визначення амінокислот, неочищених масел і жирів та олаквіндоксу в кормах, та доповнює Директиву 71/393/ЄЕС ([3]),

— Директива Комісії 1999/27/ЄС від 20 квітня 1999 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для визначення ампроліуму, диклазурілу і карбадоксу в кормах і вносить поправки до Директив 71/250/ЄЕС, 73/46/ЄЕС та скасовує Директиву 74/203/ЄЕС ([4]),

— Директива Комісії 1999/76/ЄС від 23 липня 1999 року, що встановлює метод аналізу Співтовариства для визначення лазалоциду натрію у кормах ([5]),

— Директива Комісії 2000/45/ЄС від 6 липня 2000 року, що встановлює методи аналізу Співтовариства для визначення вітаміну А, вітаміну Е та триптофану у кормах ([6]),

— Директива Комісії 2002/70/ЄС від 26 липня 2002 року, що встановлює вимоги для визначення рівнів діоксинів і діоксин-подібних ПХБ в кормах ([7]),

— Директива Комісії 2003/126/ЄС від 23 грудня 2003 року для аналітичного методу визначення складових тваринного походження для офіційного контролю кормів ([8]).

(2) Враховуючи, що Директива 70/373/ЄЕС була замінена Постановою (ЄС) № 882/2004, доцільно замінити акти, що виконуються, до цієї Директиви однією Постановою. У той же час методи повинні бути адаптовані в світлі розвитку науково-технічних знань. Методи, які не діють за їх прямим призначенням, повинні бути вилучені. Передбачається своєчасно оновити положення відбору проб, щоб взяти до уваги нещодавній розвиток у виготовленні, зберіганні, транспортуванні і продажу кормів, тим не менш, доцільно деякий час дотримуватись існуючих положень з відбору проб.

(3) Директиви 71/250/ЄЕС, 71/393/ЄЕС, 72/199/ЄЕС, 73/46/ЄЕС, 76/371/ЄЕС, 76/372/ЄЕС, 78/633/ЄЕС, 81/715/ЄЕС, 84/425/ЄЕС, 86/174/ЄЕС, 93/70/ЄЕС, 93/117/ЄС, 98/64/ЄС 1999/27/ЄС, 1999/76/ЄС, 2000/45/ЄС, 2002/70/ЄС і 2003/126/ЄС повинні бути скасовані.

(4) Заходи, передбачені в цьому Регламенті, відповідають висновкам Постійного комітету у справах харчового ланцюга та ветеринарії.

ПРИЙНЯЛА ЦЕ ПОЛОЖЕННЯ:

Стаття 1

Відбір проб для офіційного контролю кормів для визначення складових, добавок і небажаних речовин, за винятком залишків пестицидів і мікроорганізмів, здійснюється відповідно до методів, викладених в Додатку I.

Стаття 2

Підготовка проб для аналізу та вираження результатів здійснюється відповідно до методів, викладених в Додатку II.

Стаття 3

Аналіз для офіційного контролю кормів здійснюється за допомогою методів, викладених у Додатку III (методи аналізу для контролю складу кормових матеріалів і комбікормів), Додаток IV (Методи аналізу для контролю рівня оголошених добавок у корми), Додаток V (Методи аналізу для контролю небажаних речовин у кормах) та Додаток VI (Методи аналізу для визначення складових тваринного походження для офіційного контролю кормів).

Стаття 4

Енергетична цінність комбікормів повинна бути розрахована відповідно до Додатку VII.

Стаття 5

Методи аналізу для контролю заборонених добавок у кормах, викладених у Додатку VIII, повинні бути використані для цілей підтвердження.

Стаття 6

Директиви 71/250/ЄЕС, 71/393/ЄЕС, 72/199/ЄЕС, 73/46/ЄЕС, 76/371/ЄЕС, 76/372/ЄЕС, 78/633/ЄЕС, 81/715/ЄЕС, 84/425/ЄЕС, 86/174/ЄЕС, 93/70/ЄЕС, 93/117/ЕС, 98/64/ЕС, 1999/27/ ЕС, 1999/76/ЕС, 2000/45/ЕС, 2002/70/ЕС і 2003/126/ЕС скасовані.

Посилання на скасовані Директиви тлумачаться як посилання на цю Постанову та мають враховуватись разом з таблицею, що міститься у Додатку IV.

([1]) OJ L 234, 17.9.1993, с. 17.
([2]) OJ L 329, 30.12.1993, с. 54.
([3]) OJ L 257, 19.9.1998, с. 14.
([4]) OJ L 118, 6.5.1999, с. 36.
([5]) OJ L 207, 6.8.1999, с. 13.
([6]) OJ L 174, 13.7.2000, с. 32.
([7]) OJ L 209, 6.8.2002, с. 15.
([8]) OJ L 339, 24.12.2003, с. 78.

Стаття 7

Ця Постанова набирає чинності на 20-й день після її публікації в Офіційному віснику Європейського Союзу.

Вона застосовуватиметься з 26 серпня 2009 року.

Всі положення цієї Постанови є обов'язковими та безпосередньо застосовуються стосовно всіх держав-членів.

Підготовлено в Брюсселі, 27 січня 2009 року.

Від імені Комісії
Андрула ВАСІЛІУ
Член Комісії

ДОДАТОК I

МЕТОДИ ВІДБОРУ ПРОБ

1. МЕТА І ЗМІСТ

Відбір проб для офіційного контролю здійснюється відповідно до методів, описаних нижче. Проби, отримані таким чином, розглядатимуться як такі, що представляють собою вибіркову частину.

2. ПЕРСОНАЛ ДЛЯ ВІДБОРУ ПРОБ

Проби мають відбиратись особами, уповноваженими державами-членами.

3. ВИЗНАЧЕННЯ ТЕРМІНІВ

Вибіркова частина: Деяка кількість продукту, що складає єдине ціле і має однакові характеристики.
Точкова проба: Деяка кількість, що береться з однієї точки в вибірковій частини.
Сукупна проба: Сукупність точкових проб, взятих з тієї ж вибіркової частини.
Зменшена проба: Репрезентативна частина сукупної проби, отримана в результаті останнього процесу зменшення.
Кінцева проба: Частина зменшеної проби або однорідної сукупної проби.

4. ОБЛАДНАННЯ

4.1. Обладнання для відбору проб повинно бути виготовлено з матеріалів, що не забруднюватимуть продукти для відбору проб. Таке обладнання може бути офіційно затверджене державами-членами.

4.2. **Обладнання, що рекомендується для відбору проб твердих кормів.**

4.2.1. *Ручний відбір проб*

4.2.1,1. Плоскодонна лопата з вертикальними стінками.

4.2.1.2. Гачок для відбору проб з довгим роздвоєнням чи відсіками. Розміри гачка для відбору проб повинні відповідати характеристикам вибіркової частини (глибина контейнера, розміри мішка і т.д.), а також розміру часток корму.

4.2.2. *Автоматичний відбір проб*

Затверджене автоматичне обладнання може бути використане для відбору проб корму, що перевозиться.

4.2.3. *Дільник*

Обладнання, призначене для розділення проб на приблизно рівні частини, може бути використане для відбору точкових проб і для приготування зменшених і кінцевих проб.

5. КІЛЬКІСНІ ВИМОГИ

5.A.	У зв’язку з контролем речовин або продуктів, що рівномірно розподілені по всьому корму
5.A.1.	**Вибіркова частина** Розмір вибіркової частини повинен бути таким, щоб з кожної з його складових частин можна було взяти пробу

5.A.2.	**Точкові проби**	
5.A.2.1.	Незапакований корм:	Мінімальна кількість точкових проб
5.A.2.1.1.	вибіркові частини не більше 2,5 тонн	сім
5.A.2.1.2.	вибіркові частини більше 2,5 тонн	√ 20-кратна кількість тонн, що складає вибіркову частину (*), максимум до 40 точкових проб
5.A.2.2.	Запакований корм:	Мінімальна кількість упаковок для відбору проб (**):
5.A.2.2.1.	Пакети понад 1 кг:	
5.A.2.2.1.1.	вибіркові частини від однієї до чотирьох упаковок	всі упаковки
5.A.2.2.1.2.	вибіркові частини від 5 до 16 упаковок	чотири
5.A.2.2.13.	вибіркові частини від 16 упаковок	√ кількість упаковок, що складає вибіркову частину (*), максимум до 20 упаковок
5.A.2.2.2.	Пакети не більше 1 кг	чотири
5.A.2.3.	Рідкий або напіврідкий корм:	Мінімальна кількість контейнерів для відбору проб (**):
5.A.2.3.1.	Контейнери більше одного літра:	
5.A.2.3.1.1.	вибіркові частини від одного до чотирьох контейнерів	всі контейнери
5.A.2.3.1.2.	вибіркові частини від 5 до 16 контейнерів	чотири
5.A.2.3.1.3.	вибіркові частини від 16 контейнерів	√ кількість контейнерів, що складає вибіркову частину (*), максимум до 20 контейнерів
5.A.2.3.2.	Контейнери до одного літра	чотири
5.A.2.4.	Кормові блоки і мінеральні лизунці	Мінімальна кількість блоків або лизунців для відбору проб (**): один блок чи лизунець на вибіркову частину з 25 одиниць, максимум до чотирьох блоків або лизунців
5.A.3.	**Сукупна проба** Єдина сукупна проба на вибіркову частину. Загальна сума точкових проб, що складають сукупну пробу, повинна бути не менше, ніж вказана нижче:	
5.A.3.1.	Незапакований корм	4 кг
5.A.3.2.	Запакований корм:	
5.A.3.2.1.	пакети понад 1 кг:	4 кг
5.A.3.2.2.	пакети не більше 1 кг	вага вмісту чотирьох оригінальних упаковок
5.A.3.3.	Рідкий або напіврідкий корм:	
5.A.3.3.1.	контейнери більше одного літра:	чотири літри
5.A.3.3.2.	контейнери до одного літра	об’єм вмісту чотирьох оригінальних контейнерів
5.A.3.4.	Кормові блоки і мінеральні лизунці:	
5.A.3.4.1.	кожен вагою більше 1 кг	4 кг
5.A.3.4.2.	кожен вагою до 1 кг	Вага чотирьох оригінальних блоків або лизунців

5.A.4.	**Кінцеві проби** Кінцеві проби для зменшення в разі потреби беруться з сукупної проби. Необхідно провести аналіз щонайменше однієї кінцевої проби. Кількість кінцевих проб для аналізу повинна бути не менше, ніж вказана нижче:	
	Тверді корми	500 г
	Рідкий або напіврідкий корм	500 мл
5.B.	Стосовно контролю небажаних речовин або продуктів, що можуть бути розподілені нерівномірно по всьому корму, такі як афлатоксини, ріжки жита, рицина і кроталярія у кормових матеріалах (***)	
5.B.1.	**Вибіркова частина:** див. 5.A.1.	
5.B.2.	**Точкові проби**	
5.B.2.1.	Незапакований корм: див. 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Запакований корм:	Мінімальна кількість упаковок для відбору проб:
5.B.2.2.1.	вибіркові частини, що складаються з однієї до чотирьох упаковок	всі упаковки
5.B.2.2.2.	вибіркові частини, що складаються з 5-16 упаковок	чотири
5.B.2.2.3.	вибіркові частини, що складаються більше ніж з 16 упаковок	√ кількість упаковок, що складає вибіркову частину (*), максимум до 40 упаковок
5.B.3.	**Сукупні проби** Кількість сукупних проб буде змінюватися залежно від розміру вибіркової частини. Мінімальна кількість сукупних проб на вибіркову частину вказана нижче. Загальна вага точкових проб, що складають кожну сукупну пробу, повинна бути не менше 4 кг	
5.B.3.1.	Незапакований корм	
	Вага вибіркової частини в тоннах:	Мінімальна кількість сукупних проб на вибіркову частину.
	до 1	1
	більше 1 і до 10	2
	більше 10 і до 40	3
	більше 40	4
5.B.3.2.	Запакований корм	
	Розмір вибіркової частини у кількості упаковок:	Мінімальна кількість сукупних проб на вибіркову частину.
	від 1 до 16	1
	від 17 до 200	2
	від 201 до 800	3
	більше 800	4
5.B.4.	**Кінцеві проби** Кінцеві проби для зменшення беруться з сукупної проби. Необхідно провести аналіз щонайменше однієї кінцевої проби на *кожну сукупну пробу*. Вага кінцевої проби для аналізу не може бути менше 500 г	

(*) Якщо отримана кількість є дробовим числом, вона повинна бути округлена до найближчого цілого числа.

(**) Для упаковок або контейнерів, зміст яких не перевищує 1 кг або один літр і для блоків або лизунців, вагою не більше 1 кг кожен, точкова проба має складатися з однієї оригінальної упаковки або контейнера, одного блоку або одного лизунця.

(***) Методи, передбачені в пункті 5.A, призначені для використання в боротьбі з афлатоксинами, ріжками жита, рицинами і кроталяріями в основному і додатковому кормі.

6. ІНСТРУКЦІЯ ПО ВІДБОРУ, ПІДГОТОВЦІ І УПАКОВЦІ ПРОБ

6.1. **Загальна інформація**

Проби повинні бути прийняті і підготовлені якнайшвидше, беручи до уваги запобіжні заходи, необхідні для забезпечення того, щоб продукт не змінився і не забруднився. Інструменти, поверхні і контейнери, призначені для отримання проб, повинні бути чистими і сухими.

6.2. **Точкові проби**

6,2.A. *У зв'язку з контролем речовин або продуктів, що рівномірно розподілені по всьому корму*

Точкові проби необхідно взяти випадковим чином зі всієї вибіркової частини, і вони повинні бути приблизно рівними за розмірами.

6,2.A.1. Незапакований корм

Необхідно зробити уявний поділ вибіркової частини на приблизно однакові частини. Кількість частин, відповідних числу точкових проб, необхідних відповідно до пункту 5.A.2, повинна бути відібрана випадковим чином, і принаймні одну пробу необхідно взяти з кожної з цих частин.

Де це доречно, відбір може бути здійснений, коли вибіркову частину переміщують (вантаження або розвантаження).

6,2.A.2. Запакований корм

Вибравши необхідну кількість упаковок для відбору проб, як зазначено в пункті 5.A.2, частина вмісту кожної упаковки повинна бути видалена за допомогою гачка або лопати. За необхідності, проби повинні бути прийняті після окремого спорожнення кожної упаковки. Будь-які шматки повинні бути розбиті, якщо це необхідно, шляхом їхнього поділу і повернення до проби, окремо в кожній сукупній пробі.

6,2.A.3. Гомогенні або гомогенізовані рідини або напіврідкі корми

Після вибору необхідної кількості контейнерів для відбору проб, як зазначено в пункті 5.A.2, вміст має бути ретельно перемішаний за необхідності, і кількість рідини відібрана з кожної ємкості.

Точкові проби можуть бути відібрані, якщо вміст відкидають.

6,2.A.4. Негомогенізований, рідкий або напіврідкий корм:

Після вибору необхідної кількості контейнерів для відбору проб, як зазначено в пункті 5.A.2, проби мають бути відібрані з різних рівнів.

Проби також можуть бути відібрані, якщо вміст відкидають, але перші фракції повинні бути відкинуті.
У кожному разі сумарний відібраний об'єм не повинен бути менше 10 літрів.

6.2.A.5. Кормові блоки і мінеральні лизунці

Вибравши необхідну кількість блоків або лизунців для відбору проб, як зазначено в пункті 5.A.2, частина кожного блоку або лизунця повинна бути відібрана.

6.2.B. *По відношенню до контролю небажаних речовин або продуктів, що можуть бути розподілені нерівномірно по всьому корму, такі як афлатоксини, ріжки жита, рицини і кроталярія у кормових матеріалах*

Необхідно зробити уявний поділ вибіркової частини на приблизно рівні частини, що відповідають кількості сукупних проб, передбачених у пункті 5.B.3. Якщо це число більше одного, загальна кількість точкових проб, передбачених у пункті 5.B.2, повинна бути розподілена приблизно порівну на різні частини. Потім відберіть проби приблизно рівних розмірів ([1]) і таких, що загальна кількість проб з кожної частини становитиме не менше мінімальної кількості 4 кг, необхідної для кожної сукупної проби. Точкові проби, відібрані з різних частин, не повинні бути об'єднані.

(1) Для упакованих кормів, частина вмісту відібраних упаковок повинна бути видалена, використовуючи гачок або лопату після окремого спорожнення упаковок, при необхідності.

6.3. **Підготовка скупних проб**

6.3.A. *У зв'язку з контролем речовин або рівномірно розподілених продуктів у кормів* Точкові проби повинні змішуватися для утворення єдиної вибіркової проби.

6,3.B. *По відношенню до контролю небажаних речовин або продуктів, що можуть бути розподілені нерівномірно по всьому корму, такі як афлатоксини, ріжки жита, рицини і кроталярія у кормових матеріалах*

Точкові проби з кожної частини вибіркової частини повинні бути змішані, і кількість сукупних проб, передбачених у пункті 5.B.3, складена, приділяючи увагу відзначенню походження кожної сукупної проби.

6.4. **Підготовка кінцевих проб**

Матеріал у кожній сукупній пробі повинен бути ретельно перемішаний для отримання однорідної проби ([1]). За необхідності, сукупна проба повинна спочатку бути зменшена не менше ніж до 2 кг або двох літрів (зменшена проба) або за допомогою механічного або автоматичного дільника, або методом розподілення.

Необхідно підготувати щонайменше три кінцеві проби у приблизно такій же кількості відповідно до кількісних вимог, що містяться у пунктах 5.A.4 або 5.B.4. Кожну пробу має бути поміщено у відповідний контейнер. Необхідно вжити всіх запобіжних заходів, щоб уникнути будь-яких змін у складі проби, забруднення або фальсифікації, що можуть виникнути під час транспортування або зберігання.

6.5. **Пакування остаточних проб**

Контейнери або упаковки повинні бути герметично закриті і промарковані (загальна етикетка повинна бути включена в пломбу) таким чином, щоб їх неможливо було розкрити без пошкодження пломби.

7. РЕЄСТРАЦІЯ ВІДБОРУ

Необхідно реєструвати кожний відбір проб, що дозволить однозначно визначити кожну вибіркову частину.

8. ПРИЗНАЧЕННЯ ПРОБ

Для кожної сукупної проби, щонайменше одна остаточна проба направляється (в найкоротший термін) в уповноважену аналітичну лабораторію разом з інформацією, необхідною для лаборанта.

([1]) Будь-які шматки повинні бути розбиті (якщо це необхідно, шляхом їхнього поділу і повернення до проби) окремо в кожній сукупній пробі.

ДОДАТОК II

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ ПРО МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДЛЯ КОРМУ

А. ПІДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АНАЛІЗУ

1. **Мета**

Процедури, описані нижче, стосуються підготовки остаточних проб для аналізу, відправлених в контрольні лабораторії після відбору проб відповідно до положень, викладених в Додатку I.

Ці проби повинні бути підготовлені таким чином, щоб зважені кількості, як це передбачено в методах аналізу, були однорідними і репрезентативними щодо остаточних проб.

2. **Запобіжні заходи, яких необхідно вжити**

Процедура підготовки проб, якої необхідно дотримуватись, залежить від застосовних методів аналізу. Тому важливо забезпечити, щоб наступна процедура підготовки проб відповідала застосовному методу аналізу.

Всі необхідні операції повинні здійснюватися таким чином, щоб уникнути (наскільки це можливо) забруднення проби та зміни її складу.

Подрібнення, перемішування і просіювання здійснюється в найкоротший термін з мінімальним впливом на пробу повітря і світла. Млини та подрібнювачі, що ймовірно помітно нагріватимуть пробу, не повинні використовуватися.

Ручне подрібнення рекомендується для корму, який особливо чутливий до тепла. Необхідно також впевнитися у тому, що саме обладнання не є джерелом забруднення мікроелементами.

Якщо підготовка не може бути здійснена без істотних змін вмісту вологи в пробі, необхідно визначити вміст вологи до і після підготовки за методом, викладеним у частині А Додатку III.

3. **Процедура**

Розділіть пробу на необхідні частини для аналізу і контролю, застосовуючи відповідні методи поділу, наприклад за допомогою лопати, нерухомого або поворотного скорочувача. Насипання проби у формі конуса та квартування не рекомендується, тому що це може спричинити велику похибку поділу частин. Тримайте пробу для контролю в підходящому чистому, сухому контейнері, обладнаному герметичною пробкою, і підготуйте частини проби для аналізу, щонайменше 100 г, як зазначено нижче.

3.1. *Корм, що може бути подрібнений наступним способом*

Якщо інше не зазначено в методах аналізу, просійте всю пробу через сито з квадратними отворами з довжиною сторони 1 мм (відповідно до рекомендації ISO R565) після подрібнення, якщо це необхідно. Уникайте будь-якого надлишкового подрібнення.

Перемішайте просіяну пробу і покладіть його у відповідний чистий, сухий контейнер, обладнаний герметичною пробкою. Перемішайте знову безпосередньо перед зважуванням кількості для аналізу.

3.2. *Корм, що може бути подрібнений після сушки*

Якщо не вказано інше в методах аналізу, необхідно висушити пробу, щоб привести її вологість до рівня 8-12%, відповідно до процедури попереднього висушування, описаної в пункті 4.3 методу визначення вологості, зазначеного у частині А Додатка III. Потім переходьте до наступного етапу, як зазначено в розділі 3.1.

3.3. *Рідкий або напіврідкий корм*

Розмістіть пробу у відповідний чистий, сухий контейнер, обладнаний герметичною пробкою. Ретельно перемішайте безпосередньо перед зважуванням кількості для аналізу.

3.4. *Інший вид корму*

Проби, що не можуть бути підготовлені відповідно до однієї з описаних вище процедур, повинні бути підготовлені за будь-якою іншою процедурою, що забезпечує однорідність і репрезентативність кінцевих проб.

4. **Зберігання проб**

Проби повинні зберігатися при температурі, що не впливатиме на їх склад. Проби, призначені для аналізу вітамінів або речовин, які особливо чутливі до світла, повинні зберігатися в коричневих скляних контейнерах.

Б. ПОЛОЖЕННЯ ЩОДО РЕАГЕНТІВ І ОБЛАДНАННЯ, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

1. Якщо не зазначене інше в методах аналізу, всі реагенти для аналізу повинні буди аналітично чистими (а.ч.). При здійсненні аналізу мікроелементів, чистота реагентів повинна бути перевірена контрольним тестом. Залежно від отриманих результатів, може бути необхідним подальше очищення реагентів.

2. Будь-яка операція, що включає підготовку розчинів, розведення, полоскання або промивання (відповідно до методів аналізу) без вказівки на природу розчинника або розріджувача, що використовується, означає необхідність використання води. Як правило, вода повинна бути демінералізована або дистильована. В окремих випадках, які вказані в методах аналізу, вона має пройти спеціальні процедури очищення.

3. У зв'язку з обладнанням, що зазвичай знаходиться в контрольних лабораторіях, в методах аналізу вказуються тільки ті інструменти і обладнання, що є спеціальними, або використовуються в окремих випадках. Вони повинні бути чистими, зокрема, якщо необхідно визначити невеликі кількості речовин.

В. ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ І ПРЕДСТАВЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. **Процедура екстракції**

Декілька методів визначають конкретну процедуру екстракції. Як правило, процедури екстракції, що відрізняються від процедури, вказаної в методі, можуть бути застосовані за умови, якщо застосування процедури екстракції має еквівалентну ефективність екстракції для матриці, що аналізується, у порівнянні з процедурою, зазначеною в методі.

2. **Процедура очищення**

Декілька методів визначають конкретну процедуру очищення. Як правило, процедури очищення, що відрізняються від процедури, вказаної в методі, можуть бути застосовані за умови, що результат процедури очищення має еквівалентну ефективність очищення для матриці, що аналізується, у порівнянні з процедурою, зазначеною в методі.

3. **Звітність використовуваного методу аналізу**

Загалом один метод аналізу встановлюється для визначення кожної речовини в кормі. Якщо дано декілька методів, конкретний спосіб, що використовується контрольною лабораторією, повинен бути зазначений в звіті аналізу.

4. **Кількість визначень**

Результат, наведений у звіті аналізу, повинен бути середнім значенням, що отримане принаймні з двох визначень, проведених на окремих вибіркових частинах, і повинен мати задовільну повторюваність.

Тим не менш, у випадку аналізу небажаних речовин, якщо результат першого визначення значно (> 50%) менше, ніж в контрольній специфікації, ніяких додаткових визначень не потребується за умови, що застосовуються відповідні процедури контролю якості.

У разі контролю заявленого вмісту речовини або компонента, якщо результат першого визначення підтверджує заявлений вміст, тобто результат аналізу потрапляє в прийнятний діапазон зміни заявленого вмісту, ніяких додаткових визначень не потребується за умови, що застосовуються відповідні процедури контролю якості.

У деяких випадках цей прийнятний діапазон зміни визначається в законодавстві, наприклад, в Директиві Ради 79/373/ЄЕС ([1]).

5. **Звітність аналітичного результату**

Аналітичний результат повинен бути виражений в порядку, встановленому в методі аналізу з відповідною кількістю значущих цифр і повинен бути скорегований, якщо це необхідно, до вмісту вологи в остаточній пробі перед приготуванням.

([1]) OJ L 86, 6.4.1979, с. 30.

6. **Похибка вимірювання і швидкість відновлення в разі аналізу небажаних речовин**

Щодо небажаних речовин в межах Директиви 2002/32/ЕС, у тому числі діоксинів і діоксин-подібних ПХБ, продукт, призначений для корму тварин, вважається невідповідним встановленому максимальному вмісту, якщо результат аналізу перевищує максимальний вміст з урахуванням розширеної похибки вимірювання і корекції для відновлення. Для того, щоб оцінити відповідність, проаналізована концентрація використовується після коригування для відновлення і після вирахування розширеної похибки вимірювання. Ця процедура застосовується тільки в тих випадках, коли метод аналізу дозволяє оцінити похибку вимірювань та корекцію для відновлення (наприклад, це не можливо у випадку мікроскопічного аналізу).

Аналітичний результат повинен бути представлений наступним чином (досі використовуваний метод аналізу дозволяє оцінити похибку вимірювання та швидкість відновлення):

(a) скоригований для відновлення, вказана швидкість відновлення. корекція для відновлення НЕ є необхідною, коли швидкість відновлення знаходиться в діапазоні 90% і 110%;

(b) як «x +/- U», де x є аналітичним результатом і U є розширеною похибкою вимірювання, використовуючи коефіцієнт охоплення 2, який дає рівень вірогідності приблизно 95%.

Тим не менш, якщо результат аналізу значно (>50%) нижче контрольної специфікації, і за умови, що застосовуються відповідні процедури контролю якості, і аналіз служить тільки в цілях перевірки дотримання правових норм, аналітичний результат може бути представлений без корекції для відновлення та звітування швидкості відновлення і похибки вимірювання, що можуть бути опущені в цих випадках.

Додаток III

МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДЛЯ КОНТРОЛЮ СКЛАДУ ВИХІДНИХ МАТЕРІАЛІВ І КОМБІКОРМІВ

А. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВОЛОГИ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити вміст вологи в кормі. Коли корми містять летючі речовини, такі як органічні кислоти, слід зауважити, що значна кількість летючих речовин також визначається разом зі змістом вологи.

Це не поширюється на аналіз молочних продуктів в якості матеріалів корму, аналіз мінеральних речовин і сумішей, що складаються в основному з мінеральних речовин, аналіз рослинних і тваринних жирів і масел або аналіз олійного насіння і плодів, що містять олію.

2. **Принцип**

Проба висушується за певних умов, які змінюються залежно від природи корму. Втрата у вазі визначається шляхом зважування. Необхідно проводити попередню сушку при роботі з твердим кормом, який має високий вміст вологи.

3. **Обладнання**

3.1. Дробарка з непоглинаючих вологу матеріалів, яку легко чистити, що надає швидке, рівномірне дроблення без будь-якого помітного нагрівання, запобігає контакту із зовнішнім повітрям, наскільки це можливо, та відповідає вимогам, викладеним у пунктах 4.1.1 і 4.1.2 (наприклад, молоткові дробарки або мікро-дробарки з водяним охолодженням, розбірні конусні млини, повільний рух або зубчасті дробарки).

3.2. Аналітичний баланс, точність до 1 мг.

3.3. Сухі контейнери з нержавіючого металу або зі скла з кришками, що забезпечують герметичне закриття; робоча поверхня, що дозволяє розподіляти випробувану пробу приблизно частинами по 0,3 г/см^2.

3.4. Ізотермічна піч з електричним підігрівом (± 2°C) і належною вентиляцією, що забезпечує швидке регулювання температури ([1]).

3.5. Вакуумна піч з регульованим електричним підігрівом, оснащена масляним насосом і механізмом для введення гарячого сухого повітря або висушуючої речовини (наприклад, оксид кальцію).

3.6. Ексикатор з товстим перфорованим металом або фарфоровою тарілкою, що містить ефективну висушуючу речовину.

4. **Процедура**

Увага! Операції, описані в цьому розділі, повинні виконуватися відразу ж після відкриття упаковок проб. Аналіз повинен проводитися принаймні у двох паралельних тестах.

4.1. *Підготовка*

4.1.1. Корм, що відрізняється від того, що описаний в пунктах 4.1.2 та 4.1.3

Візьміть принаймні 50 г проби. При необхідності, подрібніть або розділіть таким чином, щоб уникнути будь-яких змін у вмісті вологи (див. 6).

4.1.2. Злаки і крупи

Візьміть принаймні 50 г проби. Подрібніть на частинки, з яких принаймні 50% пройде через 0,5 мм сито і не залишить більше 10% частинок в ситі з 1 мм круглими отворами.

(1) Для сушіння злакових, борошна та круп піч повинна мати таку теплову потужність, що, коли вона попередньо налаштована на 131°C, вона повернеться до цієї температурі менше ніж за 45 хвилин після того, як максимальна кількість проб була поміщена всередину для одночасного висушування. Вентиляція повинна бути такою, щоб при максимальному завантаженні пробами м'якої пшениці, які пройшли висушування протягом двох годин, результати висушування відрізнялись від результатів, отриманих після чотирьох годин висушування менше ніж на 0,15%.

4.1.3. Корм у вигляді рідини або пасти, корм, переважно сформований з масел і жирів

Візьміть близько 25 г проби, зважте з точністю до 10 мг, додайте відповідну кількість безводного піску, зваженого з точністю до 10 мг, і перемішуйте, доки не буде отриманий однорідний продукт.

4.2. *Висушування*

4.2.1. Корм, що відрізняється від описаного в пунктах 4.2.2 та 4.2.3

Зважте контейнер (3.3) з кришкою з точністю до 1 мг. Зважте в зваженому контейнері, з точністю до 1 мг близько 5 г проби і рівномірно розподіліть. Помістіть контейнер, без кришки, в піч, попередньо нагріту до 103 °C. Щоб запобігти зайвому падінню температури у печі, помістіть контейнер якнайшвидше. Залиште на висушування протягом чотирьох годин, що відраховуються від моменту, коли температура печі повертається до 103°C. Замініть кришку контейнера, вийміть контейнер з печі, дайте йому охолонути протягом від 30 до 45 хвилин в ексикаторі (3.6) і зважте з точністю до 1 мг.

Корм, що складається переважно з рослинних олій та жирів, висушуйте в печі протягом додаткових 30 хвилин при 130 °C. Різниця між цими двома зважуваннями не повинна перевищувати 0,1% вологи.

4.2.2. Злакові, борошно та крупа

Зважте контейнер (3.3) з кришкою з точністю до 0,5 мг. Зважте в зваженому контейнері, з точністю до 1 мг, близько 5 г подрібненої проби і рівномірно розподіліть. Помістіть контейнер, без кришки, в піч, попередньо нагріту до 130°C. Щоб запобігти зайвому падінню температури у печі, помістіть контейнер якнайшвидше. Залиште на висушування протягом двох годин, що відраховуються від моменту, коли температура печі повертається до 130°C. Замініть кришку контейнера, вийміть контейнер з печі, дайте йому охолонути протягом від 30 до 45 хвилин в ексикаторі (3.6) і зважте з точністю до 1 мг.

4.2.3. Комбікорм, що містить більше 4 % сахарози або лактози: кормові матеріали, такі як плід ріжкового дерева, гідролізована круп'яна продукція, солодове насіння, бурякова стружка, риби і розчинений цукор; комбікорм, що містить більше 25% мінеральних солей, включаючи кристалізаційну воду.

Зважте контейнер (3.3) з кришкою з точністю до 0,5 мг. Зважте в зваженому контейнері, з точністю до 1 мг, близько 5 г проби і рівномірно розподіліть. Помістіть контейнер, без кришки, в вакуумну піч (3.5), попередньо нагріту від 80 до 85 °C. Щоб запобігти зайвому падінню температури у печі, помістіть контейнер якнайшвидше.

Доведіть тиск до 100 мм рт.ст. і залиште висушуватись протягом чотирьох годин при цьому тиску, використовуючи гаряче сухе повітря або за допомогою висушуючої речовини (близько 300 г на 20 проб). В останньому випадку від'єднайте вакуумний насос, коли був досягнутий заданий тиск. Розрахуйте час висихання від моменту, коли температура печі повертається до діапазону від 80°C до 85C. Обережно доведіть піч назад до атмосферного тиску. Відкрийте піч, відразу покладіть кришку на контейнер, заберіть контейнер з печі, дайте охолонути протягом від 30 до 45 хвилин в ексикаторі (3.6) і зважте з точністю до 1 мг. Висушуйте протягом додаткових 30 хвилин у вакуумній печі при від 80 °C до 85 °C і повторно зважте. Різниця між цими двома зважуваннями не повинна перевищувати 0,1% вологи.

4.3. *Попереднє висушування*

4.3.1. Корм, що відрізняється від того, що описаний в пункті 4.3.2

Тверді корми з високим вмістом вологи, яка ускладнює дроблення, мають пройти попереднє висушування наступним чином:

Зважте 50 г *цільної* проби з точністю до 10 мг (стиснутий або агломерований корм може бути грубо розділений за необхідності) в підходящому контейнері (наприклад, алюмінієва пластина 20×12 см з 0,5 см обідком). Залиште висушуватись в печі при температурі від 60 °C до 70 °C, доки вміст вологи не буде знижений до 8-12%. Заберіть з печі, дайте охолонути без накриття в лабораторії протягом однієї години і зважте з точністю до 10 мг. Подрібніть відразу ж, як зазначено в пункті 4.1.1 і висушіть, як зазначено в пунктах 4.2.1 або 4.2.3, залежно від природи кормової сировини.

4.3.2. Зернові культури

Зерно із вмістом вологи більше 17 % має пройти попереднє висушування наступним чином:

Зважте 50 г цільного зерна з точністю до 10 мг в підходящому контейнері (наприклад, алюмінієва пластина 20×12 см з 0,5 см обідком). Залиште висушуватись протягом від 5 до 7 хвилин в сушильній шафі при 130°C. Заберіть з печі, дайте охолонути без накриття в лабораторії протягом двох годин і зважте з точністю до 10 мг. Подрібніть відразу ж, як зазначено в пункті 4.1.2 і висушіть, як зазначено в 4.2.2, залежно від природи кормової сировини.

5. **Підрахунок результатів**

Вміст вологи (X), у відсотках від проби, розраховується з використанням наступних формул:

5.1. *Висушування без попереднього висушування*

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

де:

m = початкова вага, в грамах, тестової проби, $м_0$ = вага в грамах сухого випробуваної проби.

5.2. *Висушування з попереднім висушуванням*

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

де:

m = початкова вага, в грамах, тестової проби,
m1 = вага, в грамах, випробуваної проби після попереднього висушування,
m_2 = вага, в грамах, випробуваної проби після трощіння або подрібнення,
m_0 = вага, в грамах, сухої тестової проби,

5.3. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати 0,2% від абсолютної величини вологості.

6. **Результати спостереження**

Якщо подрібнення виявиться необхідним і якщо воно змінить вміст вологи в продукті, результати аналізу компонентів корму повинні бути виправлені на підставі вмісту вологи у пробі в початковому стані.

Б. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВОЛОГИ У ТВАРИННИХ І РОСЛИННИХ ЖИРАХ І МАСЛАХ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дозволяє визначити вміст води і летючих речовин тваринних і рослинних жирів і масел.

2. **Принцип**

Пробу висушують до постійної ваги (втрата ваги між двома послідовними зважування повинна бути менше або дорівнювати 1 мг) при 103°C. Втрата у вазі визначається шляхом зважування.

3. **Обладнання**

3.1. Плоскодонна посудина, з корозійно-стійкого матеріалу, від 8 до 9 см в діаметрі і близько 3 см висотою.

3.2. Термометр з посиленим шариком і капілярною трубкою у верхньому кінці, градуйований від приблизно 80°C до, принаймні, 110°C і приблизно 10 см довжиною.

3.3. Пісочна ванна або електрична плита.

3.4. Ексикатор з ефективною речовиною висушування.

3.5. Аналітичний баланс.

4. **Процедура**

Зважте з точністю до мг приблизно 20 г однорідної проби в сухій, зваженій посудині (3.1), що містить термометр (3.2). Розігрійте на піщаній ванні або гарячій плиті (3.3), безперервно перемішуючи, з термометром, щоб температура досягла 90 °Сприблизно через 7 хвилин.

Необхідно зменшити температуру, спостерігаючи, з якою частотою бульбашки піднімаються з дна чашки. Температура не повинна перевищувати 105 °С. Продовжуйте перемішувати, включаючи дно посудини, поки бульбашки не перестануть утворюватися.

Для того щоб забезпечити повне видалення вологи, розігрійте кілька разів до 103°С ± *2°С*, охолодіть до 93°С між послідовними нагріваннями. Потім дайте охолонути до кімнатної температури в ексикаторі (3.4) і зважте. Повторіть цю операцію доти, доки втрата ваги між двома послідовними зважуваннями не перевищуватиме 2 мг.

Увага: Збільшення маси проби після повторного нагрівання вказує на окислення жиру, в цьому випадку обчисліть результати від зважування, проведеного безпосередньо перед збільшенням ваги.

5. **Підрахунок результатів**

Вміст вологи (X), у відсотках від проби, дається з використанням наступної формули:

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

де:

m = вага, в грамах, тестової проби,
m1 = маса, в грамах, посудини із вмістом до нагрівання,
m2 = маса, в грамах, посудини із вмістом після нагрівання,

Результати нижче 0,05% повинні бути записані як нижче 0,05%.

Повторюваність

Різниця вологості між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати 0,05 % від абсолютної величини вологості.

С. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СИРОГО ПРОТЕЇНУ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити вміст сирого протеїну корму на основі вмісту азоту, визначеного за методом К'єльдаля.

2. **Принцип**

Проба розчиняється сірчаною кислотою з каталізатором. Кислий розчин підлужують розчином гідроксиду натрію. Аміак дистилюють і збирають в виміряну кількість сірчаної кислоти, надлишок якої титрують зі стандартним розчином гідроксиду натрію.

Або виділений аміак дистилюють в надлишок розчину борної кислоти, з подальшим титруванням соляною кислотою або розчином сірчаної кислоти.

3. **Реактиви**

3.1. Сульфат калію.

3.2. Каталізатор: мідь (II), оксид CuO або пентагідрат сульфату міді (II), $CuSO_4\ 5H_2O$.
3.3. Гранульований цинк.
3.4. Сірчана кислота, ρ20 = 1,84 г/мл.
3.5. Сірчана кислота, стандартний об'ємний розчин, $c(H_2SO_4)$ = 0,25 моль/л.
3.6. Сірчана кислота, стандартний об'ємний розчин, $c(H_2SO_4)$ = 0,10 моль/л.
3.7. Сірчана кислота, стандартний об'ємний розчин, $c(H_2SO_4)$ = 0,05 моль/л.
3.8. Метиловий червоний індикатор ; розчиніть 300 мг метилового червоного в 100 мл етанолу, ***a*** =95-96 % (об'ємний вміст).
3.9. Розчин гідроксиду натрію (може бути використана технічна категорія) **β** = 40 г/100 мл (м/об: 40%).
3.10. Гідроксид натрію, стандартний об'ємний розчин c(NaOH) = 0,25 моль/л.
3.11. Гідроксид натрію, стандартний об'ємний розчин c(NaOH) = 0,10 моль/л.
3.12. Гранульована пемза, промита в соляній кислоті і обзолена.
3.13. Ацетанілід (точка плавлення = 114°C, N-вміст= 10,36%).
3.14. Сахароза (без азоту).
3.15. Борна кислота (H3BO3).
3.16. Розчин індикатору метилового червоного: розчиніть 100 мг метилового червоного в 100 мл етанолу або метанолу.
3.17. Розчин бромкрезолового зеленого: розчиніть 100 мг бромкрезолу зеленого в 100 мл етанолу або метанолу.
3.18. Розчин борної кислоти (10 г/л до 40 г/л, залежно від використовуваного обладнання).

При застосуванні колориметричної кінцевої точки, метиловий червоний і бромкрезоловий індикатори повинні бути додані до кислих борних розчинів. Якщо підготовлений 1 літр розчину борної кислоти, перед доведенням об'єму 7 мл розчину індикатору метилового червоного (3.16) і 10 мл розчину бромкрезолового зеленого (3.17) повинні бути додані.

Залежно від використовуваної води, pH розчину борної кислоти може відрізнятися від партії до партії. Часто доведення невеликим обсягом лугу необхідно для отримання позитивного контролю.

Примітка: Додавання близько від 3 мл до 4 мл NaOH (3.11) до 1 л 10 г/л борної кислоти, як правило, дає хороші коригування. Зберігайте розчин при кімнатній температурі і захищайте розчин від світла та джерел пар аміаку при зберіганні.

3.19. Соляна кислота, стандартний об'ємний розчин c(HCl) = 0,10 моль/л.

Примітка: Інші концентрації об'ємних розчинів (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 і 3.19) можуть бути використані, якщо це буде виправлено в розрахунках. Концентрації завжди повинні бути виражені до чотирьох десяткових знаків.

4. Обладнання

Обладнання, що підходить для виконання розщеплення, дистиляції та титрування відповідно до процедури по К'єльдаля.

5. Процедура

5.1. *Розщеплення*

Зважте 1 г проби з точністю до 0,001 г і перенесіть пробу в колбу обладнання для розщеплення. Додайте 15 г сульфату калію (3.1), відповідну кількість каталізатору (3.2) (від 0,3 до 0,4 г оксиду міді (II) або 0,9 до 1,2 г пентагідрату сульфату міді (II)), 25 мл сірчаної кислоти (3.4) і, якщо потрібно, кілька гранул пемзи (3.12) і перемішайте.

Спочатку помірно нагрійте колбу, збовтуючи час від часу, якщо це необхідно, поки маса не карбонізується, а піна зникне; потім нагрійте більш інтенсивно, поки рідина не буде постійно кипіти. Нагрівання є відповідним, якщо кипляча кислота конденсується на стінках колби. Уникайте перегрівання стінок і прилипання до них органічних часток.

Коли розчин стає прозорим і світло-зеленим, продовжуйте кипіння ще протягом двох годин, потім дайте охолонути.

5.2. *Дистиляція*

Досить обережно додайте воду, щоб гарантувати повне розчинення сульфатів. Дайте охолонути, а потім додайте кілька гранул цинку (3.3), якщо потрібно. Продовжуйте аналіз відповідно до пунктів 5.2.1 або 5.2.2.

5.2.1. Дистиляція в сірчаний кислоті

Додайте до колекторної колби дистиляційного обладнання точно відміряну кількість 25 мл сірчаної кислоти (3.5) або (3.7), залежно від передбачуваного вмісту азоту. Додайте кілька крапель метилового червоного індикатора (3.8).

Під’єднайте колбу розщеплення до конденсатору в дистиляційному обладнанні і занурте кінець конденсатора в рідину, що міститься в колекторній колбі на глибину не менше 1 см (див. результати спостереження 8.3). Повільно залийте 100 мл розчину гідроксиду натрію (3.9) в колбу розщеплення без втрати аміаку (див. результати спостереження 8.1). Нагрійте колбу, поки аміак не дистилюється.

5.2.2. Дистиляція в борній кислоті

Коли титрування вмісту аміаку в дистиляті виконується вручну, проводиться процедура, наведена нижче. Якщо дистиляція повністю автоматизована для включення титрування вмісту аміаку в дистиляті, дотримуйтесь інструкцій виробника апарату дистиляції.

Помістіть колекторну колбу, що містить від 25 мл до 30 мл розчину борної кислоти (3.18) під вихідною трубкою конденсатора таким чином, щоб подавальна трубка знаходилася нижче поверхні надлишку розчину борної кислоти. Відрегулюйте дистиляційний апарат для дозування 50 мл розчину гідроксиду натрію (3.9). Використовуйте дистиляційний апарат відповідно до інструкцій виробника та дистилюйте виділений аміак шляхом додаванням розчину гідроксиду натрію. Зберіть дистилят в отриманий розчин борної кислоти. Кількість дистиляту (час парової дистиляції) залежить від кількості азоту у пробі. Дотримуйтеся інструкцій виробника.

Примітка: У напівавтоматичному дистиляційному апараті додавання надлишкового гідроксиду натрію і дистиляція з водяною парою виконуються автоматично.

5.3. *Титрування*

Продовжуйте аналіз відповідно до пунктів 5.3.1 або 5.3.2.

5.3.1. Сірчана кислота

Протитруйте надлишок сірчаної кислоти в колекторну колбу з розчином гідроксиду натрію (3.10 або 3.11), залежно від використовуваної концентрації сірчаної кислоти, поки кінцева точка не буде досягнута.

5.3.2. Борна кислота

Протитруйте вміст колекторної колби із розчином соляної кислоти стандартного об’єму (3.19) або із розчином сірчаної кислоти стандартного об’єму (3.6) з використанням бюретки і визначте кількість використаного титранту.

Коли застосовується колориметрична кінцева точка, кінцева точка досягається при першій появі рожевого кольору у вмісті. Оцініть показники бюретки з точністю до 0,05 мл. Ілюмінована магнітна пластина мішалки або фотометричний детектор можуть допомогти у візуалізації кінцевої точки.

Це може бути зроблено автоматично за допомогою парового дистилятору з автоматичним титруванням.

Дотримуйтеся інструкцій виробника з експлуатації конкретного дистилятору або дистилятору/титратору.

Примітка: При використанні автоматичної системи титрування, титрування починається відразу ж після початку дистиляції, використовується 1% розчин борної кислоти (3.18).

При використанні повністю автоматичного апарату дистиляції, автоматичне титрування аміаку також може бути проведене з виявленням кінцевої точки за допомогою потенціометричної pH системи.

У цьому випадку використовується автоматичний титратор з pH-метром. pH-метр повинен бути належним чином відкалібрований в діапазоні від pH 4 до pH 7, у відповідності з нормальними лабораторними процедурами pH-калібрування.

Кінцева pH-точка титрування досягається при pH 4,6, що є найвищою точкою на кривій титрування (точка перегину).

5.4. *Контрольний тест*

Щоб підтвердити, що реагенти вільні від азоту, проведіть контрольний тест (розщеплення, дистиляція та титрування), використовуючи 1 г сахарози (3.14) замість проби.

6. **Підрахунок результатів**

Розрахунки виконуються відповідно до пунктів 6.1 або 6.2.

6.1. *Розрахунок для титрування, відповідно до пункту 5.3.1*

Вміст сирого протеїну, виражений у відсотках маси, розраховують за такою формулою:

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

де:

V_o = об'єм (мл) NaOH (3.10 або 3.11), використовуваний в контрольному тесті, V1 = об'єм (мл) NaOH (3.10 або 3.11), використовуваний в контрольному титруванні, c = концентрація (моль/л) гідроксиду натрію (3.10 або 3.11), m = вага (г) проби.

6.2. *Розрахунок для титрування відповідно до пункту 5.3.2*

6.2.1. Титрування соляною кислотою

Вміст сирого протеїну, виражений у відсотках маси, розраховують за такою формулою:

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

де:

m = вага (г) досліджуваної частини,
c = концентрація (моль/л) стандартного об'єму розчину соляної кислоти (3.19),
V_0 = об'єм (у мл) соляної кислоти, що використовується для контрольних тестів,
V1 = об'єм (у мл) соляної кислоти, що використовується для тестових частин,

6.2.2. Титрування сірчаною кислотою

Вміст сирого протеїну, виражений у відсотках маси, розраховують за такою формулою:

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

де:

m = вага (г) досліджуваної частини,
c = концентрація (моль/л) стандартного об'єму розчину сірчаною кислоти (3.6),
V_0 = об'єм (у мл) сірчаної (3.6) кислоти, що використовується для контрольних тестів,
V1 = об'єм (у мл) сірчаної (3.6) кислоти, що використовується для тестової частини,

7. **Перевірка методу**

7.1. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з використанням тієї ж проби, не повинна перевищувати:

— 0,2% абсолютної величини, для вмісту сирого протеїну менше 20%,
— 1,0% відносної найвищої величини, для вмісту сирого протеїну в діапазоні від 20% до 40%,
— 0,4% абсолютної величини, для вмісту сирого протеїну більше 40%.

7.2. *Точність*

Проведення аналізу (розщеплення, дистиляція та титрування) з від 1,5 до 2,0 г ацетаніліду (3.13) при наявності 1 г сахарози (3.14); 1 г ацетаніліду витрачає 14,80 мл сірчаної кислоти (3.5). Відновлення повинне бути принаймні 99%.

8. **Результати спостереження**

8.1. Обладнання може бути ручного, напівавтоматичного або автоматичного типу. Якщо обладнання вимагає перенесення між стадіями розщеплення та дистиляції, ця передача повинна здійснюватися без втрат. Якщо колба дистиляційного обладнання не оснащена крапельною воронкою, додайте гідроксид натрію безпосередньо перед підключенням колби до конденсатору, заливаючи рідину повільно по стінці.

8.2. Якщо розщеплений продукт твердне, відновіть аналіз за допомогою більшої кількості сірчаної кислоти (3.4), ніж зазначено вище.

8.3. Для продуктів з низьким вмістом азоту, об’єм сірчаної кислоти (3.7) для розміщення в колекторній колбі може бути знижений, якщо це необхідно, до 10 або 15 мл, і доведений водою до об’єму 25 мл.

8.4. Для рутинного аналізу можуть бути застосовані альтернативні методи аналізу для визначення сирого протеїну, але метод К’єльдалю, описаний в частині С, є еталонним. Еквівалентність результатів, отриманих альтернативним методом (наприклад, DUMAS), в порівнянні з контрольним методом, повинна бути продемонстрована індивідуально для кожної матриці. Оскільки результати, отримані альтернативним методом, навіть після перевірки еквівалентності, можуть дещо відхилятися від результатів, отриманих за допомогою контрольного методу, то варто згадати в аналітичній доповіді метод аналізу, що використовуються для визначення сирого протеїну.

Г. ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити рівень сечовини в кормі.

2. **Принцип**

Проба суспендується у воді з очисним реагентом. Суспензія фільтрується. Вміст сечовини фільтрату визначається після додавання 4-диметиламінобензальдегіду (4-ДМАБ), виміряючи оптичну щільність на довжині хвилі 420 нм.

3. **Реактиви**

3.1. Розчин з 4-диметиламінобензальдегідом: розчиніть 1,6 г 4-ДМАБ в 100 мл 96% етанолу і додайте 10 мл соляної кислоти (ρ_{20}1,19 г/мл). Цей реагент має термін придатності не більше двох тижнів.

3.2. Розчин Карреза I: розчиніть у воді 21,9 г ацетату цинку, $Zn(CH_3COO)_2$ $2H_2O$ і 3 г крижаної оцтової кислоти. Доведіть до об’єму 100 мл води.

3.3. Розчин Карреза II: розчиніть у воді 10,6 г залізосиньородистого калію, K_4 Fe $(CN)_6$ $3H_2O$. Доведіть до 100 мл водою.

3.4. Активоване вугілля, яке не поглинає сечовину (перевірити).

3.5. Сечовина, 0,1%-ний розчин (маса/об'єм).

4. **Обладнання**

4.1. Змішувач (барабанний): приблизно від 35 до 40 об./хв.

4.2. Пробірки: 160 × 16 мм з пробками з матового скла.

4.3. Спектрофотометр

5. **Процедура**

5.1. *Аналіз проби*

Зважте 2 г проби з точністю до мг і додайте 1 г активованого вугілля (3.4) у мірну колбу об'ємом 500 мл. Додайте 400 мл води і 5 мл розчину Карреза I (3.2), перемішуйте протягом приблизно 30 секунд і додайте 5 мл розчину Карреза II (3.3). Перемішуйте протягом 30 хвилин в барабані. Доведіть до об'єму водою, збовтайте і відфільтруйте.

Видаліть 5 мл безбарвних прозорих фільтратів, помістіть в пробірки з пробками з матового скла, додайте 5 мл розчину 4-ДМАБ (3.1) і перемішайте. Розмістіть пробірки у водяній бані при 20°C (+/- 4°C). Після 15 хвилин виміряйте оптичну щільність розчину спектрофотометром при 420 нм. Порівняйте з контрольним тестовим розчином реагентів.

5.2. *Калібрувальна крива*

Видаліть об'єми 1, 2, 4, 5 і 10 мл розчину сечовини (3.5), розмістіть в мірних колбах об'ємом 100 мл і доведіть до об'єму водою. Видаліть 5 мл з кожного розчину, додайте 5 мл розчину (3.1) 4-ДМАБ до кожного з них, гомогенізуйте і виміряйте оптичну щільність, як показано вище, порівняно з контрольним розчином, що містить 5 мл 4-ДМАБ і 5 мл води без сечовини. Зобразіть калібрувальну криву.

6. **Підрахунок результатів**

Визначте кількість сечовини у пробі за допомогою кривої.

Виразіть результати у відсотках від проби.

7. **Результати спостереження**

7.1. У разі вмісту сечовини більше 3%, необхідно зменшити пробу до 1 г або розбавити похідним розчином, так щоб було не більше 50 мг сечовини в 500 мл.

7.2. У разі невеликого вмісту сечовини, необхідно збільшувати пробу до тих пір, поки фільтрат залишається прозорим і безбарвним.

7.3. Якщо проба містить прості азотисті сполуки, такі як амінокислоти, оптична щільність повинна бути виміряна при 435 нм.

Д. ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕТЮЧИХ АЗОТИСТИХ ОСНОВ

I. ШЛЯХОМ МІКРОДИФУЗІЇ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає змогу визначити вміст летючих азотистих основ, виражених аміаком, в кормі.

2. **Принцип**

Проба видобувається водою, розчин очищується і фільтрується. Летючі азотисті основи заміщаються мікродифузією за допомогою розчину калію карбонату, зібраного в розчині борної кислоти та титрованого сірчаною кислотою.

3. **Реактиви**

3.1. Трихлороцтова кислота, 20%-ий розчин (маса/об'єм).

3.2. Індикатор: розчиніть 33 мг бромкрезолового зеленого і 65 мг метилового червоного в 100 мл 95% -96% (об./об.) етанолу.

3.3. Розчин борної кислоти: в градуйованій колбі об'ємом 1 л розчиніть 10 г борної кислоти в 200 мл 95% -96% (об./об.) етанолу і 700 мл води. Додайте 10 мл індикатору (3.2). Перемішайте і, якщо треба, скоригуйте колір розчину до світло-червоного, додаючи розчин гідроксиду натрію. 1 мл цього розчину виправить максимум 300 мкг NH_3.

3.4. Насичений розчин карбонату калію: розчиніть 100 г карбонату калію в 100 мл киплячої води. Залиште охолонути, відфільтруйте.

3.5. Сірчана кислота 0,01 моль/л.

4. **Обладнання**

4.1. Змішувач (барабан): приблизно від 35 до 40 об./хв.

4.2. Скляні або пластикові клітинки Конвея (див. схему).

4.3. Мікробюретки градуйовані 1/100 мл.

5. **Процедура**

Зважте 10 г проби з точністю до 1 мг і додайте 100 г води у градуйовану колбу об'ємом 200 мл. Змішуйте або перемішуйте в стакані протягом 30 хвилин. Додайте 50 мл розчину трихлороцтової кислоти (3.1), доведіть до об'єму водою, енергійно збовтайте і процідіть через гофрований фільтр.

За допомогою піпетки введіть 1 мл розчину борної кислоти (3.3) в центральну частину клітки Конвея та 1 мл проби фільтрату в корону клітки. Частково накрийте змащеною кришкою. Швидко додайте 1 мл насиченого розчину карбонату калію (3.4) в корону і закрийте кришкою таким чином, щоб клітка була герметичною. Поверніть клітку, обережно обертаючи її в горизонтальній площині, щоб два реагенти змішались. Залишити для інкубації або принаймні на чотири години при кімнатній температурі, або на одну годину при 40 ^{o}C.

За допомогою мікробюретки (4.3) протитруйте летючі основи в розчині борної кислоти з сірчаною кислотою (3.5).

Проведіть контрольний тест, використовуючи ту ж процедуру, але без проби для аналізу.

6. **Підрахунок результатів**

1 мл H_2SO_4 0,01 моль/літр відповідає 0,34 мг аміаку.
Виразіть результати у відсотках від проби.
Повторюваність

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати:

— 10% у відносній величини, коли вміст аміаку менше 1,0%,

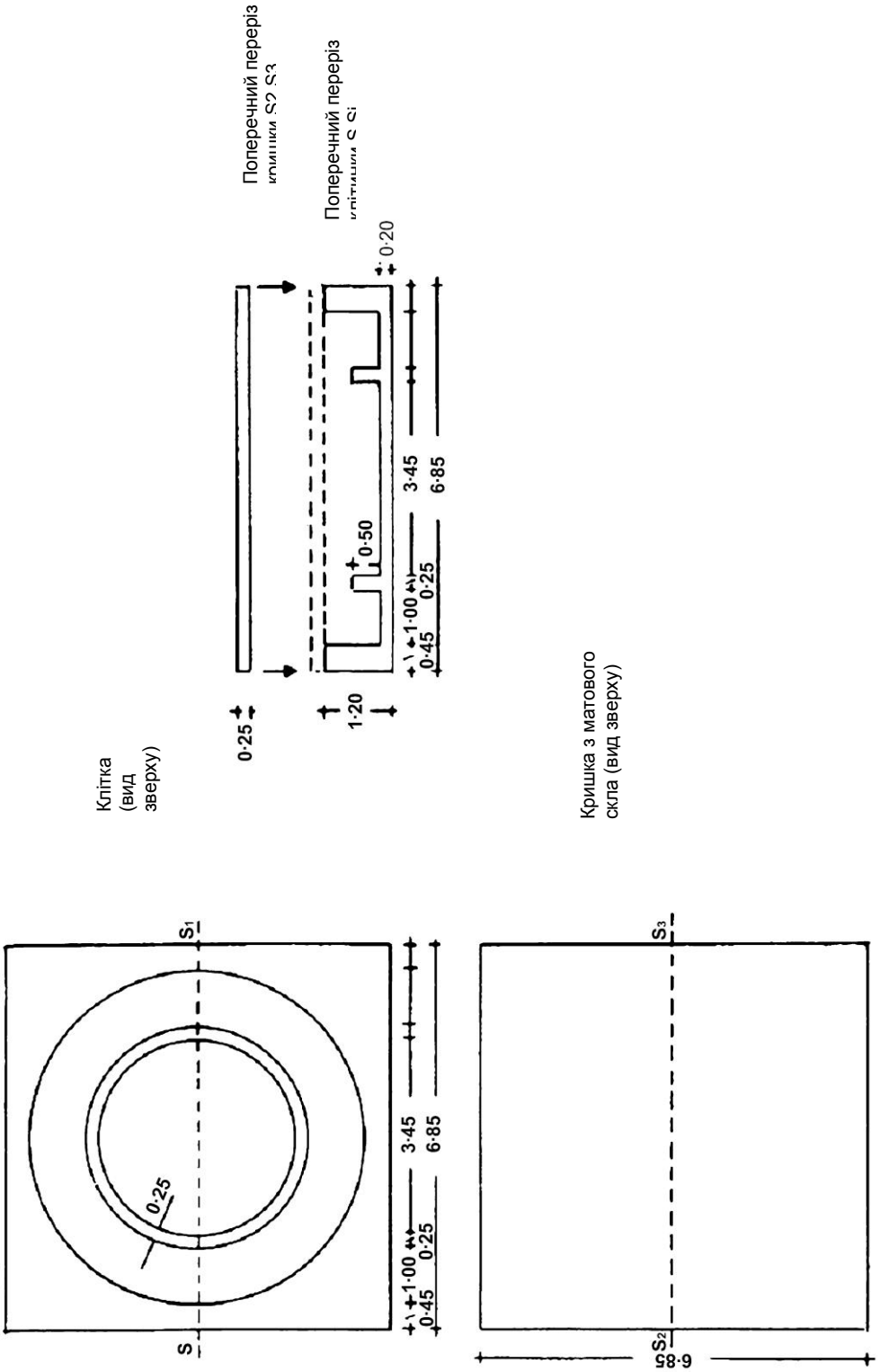
— 0,1%, в абсолютній величині, коли вміст аміаку 1,0% або більше.

7. **Результати спостереження**

Якщо вміст аміаку проби перевищує 0,6%, розведіть первинний фільтрат.

КЛІТКА КОНВЕЯ

Шкала 1/1



II. ШЛЯХОМ ДИСТИЛЯЦІЇ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає змогу визначити вміст летючих азотистих основ, виражених аміаком, в рибній муці, яка практично не містить сечовини. Це відноситься тільки до вмісту аміаку менше, ніж 0,25%.

2. **Принцип**

Проба видобувається водою, розчин очищується і фільтрується. Летючі азотисті основи зміщуються при температурі кипіння з додаванням оксиду магнію і зібраної у певній кількості сірчаної кислоти, перевищення якої відтитровують розчином гідроксиду натрію.

3. **Реактиви**

3.1. Трихлороцтова кислота, 20%-ий розчин (маса/об'єм).
3.2. Окис магнію.
3.3. Антипінна емульсія (наприклад, кремнієва).
3.4. Сірчана кислота 0,05 моль/л.
3.5. Розчин гідроксиду натрію 0,1 моль/л.
3.6. Метил-червоний розчин 0,3% в 95%-96% (об./об.) етанолі.

4. **Обладнання**

4.1. Змішувач (барабанний): приблизно від 35 до 40 об./хв.

4.2. Обладнання для дистиляції типу К'єльдаля.

5. **Процедура**

Зважте 10 г проби з точністю до 1 мг і додайте 100 г води у градуйовану колбу об'ємом 200 мл. Змішуйте або перемішуйте в стакані протягом 30 хвилин. Додайте 50 мл розчину трихлороцтової кислоти (3.1), доведіть до об'єму водою, енергійно збовтайте і процідіть через гофрований фільтр.

Візьміть кількість чистого фільтрату, що є прийнятним для передбачуваного вмісту летючих азотистих основ (зазвичай підходить 100 мл). Розбавте 200 мл і додайте 2 г оксиду магнію (3.2) і кілька крапель антипінної емульсії (3.3). Розчин має бути лужним на лакмусовому папірці; в іншому випадку додайте оксид магнію (3.2). Дійте згідно з пунктами 5.2 і 5.3 методу аналізу для визначення вмісту сирого протеїну (частина С цього додатка).

Проведіть контрольний тест, використовуючи ту ж процедуру, але без проби для аналізу.

6. **Підрахунок результатів**

1 мл H_2SO_4 0,05 моль/літр відповідає 1,7 мг аміаку.
Виразіть результати у відсотках від проби.
Повторюваність

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати, в відносній величині, 10% аміаку.

Е. ВИЗНАЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТ (ЗА ВИНЯТКОМ ТРИПТОФАНУ)

1. **Мета і зміст**

Цей метод дозволяє провести визначення вільних (синтетичних та природних) і загальних (пептидних і вільних) амінокислот в кормі, використовуючи аналізатор амінокислоти. Це відноситься до наступних амінокислот: цистеїн,

метіонін, лізин, треонін, аланін, аргінін, аспаргінова кислота, глутамінова кислота, гліцин, гістидин, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, пролін, серин, тирозин і валін.

Метод не розрізняє солі амінокислот та не може розрізняти D і L форми амінокислот. Він неприйнятний для визначення триптофану або гідроксильних аналогів амінокислот.

2. **Принцип**

2.1. *Вільні амінокислоти*

Вільні амінокислоти екстрагують розведеною соляною кислотою. Сумісно екстраговані азотисті макромолекули осідають в розчині сульфосаліцилової кислоти і фільтруються. Відфільтрований розчин коригується до pH 2,20. Амінокислоти розділяються іонообмінною хроматографією і визначаються реакцією на нінгідрин з фотометричним виявленням при 570 нм.

2.2. *Загальні амінокислоти*

Обрана процедура залежить від досліджуваної амінокислоти. Цистеїн і метіонін повинні бути окислені цистеїновою кислотою та сульфоном метіоніну відповідно до гідролізу. Тирозин повинен бути визначеним в гідролізатах неокислених проб. Всі інші амінокислоти, перераховані в пункті 1, можуть визначатися в окисленій або неокисленій пробі.

Окислення проходить при 0°C сумішшю надмурашиної кислоти/фенолу. Надлишок окислення реагенту розкладається з дисульфатом натрію. Окислені або неокислені проби гідролізуються соляною кислотою (3.20) протягом 23 годин. Гідролізат коригується до pH 2,20. Амінокислоти розділяються іонообмінною хроматографією і визначаються реакцією на нінгідрин з фотометричним виявленням при 570 нм (440 нм для проліну).

3. **Реактиви**

Необхідно використовувати подвійно дистильовану воду або воду еквівалентної якості (провідність < 10 мкСм).

3.1. Перекис водню, вага (вага/об) = 30 %.
3.2. Мурашина кислота, вага (вага/вага) = 98% -100%.
3.3. Фенол.
3.4. Дисульфіт натрію.
3.5. Гідроксид натрію.
3.6. Дигідрат 5-сульфосаліцилової кислоти.
3.7. Соляна кислота, щільність близько 1,18 г/мл.
3.8. Дигідрат три-натрію цитрату.
3.9. 2,2-тіодіетанол (тіодігліколь).
3.10. Хлорид натрію.
3.11. Нінгідрин.
3.12. Петролейний ефір, діапазон кипіння 40-60 °C.
3.13. Норлейцин або інше з’єднання, що підходять для використання в якості внутрішнього стандарту.
3.14. Азот (<10 частин на мільйон кисню).
3.15. 1-октанол.

3.16. Амінокислоти

3.16.1. Стандартні речовини, перелічені в пункті 1. Чисті сполуки, що не містять кристалізаційну воду. Сушити у вакуумі з P_2O_5 або H_2SO_4 протягом 1 тижня перед використанням.

3.16.2. Цистеїнова кислота.

3.16.3. Сульфон метіоніну.

3.17. Розчин гідроксиду натрію, c = 7,5 моль/л:
Розчиніть 300 г NaOH (3.5) у воді і доведіть до 1 літра.

3,18. Розчин гідроксиду натрію, c = 1 моль/л:
Розчиніть 40 г NaOH (3.5) у воді і доведіть до 1 літра.

3.19. Мурашина кислота - фенольний розчин:
Змішайте 889 г мурашиної кислоти (3.2) зі 111 г води і додати 4,73 г фенолу (3.3).

3.20. Гідролізна суміш, c = 6 моль HCl/л, що містить 1 г фенолу/л:
Додайте 1 г фенолу (3.3) до 492 мл HCl (3.7) та доведіть до 1 літра водою.

3.21. Екстрагуюча суміш, c = 0,1 моль HCl/л, що містить 2 % тіодігліколя: Візьміть 8,2 мл HCl (3.7), розбавте приблизно 900 мл води, додайте 20 мл тіодігліколя (3.9) і доведіть до 1 л водою, (не змішуйте 3.7 і 3.9 безпосередньо).

3.22. Розчин 5-сульфосаліцилової кислоти, ß = 6 %:
Розчиніть 60 г розчину 5-сульфосаліцилової кислоти (3.6) у воді і доведіть до 1 л водою.

3,23. Суміш окислення (Надмурашина кислота — фенол):

Змішайте 0,5 мл перекису водню (3.1) з розчином 4,5 мл мурашиної кислоти з фенолом (3.19) в маленькому стакані. Інкубуйте при 20-30°C протягом години для того, щоб сформувати надмурашину кислоту, а потім охолодіть на льодовій бані (15 хв.) перш ніж додавати до проби.

Увага: Уникайте контакту зі шкірою і носіть захисний одяг.

3.24. Буфер цитрату, c = 0,2 моль Na^+/л, pH 2,20:

Розведіть 19,61 г цитрату натрію (3.8), 5 мл тіодігліколя (3.9), 1 г фенолу (3.3) і 16,50 мл HCl (3.7) у приблизно 800 мл води. Скоригуйте pH до 2,20. Доведіть до об'єму 1 л води.

3.25. Буфери елюції, отримані відповідно до умов використовуваного аналізатора (4.9)

3.26. Нінгідриновий реагент, отриманий відповідно до умов використовуваного аналізатора (4.9).

3.27. Стандартні розчини амінокислот. Ці розчини мають зберігатися при температурі нижче 5 °C.

3.27.1. Похідний стандартний розчин амінокислот (3.16.1).
c = 2,5 мкмоль/мл кожного в соляній кислоті.
Можна отримати у великих кількостях.

3.27.2. Похідний стандартний розчин цистеїнової кислоти і сульфону метіоніну, c = 1,25 мкмоль/мл.

Розчиніть 0,2115 г цистеїнової кислоти (3.16.2) і 0,2265 г сульфону метіоніну (3.16.3) в цитратному буфері (3.24) в градуйованій колбі об'ємом 1 літр і доведіть до позначки цитратного буферу. Зберігайте при температурі нижче 5 °C не більше 12 місяців. Цей розчин не використовується, якщо похідний стандартний розчин (3.27.1) містить цистеїнову кислоту та сульфон метіоніну.

3.27.3. Похідний стандартний розчин внутрішнього стандарту, наприклад, норлейцин, c = 20 мкмоль/мл.

Розчиніть 0,6560 г норлейцину (3.13) в цитратному буфері (3.24) в градуйованій колбі і доведіть до 250 мл буфером цитрату. Зберігайте при температурі нижче 5°C не більше 6 місяців.

3.27.4. Калібрувальний розчин стандартних амінокислот для використання з гідролізатами, c = 5 нмоль/50 мкл цистеїнової кислоти і сульфону метіоніну і c = 10 нмоль/50 мкл інших амінокислот. 2,2 г хлориду натрію (3.10) розчиняють в 100 мл склянці 30 мл буферу цитрату (3.24). Додайте 4,00 мл похідного стандартного розчину амінокислот (3.27.1), 4,00 мл похідного стандартного розчину цистеїнової кислоти та сульфону метіоніну (3.27.2) і 0,50 мл похідного концентрованого розчину внутрішнього стандарту (3.27.3), якщо він використовується. Скоригуйте pH до 2,20 гідроксидом натрію (3.18).

Кількісно передайте в градуйовану колбу об'ємом 50 мл і доведіть до позначки буфером цитрату (3.24) і перемішайте.
Зберігайте при температурі нижче 5 °C не більше 3 місяців.
Див. також результати спостереження 9.1.

3.27.5. Калібрувальний розчин стандартних амінокислот для використання з гідролізатами, отриманими відповідно до пункту 5.3.3.1, і для використання з екстрактами (5.2). Калібрувальний розчин отримують відповідно до пункту 3.27.4, але без хлориду натрію.

Зберігайте при температурі нижче 5 °C не більше 3 місяців.

4. **Обладнання**

4.1. кругла колба об'ємом 100 або 250 мл, обладнана дефлегматором.

4.2. 100 мл пляшка з боросилікатного скла з гумовою/тефлоновою кришкою (наприклад, Дюран, Шот) для використання в печі.

4.3. Піч з штучною вентиляцією і регулятором температури з більшою точністю, ніж ± 2 ° C.

4.4. pH-метр (три знаки після коми).

4.5. Мембранний фільтр (0,22 мкм).

4.6. Центрифуга.

4.7. Поворотний вакуумний випарник.

4.8. Механічна або магнітна мішалка.

4.9. Аналізатор амінокислот або обладнання ВЕРХ з іонообмінною колонкою, пристроєм для нінгідрину, післяколонної дериватизації і фотометричним детектором.

Колонка наповнена активованими полістирольними смолами, здатними розділяти амінокислоти, одну від одної і від інших матеріалів, що містять нінгідрин. Потік в буфері і нінгідринових лініях надається насосами, що мають стабільність потоку ± 0,5% в період, що охоплює процедуру стандартного калібрування і аналізу проб.

З деякими аналізаторами амінокислот можна використовувати процедури гідролізу, в яких гідролізат має концентрації натрію c = 0,8 моль/л і містить всю залишкову мурашину кислоту від стадії окислення. Інші не надають задовільного поділу певних амінокислот, якщо у гідролізаті міститься надлишок мурашиної кислоти і/або високі концентрації іонів натрію. У цьому випадку об'єм кислоти зменшується випаровуванням до приблизно 5 мл після гідролізу і до коригування pH. Випаровування повинно здійснюватися під вакуумом при 40°C максимум.

5. **Процедура**

5.1. *Підготовка проби*

Пробу подрібнюють для проходження через сито 0,5 мм. Проби з високим вмістом вологи повинні бути або висушені при температурі, що не перевищує 50 °C, або висушені сублімацією до подрібнення. Проби з високим вмістом жиру екстрагують петролейним ефіром (3.12) до шліфування.

5.2. *Визначення вільних амінокислот в кормі і преміксах*

Зважте з точністю до 0,2 мг відповідну суму (1-5 г) підготовленої проби (5.1) в конічній колбі і додайте 100,0 мл екстрагуючої суміші (3.21). Збовтуйте суміш протягом 60 хвилин за допомогою механічного класифікатору або магнітної мішалки (4.8). Дозвольте осаду осісти і додайте піпеткою 10,0 мл надосадового розчину у 100 мл склянку.

Додайте 5,0 мл розчину сульфосаліцилової кислоти (3.22), перемішуючи, і продовжуйте перемішувати за допомогою магнітної мішалки протягом 5 хвилин. Відфільтруйте або центрифугуйте надосадовий розчин для того, щоб видалити будь-який осад. Розмістіть 10,0 мл отриманого розчину у склянку об'ємом 100 мл і скоригуйте pH до 2,20, використовуючи розчин гідроксиду натрію (3.18), перемістіть у мірну колбу відповідного об'єму, використовуючи цитратний буфер (3.24) і доведіть до позначки буферним розчином (3.24).

Якщо використовується внутрішній стандарт, додайте 1,00 мл внутрішнього стандарту (3.27.3) для кожних 100 мл остаточного розчину і доведіть до позначки буферним розчином (3.24).

Перейдіть до наступного етапу хроматографії відповідно до параграфу 5.4.

Якщо екстракти не оцінюються того ж дня, вони мають зберігатися при температурі нижче 5°C.

5.3. *Визначення загальних амінокислот*

5.3.1. Окисно-відновна реакція

Зважте з точністю до 0,2 мг від 0,1 до 1 г підготовленої проби (5.1) у:

— круглу колбу об'ємом 100 мл (4.1) для відкритого гідролізу (5.3.2.3) або
— круглу колбу об'ємом 250 мл (4.1), якщо потрібна низька концентрація натрію (5.3.3.1), або
— пляшка 100 мл з кришкою (4.2) для закритого гідролізу (5.3.2.4).

Зважена вибіркова частина повинна мати вміст азоту приблизно 10 мг і вологість, що не перевищує 100 мг.

Розмістіть колбу/пляшку на льодовій бані й охолодіть до 0°C, додайте 5 мл суміші окислення (3.23) і змішайте, використовуючи скляний шпатель з зігнутим наконечником. Герметично закрийте колбу/пляшку, що містить шпатель, герметичною плівкою, поставте ванну з крижаною водою, яка містить закритий контейнер, в холодильник при 0°C та залиште на 16 годин. Після 16 годин вийміть з холодильника та розкладіть надлишок реагенту окислення, шляхом додавання 0,84 г дисульфату натрію (3.4).

Перейдіть до кроку 5.3.2.1.

5.3.2. Гідроліз

5.3.2.1. *Гідроліз окислених проб*

До окисленої проби, підготовленого відповідно до пункту 5.3.1, обережно додайте 25 мл гідролізної суміші (3.20), слідкуючи за тим, щоб будь-які залишки проби, що могли залишитись на посудині або шпателі, були змиті.

Залежно від застосовної процедури гідролізу, дійте згідно з пунктами 5.3.2.3 або 5.3.2.4.

5.3.2,2. *Гідроліз неокислених проб*

Відважте в круглу колбу об'ємом 100 мл або 250 мл (4.1) або пляшку об'ємом 100 мл з гвинтовою кришкою (4.2) з точністю до 0,2 мг від 0,1 до 1 г підготовленої проби (5.1). Зважена вибіркова частина повинна мати вміст азоту близько 10 мг. Обережно додайте 25 мл гідролізної суміші (3,20) і змішайте з пробою. Продовжуйте аналіз відповідно до пунктів 5.3.2.3 або 5.3.2.4.

5.3.2,3. *Відкритий гідроліз*

Додайте 3 скляні кульки в суміш в колбі (підготовлена у відповідності до 5.3.2.1 або 5.3.2.2) і продовжуйте кипіння з безперервним формуванням бульбашок під конденсатом протягом 23 годин. При завершенні гідролізу промийте конденсор 5 мл цитратного буферу (3.24). Від'єднайте колбу і охолодіть її на крижаній бані.

Продовжуйте аналіз відповідно до пункту 5.3.3.

5.3.2,4. *Закритий гідроліз*

Помістіть пляшку, що містить суміш, підготовлену відповідно до пунктів 5.3.2.1 або 5.3.2.2, до печі (4.3) при 110°C. Протягом першої години для того, щоб запобігти збільшенню тиску (через розвиток газоподібних речовин) і щоб уникнути вибуху, розмістіть гвинтовий ковпачок на верхній частини посудини. Не закривайте посудину кришкою. Після однієї години закрийте посудину кришкою і залиште в печі (4.3) на 23 години. При завершенні гідролізу зніміть пляшку з печі, обережно відкрийте ковпачок пляшки і помістіть пляшку на льодову баню. Дайте охолонути.

Залежно від процедури коригування pH (5.3.3), кількісно перенесіть вміст пляшки у склянку або круглу колбу об'ємом 250 мл, використовуючи цитратний буфер (3.24).

Продовжуйте аналіз відповідно до пункту 5.3.3.

5.3.3. Коригування pH

Залежно від відхилення натрію аналізатора амінокислот (4.9), дійте згідно з пунктами 5.3.3.1 або 5.3.3.2 для коригування pH.

5.3.3,1. *Для хроматографічних систем (4.9), що вимагають низьку концентрацію натрію*

Бажано використовувати внутрішній похідний стандартний розчин (3.27.3), якщо аналізатори амінокислот вимагають низьку концентрацію натрію (коли об'єм кислоти треба зменшити).

При цьому додайте 2,00 мл розчину внутрішнього похідного стандарту (3.27.3) до гідролізату перед випаровуванням.

Додайте 2 краплі 1-октанолу (3.15) до гідролізату, отриманому відповідно до пункту 5.3.2.3 або 5.3.2.4.

За допомогою поворотного випарника (4.7), зменшите об'єм до 5-10 мл під вакуумом при 40 °C. Якщо об'єм випадково зменшується до менш ніж 5 мл, від гідролізату необхідно відмовитись і розпочати аналіз заново.

Скоригуйте pH до 2,20 розчином гідроксиду натрію (3.18) і переходьте до пункту 5.3.4.

5.3.3,2. *Для всіх інших амінокислотних аналізаторів (4.9)*

Візьміть гідролізати, отримані відповідно до пунктів 5.3.2.3 або 5.3.2.4, і частково нейтралізуйте їх, обережно додавши, помішуючи, 17 мл розчину гідроксиду натрію (3.17), впевнившись в тому, що температура повітря зберігається нижче 40°C.

Скоригуйте pH до 2,20 при кімнатній температурі, використовуючи розчин гідроксиду натрію (3.17), і остаточно скоригуйте розчин гідроксиду натрію (3.18). Перейдіть до кроку 5.3.4.

5.3.4. Розчин проби для хроматографії

Кількісно перенесіть гідролізат зі скоригованим pH (5.3.3.1 або 5.3.3.2) з буфером цитрату (3.24) до градуйованої колби об'ємом 200 мл і доведіть до позначки буфером (3.24).

Якщо внутрішній стандарт не було застосовано, додайте 2,00 мл внутрішнього стандарту (3.27.3) і доведіть до позначки цитратним буфером (3.24). Ретельно перемішайте.

Перейдіть до стадії хроматографії (5.4).

Якщо розчини проби не оцінюються того ж дня, вони мають зберігатися при температурі нижче 5°C.

5.4. *Хроматографія*

Перед хроматографією доведіть екстракт (5.2) або гідролізат (5.3.4) до кімнатної температури. Збовтайте суміш і відфільтруйте необхідну кількість через мембранний фільтр (0,22 мкм) (4.5). Отриманий прозорий розчин піддається іонообмінній хроматографії з застосуванням аналізатору амінокислот (4.9).

Ін'єкція може бути виконана автоматично або вручну. Важливо, щоб така ж кількість розчину ± 0,5% була додана до колонки для аналізу стандартів і проб, за винятком використання внутрішнього стандарту, і відношення натрію і амінокислоти в стандартних розчинах і розчинах проб, були подібні, наскільки це практично можливо.

Загалом частота стадій калібрування залежить від стабільності нінгідринового реагенту та аналітичної системи. Стандарт або пробу розбавляють буфером цитрату (3.24), щоб дати площі піку стандарту 30 %- 200 % площі піку амінокислоти проби.

Хроматографія амінокислот буде залежати від типу задіяного аналізатору і використовуваних смол. Обрана система має бути здатна розділяти амінокислоти, одну від одної і від матеріалів, що містять нінгідрин. В діапазоні експлуатації хроматографічна система повинна дати лінійну відповідь на зміни в кількості амінокислот, що були додані до колонки.

Під час проходження стадії хроматографії співвідношення мінімальних і максимальних показників кривої, зазначених нижче, застосовується при аналізі еквімолярного розчину (з визначенням амінокислот). Цей еквімолярний розчин має містити принаймні 30% від максимального завантаження кожної амінокислоти, яка може бути точно виміряна системою аналізатору амінокислот (4.9).

Для сепарації треонін-серину співвідношення мінімальних і максимальних показників кривої нижчої з двох пересічних амінокислот на хроматограмі не може перевищувати 2:10. (якщо визначаються тільки цистеїн, метіонін, треонін і лізин, недостатнє відокремлення від сусідніх піків негативно вплине на визначення). Для всіх інших амінокислот поділ повинен бути краще за 1:10.

Система повинна гарантувати, що лізин відділяється від продуктів лізину і орнітину.

6. **Підрахунок результатів**

Площа піку проби і стандарту вимірюється для кожної окремої амінокислоти і сума (X), в г амінокислоти на кг проби, обчислюється таким чином:

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

Якщо використовується внутрішній стандарт, помножити на: $\frac{D}{C}$

A = площа піку, гідролізату або екстракту
B = площа піку, стандартний калібрувальний розчин
C = площа піку, внутрішній стандарт в гідролізаті або екстракті
D = площа піку, внутрішній стандарт, стандартний калібрувальний розчин
M = Молярна маса амінокислоти, що визначається
c = концентрації стандарту в мкмоль/мл
м = вага проби (г) (скоригована до похідної ваги, якщо проба висушувалася або знежирювалася)
V = мл загального гідролізату (5.3.4) або мл розрахованого загального об'єму розведення або екстракту (6.1)

Цистин і цистеїн визначаються як цистеїнові кислоти в гідролізатах окисленої проби, але розраховуються як цистин ($C_6H1_2N_2O_4S_2$, M 240,30 г/моль) за допомогою M 120,15 г/моль (= 0,5 x 240,30 г/моль).

Метіонін визначається як сульфон метіоніну в гідролізатах окисленої проби, але розраховується як метіонін за допомогою M метіоніну: 149,21 г/моль.

Доданий вільний метіонін визначається після екстракції як метіонін, для розрахунку використовується той же показник M.

6.1. Загальний об'єм розбавлення екстрактів (F) для визначення вільних амінокислот (5.2) обчислюється таким чином:

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

V = Об'єм остаточного екстракту

7. **Оцінка методу**

Метод було перевірено шляхом порівняння на міжнародному рівні у 1990 році з використанням різних кормів (комбікорм для свиней, суміш для бройлерів, білковий концентрат, премікс). Після усунення аномальних значень, результати допустимих та середніх відхилень наведені в таблицях у цьому пункті.

Середнє значення в г/кг

Матеріал для порівняння	Амінокислота			
	Треонін	Цистеїн	Метіонін	Лізин
Комбікорм для свиней	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Суміш для бройлерів	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Білковий концентрат	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Премікс	58,42 N= 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = Кількість лабораторій, що брали участь.

7.1. *Повторюваність*

Повторюваність, виражена як «допустиме відхилення в межах лабораторії» у вищезгаданому порівнянні показана у таблицях нижче:

Допустиме відхилення в межах лабораторії (S_r) в г/кг

Матеріал для порівняння	Амінокислота			
	Треонін	Цистеїн	Метіонін	Лізин
Комбікорм для свиней	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Суміш для бройлерів	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Білковий концентрат	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Премікс	1,30 N= 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = Кількість лабораторій, що брали участь.

Коефіцієнт варіації (%) для допустимого відхилення в межах лабораторії (S_r)

Матеріал для порівняння	Амінокислота			
	Треонін	Цистеїн	Метіонін	Лізин
Комбікорм для свиней	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Суміш для бройлерів	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Білковий концентрат	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15

Матеріал для порівняння	Амінокислота			
	Треонін	Цистеїн	Метіонін	Лізин
Премікс	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = Кількість лабораторій, що брали участь.

7,2 *Відтворюваність*

Результати допустимих відхилень у вищезгаданому порівнянні між лабораторіями показані у таблиці нижче:

Допустиме відхилення між лабораторіями (S_r) в г/кг

Матеріал для порівняння	Амінокислота			
	Треонін	Цистеїн	Метіонін	Лізин
Комбікорм для свиней	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Суміш для бройлерів	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Білковий концентрат	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Премікс	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = Кількість лабораторій, що брали участь.

Коефіцієнт варіації (%) для допустимого відхилення між лабораторіями (S_r)

Матеріал для порівняння	Амінокислота			
	Треонін	Цистеїн	Метіонін	Лізин
Комбікорм для свиней	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Суміш для бройлерів	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Білковий концентрат	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Премікс	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = Кількість лабораторій, що брали участь.

Використання матеріалів для порівняння

8.

Правильність застосування методу підтверджується шляхом повторних вимірювань матеріалів для порівняння, якщо це можливо. Бажано провести калібрування із сертифікованим амінокислотним калібрувальним розчином.

9. **Результати спостереження**

9.1. У зв’язку з відмінностями між амінокислотними аналізаторами у якості норми слід приймати кінцеву концентрацію калібрувального розчину стандартних амінокислот (див. 3.27.4 та 3.27.5) та продуктів гідролізу (див. 5.3.4).

Діапазон лінійного відгуку обладнання має перевірятися для кожної амінокислоти.

Стандартний розчин розбавляється цитратним буфером аби створити площі піка всередині діапазону.

9.2. Якщо для аналізу продуктів гідролізу використовується обладнання для високоефективної рідинної хроматографії, умови проведення експерименту слід підлаштувати відповідно до рекомендацій виробника.

9.3. У випадку якщо метод застосовується до кормів, котрі містять більше 1% хлориду (концентрат, мінеральні корми, кормові добавки) оцінка метіоніну може бути неповною і може знадобитися спеціальна обробка.

G. ВИЗНАЧЕННЯ ТРИПТОФАНУ

1. **Мета і зміст**

Цей метод допомагає визначити загальний та вільний триптофан. Він не розрізняє D-триптофан та L-триптофан.

2. **Принцип**

Для визначення загального триптофану проба гідролізується у лужному середовищі з насиченим розчином гідроксиду барію та нагрівається до 110 °C упродовж 20 годин. Після цього додається розчин внутрішнього стандарту гідролізу.

Для визначення вільного триптофану проба береться в м'яко кислому середовищі с внутрішнім стандартом.

Триптофан та внутрішній стандарт в продуктах гідролізу або у екстракті визначаються за допомогою ВЕРХ з виявленням речовин за флуоресцентним світінням.

3. **Реактиви**

3.1. Слід застосовувати бідистильовану воду або воду аналогічної якості (провідність < 10 мікросименс/см).

3.2. Стандартна речовина: триптофан (чистота/вміст> 99 %) висушений у вакуумі над пентаоксидом фосфору.

3.3. Речовина внутрішнього стандарту: А-метил-триптофан (чистота/вміст > 99%) висушений у вакуумі над пентаоксидом фосфору.

3.4. Гідроксид барію октагідрат (використовуючи $Ba(OH)_2 .8 H_2O$, слід уникати надмірного контакту з повітрям задля уникнення утворення $BaCO_3$, що може завадити визначенню) (див. результати спостереження 9.3).

3.5. Гідроксид натрію

3.6. Ортофосфорна кислота, w (w/w) = 85 %.

3.7. Соляна кислота, p_{20} 1,19 г/мл.

3.8. Метиловий спирт, еквівалент за класифікацією ВЕРХ.

3.9. Петролейний ефір, інтервал кипіння 40-60 °C

3.10. Розчин гідроксиду натрію, c = 1 моль/л:
Розчиніть 40,0 г NaOH (3.5) у воді, щоб отримати до 1 літру розчину (3.1).

3.11. Соляна кислота, c = 6 моль/л:
Додайте 492 мл HCl (3.7) до води, щоб отримати до 1 літру розчину.

3.12. Соляна кислота, c = 1 моль/л:
Додайте 82 мл HCl (3.7) до води, щоб отримати до 1 літру розчину.

3.13. Соляна кислота, c = 0,1 моль/л:
Додайте 8,2 мл HCl (3.7) до води, щоб отримати до 1 літру розчину.

3.14. Ортофосфорна кислота, c = 0,5 моль/л:
Додайте 34 мл ортофосфорної кислоти (3.6) до води, щоб отримати до 1 літру розчину (3.1).

3.15. Концентрований розчин триптофану (3.2), c = 2,50 мкмоль/мл:

У мірній колбі об'ємом 500 мл розчиніть 0,2553 г триптофану (3.2) у соляній кислоті (3.13) та доведіть до відмітки соляної кислоти (3.13) Зберігати при - 18 ^{o}C не довше 4 тижнів.

3.16. Концентрований розчин внутрішнього стандарту, c = 2,50 мкмоль/мл:

У мірній колбі об'ємом 500 мл розчиніть 0,2728 г α-метил-триптофану (3.3) у соляній кислоті (3.13) та доведіть до відмітки соляної кислоти (3.13). Зберігати при - 18 ^{o}C не довше 4 тижнів.

3.17. Калібрувальний стандартний розчин триптофану та внутрішній стандарт:

Візьміть 2,00 мл концентрованого розчину триптофану (3.15), та 2,00 мл концентрованого розчину внутрішнього стандарту (α-метил-триптофан) (3.16). Розведіть у воді (3.1) та метиловому спирті (3.8) до приблизно однакового об'єму та концентрації метилового спирту (10 %-30 %) як у випадку кінцевого продукту гідролізу.

Цей розчин слід готувати безпосередньо перед застосуванням.
Уникайте прямих сонячних променів під час приготування.

3.18. Оцтова кислота

3.19. 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанол.

3.20. Етаноламін w (w/w) > 98 %.

3.21. Розчин 1 г 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанолу (3.19) у 100 мл метилового спирту (3.8).

3.22. Мобільна фаза ВЕРХ: 3,00 г оцтової кислоти (3.18) + 900 мл води (3.1) + 50,0 мл розчину (3.21) 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанолу (3.19) у метиловому спирті (3.8) (1г/100мл). Вирівняйте рівень pH до 5,00 за допомогою етаноламіну (3.20). Приготуйте до 1 000 мл розчину (3.1).

4. **Обладнання**

4.1. Обладнання для ВЕРХ з спектрофотометричним детектором.

4.2. Рідинна хроматографічна колонка, 125 мм x 4 мм, C_{18}, 3 мкм наповнювача, або аналогічного матеріалу.

4.3. pH-метр.

4.4. Поліпропіленова колба, об'ємом 125 мл, з широким горлом та гвинтовою кришкою.

4.5. Мембрановий фільтр, 0,45 мкм.

4.6. Автоклав, 110 (± 2) ^{o}C, 1,4 (± 0,1) бар.

4.7. Механічний класифікатор або магнітний перемішувач.

4.8. Вихровий міксер.

5. **Процедура**

5.1. *Підготовка проб*

Пробу необхідно розмолоти та пропустити через 0,5 мм сито. Вологі проби необхідно висушити або за допомогою повітряної сушки за температури не вище 50°C або сублімаційної сушки перед помелом. Проби з високим вмістом жиру слід обробити петролейним ефіром (3.9) перед помелом.

5.2. *Визначення вільного триптофану (екстракт)*

Відважте необхідну кількість проби (1-5 г) (5.1) з точністю до 1 мг у конічну колбу. Додайте 100,0 мл соляної кислоти, (3.13) та 5,00 мл концентрованого розчину внутрішнього стандарту (3.16). Змішайте або збовтайте у механічному класифікаторі або магнітному перемішувачі (4.7) упродовж 60 хв. Після того як осад опуститься на дно, відміряйте піпеткою 10,0 мл відстояного розчину та помістіть його у мензурку. Додайте 5 мл ортофосфорної кислоти (3.14). Вирівняйте рівень pH до 3 за допомогою гідроксиду натрію (3.10). Додайте достатню кількість метилового спирту (3.8) аби його концентрація у кінцевому об'ємі складала від 10% до 30%. Перелийте розчин у мірну колбу відповідного об'єму та розведіть водою, щоб отримати необхідну кількість розчину для хроматографії (об'єм має приблизно дорівнювати об'ємові калібрувального стандартного розчину (3.17)).

Відфільтруйте кілька мл розчину через 0,45 **м**км мембрановий фільтр (4.5) перед введенням у колонку ВЕРХ. Перейдіть до наступного етапу хроматографії відповідно до параграфу 5.4.

Захистіть стандартний розчин та екстракти від потрапляння прямих сонячних променів. Якщо немає можливості проаналізувати екстракти того ж дня, їх можна зберігати за температури 5°C не більше 3 діб.

5.3. *Визначення загального триптофану (продукти гідролізу)*

Відважте від 0,1 до 1 г підготованої проби (5.1) з точністю до 0,2 мг у поліпропіленову колбу (4.4). Вміст азоту у відваженій порції проби має складати близько 10 мг. Додайте 8,4 г гідроксиду барію октагідрату (3.4) та 10 мл води. Перемішайте у вихровому міксері (4.8) або у магнітному перемішувачі (4.7). Покладіть у суміш магніт з тефлоновим покриттям. Промийте стінки ємкості 4 мл води. Закрийте колбу, вільно закрутивши кришку. Перелийте в автоклав (4.6) з киплячою водою та паром на 30-60 хв. Закрийте автоклав та проведіть стерилізацію за температури 110 (± 2) °C упродовж 20 годин.

Перш ніж відкривати автоклав, необхідно знизити температуру до 100°C. Щоб уникнути кристалізації $Ba(OH)_2 \blacksquare 8\ H_2O$, додайте до теплої суміші 30 мл води кімнатної температури. Обережно збовтайте або перемішайте. Додайте 2,00 мл розчину концентрованого внутрішнього стандарту (а-метил-триптофан) (3.16). Охолодіть ємкості на водяній/льодовій бані упродовж 15 хв.

Далі додайте 5 мл ортофосфорної кислоти (3.14). Тримайте ємкість у ванні для охолодження, нейтралізуйте розчин за допомогою HCl (3.11), помішуючи, та вирівняйте рівень pH до 3,0 за допомогою HCl (3.12). Додайте достатню кількість метилового спирту аби його концентрація у кінцевому об'ємі складала від 10% до 30%. Перелийте розчин у мірну колбу відповідного об'єму та розведіть водою, щоб отримати необхідну кількість розчину для хроматографії (наприклад 100 мл). Додавання мелилового спирту не повинно викликати появу осаду.

Відфільтруйте кілька мл розчину через 0,45 **м**км мембрановий фільтр (4.5) перед введенням у колонку ВЕРХ. Перейдіть до наступного етапу хроматографії відповідно до параграфу 5.4.

Захистіть стандартний розчин та продукти гідролізу від потрапляння прямих сонячних променів. Якщо немає можливості проаналізувати продукти гідролізу того ж дня, їх можна зберігати за температури 5°C не більше 3 діб.

5.4. *Визначення методом ВЕРХ*

Умови для ізократичного елюювання, що вказані нижче, наводяться в якості керівництва. Інші умови можна застосовувати за умови, що вони даватимуть аналогічний результат (див. Результати спостереження 9.1 та 9.2):

Колонка рідинної хроматографії матеріал (4.2): 125 мм x 4 мм, C_{18}, 3 **м**км наповнювач, або аналогічний

Температура колонки: Кімнатна температура

Мобільна фаза (3.22): 3,00 г оцтової кислоти (3.18) + 900 мл води (3.1) + 50,0 мл розчину (3.21) 1,1,1-трихлог-2- метил-2-пропанолу (3.19) у метиловому спирті (3.8) (1 г/100 мл). Вирівняйте рівень pH до 5,00 за допомогою етаноламіну (3.20). Приготуйте до 1 000 мл розчину (3.1).

Швидкість потоку: 1 мл/хв.

Загальний час аналізу: приблизно 34 хв.

Довжина хвилі виявлення: збудження: 280 нм, емісія: 356 нм.

Об'єм введеної проби 20 **м**кл

6. **Підрахунок результатів**

Кількість триптофану (X) в г на 100 г проби розраховується за наступною формулою:

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

A = площа піка внутрішнього стандарту, стандартного калібрувального розчину (3.17)
B = площа піка триптофану, екстракту (5.2) або продуктів гідролізу (5.3)
V_1 = об'єм в мл (2 мл) концентрованого розчину триптофану (3.15), доданого до калібрувального розчину (3.17)
c = концентрація в мкмоль/мл (= 2,50) концентрованого розчину триптофану (3.15), доданого до калібрувального розчину (3.17)
V_2 = об'єм в мл концентрованого розчину внутрішнього стандарту (3.16) доданого до екстракту (5.2) (= 5,00 мл) або продуктів гідролізу (5.3) (= 2,00 мл)
C = площа піка внутрішнього стандарту, екстракту (5.2) або продуктів гідролізу (5.3)
D = площа піка триптофану, стандартного калібрувального розчину (3.17)
V_3 = об'єм в мл (2,00 мл) концентрованого розчину внутрішнього стандарту (3.16), доданого до калібрувального розчину (3.17)
m = вага проби в г (з поправкою на початкову вагу у випадку висушування та/або знежирення)
M = молярна маса триптофану (= 204,23 г/моль)

7. **Повторюваність**

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на одній пробі, не повинна перевищувати 10% відносно найвищого результату.

8. **Результати спільного дослідження**

Було організоване сумісне дослідження ЄС (4-те порівняння), під час якого три проби були проаналізовані у 12 лабораторіях для підтвердження методу гідролізу. Для кожної проби проводився аналіз (5) реплік. Результати наведені у таблиці нижче:

	Проба 1 Корм для свиней	Проба 2 Проба корму для свиней з L-триптофаном	Проба 3 Концентрований корм для свиней
L	12	12	12
n	50	55	50
Середнє значення [г/кг]	2,42	3,40	4,22
sr [г/кг]	0,05	0,05	0,08
r [г/кг]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
SR [г/кг]	0,15	0,20	0,09
R [г/кг]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = кількість лабораторій, що надали результати
n = кількість окремих результатів, отриманих шляхом усунення аномальних значень (визначено за методом виключення аномальних значень Кокрана і Діксона)
s_r = допустиме відхилення повторюваності
S_R = допустиме відхилення відтворюваності
r = повторюваність
R = відтворюваність
CV_r = коефіцієнт варіації повторюваності, %
CV_R = коефіцієнт варіації відтворюваності, %

Було організоване інше сумісне дослідження ЄС (3-тє порівняння), під час якого дві проби були проаналізовані у 13 лабораторіях для підтвердження методу екстрагування вільного триптофану. Для кожної проби проводився аналіз (5) реплік. Результати наведені у таблиці нижче:

	Проба 4 Суміш пшениці та сої	Проба 5 Суміш пшениці та сої (= проба 4) з додаванням триптофану (0,457г/кг1)
L	12	12
n	55	60
Середнє значення [г/кг]	0,391	0,931
sr [г/кг]	0,005	0,012
r [г/кг]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
SR [г/кг]	0,018	0,048
R [г/кг]	0,050	0,134
CV_R *[%]*	4,71	5,11

L = кількість лабораторій, що надали результати
n = кількість окремих результатів, отриманих шляхом усунення аномальних значень (визначено за методом виключення аномальних значень Кокрана і Діксона)
s_r = допустиме відхилення повторюваності
S_R = допустиме відхилення відтворюваності
R = повторюваність
R = відтворюваність
CV_r = коефіцієнт варіації повторюваності, %
CV_R = коефіцієнт варіації відтворюваності, %

Було організоване інше порівняльне дослідження ЄС, під час якого чотири проби були проаналізовані у 7 лабораторіях для підтвердження триптофану для гідролізу. Результати наведені нижче. Для кожної проби проводився аналіз (5) реплік.

	Проба 1 Комбікорм для свиней (CRM 117)	Проба 2 Рибне борошно з низьким вмістом жирів (CRM 118)	Проба 3 Соєве борошно (CRM 119)	Проба 4 Сухе знежирене молоко (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Середнє значення	2,064	8,801	6,882	5,236
sr [г/кг]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [г/кг]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
SR [г/кг]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [г/кг]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = кількість лабораторій, що надали результати
n = кількість окремих результатів, отриманих шляхом усунення аномальних значень (визначено за методом виключення аномальних значень Кокрана і Діксона)
s_r = допустиме відхилення повторюваності
S_R = допустиме відхилення відтворюваності
r = повторюваність
R = відтворюваність
CV_r = коефіцієнт варіації повторюваності, %
CV_R = коефіцієнт варіації відтворюваності, %

9. **Результати спостереження**

9.1. Дотримуючись спеціальних умов хроматографії вдається краще розрізняти триптофан та α-метил-триптофан.

Ізократичне елюювання та очищення градієнтної колонки:

Колонка для рідинної хроматографії:	125 мм x 4 мм, C_{18}, 5 мкм наповнювач, або аналогічний матеріал		
Температура колонки:	32 °C		
Мобільна фаза:	A: 0,01 моль/л KH_2PO_4/метиловий спирт, 95+5 (V+V).		
	B: метиловий спирт		
Градієнтна програма:	0 хв.	100 % A	0%B
	15 хв.	100 % A	0%B
	17 хв.	60 % A	40%B
	19 хв.	60 % A	40%B
	21 хв.	100 % A	0%B
	33 хв.	100 % A	0%B
Швидкість потоку:	1,2 мл/хв.		
Загальний час аналізу:	приблизно 33 хв.		

9.2. Хроматографія варіюватиметься відповідно до типу ВЕРХ та типу наповнювача, що застосовується. Обрана система повинна розрізняти триптофан та внутрішній стандарт по нульовій лінії. Крім того, важливо, аби продукти розпаду ретельно відділялися від триптофану та внутрішнього стандарту. Продукти гідролізу без внутрішнього стандарту мають бути проаналізовані для перевірки нульової лінії під внутрішнім стандартом для виявлення домішок. Важливо, аби часу аналізу було достатньо для елюювання всіх продуктів розпаду, інакше піки пізнього елюювання будуть відображуватись під час подальшого хроматографічного аналізу.

У робочому діапазоні реакція хроматографічної системи має бути лінійною. Лінійну реакцію слід вимірювати з постійною (нормальною) концентрацією внутрішнього стандарту та змінними концентраціями триптофану. Важливо аби піки триптофану та внутрішнього стандарту залишалися в межах лінійного діапазону системи ВЕРХ/флуоресценції. Якщо піки триптофану та/або внутрішнього стандарту будуть надто низькими або надто високими, аналіз необхідно повторити на пробі іншого розміру та/або з іншим кінцевим об’ємом.

9.3. *Гідроксид барію*

З часом гідроксид барію розчиняється важче. Це призводить до неясних показників розчину для визначення ВЕРХ, що може показати низькі результати для триптофану.

Н. ВИЗНАЧЕННЯ СИРОЇ ОЛІЇ ТА ЖИРІВ

1. **Мета і зміст**

Цей метод застосовується для визначення сирих олій та жирів у кормах. Метод не охоплює аналіз насіння олійних культур та олійних плодів.

Застосування двох процедур, описаних нижче, залежить від характеру та складу корму та причини проведення аналізу.

1.1. *Процедура А - Безпосереднє екстрагування олій та жирів*

Цей метод застосовується до кормів рослинного походження, за винятком кормів включених у зміст процедури В.

1.2. *Процедура А - Загальні олії та жири*

Цей метод застосовується до кормів тваринного походження та кормових сумішей. Він застосовується до тих матеріалів, з яких неможливо повністю добути олії та жири без попереднього гідролізу (наприклад, клейковина, дріжджі, картопляні білки та продукти, що вимагають такої обробки як добування, відшулушування та нагрівання).

1.3. *Тлумачення результатів*

У випадку, якщо Процедура В дає кращі результати ніж Процедура А, результати Процедури В слід вважати фактичним значенням.

2. **Принцип**

2.1. *Процедура А*

Проба береться за допомогою петролейного ефіру. Розчинник відганяється, а осад висушується та зважується.

2.2. *Процедура В*

Проба нагрівається та оброблюється соляною кислотою. Суміш охолоджується та фільтрується. Осад промивається та висушується і відправляється для визначення відповідно до Процедури А.

3. **Реактиви**

3.1. Петролейний ефір, інтервал кипіння: від 40 до 60 °C. Значення броміну не повинно перевищувати 1, а значення осаду після випаровування має бути не більше 2 мг/100 мл.

3.2. Сульфат натрію, безводний.

3.3. Соляна кислота, c = 3 моль/л

3.4. Фільтрувальна добавка, наприклад, Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. **Обладнання**

4.1. Обладнання для екстрагування. Якщо обладнання оснащене сифоном (апарат Сокслета), індекс рефлюксу має бути таким, аби генерувати близько 10 циклів на годину; якщо обладнання не оснащене сифоном, індекс рефлюксу має складати близько 10 мл на хвилину.

4.2. Екстракційні комірки, без речовини, розчиненої у петролейному ефірі, пористість яких відповідає вимогам, вказаним у пункті 4.1.

4.3. Сушильна шафа, або вакуумна шафа, встановлена на 75 ± 3 °C, або повітряна шафа, встановлена на 100 ± 3 °C.

5. **Процедура**

5.1. *Процедура А (див. пункт 8.1)*

Відважте 5 г проби з точністю до 1 мг, перекладіть її до екстракційної комірки (4.2) та накрийте знежиреним ватним тампоном.

Помістіть комірку в екстрактор (4.1) та проведіть екстрагування упродовж 6 годин з петролейним ефіром (3.1). Зберіть екстракт петролейного ефіру у суху зважену колбу зі шматочками пемзи ([1]).

Відженіть розчинник. Висушіть осад, помістивши колбу на півтори години в сушильну шафу (4.3). Залиште охолонути у ексикаторі та зважити. Просушіть знову упродовж 30 хв., аби гарантувати, що вага олій та жирів залишається незмінною (втрата ваги між двома послідовними зважуваннями не повинна перевищувати 1 мг).

5.2. *Процедура В*

Відважте 2,5 г з точністю до 1 мг (див. пункт 8.2), помістіть в мензурку об'ємом 400 мл або конічну колбу об'ємом 300 мл та додайте 100 мл соляної кислоти (3.3) та шматочки пемзи. Накрийте мензурку предметним склом або вставте у колбу дефлегматор. Доведіть суміш до кипіння на низькому вогні або електроплитці та тримайте на вогні упродовж години. Не допускайте прилипання речовини до стінок посудини.

Охолодіть та додайте необхідну кількість фільтрувальної добавки (3.4), аби запобігти втратам олії та жиру під час фільтрування. Пропустіть через зволожений, знежирений, подвійний фільтрувальний папір. Промийте осад у холодній воді, щоб отримати нейтральний фільтрат. Переконайтеся, що фільтрат не містить жодних олій або жирів. Їх наявність свідчить про те, що пробу слід обробити петролейним ефіром, застосувавши Процедуру А перед гідролізом.

([1]) Якщо олії та жири мають пройти подальші перевірки якості, замініть шматочки пемзи скляними кульками.

Покладіть подвійний фільтрувальний папір з осадом на предметне скло та сушіть у повітряній шафі упродовж півтори години (4.3) за температури 100 ± 3 °C.

Покладіть подвійний фільтрувальний папір з сухим осадом у екстракційну комірку (4.2) та накрийте знежиреним ватним тампоном. Вставте комірку в екстрактор (4.1) та продовжуйте, як вказано в другому та третьому абзаці пункту 5.1.

6. **Запис результатів**

Запишіть вагу осаду у відсотковому співвідношенні проби.

7. **Повторюваність**

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на одній пробі одним і тим самим аналітиком. не повинна перевищувати:

— 0,2 %, в абсолютній величині, для вмісту сирих олій та жирів нижче 5 %,
— 4,0 % відносно найвищого результату для вмісту від 5 % до 10 %,
— 0,4 %, в абсолютній величині, для вмісту понад 10 %.

8. **Результати спостереження**

8.1. У випадку продуктів з високим вмістом олій та жирів, які важко розмолоти або які не підходять для взяття однорідної проби для випробувань за скороченою процедурою, продовжуйте наступним чином.

Відважте 20 г проби з точністю до 1 мг та змішайте з 10 г або більше безводного сульфату натрію (3.2). Проведіть екстрагування з петролейним ефіром (3.1), як вказано в пункті 5.1. Доведіть отриманий екстракт до відмітки 500 мл петролейного ефіру (3.1) та змішайте. Перелийте 50 мл розчину в невелику, суху, зважену колбу зі шматочками пемзи. Відженіть розчинник, висушіть та продовжуйте, як зазначено в останньому абзаці пункту 5.1.

Приберіть розчинник з осаду екстракту, що залишився в комірці, розітріть осад до розміру часток не більше 1 мм, поверніть його назад в екстракційну комірку (не додавайте сульфат натрію) та продовжуйте, як зазначено в другому та третьому абзаці пункту 5.1.

Розрахуйте вміст олій та жирів у відсотковому співвідношенні проби за наступною формулою:

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

де:

m_1 = вага осаду в грамах після першого екстрагування (аліквотна частина екстракту), m_2 = вага осаду в грамах після другого екстрагування.

8.2. У випадку продуктів з низьким вмістом олій та жирів об’єм проби можна збільшити до 5 г.

8.3. Є ймовірність, що корми для тварин з високим вмістом води необхідно буде змішати з безводним сульфатом натрію перед гідролізом та екстрагуванням відповідно до Процедури B.

8.4. У пункті 5.2 задля більшої ефективності для промивання осаду після фільтрування краще застосовувати гарячу воду замість холодної.

8.5. Для деяких кормів може виникнути необхідність збільшити стандартний час просушування понад 1,5 год. Намагайтеся не пересушити пробу, оскільки це може призвести до низьких результатів. Також можна використовувати мікрохвильову піч.

8.6. Попереднє екстрагування відповідно до Процедури A перед гідролізом та повторне екстрагування відповідно до Процедури B рекомендується у тих випадках, коли вміст сирої олії/жиру перевищує 15 %. Певною мірою це залежить від характеру корму та характеру олії/жиру, що міститься в кормі.

I. ВИЗНАЧЕННЯ СИРОЇ КЛІТКОВИНИ

1. **Мета і зміст**

За допомогою цього методу вдається виявити не жирні органічні речовини в кормах, які не розчиняються в кислоті та лугах і які традиційно називають сирою клітковиною.

2. **Принцип**

Пробу знежирюють за необхідності та по черзі оброблюють киплячими розчинами сірчаної кислоти та гідроксиду калію вказаної концентрації. Осад відокремлюється шляхом фільтрації через фільтр з пористого скла, промивається, висушується, зважується та спалюється за температури від 475 до 500 ^{o}C. Втрата ваги в результаті спалювання відповідає вмісту сирої клітковин в контрольній пробі.

3. **Реактиви**

3.1. Сірчана кислота, c = 0,13 моль/л.
3.2. Протипінний агент (наприклад н-октанол).
3.3. Фільтрувальна добавка (Celite 545 або аналогічна), нагріта до 500 ^{o}C упродовж чотирьох годин (8.6).
3.4. Ацетон.
3.5. Петролейний ефір інтервал кипіння від 40 до 60 ^{o}C.
3.6. Соляна кислота, c = 0,5 моль/л.
3.7. Розчин гідроксиду калію, c = 0,23 моль/л.

4. **Обладнання**

4.1. Нагрівальна установка для розщеплення з сірчаною кислотою та розчином гідроксиду калію, оснащена підставкою для фільтрувального тигеля (4.2) та вихідним патрубком з кришкою для виходу рідини та вакууму, можливо зі стиснутим повітрям. Кожного дня перед використанням попередньо нагрівайте установку за допомогою окропу упродовж п’яти хвилин.

4.2. Скляний фільтрувальний тигель зі склокерамічним фільтром з розміром пор 40-90 мкм . Перед першим застосуванням нагріти до 500 ^{o}C упродовж кількох хвилин та остудити (8.6).

4.3. Циліндр мінімум на 270 мл з дефлегматором, жаростійкий.
4.4. Сушильна шафа з термостатом.
4.5. Муфельна піч з термостатом.

4.6. Екстрактор складається з опорною тарілкою для фільтрувального тигеля (4.2) та з випускною трубою та кришкою для виходу рідини та вакууму.

4.7. Сполучні кільця для монтажу нагрівальної установки (4.1) тигель (4.2) та циліндр (4.3) та для з’єднання холодного екстрактора (4.6) та тигеля.

5. **Процедура**

Відважте 1 г підготованої проби з точністю до 1 мг та помістіть її у тигель (4.2), (див. результати спостережень 8.1, 8.2 та 8.3) та додайте 1 г фільтрувальної добавки (3.3).

Зберіть нагрівальну установку (4.1) та фільтрувальний тигель (4.2), далі під’єднайте циліндр (4.3) до тигеля. Налийте 150 мл киплячої сірчаної кислоти (3.1) у встановлений циліндр та тигель і, за необхідності, додайте кілька крапель протипінного агента (3.2).

Доведіть рідину до кипіння за 5 ± 2 хв та підтримуйте активне кипіння рівно 30 хв.

Відкрийте кришку випускної труби (4.1) та, у вакуумі, пропустіть сірчану кислоту через фільтрувальний тигель і змийте осад окропом, порціями по 30 мл тричі поспіль так, щоб осад фільтрувався насухо після кожного промивання.

Закрийте кришку виходу та налийте 150 мл киплячого розчину гідроксиду калію (3.7) у зібраний циліндр та тигель і додайте кілька крапель протипінного агента (3.2). Доведіть рідину до кипіння за 5 ± 2 хв та підтримуйте активне кипіння рівно 30 хв. Відфільтруйте та повторіть процедуру промивання як для сірчаної кислоти.

Після кінцевого промивання та сушки, від'єднайте тигель з його вмістом та під'єднайте до холодного екстрактора (4.6). Увімкніть вакуум та промийте осад у тигелі трьома порціями ацетону (3.4) по 25 мл поспіль так, щоб осад фільтрувався насухо після кожного промивання.

Висушіть тигель до стабільної ваги в шафі за температури 130°C. Після кожної сушки охолоджуйте у ексикаторі та зважуйте швидко. Поставте тигель у муфельну піч та спаліть до постійної ваги (втрата ваги між двома послідовними зважуваннями має складати максимум 2 мг) за температури від 475°C до 500°C упродовж щонайменше 30 хв.

Після кожного нагрівання охолоджуйте спочатку в печі, а потім в ексикаторі, перш ніж зважувати.

Проведіть контрольне випробування без проби. Втрата ваги в результаті спалювання не повинна перевищувати 4 мг.

6. **Підрахунок результатів**

Вміст сирої клітковини у відсотковому співвідношенні проби наводиться у виразі:

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

де:

m = вага проби в г,
m_0 = втрата ваги після спалювання під час визначення, в г,
m_1 = втрата ваги після спалювання під час контрольного випробування, в г,

7. **Повторюваність**

Різниця між двома паралельними визначеннями, проведеними на одній пробі, не повинна перевищувати:
— 0,6 % в абсолютній величині, для вмісту сирої клітковини менше 10 %,
— 6 % відносно найвищого результату, для вмісту сирої клітковини понад 10 %.

8. **Результати спостереження**

8.1. Якщо вміст сирого жиру в кормі перевищує 10 %, перед аналізом його слід знежирити за допомогою петролейного ефіру (3.5). Під'єднайте фільтрувальний тигель (4.2) з його вмістом до холодного екстрактора (4.6) та увімкніть вакуум, промийте осад трьома порціями петролейного ефіру по 30 мл, аби гарантувати сухість осаду. Під'єднайте тигель з його вмістом до нагрівальної установки (4.1) та продовжуйте, як описано у пункті 5.

8.2. Якщо корм містить жири, які неможливо безпосередньо екстрагувати за допомогою петролейного ефіру (3.5), його слід знежирити як вказано в пункті 8.1 та знежирити ще раз після кип'ятіння з кислотою. Після кип'ятіння з кислотою та подальшого промивання під'єднайте тигель з його вмістом до холодного екстрактора (4.6) та промийте трьома порціями ацетону по 30 мл, а далі ще трьома порціями петролейного ефіру по 30 мл. Відфільтруйте у вакуумі до сухого стану та продовжуйте аналіз, як описано у пункті 5, починаючи з обробки гідроксидом калію.

8.3. Якщо корм містить більше 5 % карбонатів, виражених у вигляді карбонату кальцію, під'єднайте тигель (4.2) зі зваженою пробою до нагрівальної установки (4.1). Промийте пробу тричі 30 мл соляної кислоти (3.6). Після кожного додавання залиште пробу постояти приблизно одну хвилину перед фільтруванням. Промийте один раз 30 мл води та продовжуйте, як описану у пункті 5.

8.4. Якщо застосовується обладнання у вигляді штатива (до нагрівальної установки під'єднано кілька тигелів), не можна проводити два окремих визначення на одній пробі для аналізу під час однієї серії.

8.5. Якщо після кип'ятіння важко відфільтрувати кислотний та базовий розчин, пропустіть стиснуте повітря через випускну трубу нагрівальної установки та продовжуйте фільтрування.

8.6. Температура спалювання не повинна перевищувати 500 ° C, аби продовжити термін служби скляних фільтрувальних тигелів. Слід уникати різких коливань температури під час циклів нагрівання та охолодження.

J. ВИЗНАЧЕННЯ ЦУКРУ

1. **Мета і зміст**

За допомогою цього методу вдається визначити кількість відновлювальних цукрів та загальних цукрів після інверсії, виражених в якості глюкози або, якщо застосовно, сахарози з коефіцієнтом перетворення 0,95. Застосовується для комплексних кормів. Для інших кормів застосовуються спеціальні методи. Якщо необхідно, лактозу слід вимірювати окремо та враховувати ці дані під час розрахунків результатів.

2. **Принцип**

Цукри екстрагуються в розчиненому етиловому спирті. Розчин освітлюється розчинами Карреза I і II. Після усунення етилового спирту, кількість до та після інверсії визначається за методом Лаффа-Скорла.

3. **Реактиви**

3.1. Розчин етилового спирту 40 % (v/v) щільність: 0,948 г/мл за температури 20 ^{o}C, нейтралізований до фенолфталеїну.

3.2. Розчин Карреза I: розчиніть у воді 21,9 г ацетату цинку Zn $(CH_3COO)_2$ $2H_2O$ та 3 г крижаної оцтової кислоти. Доведіть до об'єму 100 мл води.

3.3. Розчин Карреза II: розчиніть у воді 10,6 г фероціаніду калію K_4Fe $(CN)_6$ $3H_2O$. Приготуйте до 100 мл розчину.

3.4. Метилоранж, розчин 0,1 % (маса/об'єм).

3.5. Соляна кислота 4 моль/літр.

3.6. Соляна кислота 0,1 моль/літр.

3.7. Розчин гідроксиду натрію 0,1 моль/літр.

3.8. Реагент Лаффа-Скорла:

Обережно помішуючи, налийте в розчин карбонату натрію (3.8.3) розчин лимонної кислоти (3.8.2). Додайте розчин сульфату міді (3.8.1) та розведіть водою, щоб отримати до 1 літру розчину. Залиште на ніч, щоб осад осів, та відфільтруйте.

Перевірте концентрацію отриманого реагенту (Cu 0,05 моль/літр; Na_2 CO_3 1 моль/літр), див. (5.4) останній абзац. Рівень pH розчину має складати приблизно 9,4.

3.8.1. Розчин сульфату міді: розчиніть 25 г сульфату міді, Cu SO_4 $5H_2O$, без заліза, в 100 мл води.

3.8.2. Розчин лимонної кислоти: розчиніть 50 г лимонної кислоти, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ в 50 мл води.

3.8.3. Розчин карбонату натрію: розчиніть 143,8 г безводного карбонату натрію приблизно в 300 мл теплої води. Дайте охолонути.

3.9. Розчин тіосульфату натрію 0,1 моль/літр.

3.10. Розчин крохмалю: додайте суміш 5 г крохмалю, розчиненого у 30 мл води до 1 літру киплячої води. Кип'ятіть упродовж трьох хвилин, дайте охолонути та, за необхідності, додайте 10 мг йодиду ртуті в якості консерванту.

3.11. Сірчана кислота 3 моль/літр.

3.12. Йодид калію, розчин 30 % (маса/об'єм).

3.13. Подрібнена пемза, проварена у соляній кислоті, промита водою та висушена.

3.14. 3-метилбутан-1-ол.

4. **Обладнання**

Міксер (барабанний): приблизно 35-40 об./хв.

5. **Процедура**

5.1. *Екстракт з проби*

Відважте 2,5 г проби з точністю до мг та помістіть у мірну колбу об'ємом 250 мл. Додайте 200 мл етилового спирту (3.1) та змішуйте в барабані упродовж години. Додайте 5 мл розчину Карреза I (3.2) та перемішайте упродовж приблизно 30 секунд. Додайте 5 мл розчину Карреза II (3.3) та перемішайте знову упродовж 1 хвилини. Розбавте етиловим спиртом до відмітки (3.1), доведіть до однорідності та відфільтруйте. Візьмуть 200 мл фільтрату та випаруйте приблизно половину об'єму, щоб усунути більшу частину етилового спирту. Кількісно перенесіть осад від випаровування у мірну колбу об'ємом 200 мл за допомогою теплої води, дайте охолонути, розбавте водою до відмітки, доведіть до однорідності та відфільтруйте, якщо необхідно. Цей розчин буде використовуватись для визначення кількості відновлювальних цукрів, а після інверсії для визначення кількості загальних цукрів.

5.2. *Визначення відтворювальних цукрів*

За допомогою піпетки відміряйте 25 мл розчину з вмістом відтворювальних цукрів, виражених в якості глюкози, не більше 60 мг. За необхідності, розведіть розчин 25 мл дистильованої води та визначте вміст відтворювальних цукрів за методом Лаффа-Скорла. Результат записується у відсотковому співвідношенні глюкози в пробі.

5.3. *Визначення загальних цукрів після інверсії.*

За допомогою піпетки відміряйте 50 мл розчину та перемістіть його у мірну колбу об'ємом 100 мл. Додайте кілька крапель розчину метилоранжу (3.4), далі, постійно помішуючи, обережно додайте соляну кислоту (3.5), поки рідина не стане чіткого червоного кольору. Додайте 15 мл соляної кислоти (3.6), занурте колбу у ванну з киплячою водою на 30 хвилин. Швидко охолодіть до приблизно 20 ^{o}C та додайте 15 мл розчину гідроксиду натрію (3.7). Приготуйте до 100 мл розчину та доведіть до однорідності. Відміряйте не більше 25 мл розчину з вмістом відтворювальних цукрів, виражених в якості глюкози, не більше 60 мг. За необхідності, розведіть розчин 25 мл дистильованої води та визначте вміст відтворювальних цукрів за методом Лаффа-Скорла. Результат записується у вигляді відсоткового співвідношення глюкози або, якщо застосовно, сахарози, помножене на коефіцієнт 0,95.

5.4. *Титрування за методом Лаффа-Скорла*

За допомогою піпетки відміряйте 25 мл реагенту Лаффа-Скорла (3.8) та перелийте у колбу Ерленмеєра об'ємом 300 мл. Додайте рівно 25 мл освітленого цукрового розчину. Додайте 2 гранули пемзи (3.13), нагрійте над середнім відкритим вогнем, помішуючи вручну, та доведіть рідину до кипіння приблизно за дві хвилини. Поставте колбу Ерленмейєра одразу на сітку з азбестовим покриттям, з діаметром отворів 6 см та запаліть під нею вогонь. Полум'я слід відрегулювати таким чином, щоб нагрівалось лише дно колби. Вставте в колбу Ерленмеєра дефлегматор. Кип'ятіть рівно 10 хвилин. Охолодіть одразу в холодній воді, далі проведіть титрування упродовж приблизно п'яти хвилин як вказано далі:

Додайте 10 мл розчину йодиду калію (3.12) і одразу за ним (обережно, у зв'язку з ризиком інтенсивного утворення піни), додайте 25 мл сірчаної кислоти (3.11). Проведіть титрування розчину тіосульфату натрію (3.9) до появи тьмяного жовтого кольору, додайте крохмальний індикатор (3.10) та закінчіть титрування.

Проведіть аналогічне титрування ретельно відміряної суміші 25 мл реагенту Лаффа-Скорла (3.8) та 25 мл води, після додавання 10 мл розчину йодиду калію (3.12) та 25 мл сірчаної кислоти (3.11) без кип'ятіння

6. **Підрахунок результатів**

Користуючись таблицею, визначте кількість глюкози в мг, яка дорівнює різниці між значеннями двох титрувань, та виражається в мг тіосульфату натрію 0,1 моль/літр. Виразіть результати у відсотках від проби.

7. **Спеціальні процедури**

7.1. У випадку кормів багатих мелясою та інших неоднорідних кормів, відважте 20 г та покладіть до мірної колби об'ємом 1 літр з додаванням 500 мл води. Змішайте в барабані упродовж години. Висвітліть розчин за допомогою реагентів Карреза I (3.2) та II (3.3), як описано в пункті 5.1, однак цього разу візьміть у чотири рази більше кожного реагенту. Доведіть до відмітки додавши 80% етилового спирту (v/v).

Доведіть до однорідності та відфільтруйте. Усуньте етиловий спирт як описано в пункті 5.1. Якщо немає декстринового крохмалю, доведіть до відмітки додавши дистильованої води.

7.2. У випадку кормів з високим вмістом цукру та низьким вмістом крохмалю (плоди ріжкового дерева, бурякова гичка тощо), відважте 5 г, покладіть до мірної колби об'ємом 250 мл, додайте 200 мл дистильованої води та змішайте в барабані упродовж години або більше, якщо необхідно. Висвітліть розчин за допомогою реагентів Карреза I (3.2) та II (3.3), як описано в пункті 5.1. Розбавте холодною водою до відмітки, доведіть до однорідності та відфільтруйте. Щоб визначити кількість загальних цукрів, продовжуйте, як описано в пункті 5.3.

8. **Результати спостереження**

8.1. Щоб уникнути утворення піни, рекомендується додавати (незалежно від об'єму) приблизно 1 мл 3-метилбутан-1-ол (3.14), перш ніж кип'ятити з реагентом Лаффа-Скорла.

8.2. Різниця між вмістом загальних цукрів після інверсії, виражених в якості глюкози, та вмістом відтворювальних цукрів, виражених в якості глюкози, помножена на коефіцієнт 0,95 дорівнює відсотковому співвідношенню вмісту сахарози.

8.3. Для визначення вмісту відтворювальних цукрів, за винятком лактози, можна застосовувати два методи:

8.3.1. Для приблизного розрахунку помножте вміст лактози, визначений різними методами аналізу, на 0,675 та відніміть отриманий результат від вмісту відтворювальних цукрів.

8.3.2. Для точного розрахунку відтворювальних цукрів, за винятком лактози, для двох останніх визначень слід використовувати одну й ту ж пробу. Один аналіз проводиться з частиною розчину, отриманого відповідно до пункту 5.1, інший - з частиною розчину, отриманого під час визначення лактози за методами, встановленими для цієї мети (після ферментування інших типів цукрів та освітлення).

В обох випадках кількість наявних цукрів визначається за методом Лаффа-Скорла та вираховується в мг глюкози. Одне із значень віднімають від іншого, і різниця виражається у відсотковому співвідношенні проби.

Приклад:

Два взяті об'єми, для кожного визначення, відповідають пробі масою 250 мг.

У першому випадку використовується 17 мл розчину тіосульфату натрію 0,1 моль/літр, що відповідає 44,2 мг глюкози. У другому випадку використовується 11 мл, що відповідає 27,6 мг глюкози.

Різниця складає 16,6 мг глюкози.

Вміст відтворювальних цукрів (за винятком лактози), вирахуваний в якості глюкози, таким чином складає:

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

Таблиця значень для 25 мл реагенту Люффа-Шурла

мл Na_2 S_2 O_3 0,1 моль/літр, нагрівати дві хвилини, кип'ятити 10 хвилин

$Na_2S_2O_3$ 0,1 моль/літр	Глюкоза, фруктозаінвертний цукор C6 H12 O6		Лактоза C12 H22 O11		Мальтоза C12 H22 O11		$Na_2S_2O_3$ 0,1 моль/літр
мл	мг	Різниця	мг	Різниця	мг	Різниця	мл
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

И. ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТОЗИ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити рівень лактози в сировині, що містить більше 0,5% лактози.

2. **Принцип**

Цукор розчиняють у воді. Розчин піддають ферментації за допомогою дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що не впливає на лактозу. Після очищення та фільтрації вміст фільтрату лактози визначають за методом Люффа-Шурла.

3. **Реактиви**

3.1. Суспензія *Saccharomyces cerevisiae:* розчинити 25 г свіжих дріжджів в 100 мл води. Суспензію тримати в холодильнику не більше одного тижня.

3.2. Розчин Карреза I: розчинити у воді 21,9 г ацетату цинку $Zn\ (CH_3COO)_2\ 2H_2O$ і 3 г крижаної оцтової кислоти. Доведіть до об'єму 100 мл води.

3.3. Розчин Карреза II: розчинити у воді 10,6 г калію фероціаніду $K_4Fe\ (CN)_6\ 3H_2O$. Доведіть до об'єму 100 мл води.

3.4. Реагент Люффа-Шурла:

Ретельно помішуючи, влити розчин лимонної кислоти (3.4.2) в розчин карбонату натрію (3.4.3) Додати розчин сульфату міді (3.4.1) і довести до 1 літра води. Залишити на ніч, щоб осів осад і відфільтрувати. Перевірити концентрацію отриманого в такий спосіб реактиву (Cu 0,05 моль/літр; Na_2CO_3 1 моль/літр). Рівень pH розчину повинен становити приблизно 9,4.

3.4.1. Розчин сульфату міді: розчинити 25 г сульфату міді $Cu\ SO_4\ 5H_2O$, без заліза, в 100 мл води.

3.4.2. Розчин лимонної кислоти: розчинити 50 г лимонної кислоти $C_6H_8O_7\ H_2O$ в 50 мл води

3.4.3. Розчин карбонату натрію: розчинити 143,8 г безводного карбонату натрію в приблизно 300 мл теплої води. Дайте охолонути.

3.5. Гранульовану пемзу прокип'ятити в соляній кислоті, промити водою і висушити.

3.6. Йодид калію, розчин 30% (маса/об'єм).

3.7. Сірчана кислота 3 моль/л.

3.8. Розчин натрію тіосульфату 0,1 моль/л.

3.9. Крохмальний розчин: додати суміш 5 г розчиненого крохмалю в 30 мл води до 1 л киплячої води. Кип'ятити протягом трьох хвилин, дати охолонути, а при необхідності додати 10 мг йодиду ртуті в якості консерванту.

4. **Обладнання**

Водяна баня з термостатом, встановленим на 38-40°C.

5. **Процедура**

Зважити 1 г проби з точністю до мг і помістити цю частину проби в мірну колбу об'ємом 100 мл. Додати 25 до 30 мл води. Помістити колбу до киплячої водяної бані на 30 хвилин, а потім охолодити до приблизно 35°C. Додати 5 мл суспензії дріжджів (3.1) і гомогенізувати. Залишити колбу на дві години на водяній бані при температурі 38-40°C. Охолодити до приблизно 20°C.

Додати 2,5 мл розчину Карреза I (3.2) і перемішати протягом 30 секунд, потім додати 2,5 мл розчину Карреза II (3.3) і знову перемішати протягом 30 секунд. Влити до 100 мл води, перемішати і відфільтрувати. За допомогою піпетки, взяти певну кількість фільтрату, не більше 25 мл (який переважно містить від 40 до 80 мг лактози) і перенести його до колби Ерленмеєра об'ємом 300 мл. При необхідності, влити до 25 мл води.

Провести таким же чином пробний тест з 5 мл суспензії дріжджів (3.1). Визначити вміст лактози відповідно до методу Люффа-Шурла, а саме: додати рівно 25 мл реагенту Люффа-Шурла (3.4) і дві гранули пемзи (3.5). Перемішати вручну, нагріваючи на відкритому середньому вогні, і варити рідину близько двох хвилин. Відразу помістити колбу Ерленмейера на дротяну сітку з азбестовим покриттям та з отвором близько 6 см в діаметрі, під яким горить вогонь. Вогонь слід регулювати таким чином, щоб нагрівалось лише дно колби. До колби Ерленмеєра прикріпити дефлегматор. Кип'ятіть рівно 10 хвилин. Одразу охолодити в холодній воді і приблизно через п'ять хвилин титрувати наступним чином:

Додати 10 мл розчину йодиду калію (3.6) і відразу після цього (обережно, через ризик рясного піноутворення) додати 25 мл сірчаної кислоти (3.7). Титрувати розчином тіосульфату натрію (3.8), поки не з'явиться матовий жовтий колір, додати розчин крохмалю (3.9) і завершити титрування.

За тим же алгоритмом титрувати точно виміряну суміш 25 мл реагенту Люффа-Шурла (3,4) та 25 мл води, після додавання 10 мл йодистого калію (3.6) і 25 мл сірчаної кислоти (3.7), не доводячи до кипіння.

6. **Підрахунок результатів**

Використовуючи додану таблицю, встановити кількість лактози в мг, що відповідає різниці між результатами двох титрувань, виражену в мл натрію тіосульфату 0,1 моль/літр.

Результат встановлення кількості безводної лактози виражається у відсотках проб.

7. **Результати спостереження**

Для продуктів, що містять більше 40% цукру, який може зброджуватися, необхідно використовувати більше 5 мл суспензії дріжджів (3.1).

Таблиця значень для 25 мл реагенту Люффа-Шурла

мл $Na_2S_2O_3$ 0,1 моль/літр, нагрівати дві хвилини, кип'ятити 10 хвилин

$Na_2S_2O_3$ 0,1 моль/літр	Глюкоза, фруктозаінвертний цукор $C_6H_{12}O_6$		Лактоза $C_{12}H_{22}O_{11}$		Мальтоза $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 моль/літр
мл	мг	Різниця	мг	Різниця	мг	Різниця	мл
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

I. ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТОЗИ

ПОЛЯРИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД

1. **Мета і зміст**

Цей метод дозволяє визначити рівні крохмалю і крохмалопродуктів з високою молекулярною масою в кормах з метою перевірки відповідності заявленої енергетичної цінності (положення Додатку VII) і Директиви Ради 96/25/ЄС ([1]).

2. **Принцип**

Метод включає два способи визначення. Перший спосіб: пробу обробляють розведеною соляною кислотою. Після очищення та фільтрації оптичне обертання розчину вимірюється за допомогою поляриметричного методу.

Другий спосіб: пробу екстрагують 40%-вим розчином етанолу. Після підкислення фільтрату соляною кислотою, очищення та фільтрації, оптичне обертання вимірюють як у першому способі.

Різниця між двома вимірами, множиться на відомий фактор, відображає вміст крохмалю у пробі.

3. **Реактиви**

3.1. Соляна кислота, розчин 25% (вага/вага) щільність: 1,126 г/мл.

(1) OJ L 125, 23.5.1996, p. 35.

3.2. Розчин хлоридної кислоти 1,13% (маса/об'єм)

Концентрація повинна бути перевірена шляхом титрування з використанням розчину гідроксиду натрію 0,1 моль/л у доданому 0,1% (маса/об'єм) розчину метилового червоного до 94% (об'єм/об'єм) етанолу. Для нейтралізації 10 мл, необхідно 30,94 мл NaOH 0,1 моль/л.

3.3. Розчин Карреза I: розчинити 21,9 г ацетату цинку $Zn(CH_3COO)$ 2 $2H_2O$ і 3 г крижаної оцтової кислоти у воді. Доведіть до об'єму 100 мл води.

3.4. Розчин Карреза II: розчинити 10,6 г калію фероцианіду $K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$ у воді. Доведіть до об'єму 100 мл води.

3.5. Етанол, 40% розчин (об'єм/об'єм), щільність: 0,948 г/мл на 20°C

4. **Обладнання**

4.1. колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл зі стандартним шліфом і дефлегматор.

4.2. Поляриметр або цукрометр.

5. **Процедура**

5.1. *Підготовка проби*

Подрібнити пробу, поки вона не стане достатньо дрібною, щоб пройти через сито з крупними отворами - 0,5 мм.

5.2. *Визначення загального оптичного обертання (P або S) (див. результати спостереження 7.1)*

Зважити 2,5 г подрібненого проби з точністю до мг і помістити в градуйовану колбу об'ємом 100 мл. Додати 25 мл соляної кислоти (3.2), струснути, щоб отримати рівномірний розподіл досліджуваної проби і додати ще 25 мл соляної кислоти (3.2). Занурити колбу до киплячої водяної бані, енергійно і безперервно струшувати протягом перших трьох хвилин, щоб запобігти утворенню агломератів. Кількість води для водяної бані повинна бути достатньою для того, щоб продовжувати кипіти після занурення колби. Колба не повинна виходити з води у процесі струшування. Рівно через 15 хвилин, вийняти колбу з води, додати 30 мл холодної води і одразу охолодити до 20°C.

Додати 5 мл розчину Карреза I (3.3) і струшувати протягом приблизно 30 секунд. Потім додати 5 мл розчину Карреза II (3.4) і струсити ще раз протягом 30 секунд. Довести до об'єму водою, переміщати та відфільтрувати. Якщо фільтрат не є чистим (що буває вкрай рідко), повторити процедуру визначення, використовуючи більшу кількість розчинів Карреза I і Карреза II, наприклад 10 мл.

Виміряти оптичне обертання розчину в 200 мм трубці за допомогою поляриметра або цукрометра.

5.3. *Визначення оптичного обертання (P 'або S') речовин, розчинних у 40% -вому етанолі*

Зважити 5 г проби з точністю до мг, помістити в градуйовану колбу об'ємом 100 мл і додати близько 80 мл етилового спирту (3.5) (див. результати спостереження 7.2). Залиште колбу на годину при кімнатній температурі; протягом цього часу, енергійно струсити шість разів, так щоб випробувана проба ретельно змішалася з етанолом. Довести до об'єму етанолом (3.5), перемішати і відфільтрувати.

За допомогою піпетки додати 50 мл фільтрату (відповідно 2,5 г проби) у колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл, додати 2,1 мл соляної кислоти (3.1) і енергійно струсити. Встановити дефлегматор до колби Ерленмеєра і занурити останню до киплячої водяної бані. Рівно через 15 хвилин, зняти колбу Ерленмеєра з водяної бані, перелити вміст в градуйовану колбу об'ємом 100 мл, промиваючи невеликою кількістю холодної води, і охолодити до 20°C.

Очистити за допомогою розчинів Карреза I (3.3) і II (3.4), довести до об'єму водою, змішати, процідити і виміряти оптичну ротацію, як зазначено в підпунктах 2 і 3 пункту 5.2.

6. **Підрахунок результатів**

Вміст крохмалю (%) розраховують наступним чином:

6.1. *Вимірюють поляриметром*

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

P = загальне оптичне обертання в кутових градусах

P' = Оптичне обертання в кутових градусах речовин, розчинних у 40% (об/об) етанолі

$[\alpha]_D^{20°}$ = Питоме оптичне обертання чистого крохмалю. Числові значення, що зазвичай приймаються для цього чинника наступні:

+ 185,9o: рисовий крохмаль
+ 185,7o: картопляний крохмаль
+ 184,6o: кукурудзяний крохмаль
+ 182,7o: пшеничний крохмаль
+ 181,5o: ячмінний крохмаль
+ 181,3o: вівсяний крохмаль
+ 184,0o: інші види крохмалю і сумішей комбікормових

6.2. **Вимірювання цукрометром**

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

S = Загальна оптичне обертання в градусах цукрометра

S' = Оптичне обертання в градусах цукрометра, речовин розчинних у 40% (обсяг / об'єм) етанолу

N = вага (г) сахарози в 100 мл води, кількість оптичного обертання 100 градусів Цукрометру при вимірюванні з використанням 200 мм трубки

16,29 г для французьких цукрометрів
26,00 г для німецьких цукрометрів
20,00 г змішаних цукрометрів.

$[\alpha]_D^{20°}$ = Питоме оптичне обертання чистого крохмалю (див 6.1)

6.3. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати 0,4 абсолютної величини вмісту крохмалю нижче ніж 40% і 1% відповідно вмісту крохмалю, рівних або більших, ніж 40%.

7. **Результати спостереження**

7.1. Якщо проба містить більше 6% карбонатів, розрахованих по карбонатом кальцію, вони повинні бути знищені шляхом обробки точної відповідної кількості розведеної сірчаної кислоти до визначення загальної оптичного обертання.

7.2. При використанні продуктів з високим вмістом лактози, наприклад, сухого молока, сироватки або сухого знежиреного молока, процедуру проводити за вказаним алгоритмом лише після додавання 80 мл етанолу (3.5). Прикріпити дефлегматор до колби і занурити останню до водяної бані при температурі 50 ° C на 30 хвилин. Охолодити і продовжити аналіз, відповідно до пункту 5.3.

7.3. Наступні вихідні матеріали, де вони присутні в значних кількостях в кормі, як відомо, викликають перешкоди при визначенні вмісту крохмалю поляриметричним методом і, таким чином, можуть бути неправильні результати :

— (цукор) буряка продукти, такі як (цукор) бурякового жому, (цукор) меляси, (цукор) м'якоті буряка - мелясованої, (цукор) бурякової барди, (буряковий) цукор

— м'якоть цитрусових,

— лляне насіння; лляна макуха; лляні витяжки,

— рапсове насіння; рапсова макуха; рапсова витяжка; ріпак корпусу, відходи ріпаку,

— соняшникове насіння; соняшникова витяжка, насіння соняшнику, частково очищене від шкаралупи, екстракт,

— макуха з копри, екстракт з копри,

— картопляна целюлоза,

— збезводнені дріжджі,

— продукти, багаті на інулін (наприклад чіпси і Єрусалимський артишок),

— шкварки.

Ї. ВИЗНАЧЕННЯ СИРОГО ПОПЕЛУ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити вміст сирої золи в кормі.

2. **Принцип**

Пробу спалюють при 550°C; залишок зважують.

3. **Реактиви**

Нітрат амонію, розчин 20% (маса/об'єм).

4. **Обладнання**

4.1. Плита.

4.2. Електрична муфельна піч з термостатом.

4.3. Тиглі для озолення виготовлені з діоксиду кремнію, порцеляни або платини прямокутної (приблизно 60 × 40 × 25 мм) або круглої (діаметр: від 60 до 75 мм та висотою: від 20 до 40 мм) форми.

5. **Процедура**

Зважити з точністю до мг приблизно 5 г проби (2,5г при використанні продуктів, які мають тенденцію до набухання) помістити в тигель для озолення, який спочатку був нагрітий до 550°C, потім охолоджений і зважити. Помістити тигель на плиту і поступово нагрівати до обвуглювання речовини. Попіл згідно з пунктом 5.1 або 5.2.

5.1. Поставити тигель в калібровану муфельну піч, встановлену на 550°C. Утримувати при цій температурі до білого, світло-сірого або червонуватого попелу, який з'являється при звільненні від вуглецевих частинок. Помістити тигель до ексикатору, залишити остигати і швидко зважити.

5.2. Поставити тигель до каліброваної муфельної печі при температурі 550°C. Озолювати протягом 3 годин. Помістити тигель до ексикатору, залишити остигати і швидко зважити. Озолювати знову протягом 30 хвилин, щоб впевнитися, що вага попелу залишається константною (втрата ваги між двома послідовними зважуваннями повинна становити менше або рівно 1 мг).

6. **Підрахунок результатів**

Розрахувати вагу залишку шляхом відрахування тари.

Виразіть результати у відсотках від проби.

7. **Результати спостереження**

7.1. Попіл з речовин, які важко озолювати спочатку піддати початковому озолюванню щонайменше протягом трьох годин, охолодити, а потім додати кілька крапель 20% розчину нітрату амонію або води, (обережно, щоб уникнути розсіювання попелу або формування грудок). Продовжити озолення після сушіння в духовці. Повторіть операцію за необхідності, до повного озолення.

7.2. У разі використання речовин, стійких до обробки, описаної в пункті 7.1, виконати наступні дії: після озолення протягом трьох годин, помістити попіл у теплу воду і фільтрувати через невеликий беззольний фільтр. Озолити фільтр і його вміст в першому тиглі. Помістити фільтрат до охолодженого тиглю, випарувати до сухої речовини, озолити і зважити.

7.3. У разі використання рослинних олій і жирів, зважити точно 25 г проби у тигелі підходящого розміру. Карбонізувати, направивши світло на речовину з смугою беззольного фільтрувального паперу. Після окислювання, якщо можливо змочити в невеликій кількості води. Висушити і озолити, як вказано у 5 пункті.

К. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ПОПЕЛУ, ЯКИЙ НЕ РОЗЧИНЯЄТЬСЯ В СОЛЯНІЙ КИСЛОТІ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити рівень мінеральних речовин в кормі, які нерозчинні в соляній кислоті. Залежно від природи проби, можна скористатися двома методами.

1.1. *Метод А:* застосовується до органічних кормових матеріалів і більшості комбікормів.

1.2. *Метод Б:* застосовується до мінеральних сполук і сумішей, та комбікормів, у яких вміст речовин, нерозчинних у соляній кислоті, визначених за методом А, більше ніж 1%.

2. **Принцип**

2.1. *Метод А:* пробу озолити, попіл кип'ятити в соляній кислоті і нерозчинний залишок відфільтрувати та зважити.

2.2. *Метод Б:* пробу обробити соляною кислотою. Розчин відфільтрувати, залишок озолення і попіл, отриманого таким чином, обробити відповідно до методу А.

3. **Реактиви**

3.1. Соляна кислота 3 моль/л.

3.2. Розчин трихлороцтової кислоти, 20% -вий розчин (маса/об'єм).

3.3. Трихлороцтова кислота, розчин 1%- вий (маса/об'єм).

4. **Обладнання**

4.1. Плита.

4.2. Електрична муфельна піч з термостатом.

4.3. Тиглі для озолення виготовлені з діоксиду кремнію, порцеляни або платини, прямокутної (близько 60 × 40 × 25 мм) або круглої (діаметром близько: від 60 до 75 мм та висотою: від 20 до 40 мм) форми.

5. **Процедура**

5.1. *Метод А*

Озолити пробу за допомогою методу, описаного для визначення сирого попелу. Попіл отриманий за допомогою такого аналізу також може бути використаний.

Помістити попіл у склянку об'ємом 250-400 мл використовуючи 75 мл соляної кислоти (3.1). Повільно довести до кипіння і кип'ятити на повільному вогні 15 хвилин. Відфільтрувати теплий розчин через беззольний фільтрувальний папір і вимити залишок теплою водою до тих пір, поки реакція на кислота стане непомітною. . Висушити фільтр з залишком та озолити в тарованому тиглі при температурі не менше 550°C і не більше 700°C. Охолодити в ексикаторі і зважити.

5.2. *Метод Б*

Зважити 5 г проби з точністю до мг і помістити до склянки 250-400 мл. Послідовно додати по 25 мл води і соляної кислоти (3.1) перемішати і почекати до закінчення виділення газу. Додати ще 50 мл соляної кислоти (3.1). Зачекати доки виділення газу повністю припиниться, потім склянку помістити на киплячу водяну баню і тримати її протягом 30 хвилин або довше, якщо це необхідно, для того, щоб ретельно гідролізувати крохмаль, який може бути присутнім.

Відфільтрувати доки розчин теплий за допомогою беззольного фільтру і промити фільтр в 50 мл теплої води (див. результати спостереження 7). Помістити фільтр з залишком до тиглю, висушити та озолити при температурі не менше 550°C і не більше 700°C. Помістити попіл у склянку об'ємом 250-400 мл використовуючи 75 мл соляної кислоти (3.1); продовжити згідно другого абзацу пункту 5.1.

6. **Підрахунок результатів**

Розрахувати вагу залишку шляхом відрахування тари. Виразіть результати у відсотках від проби.

7. **Результати спостереження**

Якщо фільтрація виявляється важкою для відновлення аналізу, замінити 50 мл соляної кислоти (3.1) на 50 мл 20% трихлороцтової кислоти (3.2) і промити фільтр в теплому розчині 1% трихлороцтової кислоти (3.3).

Л. ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОНАТІВ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити кількість карбонатів, зазвичай представлених у вигляді карбонату кальцію, в більшості кормів.

Однак в окремих випадках (наприклад, з карбонатом заліза) слід використовувати спеціальний метод.

2. **Принцип**

Карбонати розкладаються в соляній кислоті; двоокис вуглецю, що при цьому виділяється збирають у градуйовану пробірку, і його обсяг порівнюють з об'ємом виділень за таких же умов при використанні відомої кількості карбонату кальцію.

3. **Реактиви**

3.1. Соляна кислота, щільність 1,10 г/мл.

3.2. Карбонат кальцію.

3.3. Сірчана кислота, приблизно 0,05 моль/л, зафарбована метиловим червоним.

4. **Обладнання**

Апарат Шайблера-Дітріха (див. діаграму) або подібний прилад.

5. **Процедура**

Відповідно до вмісту карбонату проби зважити порцію проби, як показано нижче:

— 0,5 г продуктів, що містять від 50% до 100% карбонатів, виражених у вигляді карбонату кальцію,
— 1 г продуктів, що містять від 40% до 50% карбонатів, виражених у вигляді карбонату кальцію,
— від 2 до 3 г інших продуктів.

Помістити частину проби в спеціальну колбу (4) пристрою, оснащену невеликою трубкою нерозривного матеріалу, що містить 10 мл соляної кислоти (3.1), і з'єднати колбу з пристроєм. Увімкнути триходовий кран (5), так що трубка (1) з'єднувалась із зовнішнього боку. Використовуючи мобільну трубку (2), яка заповнюється кольоровою сірчаною кислотою (3.3) і підключена до градуювальної трубки (1), довести рівень рідини до нульової позначки. Повернути кран (5) для того, щоб підключити трубки (1) і (3) і переконатися, що рівень знаходиться на нулі.

Пропустити соляну кислоту (3.1) повільно через частину проби, нахиляючи колбу (4). Вирівняти тиск за рахунок опускання трубки (2). Трусити колбу (4) до повної зупинки випаровування двоокису вуглецю.

Відновити тиск, за рахунок повернення рідини назад до того ж самого рівня в трубках (1) і (2). Через кілька хвилин, коли обсяг газу стане постійним, зняти показання.

Провести контрольний тест за тих же умов, з 0,5 г карбонату кальцію (3.2)

6. **Підрахунок результатів**

Вміст карбонатів, виражених в якості карбонату кальцію, розраховується за формулою:

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

де:

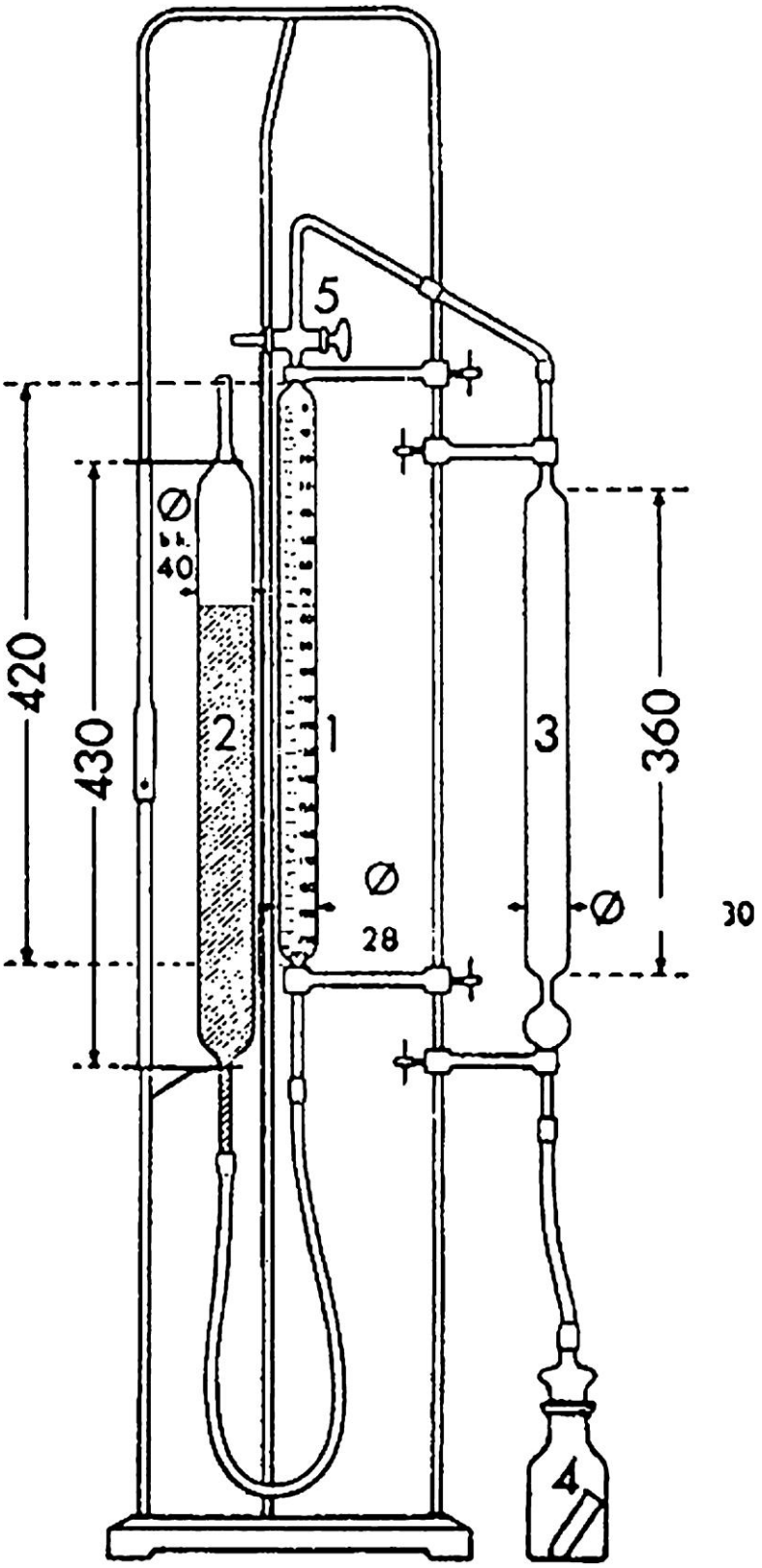
X =% (вага/вага) карбонатів у пробі, виражена в якості карбонату кальцію
V = CO_2, що випарувався з частини проби, мл.
V1 = CO_2, що випарувався з 0,5 г $CaCO_3$, мл.
m = вага частини проби, в грамах.

7. **Результати спостереження**

7.1. Якщо частина проби важить більше 2 г, спочатку помістити 15 мл дистильованої води в колбу (4) і перемішати до початку тесту. Використати той же об’єм води для контрольного тесту.

7.2. Якщо обладнання, що використовується має інший об’єм ніж апарат Шайблера-Дітріха, тоді частини взяті з проби і контрольної речовини і обчислення результатів необхідно відповідним чином адаптувати.

АПАРАТ ШАЙБЛЕРА-ДІТРІХА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ CO_2



(вимірюється в міліметрах)

M. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ФОСФОРУ

ФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити вміст загального фосфору в кормі. Він особливо підходить для аналізу продуктів з низьким вмістом фосфору. У деяких випадках (продукт багатий фосфором), може бути використаний гравіметричний метод.

2. **Принцип**

Пробу мінералізують, через сухе згоряння (для органічної сировини) або через кислотний розклад (для мінеральних сполук та рідких кормів), і поміщають в розчин кислоти. Розчин обробляють реагентом фосфоромолібдату амонію. Оптичну щільність утвореного таким чином жовтого розчину виміряти в спектрофотометрі при 430 нм.

3. **Реактиви**

3.1. Карбонат кальцію.

3.2. Соляна кислота, ρ20 = 1,10 г/мл (близько 6 моль/л).

3.3. Нітратна кислота, ρ20 = 1,045 г/мл.

3.4. Нітратна кислота, ρ20 = від 1,38 до 1,42 г/мл.

3.5. Сірчана кислота, ρ20 = 1,84 г/мл.

3.6. Реагент фосфоромолібдату амонію. Змішати 200 мл гептамолібдату амонію (3.6.1), 200 мл монованадату амонію (3.6.2) і 134 мл азотної кислоти (3.4) в градуйованій колбі об'ємом 1 літр. Довести до об'єму водою.

3.6.1. Розчин гептамолібдату амонію: розчинити в гарячій воді 100 г гептамолібдату амонію $(NH_4)6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$. Додати 10 мл аміаку (щільністю 0,91 г/мл) і влити до 1 літра води.

3.6.2. Розчин монованадату амонію: розчинити 2,35 г монованадату амонію NH_4VO_3 в 400 мл гарячої води. Постійно помішуючи, повільно додати 20 мл розведеної азотної кислоти (7 мл HNO_3 (3.4) + 13 мл H_2O і влити до 1 літра води.

3.7. Стандартний розчин 1 мг фосфору на мл: розчинити 4,387 г дигідрофосфату калію KH_2PO_4 у воді. Доведіть до об'єму 1 л води.

4. **Обладнання**

4.1. Кремнієвий, порцеляновий або платиновий тигель для озолення.

4.2. Електрична муфельна піч з термостатом встановленим на 550°C.

4.3. колба К'єльдаля об'ємом 250 мл.

4.4. Градуйовані колби і прецизійні піпетки.

4.5. Спектрофотометр.

4.6. Пробірки близько 16 мм в діаметрі, з градуювальними пробками діаметром 14,5 мм; ємкість: від 25 до 30 мл.

5. **Процедура**

5.1. *Приготування розчину*

Відповідно до природи проби, приготувати розчин, як зазначено в 5.1.1 або 5.1.2.

5.1.1. Звичайна процедура

Зважити 1 г або більше проби з точністю до 1 мг. Помістити випробувану пробу в колбу К'єльдаля, додати 20 мл сірчаної кислоти (3.5), струснути, щоб речовина повністю просочилася кислотою і, щоб запобігти її прилипанню до боків колби, нагріти і тримати при температурі кипіння протягом 10 хвилин. Залишити трохи охолонути, додати 2 мл азотної кислоти (3.4), обережно нагріти, залишити охолонути, додати трохи більше азотної кислоти (3.4) і знову нагріти до температури кипіння. Повторити процедуру, до отримання безбарвного розчину. Охолодити, додати трохи води, перелити рідину в градуйовану колбу об'ємом 500 мл, колбу К'єльдаля прополоскати в гарячій воді. Дати охолонути, довести до об'єму водою, довести до однорідності і відфільтрувати.

5.1.2. Проби, що містять органічні речовини і вільні від кальцію і дигідрофосфату магнію.

Зважити близько 2,5 г проби з точністю до 1 мг в тиглі для озолення. Змішати тестову пробу до повного об'єднання з 1 г карбонату кальцію (3.1). Озолити в духовці при 550°C до білого або сірого попелу (трохи деревного вугілля не має значення). Пересипати попіл в 250 мл хімічний стакан. Додати по 20 мл води і соляної кислоти (3.2) до закінчення реакції. Додати ще 10 мл соляної кислоти (3.2). Помістіть стакан на піщану баню і випаровувати, поки діоксид кремнію стане нерозчинний. Повторно розчинити залишок в 10 мл азотної кислоти (3.3) і варити на піщаній бані або гарячій плиті протягом 5 хвилин без випаровування до повного висихання. Зцідити рідину в градуйовану колбу об'ємом 500 мл, промити хімічну склянку кілька разів гарячою водою. Дати охолонути, довести до об'єму водою, довести до однорідності і відфільтрувати.

5.2. *Зміна забарвлення і вимірювання оптичної щільності*

Розвести аліквотну частину фільтрату, отриманого відповідно до 5.1.1 або 5.1.2, щоб отримати концентрацію фосфору не більше 40 мкг/мл. Помістити 10 мл цього розчину в пробірку (4.6) і додати 10 мл реагенту фосфоромолібдату амонію (3.6). Гомогенізувати і залишити щонайменше на 10 хвилин при температурі 20°C. Виміряти оптичну щільність на спектрофотометрі при 430 нм проти розчину, отриманого, додавши 10 мл реагенту фосфомолібдату амонію (3.6) до 10 мл води.

5.3. Калібрувальна крива

З стандартного розчину (3.7) приготувати розчини, які, відповідно, містять 5, 10, 20, 30 і 40 мкг фосфору на мл. Взяти 10 мл кожного з цих розчинів і додати до кожного 10 мл реагенту фосфомолібдату амонію (3.6). Гомогенізувати і залишити щонайменше на 10 хвилин при температурі 20°C. Виміряти оптичну щільність, як описано в 5.2. Прослідкувати калібрувальний графік, вказуючи оптичну щільність напроти відповідних кількостей фосфору. Для концентрації від 0 до 40 мкг/мл, крива буде лінійною.

6. **Підрахунок результатів**

Визначити кількість фосфору в досліджуваній пробі за допомогою калібрувальної кривої.

Виразіть результати у відсотках від проби.

Повторюваність

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати:

— 3%, для більш високих результатів, на вміст фосфору менший ніж 5%,

— 0,15% за абсолютною величиною, на вміст фосфору 5% або більше.

Н. ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРУ З ХЛОРИДАХ

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити кількість хлору в хлоридах, які розчиняються у воді, зазвичай виражених як хлорид натрію. Це стосується всіх кормів.

2. **Принцип**

Хлориди розчинити у воді. Це дозволить визначити, чи містить продукт органічні речовини. Розчин злегка підкислити азотною кислотою за допомогою розчину нітрату срібла і хлориди осаджують у вигляді хлориду срібла. Надлишок нітрату срібла титрувати розчином тіоціанату амонію за методом Фольгарда.

3. **Реактиви**

3.1. Розчин амонію тіоцианат 0,1 моль/л.

3.2. Розчин нітрату срібла 0,1 моль/л.

3.3. Насичений розчин сульфату заліза-амонію (NH 4) Fe (SO4) 2.

3.4. Нітратна кислота, щільністю: 1,38 г/мл.

3.5. Діетиловий ефір.

3.6. Ацетон.

3.7. Розчин Каррез I: розчинити у воді 21,9 г ацетату цинку Zn $(CH_3\ COO)_2\ 2H_2O$ і 3 г крижаної оцтової кислоти. Доведіть до об'єму 100 мл води.

3.8. Розчин Каррез II: розчинити у воді 10,6 г калію фероціаніду $K_4Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Об'єм води становить 100 мл.

3.9. Активоване вугілля, без хлоридів, що не поглинає їх.

4. **Обладнання**

Міксер (барабанний): приблизно 35-40 об/хв.

5. **Процедура**

5.1. *Приготування розчину*

Відповідно до природи проби, приготувати розчин, як передбачено 5.1.1, 5.1.2 або 5.1.3.

У той же час виконувати *холостий тест* без аналізованої проби.

5.1.1. Проби, вільні від органічних речовин.

Зважують з точністю до мг пробу вагою не більше 10 г і вмістом хлору не більше 3 г у вигляді хлоридів. Помістити в мірну колбу об'ємом 500 мл 400 мл води приблизно 20°C. Мішати протягом 30 хвилин у склянці, довести до об'єму, гомогенізувати і відфільтрувати.

5.1.2. Проби, що містять органічну речовину, виключаючи продукти, перераховані в 5.1.3.

Зважити приблизно 5 г проби з точністю до мг і помістити 1 г активованого вугілля в мірну колбу об'ємом 500 мл. Додати 400 мл води приблизно 20°C і 5 мл розчину Карреза I (3.7), перемішати протягом 30 секунд, потім додати 5 мл розчину Карреза II (3.8). Мішати протягом 30 хвилин у склянці, довести до об'єму, гомогенізувати і відфільтрувати.

5.1.3. Готовий корм, макуха і лляне борошно, продукти, багаті на лляне борошно, та інші продукти, багаті рослинним слизом або колоїдними речовинами (наприклад, декстринізований крохмаль)

Приготувати розчин, як описано в 5.1.2, але не фільтрувати. Декантирувати (при необхідності центрифугувати), видалити 100 мл надосадової рідини і перелити в мірну колбу об'ємом 200 мл. Змішати з ацетоном (3.6) і довести до обсягу розчинником, гомогенізувати і відфільтрувати.

5.2. *Титрування*

За допомогою піпетки, до колби Ерленмеєра помістити від 25 мл до 100 мл фільтрату (відповідно до передбачуваного вмісту хлору), отриманого, відповідно до 5.1.1, 5.1.2 або 5.1.3. Аліквотна частина не повинна містити більше 150 мг хлору (Cl). Розвести в разі необхідності у воді (не менше 50 мл), додати 5 мл азотної кислоти (3.4), 20 мл насиченого розчину амонію сульфату заліза (3.3) і дві краплі тиоционату амонію (3.1), поміщеного за допомогою бюретки заповненої до нульової позначки. Використовуючи бюретку, помістити розчин нітрату срібла (3.2) таким чином, що утворився надлишок 5 мл. Додати 5 мл діетилового ефіру (3.5) і сильно струсити для коагуляції осаду. Титрувати надлишок нітрату срібла тиоционатом амонію (3,1) до червонувато-коричневим відтінку протягом однієї хвилини.

6. **Підрахунок результатів**

Кількість хлору (X), виражається як % хлориду натрію, що розраховується за допомогою наступної формули:

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

де:

V1 = розчину нітрату срібла 0,1 моль/л додали, мл
V2 = розчин амонію тиоционату 0,1 моль/л мл для титрування, мл
м = вага проби.

Якщо холостий тест показує, що розчин нітрату срібла 0,1 моль/л витрачено відняти це значення з об'єму (V1 - V2).

7. **Результати спостереження**

7.1. Титрування може також здійснюватися потенціометром

7.2. При використанні продуктів, які дуже багаті маслами та жирами, спочатку знежирити їх діетиловим ефіром або петролейним ефіром.

7.3. При використанні рибних продуктів, титрування може бути проведено за методом Мора.

Додаток IV

МЕТОДИ АНАЛІЗУ ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ РІВЕНЬ ВИЗНАЧЕНИХ ДОБАВОК У КОРМІ

А. ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ А

1. **Мета і зміст**

Цей метод дозволяє визначити рівень вітаміну А (ретинолу) в кормах і преміксах. Вітамін А включає в себе увесь-транс-ретініловий алкоголь і його цис-ізомери, які визначаються за допомогою цього методу. Вміст вітаміну А виражається в міжнародних одиницях (МО) на кг. Один МО відповідає діяльності 0,300 мкг все-транс-вітамін А алкоголю або 0,344 мкг все-транс-вітамін А ацетату або 0,550 мкг все-транс-вітаміну А пальмітату.

Кількісна межа вітаміну А становить 2000 МО/кг.

2. **Принцип**

Пробу піддають гідролізу спиртовим розчином гідроокису калію і вітамін А екстрагують петролейним ефіром. Розчинник видаляють за допомогою випарювання, і залишок розчиняють в метанолі, при необхідності, розбавляють до необхідної концентрації. Вміст вітаміну А визначається обернено-фазовою рідинно хроматографією високої прохідності (ОФ-РХВХ) за допомогою УФ або флуоресцентним детектором. Хроматографічні параметри вибрані так, що не розділяти все-транс-вітамін А алкоголь і його цис-ізомери.

3. **Реактиви**

3.1. Етанол, **о** = 96%

3.2. Петролейний ефір, діапазон кипіння 40-60 °C

3.3. Метанол.

3.4. Розчину гідроксиду калію, с = 50 г/100 мл

3.5. Натрію аскорбат, с = 10 г/100 мл (див. результати спостереження 7.7)

3.6. Сульфід натрію, Na 2 S • x H 2 O (x = 7-9)

3.6.1. Розчин сірчаного натрію, с = 0,5 моль/л в гліцерині, ß = 120 г/л (x = 9) (див. результати спостереження 7.8)

3.7. Розчину фенолфталеїну, с = 2 г/100 мл в етанолі (3.1)

3.8. 2-пропанол

3.9. Рухома фаза для ВЕРХ: суміш метанолу (3.3) і води, наприклад, 980 + 20 (О+О). Точне співвідношення буде залежати від характеристик використовуваної колонки.

3.10. Азот, без оксигену

3.11. Все-*транс*-вітамін А ацетат, особливо чистий, сертифікований активністю, наприклад, 2,80 x 10^6 МО/г

3.11.1. Вихідний розчин все-транс-вітаміну А ацетат: Зважити з точністю до 0,1 мг, 50 мг вітаміну А ацетату (3.11) в градуйованій колбі об'ємом 100 мл. Розчиніть в 2-пропанол (3,8) і доведіть до мітки тим же розчинником. Номінальна концентрація цього розчину 1400 МО вітаміну А на мл. Точний вміст має бути визначений відповідно до 5.6.3.1.

3.12. Все-*транс*-вітамін А пальмітат, особливо чистий, сертифікований активністю, наприклад, 1,80 x 10^6 МО / г

3.12.1. Вихідний розчин все-транс-вітаміну А пальмітат: Зважити з точністю до 0,1 мг, 80 мг вітаміну А пальмітату (3.12) в градуйованій колбі об'ємом 100 мл. Розчиніть в 2-пропанол (3,8) і доведіть до мітки тим же розчинником. Номінальна концентрація цього розчину 1400 МО вітаміну А на мл. Точний вміст має бути визначений відповідно до 5.6.3.2.

3.13. 2,6-ді-трет-бутил-4-метилфенол (BHT) (див. результати спостереження 7.5)

4. **Обладнання**

4.1. Вакуумний роторний випарник

4.2. Бурштиновий посуд

4.2.1. Колби з плоским дном або конічні колби, об'ємом 500 мл, з притертим гніздом

4.2.2. Градуйовані колби з матовими скляними пробками, з вузьким горлом, об'ємом 10, 25, 100 і 500 мл

4.2.3. Ділильні воронки, конічні, об'ємом1 000 мл, з пробками з матового скла

4.2.4. Грушоподібна колби, об'ємом 250 мл, з гніздом з матового скла

4.3. Конденсатор Алліна, довжина куртки 300 мм, з притертим суглобом, з адаптером для трубки подачі газу

4.4. Гофрований фільтрувальний папір для розділення фаз, діаметром 185 мм (наприклад, Шлейхер і Шуелл 597 HY 1/2)

4.5. ВЕРХ-обладнання з системою впорскування

4.5.1. Рідинна хроматографічна колонка, 250 мм x 4 мм, C18, 5 мкм або 10 упаковок, або еквівалент (критерій ефективності: тільки один пік для всіх ізомерів ретинолу при ВЕРХ-умовах)

4.5.2. УФ детектор флуоресценції або регулюваної довжини хвилі

4.6. Спектрофотометр з 10 мм кварцовими клітинами

4.7. Водяна баня з магнітною мішалкою

4.8. Екстракційне обладнання (малюнок 1), що складається з:

4.8.1. Скляний циліндр об'ємом 1 л оснащений матовим горлом і пробкою

4.8.2. Матова скляна вставка оснащена бічним рукавом і регульованою трубкою, що проходить через центр. Регульована трубка повинна мати U-подібний нижній кінець і струмінь на протилежному кінці так, щоб верхній шар рідини в циліндрі міг транспортуватися в ділильну воронку.

5. **Процедура**

Примітка: Вітамін А чутливий до УФ світла і до окислення. Всі операції здійснюються за відсутності світла (з використанням бурштинового посуду, або посуду, захищеного алюмінієвою фольгою) і кисню (на одному рівні з азотом). Під час екстрагування повітря над рідиною має бути замінене азотом (щоб уникнути надлишкового тиску, необхідно послаблювати пробку час від часу).

5.1. Підготовка проби

Подрібнити пробу таким чином, щоб вона проходила через 1 мм сито, намагаючись уникнути утворення тепла. Подрібнення має здійснюватися безпосередньо перед зважуванням і омилення в іншому випадку можуть бути втрати вітаміну А.

5.2. *Омилення*

Залежно від вмісту вітамін А зважують з точністю до 1 мг, від 2 г до 25 г проби в колбі з плоским дном об'ємом 500 мл (4.2.1). Додати послідовно закручуючи 130 мл етанолу (3.1), приблизно 100 мг BHT (3.13), 2 мл розчину натрію аскорбат (3.5) і 2 мл розчину сульфіду натрію (3.6). Встановіть конденсатор (4.3) в колбу і занурте колбу в водяну баню з магнітною мішалкою (4.7). Нагріти до кипіння і залишити конденсувати протягом 5 хвилин. Потім додають 25 мл розчину гідроксиду калію (3.4) через конденсатор (4.3) і залишають конденсувати протягом ще 25 хв. перемішуючи при повільній течії азоту. Потім промити конденсатор приблизно 20 мл води і охолодити вміст колби до кімнатної температури.

5.3. *Екстрагування*

Передавати декантацією розчин омилення кількісно шляхом промивання загальним обсягом 250 мл води 1 000 мл ділильної воронки (4.2.3) або екстракційного обладнання (4.8). Промити омилену колбу послідовно 25 мл етанолу (3.1) і 100 мл петролейного ефіру (3,2) і перейти до полоскання ділильної воронки або екстракційного обладнання. Частка води і етанолу в об'єднаних розчинах має бути приблизно 2: 1. Струшувати протягом 2 хв. і дати відстоятися протягом 2 хвилин.

5.3.1. Екстрагувати за допомогою ділильної воронки (4.2.3).

Коли шари відокремилися (див. результати спостереження 7.3) перемістити шар петролейного ефіру на іншу ділильну воронку (4.2.3). Повторити процедуру екстрагування двічі, з 100 мл петролейного ефіру (3,2) і двічі, з 50 мл петролейного ефіру (3.2).

Промити змішані екстракти через ділильну воронку, двічі м'яко закручуючи (щоб уникнути утворення емульсій) порціями по 100 мл води, а потім повторити струшування стосовно ще 100 мл води, поки вода не залишиться безбарвною при додаванні фенолфталеїну (3.7) (промити чотири рази, як правило, достатньо). Відфільтрувати промитий екстракт через сухий гофрований фільтр для розділення фаз (4.4), щоб видалити будь-яку воду в градуйовану колбу об'ємом 500 мл (4.2.2). Промити ділильну воронку і фільтр 50 мл петролейного ефіру (3.2), додати до позначки петролейний ефір (3.2) і добре перемішати.

5.3.2. Екстрагування за допомогою екстракційного обладнання (4.8)

Коли шари відокремилися (див. результати спостереження 7.3) замінити пробку скляного циліндра (4.8.1) на матову скляну вставку (4.8.2) і встановити U-подібний нижній кінець регульованої трубки так, щоб вона була трохи вище рівня інтерфейсу. При застосуванні тиску з лінії азоту в бічну руку, передати верхній шар петролейного ефіру в 1000 мл ділильну воронку (4.2.3). Додати 100 мл петролейного ефіру (3.2) в скляний циліндр, закоркувати і збовтати. Дозволити шарам розділитися і спрямувати верхній шар на ділильну воронку, як і раніше. Повторіть процедуру екстрагування з ще 100 мл петролейного ефіру (3,2), потім двічі з порціями по 50 мл петролейного ефіру (3.2) і додайте петролейного ефіру в ділильну воронку.

Вимийте об'єднані екстракти петролейного ефіру, як описано в 5.3.1 і дійте, згідно опису.

5.4. Приготування розчину проби для ВЕРХ

Внесіть аліквотну частину розчину петролейного ефіру (від 5.3.1 або 5.3.2) в грушоподібну форми колбу об'ємом 250 мл (4.2.4). Розчинник випарувати майже насухо на роторному випарнику (4.1) зі зниженим тиском при температурі бані не вище 40 °C. Відновіть атмосферний тиск, визнавши азот (3,10) і зніміть колбу з роторного випарнику. Видалити залишки розчинника з потоком азоту (3.10) і відразу розчинити залишок у відомому обсязі (10-100 мл) метанолу (3.3) (концентрація вітаміну А повинна бути в діапазоні від 5 МО/мл до 30 МО/мл).

5.5. Визначення за допомогою ВЕРХ

Вітамін А відокремити від С18 обернено-фазової колоною (4.5.1) і концентрацію виміряти за допомогою УФ-детектора (325 нм) або флуоресцентним детектором (збудження: 325 нм, емісія: 475 нм) (4.5.2).

Ввести аліквотну частину (наприклад, 20 мкл) метанольного розчину, отриманого в 5.4 і елюювати в рухомій фазі (3.9). Обчислити середню висоту піку (область) кількох ін'єкцій того ж розчину проби і середню висоту піків (область) декількох ін'єкцій калібрувальних розчинів (5.6.2).

умови ВЕРХ

Наступні умови пропонуються, щоб ними керуватися; інші умови можуть бути використані за умови, що вони дають еквівалентні результати.

Рідка хроматографія 250 мм × 4 мм, С18, 5 або 10мкм упаковки, або еквівалент колонка (4.5.1):

Рухома фаза (3.9):	Суміш метанолу (3.3) і води, наприклад, 980 + 20 (О+ О).
Швидкість потоку:	1-2 мл/хв.
Детектор (4.5.2):	УФ-детектор (325 нм) або детектор флуоресценції (збудження: 325 нм/емісії: 475 нм)

5.6. *Калібрування*

5.6.1. Підготовка робочих стандартних розчинів

За допомогою піпетки влити 20 мл вітаміну А ацетату концентрованого розчину (3.11.1) або 20 мл вітаміну А пальмітату концентрованого розчину (3.12.1) в 500 мл колбу з пласким дном або конічну колбу (4.2.1) і гідролізувати, як описано в 5.2 , але без додавання ВНТ. Згодом отримати екстракт петролейного ефіру (3.2) відповідно до 5.3 і доповнити до 500 мл петролейним ефіром (3.2). Випарувати 100 мл цього екстракту на роторному випарнику (див 5.4) майже насухо, видалити залишки розчиннику потоком азоту (3.10) і повторно розчинити залишок у 10,0 мл метанолу (3.3). Номінальна концентрація цього розчину 560 МО вітаміну А на мл. Точний вміст має бути визначений відповідно до 5.6.3.3. Робочий стандартний розчин має бути приготовано безпосередньо перед використанням.

За допомогою піпетки перемістити 2,0 мл цього робочого стандартного розчину в градуйовану колбу об'ємом 20 мл, заповнити до відмітки метанолом (3.3) і перемішати. Номінальна концентрація розбавленого робочого стандартного розчину 56 МО вітаміну А на мл.

5.6.2. Підготовка калібрувальних розчинів і калібрування графіка

Помістити 1,0, 2,0, 5,0 і 10,0 мл розведеного робочого стандартного розчину в кілька градуйованих колб об'ємом 20 мл, заповнити до відмітки метанолом (3.3) і перемішати. Номінальні концентрації цих розчинів 2,8, 5,6, 14,0 і 28,0 МО вітаміну А на мл.

Ввести 20 мкл кожного калібрувального розчину кілька разів і визначають середні висоти піків (області). Використовуючи середні висоти піків (області) побудувати калібрувальний графік, враховуючи результати контролю УФ (5.6.3.3).

5.6.3. УФ стандартизація типових рішень

5.6.3.1. Вітамін А ацетат концентрований розчин

Внести за допомогою піпетки 2,0 мл вітаміну А ацетат розчин (3.11.1) в градуйовану колбу об'ємом 50 мл (4.2.2) і заповнити до відмітки 2-пропанолом (3.8). Номінальна концентрація цього розчину 56 МО вітаміну А на мл. Внести за допомогою піпетки 3,0 мл розведеного вітаміну А ацетат розчин в градуйовану колбу об'ємом 25 мл і заповнити до відмітки 2-пропанолом (3,8). Номінальна концентрація цього розчину 6,72 МО вітаміну А на мл. Виміряти УФ-спектр цього розчину з 2-пропанолом (3.8) в спектрофотометрі (4.6) між 300 нм і 400 нм. Максимальна екстинкція має бути між 325 нм і 327 нм.

Розрахунок вмісту вітаміну А:

МО вітаміну А/мл = 19,0×Е326

($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ для вітаміну А ацетат = 1530326 нм в 2-пропанолі)

5.6.3.2. Вітамін А пальмітат концентрований розчин

Внести за допомогою піпетки 2,0 мл вітаміну А пальмітат розчину (3.12.1) в градуйовану колбу об'ємом 50 мл (4.2.2) і заповнити до відмітки 2-пропанолу (3,8). Номінальна концентрація цього розчину 56 МО вітаміну А на мл. Внести за допомогою піпетки 3,0 мл вітаміну А пальмітат розчину в градуйовану колбу об'ємом 25 мл і заповнити до відмітки 2-пропанолу (3,8). Номінальна концентрація цього розчину 6,72 МО вітаміну А на мл. Виміряти УФ-спектр цього розчину з 2-пропанолом (3.8) в спектрофотометрі (4.6) між 300 нм і 400 нм. Максимальна екстинкція має бути між 325 нм і 327 нм.

Розрахунок вмісту вітаміну А:

МО вітаміну А/мл = 19,0×Е326

($E^{1\,\%}_{1\,см}$ вітаміну А пальмітат = 957 нм на 326нм в 2-пропанолі)

5.6.3.3. Вітамін А робочий стандартний розчин

За допомогою піпетки внести 3,0 мл нерозбавленого вітаміну А робочого стандартного розчину, отриманого відповідно до 5.6.1 в градуйовану колбу об'ємом 50 мл (4.2.2) і заповнити до відмітки 2-пропанолом (3,8). За допомогою піпетки внести 5,0 мл цього розчину в градуйовану колбу об'ємом 25 мл і заповнити до відмітки 2-пропанолом (3,8). Номінальна концентрація цього розчину 6,72 МО вітаміну А на мл. Виміряти УФ-спектр цього розчину з 2-пропанолом (3.8) в спектрофотометрі (4.6) між 300 нм і 400 нм. Максимальна екстинкція має бути між 325 нм і 327 нм.

Розрахунок вмісту вітаміну А:

МО вітаміну А/мл = 18,3×E325

($E^{1\,\%}_{1\,см}$ для вітаміну А спиртового = +1821 на 325 нм в 2-пропанолі)

6. **Підрахунок результатів**

Із середньої висоти (площі) піків проби розчину вітаміну А визначити концентрацію розчину проби в МО/мл по відношенню до каліброваного графіку (5.6.2).

Вміст вітаміну А в МО/кг в пробі визначається за наступною формулою:

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

де:

c = вітамін А концентрований розчину проби (5.4) в МО/мл
V1 = об'єм розчину проби (5.4) в мл
V2 = об'єм аліквоти з пункту 5.4 в мл
м = вага тестової проби в г

7. **Результати спостереження**

7.1. Для проб з низькою концентрацією вітаміну А корисно змішати з екстрактом петролейного ефіру для двох омилень (кількість зважити 25 г) до одного розчину проби для ВЕРХ-визначення

7.2. Вага проби, взятої для аналізу, не повинна містити більш ніж 2 г жиру.

7.3. Якщо фазовий поділ не відбувається додати приблизно 10 мл етанолу (3.1) для руйнування емульсії.

7.4. Для масла печінки тріски та інших чистих жирів час омилення може бути продовжений на 45-60 хвилин.

7.5. Замість BHT може бути використаний гідрохінон.

7.6. Можна використати нормальне поетапне розділення ізомерів ретинолу. Але в цьому випадку, висота (область) піків всіх цис і транс ізомерів мають бути сумовані в розрахунках.

7.7. Приблизно 150 мг аскорбінової кислоти може бути використано замість аскорбату натрію.

7.8. Приблизно 50 мг ЕДТА може бути використаний замість розчину сульфіду натрію.

7.9. У випадку визначення вітаміну А в замінниках молока, слід приділити особливу увагу.

— для омилення (5.2): через кількість жиру, присутню у пробі, слід збільшити кількість розчину гідроксиду калію (3.4) за необхідності,

— при видобутку (5.3): у зв'язку з наявністю емульсій, може бути необхідна адаптація вода/етанол у співвідношенні 2: 1

Щоб перевірити, коли застосований метод аналізу генерує надійні результати на цій конкретної матриці (ЗНМ), тест відновлення застосовується для додаткової порції проби. Якщо швидкість відновлення нижча, ніж 80%, результат аналізу повинен бути виправлений для відновлення.

8. **Повторюваність**

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати 15% по відношенню до більш високого результату.

9. **Результати спільного дослідження** ([1])

	Премікс	Премікс корм	Мінеральний концентрат	Білковий корм	Порося
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
значення [МО/кг]	17,02 x 10^6	1,21 x 10^6	537 100	151 800	18 070
S_r [МО/кг]	0,51 x 10^6	0 039 x 10^6	22 080	12 280	682
r [МО/кг]	1,43 x 10^6	0 109 x 10^6	61 824	34 384	1 910
CV_r[%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S_R [МО/кг]	1,36 x 10^6	0 069 x 10^6	46 300	23 060	3 614
R [МО/кг]	3,81 x 10^6	0 193 x 10^6	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = кількість лабораторій

n = кількість одиничних значень

s_r = допустиме відхилення повторюваності

S_R = стандартне відхилення відтворюваності

r = повторюваність

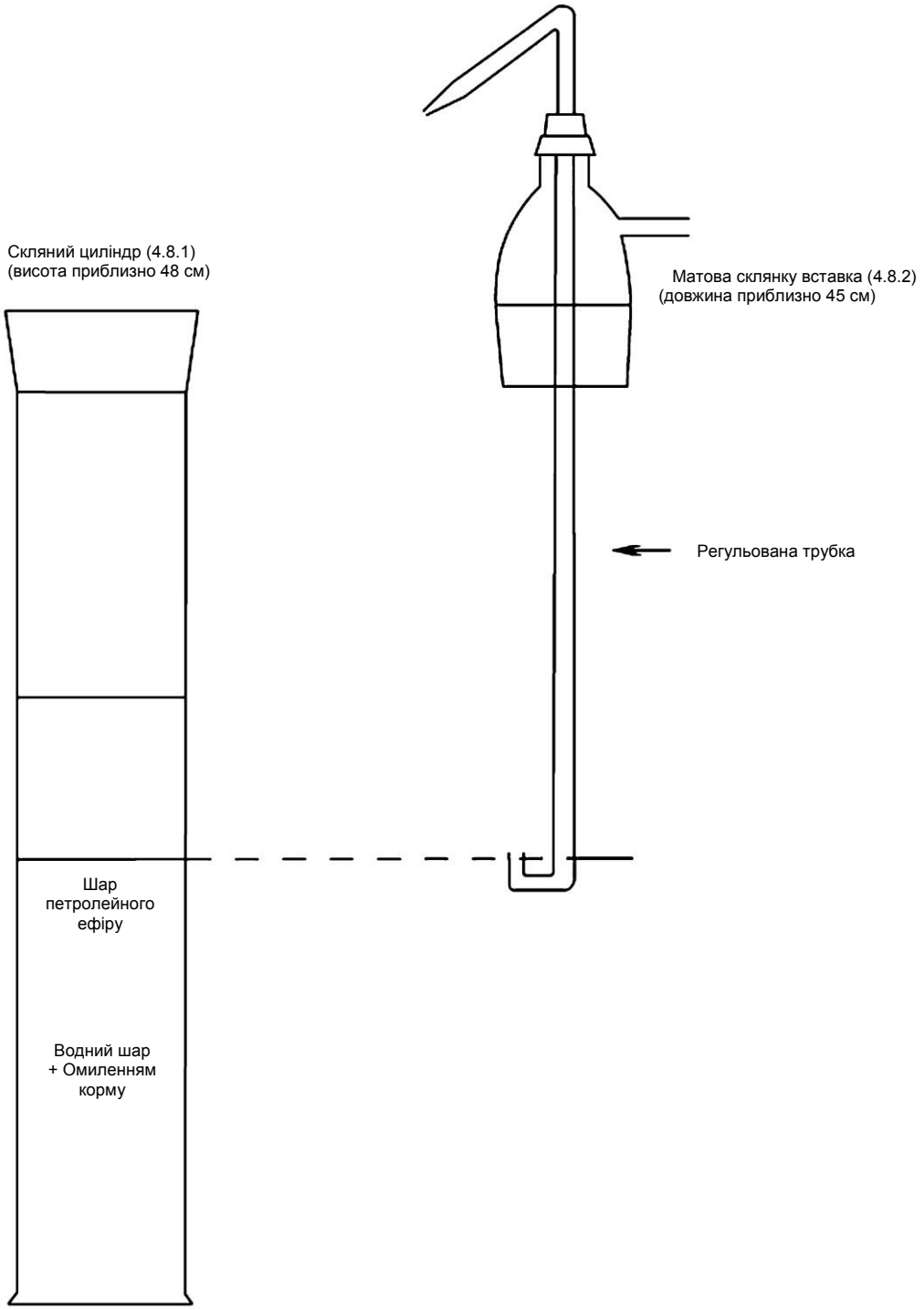
R = відтворюваність

CV_r = коефіцієнт варіації повторюваності

CV_R = коефіцієнт варіації відтворюваності.

([1]) Проведено Робочою групою Асоціації Німецького сільськогосподарського дослідження та науково-дослідних інститутів (АНСДН).

Малюнок 1: Екстракційне обладнання (4.8)



Б. ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Е

1. **Мета і зміст**

Цей метод дозволяє визначити рівень вітаміну Е в кормах і преміксах. Вміст вітаміну Е виражається у вигляді ацетату мг DL-а-токоферолу на кг. 1 мг ацетату DL-а- токоферолу відповідає 0,91 мг DL-а-токоферол (вітамін Е).

Межа квантифікації становить 2 мг вітаміну Е/кг. Ця межа квантифікації досягається лише при застосуванні флуоресцентного детектору. За допомогою УФ-детектора межа квантифікації становить 10 мг / кг.

2. **Принцип**

Пробу піддають гідролізу з спиртовим розчином гідроокису калію, вітамін Е екстрагують петролейним ефіром. Розчинник видаляють за допомогою випарювання, і залишок розчиняють в метанолі, при необхідності, розбавляють до необхідної концентрації. Вміст вітаміну Е визначається обернено-фазовою рідинною хроматографією високого дозволу (ОФ-ВЕРХ) з використанням флуоресценції або УФ-детектора.

3. **Реактиви**

3.1. Етанол, **σ** = 96%.

3.2. Петролейний ефір, діапазон кипіння 40°C-60°C.

3.3. Метанол.

3.4. Розчин гідроксиду калію, c = 50 г/100мл.

3.5. Натрію аскорбат, c = 10 г/100 мл (див. результати спостереження 7.7).

3.6. Сульфід натрію, Na_2S- x H_2O (x = 7-9).

3.6.1. розчин натрій сульфіду, c = 0,5 моль/л в гліцерині, | 3 = 120 г/л. (для x = 9) (див. результати спостереження 7.8)

3.7. Розчин фенолфталеїну, c = 2 г/100 мл в етанолі (3.1).

3.8. Рухома фаза для ВЕРХ: суміш метанолу (3.3) і води, наприклад, 980 + 20 (O+O). Точне співвідношення буде залежати від характеристик використовуваної колонки.

3.9. Азот, без кисню.

3.10. DL-а-токоферол ацетат, екстра чистий, з підтвердженою активністю.

3.10.1. Вихідний розчин DL-а-токоферолу ацетат: Зважити з точністю до 0,1 мг, 100 мг DL-а-токоферолу ацетату (3.10), помістити в градуйовану колбу об'ємом 100 мл. Розчинити в етанолі (3.1) і заповнити до мітки тим же розчинником. 1 мл цього розчину містить 1 мг ацетату DL-а-токоферолу. (УФ-контроль див. 5.6.1.3; стабілізація див. результати спостереження 7.4).

3.11. DL-а-токоферол, екстра чистий, з підтвердженою активністю.

3.11.1. Вихідний розчин DL-а-токоферолу: Зважити з точністю до 0,1 мг, 100 мг DL-а-токоферолу (3.10) і помістити в градуйовану колбу об'ємом 100 мл. Розчинити в етанолі (3.1) і заповнити до мітки тим же розчинником. 1 мл цього розчину містить 1 мг DL-а-токоферол. (УФ-контроль див. 5.6.2.3; стабілізація див. результати спостереження 7.4).

3.12. 2,6-ді-трет-бутил-4-метилфенол (BHT) (див. результати спостереження 7.5).

4. **Обладнання**

4.1. Роторний плівковий випарник.

4.2. Бурштиновий посуд.

4.2.1. Колби з пласким дном або конічні колби, об'ємом 500 мл, з заглибленням з матового скла.

4.2.2. Градуйовані колби з пробками з матового скла, з вузьким горлом, об'ємом 10, 25, 100 і 500 мл.

4.2.3. Ділильні воронки, конічні, 1 000 мл, з пробками з матового скла.

4.2.4. Грушоподібні колби, об'ємом 250 мл, з заглибленнями з матового скла.

4.3. Конденсатор Алліна, довжина куртки 300 мм, з притертим суглобом, з адаптером трубки для подачі газу.

4.4. Гофрований фільтр папір для розділення фаз, діаметр 185 мм (наприклад, Шлейхер і Шуелл 597 HY 1/2).

4.5. ВЕРХ обладнання з системою впорскування.

4.5.1. Рідинна хроматографічна колонка, 250 мм × 4 мм, C_{18}, 5 мкм або 10 упаковок, або еквівалент.

4.5.2. Флуоресцентний або УФ-детектор, з регулюванням довжини хвилі.

4.6. Спектрофотометр з 10 мм кварцовими клітинами.

4.7. Водяна баня з магнітною мішалкою.

4.8. Екстракційне обладнання (малюнок 1), що складається з:

4.8.1. Скляний циліндр об'ємом 1 л з горлом та пробкою з матового скла.

4.8.2. Матова скляна вставка оснащена бічним рукавом і регульованою трубкою, що проходить через центр. Регульована трубка повинна мати U-подібний нижній кінець і струмінь на протилежному кінці так, щоб верхній шар рідини в циліндрі міг транспортуватися в ділильну воронку.

5. **Процедура**

Примітка: Вітамін Е чутливий до УФ світла і до окислення. Всі операції здійснюються за відсутності світла (з використанням бурштинового посуду, або посуду, захищеного алюмінієвою фольгою) і кисню (на одному рівні з азотом). Під час екстрагування повітря над рідиною має бути замінене азотом (щоб уникнути надлишкового тиску, необхідно послаблювати пробку час від часу).

5.1. Підготовка проби

Подрібнити пробу таким чином, щоб вона проходила через 1 мм сито, намагаючись уникнути утворення тепла. Подрібнення має здійснюватися безпосередньо перед зважуванням і омиленням, в іншому випадку можуть бути втрати вітаміну Е.

5.2. *Омилення*

Залежно від вмісту вітамін Е зважують з точністю до 0,01 мг, від 2 г до 25 г проби в колбі з плоским дном або конічній колбі об'ємом 500 мл (4.2.1). Додати послідовно закручуючи 130 мл етанолу (3.1), приблизно 100 мг BHT (3.12), 2 мл розчину натрію аскорбат (3.5) і 2 мл розчину сульфіду натрію (3.6). Встановіть конденсатор (4.3) в колбу і занурте колбу в водяну баню з магнітною мішалкою (4.7). Нагріти до кипіння і залишити конденсувати протягом 5 хвилин. Потім додати 25 мл розчину гідроксиду калію (3.4) через конденсатор (4.3) і залишити конденсувати протягом ще 25 хв. перемішуючи при повільній течії азоту. Потім промити конденсатор приблизно 20 мл води і охолодити вміст колби до кімнатної температури.

5.3. *Екстрагування*

Передавати декантацією розчин омилення кількісно шляхом промивання загальним обсягом 250 мл води 1 000 мл ділильної воронки (4.2.3) або екстракційного обладнання (4.8). Промити омилену колбу послідовно 25 мл етанолу (3.1) і 100 мл петролейного ефіру (3,2) і перейти до полоскання ділильної воронки або екстракційного обладнання. Частка води і етанолу в об'єднаних розчинах має бути приблизно 2: 1. Струшувати протягом 2 хв. і дати відстоятися протягом 2 хвилин.

5.3.1. Екстрагувати за допомогою ділильної воронки (4.2.3).

Коли шари відокремилися (див. результати спостереження 7.3) перемістити шар петролейного ефіру на іншу ділильну воронку (4.2.3). Повторити процедуру екстрагування двічі, з 100 мл петролейного ефіру (3,2) і двічі, з 50 мл петролейного ефіру (3.2).

Промити змішані екстракти через ділильну воронку, двічі м'яко закручуючи (щоб уникнути утворення емульсій) порціями по 100 мл води, а потім повторити струшування стосовно ще 100 мл води, поки вода не залишиться безбарвною при додаванні фенолфталеїну (3.7) (промити чотири рази, як правило, достатньо). Відфільтрувати промитий екстракт через сухий гофрований фільтр для розділення фаз (4.4), щоб видалити будь-яку воду в градуйовану колбу об'ємом 500 мл (4.2.2). Промити ділильну воронку і фільтр 50 мл петролейного ефіру (3.2), додати до позначки петролейний ефір (3.2) і добре перемішати.

5.3.2. Екстрагування за допомогою екстракційного обладнання (4.8)

Коли шари відокремилися (див. результати спостереження 7.3) замінити пробку скляного циліндра (4.8.1) на матову скляну вставку (4.8.2) і встановити U-подібний нижній кінець регульованої трубки так, щоб вона була трохи вище рівня інтерфейсу. При застосуванні тиску з лінії азоту в бічну руку, передати верхній шар петролейного ефіру в 1000 мл ділильну воронку (4.2.3). Додати 100 мл петролейного ефіру (3.2) в скляний циліндр, закоркувати і збовтати. Дозволити шарам розділитися і спрямувати верхній шар на ділильну воронку, як і раніше. Повторіть процедуру екстрагування з ще 100 мл петролейного ефіру (3,2), потім двічі з порціями по 50 мл петролейного ефіру (3.2) і додайте петролейного ефіру в ділильну воронку.

Вимийте об'єднані екстракти петролейного ефіру, як описано в 5.3.1 і дійте, згідно опису.

5.4. Приготування розчину проби для ВЕРХ

Внесіть аліквотну частину розчину петролейного ефіру (від 5.3.1 або 5.3.2) в колбу грушоподібної форми об'ємом 250 мл (4.2.4). Розчинник випарувати майже насухо на роторному випарнику (4.1) зі зниженим тиском при температурі бані не вище 40 °C. Відновити атмосферний тиск, азотом (3.9) і зняти колбу з роторного випарнику. Видалити залишки розчинника з потоком азоту (3.9) і відразу розчинити залишок у відомому обсязі (10-100 мл) метанолу (3.3) (концентрація DL-альфа-токоферолу повинна бути в діапазоні 5 мкг/мл до 30 мкг/мл).

5.5. Визначення за допомогою ВЕРХ

Вітамін Е відокремити від С18 обернено-фазової колоною (4.5.1) і концентрацію виміряти за допомогою флуоресцентного детектора (збудження: 295 нм, емісія: 330 нм) або УФ-детектора (292нм) (4.5.2).

Ввести аліквотну частину (наприклад, 20 мкл) метанольного розчину, отриманого в 5.4 і елюювати в рухомій фазі (3.8). Обчислити середню висоту піку (область) кількох ін'єкцій того ж проби розчину і середню висоту піків (область) декількох ін'єкцій калібрувальних розчинів (5.6.2).

умови ВЕРХ

Наступні умови пропонуються, щоб ними керуватися; інші умови можуть бути використані за умови, що вони дають еквівалентні результати.

Рідка хроматографія 250 мм × 4 мм, С18, 5 або 10мкм упаковки, або еквівалент колонка (4.5.1):

Рухома фаза (3.8):	Суміш метанолу (3.3) і води, наприклад, 980 + 20 (О+ О).
Швидкість потоку:	1-2 мл/хв.
Детектор (4.5.2)	Флуорисцентний детектор (збудження: 295нм/емісія 330нм) або УФ детектор (292нм).

5.6. Калібрування (DL-α-токоферолу ацетат або DL-α-токоферолу)

5.6.1. DL-α-токоферолу ацетат звичайний

5.6.1.1. *Приготування робочого стандартного розчину*

За допомогою піпетки влити 25 мл розчину DL-α-токоферолу ацетат концентрат (3.10.1) в колбу з плоским дном або конічну колбу об'ємом 500 мл (4.2.1) і гідролізувати, як описано в 5.2. Згодом екстрактувати петролейним ефіром (3.2) відповідно до 5.3 і доповнити до 500 мл петролейним ефіром. Випарувати 25 мл цього екстракту на роторному випарнику (див 5.4) майже насухо, видалити залишки розчиннику потоком азоту (3.9) і повторно розчинити залишок у 25,0 мл метанолу (3.3). Номінальна концентрація цього розчину 45,5 мкг DL-α-токоферолу на мл, що еквівалентно 50 мкг DL-α-токоферолу ацетату на мл. Робочий стандартний розчин має бути приготовано безпосередньо перед використанням.

5.6.1.2. *Підготовка калібрувальних розчинів і калібрування графіка*

Помістити 1,0, 2,0, 4,0 і 10,0 мл розведеного робочого стандартного розчину в кілька градуйованих колб об'ємом 20 мл, заповнити до відмітки метанолом (3.3) і перемішати. Номінальні концентрації цих розчинів 2,5, 5,0, 10,0 і 25,0 мкг/мл ацетату DL-a-токоферол, тобто 2,28, 4,55, 9,10 мкг/мл і 22,8 мкг/мл DL-a-токоферол.

Ввести 20 мкл кожного калібрувального розчину кілька разів і визначають середні висоти піків (області). Використовуючи середні висоти піків (області) побудувати калібрувальний графік.

5.6.1.3. УФ стандартизація DL-a-токоферолу ацетат розчину (3.10.1)

Розвести 5,0 мл DL-a-токоферолу ацетат розчину (3.10.1) в 25,0 мл етанолі і виміряти УФ-спектр цього розчину в порівняні з етанолом (3.1) в спектрофотометрі (4.6) між 250 нм і 320 нм.

Максимальне поглинання повинно бути 284 нм:

E11% м = 43,6 при 284нм в етанолі

У цьому розведенні слід отримати значення поглинання 0,84-0,88.

5.6.2. DL-a-токоферол звичайний

5.6.2.1. *Приготування робочого стандартного розчину*

За допомогою піпетки помістити 2 мл DL-a-токоферол розчину (3.11.1) в градуйовану колбу об'ємом 50 мл, розчинити в метанолі (3.3) і заповнити до відмітки метанолом. Номінальна концентрація цього розчину 40 мкг DL-a-токоферол на мл, що еквівалентно 44,0 мкг DL-a-токоферолу ацетату на мл. Робочий стандартний розчин має бути приготовано безпосередньо перед використанням.

5.6.2.2. *Підготовка калібрувальних розчинів і калібрування графіка*

Помістити 1,0, 2,0, 4,0 і 10,0 мл розведеного робочого стандартного розчину в кілька градуйованих колб об'ємом 20 мл, заповнити до відмітки метанолом (3.3) і перемішати. Номінальні концентрації цих розчинів 2,0, 4,0, 8,0 і 20,0 мкг/мл DL-a-токоферол, тобто 2,20, 4,40, 8,79 мкг/мл і 22,0 мкг / мл ацетату DL-a-токоферол.

Ввести 20 мкл кожного калібрувального розчину кілька разів і визначають середні висоти піків (області). Використовуючи середні висоти піків (області) побудувати калібрувальний графік.

5.6.2.3. УФ стандартизація DL-a-токоферол розчину (3.11.1)

Розвести 2,0 мл DL-a-токоферолу розчину (3.11.1) в 25,0 мл етанолі і виміряти УФ-спектр цього розчину в порівняні з етанолом (3.1) в спектрофотометрі (4.6) між 250 нм і 320 нм. Максимальне поглинання повинно бути 292 нм:

E11% м = 75,8 при 292 нм в етанолі

У цьому розведенні слід отримати значення поглинання 0,6.

6. **Підрахунок результатів**

Із середньої висоти піків (площі) вітаміну Е розчину проби визначити концентрацію розчину проби в мкг/мл (у перерахунку а-токоферол ацетат) посилаючись на калібрований графік (5.6.1.2. або 5.6.2.2,

Вміст вітаміну Е в мг/кг проби визначається за наступною формулою:

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

де:

c = вітамін Е концентрація (а-токоферолу ацетат) розчин проби (5.4) в мкг/мл

V1 = об'єм розчину проби (5.4), в мл

V2 = об'єм аліквоти, взятої в (5.4), в мл

м = вага тестової проби в г

7. **Результати спостереження**

7.1. Для проб з низькою концентрацією вітаміну Е корисно змішати з екстрактом петролейного ефіру для двох омилень (кількість зважити 25 г) до одного розчину проби для ВЕРХ-визначення

7.2. Вага проби, взятої для аналізу, не повинна містити більш ніж 2 г жиру.

7.3. Якщо фазовий поділ не відбувається додати приблизно 10 мл етанолу (3.1) для руйнування емульсії.

7.4. Після спектрофотометричного вимірювання DL-а-токоферолу ацетат або DL-α-токоферолу до розчинів відповідно до 5.6.1.3 або 5.6.2.3, додати приблизно 10 мг ВНТ (3.12) до розчинів (3.10.1 або 3.10.2) і тримати розчини в холодильнику (макс. термін зберігання 4 тижні).

7.5. Замість ВНТ може бути використаний гідрохінон.

7.6. Можна використати звичайне поетапне розділення α-, β-, γ- і δ-токоферолу.

7.7. Приблизно 150 мг аскорбінової кислоти може бути використано замість аскорбату натрію.

7.8. Приблизно 50 мг ЕДТА може бути використаний замість розчину сульфіду натрію.

7.9. Вітамін Е ацетат дуже швидко гідролізується в лужних умовах і, отже, дуже чутливий до окислення, особливо в присутності мікроелементів, таких як залізо або мідь. У разі визначення вітаміну Е в преміксах на рівнях, що перевищують 5000 мг/кг, наслідком може бути деградація вітаміну Е. Тому метод ВЕРХ, у тому числі ферментативне розщеплення препарату вітаміну Е без лужної стадії омилення рекомендується для підтвердження.

8. **Повторюваність:**

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати 15% по відношенню до більш високого результату.

9. **Результати спільного дослідження** ([1])

	Премікс	Премікс корм	Мінеральний концентрат	Білковий корм	Порося
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Середнє арифметичне [мг/кг]	17 380	1 187	926	315	61,3
Sr [мг/кг]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [мг/кг]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
SR [мг/кг]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [мг/кг]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = кількість лабораторій

n = кількість одиничних значень

s_r = допустиме відхилення повторюваності

S_R = стандартне відхилення відтворюваності

r = повторюваність

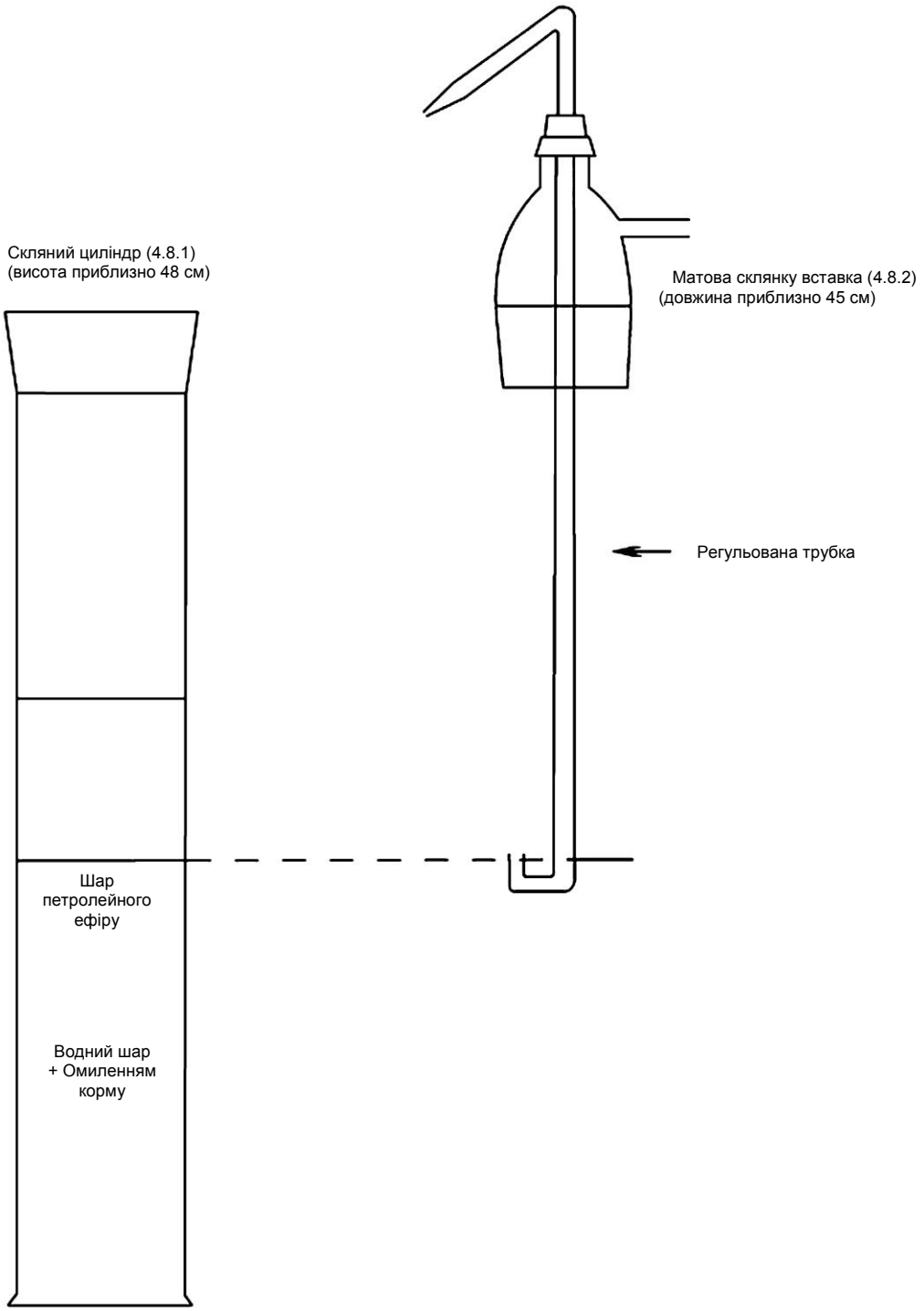
R = відтворюваність

CV_r = коефіцієнт варіації повторюваності

CV_R = коефіцієнт варіації відтворюваності

([1]) Проведено Робочою групою Асоціації Німецького сільськогосподарського дослідження та науково-дослідних інститутів (АНСДН).

Малюнок 1: Екстракційне обладнання (4.8)



B. ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ ЗАЛІЗО, МІДЬ, МАРГАНЕЦЬ І ЦИКН

1. **Мета і зміст**

Метод дозволяє визначити мікроелементи залізо, мідь, марганець і цинк в кормах. Кількісні обмеження:

— залізо (Fe): 20 мг/кг

— мідь (Cu): 10 мг/кг

— марганець (Mn): 20 мг/кг

— цинк (Zn): 20 мг/кг

2. **Принцип**

Пробу вводять в розчин соляної кислоти після руйнування органічних речовин, якщо такі є. Елементи залізо, мідь, марганець і цинк визначаються після відповідного розведення, за допомогою атомної абсорбційної спектрометрії.

3. **Реактиви**

Вступні зауваження

Для приготування реагентів та аналітичних розчинів використовують воду вільну від катіонів, яку можна отримати або шляхом подвійної перегонки води через боросилікатне скло або кварц, або подвійну обробку іонообмінною смолою.

Реагенти повинні бути, принаймні аналітичної чистоти. Свобода від елемента, який буде визначений повинна бути перевірена на холостому досвіді. При необхідності, реагенти необхідно піддати подальшому очищенню.

Замість стандартних розчинів, описаних нижче, можуть бути використані комерційні стандартні розчини за умови, що вони гарантійні і були перевірені перед використанням.

3.1. Соляна кислота (d: 1,19 г/мл).

3.2. Соляна кислота (d: 6 г/мл).

3.3. Соляна кислота (d: 0,5 г/мл).

3.4. Плавикова кислота 38%-40% (о/о), що містить заліза (Fe) менше 1 мг/л і залишок після випаровування менше 10 мг (у вигляді сульфату) / літр.

3.5. Сірчана кислота (d: 1,84 г/мл).

3.6. Перекис водню (приблизно 100 обсягів кисню (30% ваги)).

3.7. Стандартний розчин заліза (+1000 мкг Fe/мл) приготований наступним чином або еквівалент комерційного розчину: розчинити 1 г залізного дроту в 200 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2), додати 16 мл перекису водню (3.6) і розвести до одного літра з водою.

3.7.1. Робочий стандартний розчин заліза (100 мкг Fe/мл), отриманий шляхом розбавлення однієї частини стандартного розчину (3.7) з 9 частинами води.

3.8. Стандартний розчин міді (1 000 мкг Cu/мл) готують наступним чином або еквівалент комерційного розчину:

- Розчинити 1 г міді у вигляді порошку в 25 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2), додати 5 мл перекису водню (3,6) і розбавити до одного літру водою.

3.8.1. Робочий стандартний розчин міді (10 мкг Cu/мл), готують шляхом розбавлення 1 частини стандартного розчину (3.8) з 9 частинами води і подальшим розведенням 1 частину отриманого розчину з 9 частинами води.

3.9. Стандартний розчин марганцю (1000 мкг Mn/мл) готують наступним чином або еквівалент комерційного розчину:

- Розчинити 1 г марганцю у вигляді порошку в 25 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2) і розвести до одного літра водою.

3.9.1. Робочий стандартний розчин марганцю (10 мкг Mn/мл), готують шляхом розбавлення 1 частини стандартного розчину (3.9) з 9 частинами води і подальшим розведенням 1 частину отриманого розчину з 9 частинами води.

3.10. Стандартний розчин цинку (1000 мкг Zn/мл) готують наступним чином або еквівалент комерційного розчину:

- Розчинити 1 г цинку у вигляді смуги або листа в 25 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2) і розвести до одного літра водою.

3.10.1. Робочий стандартний розчин цинку (10 мкг Zn/мл), готують шляхом розбавлення 1 частини стандартного розчину (3.10) з 9 частинами води і подальшим розведенням 1 частини отриманого розчину з 9 частинами води.

3.11. Розчин лантан хлориду: Розчинити 12 г оксиду лантану в 150 мл води, додати 100 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2) і розвести до одного літра водою.

4. **Обладнання**

4.1. Муфельна піч з регулюванням температури і бажано з реєструючим приладом.

4.2. Посуд має бути міцного боросилікатного типу, і рекомендується використовувати обладнання, яке призначене виключно для визначення мікроелементів.

4.3. Атомний спектрофотометр поглинання, що відповідає вимогам методу відповідно до чутливості і точності в необхідному діапазоні.

5. **Процедура** ([1])

5.1. *Проби, що містять органічну речовину*

5.1.1. Озолення і приготування розчину для аналізу (2)

5.1.1.1. Помістити 5-10 г проби зваженої з точністю до 0,2 мг в кварцову або платинову тигель (примітка (б)), висушити в печі при температурі 105 °C і помістити тигель в холодну муфельну піч (4.1). Закрити піч (див. примітку (в)), і поступово підняти температуру до 450-475°C залишити близько 90 хвилин. Підтримувати цю температуру протягом 4 до 16 годин (наприклад, на ніч), щоб видалити вуглецевий матеріал, а потім відкрити піч і дати охолонути (див. примітка (г)).

Змочити попіл водою і перемістити їх в хімічний стакан об'ємом 250 мл. Промити тигель 5 мл соляної кислоти (3.1) і пізніше повільно і обережно вилити в склянку (може бути інтенсивна реакція через утворення CO_2). Додати соляну кислоту (3.1) по краплях перемішуючи, поки кипіння не завершиться. Випарувати насухо, періодично перемішуючи скляною паличкою.

([1]) Інші методи ферментативного розщеплення можуть бути використані за умови, що вони були продемонстровані і мають схожі результати (наприклад, розщеплення тиском мікрохвильової).

([2]) Зелений корм (свіжий або сушений), містить велику кількість рослинного кремнезему, який зберігає мікроелементи, і повинен бути видалений. Отже, для проб таких кормів, повинна застосовуватися наступна модифікована процедура. Провести фільтрацію за 5.1.1.1. Фільтруючий папір, який містить нерозчинний залишок двічі промити окропом і помістити його в кварцову або платиновому тигель. Випалювати в муфельній печі (4.1) при температурі нижче 550°C, поки всі вуглецеві матеріали повністю не зникнуть. Дати охолонути, додати кілька крапель води, потім 10-15 мл фтористоводневої кислоти (3.4) і випарувати насухо при 150 °C. Якщо який-небудь діоксид кремнію залишається в залишку, розчинити його декількома мілілітрами плавикової кислоти (3.4) і випарувати насухо. Додати п'ять крапель сірчаної кислоти (3.5) і нагрівати, поки білий дим не припинить виділятися. Після додавання 5 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2) і близько 30 мл води, наргійте та відфільтруйте розчин у мірну колбу об'ємом 250 мл і доведіть до мітки водою (концентрація HCl 0,5 моль/л). Продовжити визначення відповідно до 5.1.2.

Потім додають 15 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2) до залишку, і пізніше близько 120 мл води. Перемішати скляним стрижнем, який залишити в склянці, і покрити стакан годинниковим склом. М'яко довести до кипіння і витримати при температурі кипіння не більше ніж видно, що попіл більше не розчиниться. Відфільтрувати беззольним фільтрувальним папером і зібрати фільтрат в мірну колбу об'ємом 250 мл. Промити склянку і відфільтрувати 5 мл гарячої 6 моль/л соляної кислоти (3.2) і двічі киплячою водою. Заповнити мірну колбу до позначки водою (HCl концентрація близько 0,5 моль/л).

5.1.1.2. Якщо залишок на фільтрі з'являється чорний (карбон), покласти його назад до печі і озолити знову при 450-475 °C. Таке озолення, вимагає тільки кілька годин (від трьох до п'яти годин), і завершується, коли з'являється білий або майже білий попіл. Залишок розчинити з приблизно 2 мл соляної кислоти (3.1), випарувати насухо і додати 5 мл 6 моль/л соляної кислоти (3.2). Нагріти, відфільтрувати розчин в мірну колбу і заповнити до мітки водою (концентрація HCl близько 0,5 моль/л.)

Примітка:

(a) При визначенні мікроелементів важливо бути готовим до ризиків забруднення, особливо цинком, міддю і залізом. З цієї причини, обладнання, що використовується в підготовці проб повинно бути вільним від цих металів.

Щоб зменшити загальний ризик зараження, слід працювати в чистій атмосфері, з чистим скрупульозно почищеним обладнанням і помитим склом. При визначені цинку особливо чутливо ставитись до багатьох типів забруднень, наприклад посуду, реактивів, пилу і т.д.

(b) Вага проби, яку спалюють, розраховується за наближеним вмістом мікроелемента в кормі, для чого використовується чутливість спектрофотометра. Для деяких кормів з низьким вмістом мікроелементів може бути необхідним почати з 10-20 г проби і приготувати остаточний розчин тільки 100 мл.

(c) Озолення слід здійснюватися в закритій печі, без доступу повітря або кисню.

(d) Температура вказана на пірометрі не повинна перевищувати 475°C.

5.1.2. Спектрофотометричне визначення

5.1.2.1. *Підготовка калібрувальних розчинів*

Для кожного з елементів, які будуть визначені, готують з стандартних робочих розчинів, що вказані в пунктах 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 і 3.10.1 ряд калібрувальних розчинів, кожен калібрувальний розчин має концентрацією HCl близько 0,5 моль/л (у тих випадках, заліза, марганцю і цинку) концентрація лантану хлориду еквівалентна до 0,1% La (маса/об'єм).

Концентрації обраних мікроелементів, повинна перебувати в межах чутливості спектрофотометра який використовується. Представлені нижче таблиці показують, як приклад, композиції типових діапазонів калібрувальних розчинів; Однак, в залежності від типу і чутливості спектрофотометра, який використовується може бути за необхідне вибрати інші концентрації.

Залізо

мкг Fe/мл	0	0,5	1	2	3	4	5
мл стандартне робоче рішення (3.7.1) (1 мл = 100 мкг Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
мл HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 мл розчину хлорид лантану (3.11) і додати до 100мл води							

Мідь

мкг Cu/мл	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
мл стандартне робоче рішення (3.8.1) (1 мл = 10 мкг Cu)	0	1	2	4	6	8	10
мл HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Марганець

мкг Mn/мл	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
мл робочий стандартний розчин (3.9.1) (1 мл = 10 мкг Mn)	0	1	2	4	6	8	10
мл HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 мл розчину хлориду лантану (3.11) та довести до 100 мл, додавши води							

Цинк

мкг Zn/мл	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
мл робочий стандартний розчин (3.10.1) (1 мл = 10 мкг Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
мл HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 мл розчину хлориду лантану (3.11) та довести до 100 мл, додавши води							

5.1.2.2. *Приготування розчину для аналізу*

Для визначення міді зазвичай може бути використаний розчин, безпосередньо отриманий за пунктом 5.1.1. При необхідності слід довести його концентрацію до меж калібрувальних розчинів, аліквотну частину можна набрати піпеткою в мірну колбу об'ємом 100 мл і довести її до позначки 0,5 моль/л, додавши соляну кислоту (3.3).

Для визначення заліза, марганцю і цинку необхідно набрати піпеткою аліквотну частину розчину, отриманого за пунктом 5.1.1, мірну колбу об'ємом 100 мл, додати 10 мл розчину хлориду лантану (3.11) і довести до позначки 0,5 моль/л, додавши соляної кислоти (3.3) (див. пункт 8 «Результати спостереження»).

5.1.2.3. *«Холостий» дослід*

«Холостий» дослід повинен включати всі зазначені етапи процедури за винятком того, що не використовується проба матеріалу. Калібрувальний розчин '0' не повинен використовуватися в якості «холостої» проби.

5.1.2.4. *Вимірювання атомної абсорбції*

Атомну абсорбцію калібрувальних розчинів і розчину для аналізу, вимірюють за допомогою окисного полум'я «ацетилен-повітря» при поглинанні хвиль наступної довжини:

Fe: 248,3 нм

Cu: 324,8 нм

Mn: 279,5 нм

Zn: 213,8 нм

Кожне вимірювання проводять по чотири рази.

5.2. *Мінеральні корми*

Якщо проба не містить в собі органічних речовин, попереднє озолення не вимагається. Діють, як описано в пункті 5.1.1.1, починаючи з другого абзацу. Випаровування фтористоводневою кислотою можна пропустити.

6. **Підрахунок результатів**

Використовуючи калібрувальну криву, обчислюють концентрацію мікроелементів в розчині для аналізу і виражають результат в міліграмах мікроелемента на кілограм проби (м.д.).

7. **Повторюваність**

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з використанням тієї ж проби тим самим лаборантом, не повинна перевищувати:

— 5 мг/кг, за абсолютною величиною, якщо вміст мікроелемента, що розглядається, складає до 50 мг/кг,

— 10 % від найбільшого результату, якщо вміст мікроелемента, що розглядається, складає від 50 до 100 мг/кг,

— 10 мг/кг, за абсолютною величиною, якщо вміст мікроелемента, що розглядається, складає від 100 до 200 мг/кг,

— 5 % від найбільшого результату, якщо вміст мікроелемента, що розглядається, складає більше 200 мг/кг,

8. **Результати спостереження**

Наявність великої кількості фосфатів може заважати визначенню вмісту заліза, марганцю і цинку. Ці перешкоди необхідно усунути шляхом додаванням розчину хлориду лантану (3.11). Проте, якщо у пробі вагове відношення Ca + Mg/P> 2, розчин хлориду лантану (3.11) до розчину для аналізу та калібрувальних розчинів можна не додавати.

Г. ВИЗНАЧЕННЯ ГАЛОФУГІНОНУ

DL-транс-7-бром-6-хлор-3- [3- (3-гідроксил -2- піперидил) ацетоніл] - хіназолін-4- (3H)-он-гідробромід

1. **Мета і зміст**

Метод дозволяє визначати рівень галофугінону в кормі. Межа кількісного визначення становить 1 мг/кг.

2. **Принцип**

Після обробки гарячою водою, галофугінон екстрагується у вигляді нейтральної основи у етилацетаті, а потім розпадається у вигляді гідрохлориду у водному розчині кислоти. Екстракт очищують за допомогою іонообмінної хроматографії. Вміст галофугінону визначається обернено-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (ОфВРХ) з використанням УФ-детектора.

3. **Реактиви**

3.1. Ацетонитрил, еквівалентний ступеню чистоти за «класифікацією ВЕРХ».

3.2. Смола амберліт ХАД-2.

3.3. Ацетат амонію.

3.4. Етилацетат.

3.5. Оцтова кислота, крижана.

3.6. Стандартна речовина галофугінон (DL-транс-7-бром-6-хлор-3- [3-гідроксил -2- піпе)ацетоніл] - хіназолін-4-(3H)-он-гідробромід, E 764).

3.6.1. Маточний стандартний розчин галофугінону, 100 мкг/мл

50 мг галофугінону (3.6) відважують з точністю до 0,1 мг у градуйовану колбу об’ємом 500 мл, розчиняють в буферному розчині ацетату амонію (3.18), доводять до позначки за допомогою буферного розчину та перемішують. Цей розчин залишається стійким протягом трьох тижнів, якщо його зберігати при температурі 5 ^{o}C у темряві.

3.6.2. Калібрувальні розчини

У низку градуйованих колб об’ємом 100 мл набирають 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 і 6,0 мл маточного стандартного розчину (3.6.1). Доводять до позначки за допомогою рухомої фази (3.21) і перемішують. Ці розчини мають концентрацію галофугінону 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 і 6,0 мкг/мл відповідно. Ці розчини слід готувати безпосередньо перед використанням.

3.7. Соляна кислота (ρ_{20} приблизно 1,16 г/мл).

3.8. Метанол.

3.9. Нітрат срібла.

3.10. Аскорбат натрію.

3.11. Карбонат натрію.

3.12. Хлорид натрію.

3.13. ЕДТК (етилендіамінтетраоцтова кислота, динатрієва сіль).

3.14. Вода, еквівалентна ступеню чистоти за «класифікацією ВЕРХ».

3.15. Розчин карбонату натрію, с = 10 г/100 мл.

3.16. Розчин карбонату натрію, насичений хлоридом натрію, с = 5 г/100 мл.

50 г карбонату натрію (3.11) розчиняють у воді, розводять до 1 л і додають хлорид натрію (3.12), поки розчин не стане насиченим.

3.17. Соляна кислота, приблизно 0,1 моль/л. 10 мл HCl (3,7) розбавляють водою до 1 л.

3.18. Буферний розчин ацетату амонію, приблизно 0,25 моль/л.

19,3 г ацетату амонію (3.3) і 30 мл оцтової кислоти (3.5) розчиняють у воді (3,14) та розводять до 1 літру.

3.19. Приготування смоли амберліт ХАД-2.

Відповідну кількість амберліту (3.2) промивають водою, поки не будуть видалені всі іони хлору, як зазначено у випробуванні нітрату срібла (3.20), яке проводиться у відкинутій водній фазі. Потім смолу промивають 50 мл метанолу (3.8), відкидають метанол та зберігають смолу під свіжим метанолом.

3.20. Розчин нітрату срібла, приблизно 0,1 моль/л. 0,17 г мл нітрату срібла (3.9) розчиняють у 10 мл води.

3.21. Рухома фаза для ВЕРХ.

500 мл ацетонітрилу (3.1) змішують з 300 мл буферного розчину ацетату амонію (3.18) та 1200 мл води (3.14). Доводять pH до 4,3 за допомогою оцтової кислоти (3.5). Розчин фільтрують через 0,22 мкм фільтр (4.8) і дегазують (наприклад, за допомогою ультразвукової обробки протягом 10 хвилин). Цей розчин залишається стійким протягом одного місяця, при зберіганні в темряві в закритій ємності.

4. **Обладнання**

4.1. Ультразвукова ванна

4.2. Роторно-плівковий випарний апарат

4.3. Центрифуга

4.4. Обладнання для ВЕРХ з УФ-детектором зі змінною довжиною хвилі або діодно-матричним детектором

4.4.1. Колонка для рідинної хроматографії, 300 мм x 4 мм, C_{18}, 10 мкм упаковка, або аналог колонки

4.5. Скляна колонка (300 мм x 10 мм), обладнана фільтром зі спеченого скла та запірним краном

4.6. Скловолокнисті фільтри діаметром 150 мм

4.7. Мембранні фільтри, 0,45 мкм

4.8. Мембранні фільтри, 0,22 мкм

5. **Процедура**

Примітка: Галофугінон у вигляді нейтральної основи нестабільний в лужних та етілацетатних розчинах. Він не залишається в етилацетаті протягом більше 30 хвилин.

5.1. *Загальна інформація*

5.1.1. «Холостий» корм необхідно проаналізувати, щоб переконатися, що ані галофугінон, ані інтерферуючі речовини в ньому не містяться.

5.1.2. Випробування на відновлення проводять шляхом аналізу «холостого» корму, який був збагачений шляхом додавання тієї самої кількості галофугінону, що присутня у пробі. Для збагачення на рівні 3 мг/кг необхідно додати 300 мкл маточного стандартного розчину (3.6.1) до 10 г «холостого» корму, перемішати і почекати 10 хвилин, перш ніж приступити до стадії екстракції (5.2).

Примітка: Для даного методу повинен використовуватися «холостий» корм того ж виду, що і проба, і при аналізі галофугінон не повинен бути виявлений.

5.2. *Екстрагування*

10 г підготовленої проби зважують з точністю до 0,1 г в 200 мл центрифужній пробірці, додають 0,5 г аскорбату натрію (3.10), 0,5 г ЕДТК (3.13) і 20 мл води та перемішують. Пробірку поміщають у водяну баню (80 ^{o}C) на 5 хвилин. Після охолодження до кімнатної температури, додають 20 мл розчину карбонату натрію (3.15) і перемішують. Відразу необхідно додати 100 мл етилацетату (3.4) і енергійно потрусити вручну протягом 15 секунд. Потім пробірку поміщають на три хвилини в ультразвукову баню (4.1) і послаблюють пробку. Центрифугують протягом двох хвилин та зливають етилацетатну фазу через скловолоконний фільтр (4.6) у 500 мл ділильну лійку. Екстракцію проби повторюють з другою частиною 100 мл етилацетату. Об'єднані екстракти промивають протягом однієї хвилини 50 мл розчину хлориду натрію, насиченого розчином карбонату натрію (3.16) та відкидають водний шар.

Органічний шар екстрагують протягом 1 хв. 50 мл соляної кислоти (3.17). Нижній шар кислоти зливають через 250 мл ділильну лійку. Повторно екстрагують органічний шар протягом 1,5 хвилин ще 50 мл хлористоводневої кислоти і об'єднують з першим екстрактом. Об'єднані екстракти, отримані кислотним способом, промивають, обертаючи протягом приблизно 10 секунд з 10 мл етилацетату (3.4).

У кількісному відношенні водний шар переливають у круглодонну колбу об'ємом 250 мл і відкидають органічну фазу. З кислотного розчину випарюють весь етилацетат, що залишився, за допомогою роторно-плівкового випарного апарату (4.2). Температура води у ванні не повинна перевищувати 40 ^{o}C. Під вакуумом приблизно 25 мбар весь залишковий етилацетат буде видалений протягом 5 хвилин при 38 ^{o}C.

5.3. *Очищення*

5.3.1. Приготування колонки для амберліту

Колонка XAD-2 готується для кожного екстракту проби. 10 г приготованого амберліту (3.19) переливають у скляну колонку (4.5) з метанолом (3,8). Верхній шар смоли затуляють невеликою пробкою зі скловати. Метанол зливають з колонки і смолу промивають 100 мл води, припиняючи промивання, коли рідина досягне верхнього шару смоли. Перед використанням колонці дають 10 хвилин відстоятися. Ніколи не використовуйте колонку на холостому ходу.

5.3.2. Очищення проби

Екстракт (5.2) у кількісному відношенні наливають зверху у підготовлену колонку для амберліту (5.3.1) і елюірують, відкидаючи елюат. Швидкість елюції не повинна перевищувати 20 мл/хв. Круглодонну колбу промивають 20 мл хлористоводневої кислоти (3.17) і використовують це для промивання колонки для смоли. Весь розчин кислоти, що залишився, продувають потоком повітря. Не промивайте. До колонки додають 100 мл метанолу (3.8) і дозволяють 5-10 мл елюірувати, збираючи елюат у круглодонную колбу об'ємом 250 мл. Залишки метанолу зі смолою залишають на 10 хвилин, щоб вони відстоялися, і потім продовжують елюювання зі швидкістю, яка не перевищує 20 мл/хв., збираючи елюат в ту саму круглодонну колбу. Метанол випарюють на роторно-плівковому роторно-плівкового випарному апараті (4.2), при чому температура води у бані не повинна перевищувати 40 ^{o}C. Залишок у кількісному відношенні переливають у 10 мл мірну колбу, використовуючи рухому фазу (3.21). Доводять до позначки за допомогою рухомої фази і перемішують. Аліквота фільтрується через мембранний фільтр (4.7). Цей розчин необхідно зберегти для визначення методом ВЕРХ (5.4).

5.4. *Визначення методом ВЕРХ*

5.4.1. Параметри

Для ознайомлення пропонуються наступні умови, інші умови можуть бути використані, якщо вони дають еквівалентні результати.
Колонка для рідинної хроматографії (4.4.1)
Рухома фаза для ВЕРХ (3.21)
Швидкість потоку: Від 1,5 до 2 мл/хв.
Довжина хвилі виявлення: 243 нм
Об'єм введеної проби: 40-100 мкл.

Стабільність хроматографічної системи перевіряють, вводячи калібрувальний розчин (3.6.2) в об'ємі 3,0 мкг/мл кілька разів, доки не будуть досягнуті постійна висота (чи площа) піків і час утримування.

5.4.2. Калібрувальний графік

Кожен калібрувальний розчин (3.6.2) вводять декілька разів і вимірюють висоту (площу) піків для кожної концентрації. Калібрувальний графік розподіляють на ділянки, наносячи середню висоту піків, або площу, калібрувальних розчинів на вісь ординат, а відповідні концентрації в мкг/мл - на вісь абсцис.

5.4.3. Розчин проби

Екстракт проби (5.3.2) вводять декілька разі в тому ж об'ємі, що і для калібрувальних розчинів, і визначають середню висоту (площу) піків галофугінону.

6. **Підрахунок результатів**

Концентрацію розчину проби визначають у мкг/мл від середньої висоти (площі) піків галофугінону розчину проби з посиланням на калібрувальний графік (5.4.2).

Вміст галофугінону W (мг/кг) у пробі визначається за наступною формулою:

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

де:

c = концентрація галофугінону в розчині проби в мкг/мл,

m = маса частини, що випробовується, в грамах.

7. **Перевірка результатів**

7.1. *Ідентичність*

Ідентичність аналіту може бути підтверджена шляхом сумісної хроматографії або шляхом використання діодно-матричного детектора, за допомогою якого порівнюються спектри екстракту проби і калібрувального розчину (3.6.2), що містить 6,0 мкг/мл.

7.1.1. Сумісна хроматографія

Екстракт проби збагачується шляхом додавання відповідної кількості калібрувального розчину (3.6.2) Кількість доданого галофугінону повинна співпадати з визначеною кількістю галофугінону, знайденого в екстракті проби.

Після прийняття до уваги доданої кількості і розведення екстракту тільки висота піку галофугінону має зростати. Ширина піку посередині максимальної висоти повинна бути в межах ± 10% від початкової ширини.

7.1.2. Діодно-матричне детектування

Результати обчислюються за такими критеріями:

(a) довжина хвилі максимального поглинання проби і стандартних спектрів, записана на вершині піку на хроматограмі, повинна бути такою ж, в межах зони, обумовленої роздільною здатністю системи детектування. Для діодно-матричного детектування, як правило, це в межах ± 2 нм;

(b) між 225 і 300 нм проба і стандартні спектри, записані на вершині піку на хроматограмі, не повинні відрізнятися для частин спектру в діапазоні від 10% до 100% відносного поглинання. Цей критерій задовольняється, якщо присутні однакові максимуми і в точці спостереження відхилення між двома спектрами перевищує 15% від поглинання стандартного аналіту;

(c) між 225 і 300 нм спектри підйому, вершини піку та спаду, які дає екстракт проби, не повинні відрізнятися один від одного для частин спектра в діапазоні від 10% до 100% відносного поглинання. Цей критерій задовольняється, якщо присутні однакові максимуми і в точці спостереження відхилення між спектрами не перевищує 15% від поглинання спектру вершини піку;

Якщо один з цих критеріїв не задовольняється, наявність аналіту не підтверджується.

7.2. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з тієї ж проби, не повинна перевищувати: 0,5 мг/кг при вмісті галофугінону до 3 мг/кг.

7.3. *Відновлення*

Для збагачення «холостої» проби відновлення має охоплювати не менше 80%.

8. **Результати спільного дослідження**

Було проведене спільне дослідження ([1]), в якому три проби були проаналізовані вісьмома лабораторіями.

Результати

	Проба А (холостий) Після отримання	Проба Б (мілкого помолу)		Проба В (в гранулах)	
		Після отримання	Через два місяці	Після отримання	Через два місяці
Середнє арифметичне [мг/кг]	Не виявлено	2,80	2,42	2,89	2,45
C_B [мг/кг]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R *[%]*	—	16	18	14	17
Відн. *[%]*		86	74	88	75

ND = не виявлено

C_B = Середнє квадратичне відхилення відтворення

$КВ_B$ = коефіцієнт варіації відтворення (%)

Відн. = відновлення (%)

Д. ВИЗНАЧЕННЯ РОБЕНІДИНУ

1,3-біс [(4-хлорбензіліден)аміно]гуанидин — гідрохлорид

1. **Мета і зміст**

Метод дозволяє визначати рівень робенідину в кормі. Межа кількісного визначення становить 5 мг/кг.

([1]) Лаборант 108, 1983, с. 1252-1256.

2. **Принцип**

Проба екстрагується підкисленим метанолом. Екстракт сушать і піддають аліквотну частину очищенню на колонці з оксидом алюмінію. Робенідин елюірують з колонки з метанолом, концентрують і доводять до відповідного обсягу рухомою фазою. Вміст робенідину визначається обернено-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (ОфВРХ) з використанням УФ-детектора.

3. **Реактиви**

3.1. Метанол.

3.2. Підкислений метанол.

4,0 мл соляної кислоти (ρ20 = 1,18 г/мл) переливають у градуйовану колбу об'ємом 500 мл, доводять до позначки метанолом (3.1) та перемішують. Цей розчин повинен бути приготований перед використанням.

3.3. Ацетонитрил, еквівалентний ступеню чистоти за «класифікацією ВЕРХ».

3.4. Молекулярне сито.

Тип 3А, від 8 до 12 вічок (1,6-2,5 мм кульки, кристалічний алюмосилікат, діаметр пор 0,3 мм).

3.5. Оксид алюмінію кислої активності класу I для колонкової хроматографії.

100 г оксиду алюмінію поміщають у підходящу ємність і додають 2,0 мл води. Закривають пробкою і струшують протягом приблизно 20 хвилин. Зберігають в добре закритій ємності.

3.6. Розчин дигидрофосфату калію c = 0,025 моль/л.

3,40 г дигидрофосфату калію розчиняють у воді (ступінь чистоти ВЕРХ) у градуйованій колбі об'ємом1 000 мл, доводять до відмітки і перемішують.

3.7. Розчин гидрофосфату натрію c = 0,025 моль/л.

3,55 г безводного гідрофосфату натрію (або 4,45 г дигідрату або 8,95 г додекагидрату) розчиняють у воді (еквівалентній ступеню чистоти ВЕРХ) в літровій градуйованій колбі, доводять до позначки і перемішують.

3.8. Рухома фаза для ВЕРХ.

Змішують наступні реагенти:

650 мл ацетонітрилу (3.3),

250 мл води (еквівалентної ступеню чистоти ВЕРХ),

50 мл розчину дигидрифосфату калію (3.6),

50 мл гидрофосфату натрію (3.7).

Розчин фільтрують через 0,22 мкм фільтр (4.6) і дегазують (наприклад, за допомогою ультразвукової обробки протягом 10 хвилин).

3.9. Стандартна речовина.

Чистий робенідин: 1,3-біс [(4-хлорбензіліден)аміно]гуанидин — гідрохлорид

3.9.1. Маточний стандартний розчин робенідину: 300 мкг/мл

30 мг стандартної речовини робенідину (3.9) зважують з точністю до 0,1 мг. Розчиняють в підкисленому метанолі (3.2) в градуйованій колбі об'ємом100 мл, доводять до відмітки тим же розчинником і перемішують. Колбу загортають в алюмінієву фольгу і зберігають в темному місці.

3.9.2. Проміжний стандартний розчин робенідину: 12 мкг/мл

10,0 мл маточного стандартного розчину (3.9.1) наливають у градуйовану колбу об'ємом 250 мл, доводять до позначки мобільною фазою (3.8) і перемішують. Колбу загортають в алюмінієву фольгу і зберігають в темному місці.

3.9.3. Калібрувальні розчини

У низку мірних колб об'ємом 50 мл наливають 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 і 25,0 мл проміжного стандартного розчину (3.9.2). Доводять до позначки за допомогою рухомої фази (3.8) і перемішують. Ці розчини мають відповідають 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 і 6,0 мкг/мл робенідину відповідно. Ці розчини слід готувати безпосередньо перед використанням.

3.10. Вода, еквівалентна ступеню чистоти ВЕРХ.

4. **Обладнання**

4.1. Скляна колонка.

Виготовлений з бурштинового скла, обладнана запірним краном і резервуаром ємністю приблизно 150 мл, з внутрішній діаметром від 10 до 15 мм, довжиною 250 мм.

4.2. Механічна мішалка або магнітна мішалка.

4.3. Роторно-плівковий випарний апарат

4.4. Обладнання для ВЕРХ з ультрафіолетовим детектором зі змінною довжиною хвилі або діодно-матричним детектором, що працює в діапазоні від 250 до 400 нм.

4.4.1. Колонка для рідинної хроматографії: 300 мм x 4 мм, C_{18} 10 мкм упаковка або аналогічна упаковка.

4.5. Скловолоконний фільтрувальний папір («Ватман» ГФ/А« або його аналог).

4.6. Мембранні фільтри, 0,22 мкм

4.7. Мембранні фільтри, 0,45 мкм

5. **Процедура**

Примітка: Робенідин є світлочутливим. У всіх операціях повинні використовуватися пробірки, вироблені з бурштинового скла.

5.1. *Загальна інформація*

5.1.1. «Холостий» корм необхідно проаналізувати, щоб переконатися, що ані робенідин, ані інтерферуючі речовини в ньому не містяться.

5.1.2. Випробування на відновлення проводять шляхом аналізу «холостого» корму (5.1.1), який був збагачений тією ж самою кількістю робенідину, що присутня у пробі. Для збагачення на рівні 60 мг/кг 3,0 мл маточного стандартного розчину (3.9.1) наливають у конічну колбу об'ємом 250 мл. Розчин випарюють приблизно до 0,5 мл в струмі азоту. Додають 15 г «холостого» корму, перемішують і чекають 10 хвилин, перш ніж приступити до стадії екстракції (5.2).

Примітка: Для даного методу повинен використовуватися «холостий» корм того ж виду, що і проба, і при аналізі робенідин не повинен бути виявлений.

5.2. *Екстрагування*

Зважують з точністю до 0,01 г приблизно 15 г підготовленої проби. Поміщають у конічну колбу об'ємом 250 і додають 100,0 мл підкисленою метилового спирту (3.2), закривають пробкою і струшують протягом однієї години у мішалці (4.2). Розчин фільтрують через скловолоконний фільтрувальний папір (4.5) і збирають всю фільтрату в конічну колбу об'ємом 150 мл. Додають 7,5 г молекулярного сита (3,4), закривають пробкою і струшують протягом п'яти хвилин. Відразу ж фільтрують через скловолоконний фільтрувальний папір. Цей розчин необхідно зберегти для етапу очищення (5.3).

5.3. *Очищення*

5.3.1. Приготування колонки з окисом алюмінію

Нижній кінець скляної колонки затуляють невеликою пробкою зі скловати (4.1) і придавлюють її за допомогою скляної палички. Зважують 11,0 г приготованою окису алюмінію (3,5) і поміщають в колону. Під час цієї стадії необхідно виявляти обережність, щоб мінімізувати експозицію у атмосферу. Обережно придавлюють завантажену колонку в нижньому кінці, щоб врегулювати оксид алюмінію.

5.3.2. Очищення проби.

У колонку набирають піпеткою 5,0 мл екстракту проби, отриманого в (5.2). Наконечник піпетки розміщують близько до стінки колони і дозволяють оксиду алюмінію поглинути розчин. Проведіть елюювання рубенідину з колонки, використовуючи 100 мл метанолу (3.1), при швидкості потоку від 2 до 3 мл/хв, і зберіть елюат в круглодонну колбу об'ємом 250 мл. Розчин метанолу випарюють насухо при зниженому тиску і температурі 40 ° С за допомогою роторно-плівкового випарного апарату (4.3). Повторно розчиняють залишок у 3-4 мл рухомій фазі (3.8) і у кількісному відношенні наливають у градуйовану колбу об'ємом 10 мл. Колбу промивають декількома 1-2 мл порціями рухомої фази і виливають вміст у градуйовану колбу. Доводять до позначки за допомогою того ж розчинника і перемішують. Аліквота фільтрується через 0,45 **мк**м мембранний фільтр (4.7). Цей розчин необхідно зберегти для визначення методом ВЕРХ (5.4).

5.4. *Визначення методом ВЕРХ*

5.4.1. Параметри

Для ознайомлення пропонуються наступні умови, інші умови можуть бути використані, якщо вони дають еквівалентні результати.
Колонка для рідинної хроматографії (4.4.1),
Рухома фаза для ВЕРХ (3.8),
Швидкість потоку: від 1,5 до 2 мл/хвилину,
Довжина хвилі детектування: 317 нм,
Об'єм введеної проби: від 20 до 50 мкл.

Стабільність хроматографічної системи перевіряють, вводячи калібрувальний розчин (3.9.3) в об'ємі 3,6 мкг/мл кілька разів, доки не будуть досягнуті постійна висота (чи площа) піків і час утримування.

5.4.2. Калібрувальний графік

Кожен калібрувальний розчин (3.9.3) вводять декілька разів і вимірюють висоту (площу) піків для кожної концентрації. Калібрувальну криву розподіляють на ділянки, наносячи середню висоту піків, або площу, калібрувальних розчинів на вісь ординат, а відповідні концентрації в **мк**г на мл - на вісь абсцис.

5.4.3. Розчин проби

Екстракт проби (5.3.2) вводять декілька разів в тому ж об'ємі, що і для калібрувальних розчинів, і визначають середню висоту (площу) піків робенідину.

6. **Підрахунок результатів**

Концентрацію розчину проби визначають із середньої висоти (площі) піків робенідину розчину проби у мкг/мл, співвідносячи з калібрувальним графіком (5.4.2).

Вміст робенідину W (мг/кг) у пробі визначається за наступною формулою:

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

де:
c = концентрація робенідину в розчині проби в мкг/мл,
m = маса частини, що випробовується, в грамах.

7. **Перевірка результатів**

7.1. *Ідентичність*

Ідентичність аналіту може бути підтверджена шляхом сумісної хроматографії або шляхом використання діодно-матричного детектора, за допомогою якого порівнюються спектри екстракту проби і калібрувального розчину (3.9.3), що містить 6 мкг/мл.

7.1.1. Сумісна хроматографія

Екстракт проби збагачується шляхом додавання відповідної кількості калібрувального розчину (3.9.3) Кількість доданого робенідину повинна співпадати з визначеною кількістю робенідину, знайденого в екстракті проби.
Тільки висота піку робенідину має розвиватися після прийняття до уваги доданої кількості і розведення екстракту. Ширина піку посередині максимальної висоти повинна бути в межах приблизно 10% від початкової ширини.

7.1.2. Діодно-матричне детектування

Результати обчислюються за такими критеріями:

(a) довжина хвилі максимального поглинання проби і стандартних спектрів, записана на вершині піку на хроматограмі, повинна бути такою ж, в межах зони, обумовленої роздільною здатністю системи детектування. Для діодно-матричного детектування, як правило, вона коливається в межах приблизно 2 нм;

(b) між 250 і 400 нм проба і стандартні спектри, записані на вершині піку на хроматограмі, не повинні відрізнятися для частин спектра в діапазоні від 10% до 100% відносного поглинання. Цей критерій задовольняється, якщо присутні однакові максимуми і в точці спостереження відхилення між двома спектрами перевищує 15% від поглинання стандартного аналіту;

(c) між 250 і 400 нм спектри підйому, вершини піку та спаду, які дає екстракт проби, не повинні відрізнятися один від одного для частин спектра в діапазоні від 10% до 100% відносного поглинання. Цей критерій задовольняється, якщо присутні однакові максимуми і в точці спостереження відхилення між спектрами не перевищує 15% від поглинання спектру вершини піку;

Якщо один з цих критеріїв не задовольняється, наявність аналіту не підтверджується.

7.2. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з тієї ж проби, не повинна перевищувати 10 % найбільшого результату при вмісті робенідину більш ніж 15 мг/кг.

7.3. *Відновлення*

Для збагачення «холостої» проби відновлення має охоплювати не менше 85 %.

8. **Результати спільного дослідження**

Було організовано спільне дослідження ЄС, в якому було проаналізовано чотири проби кормів для птиці та кроликів, мілкого помолу або в гранулах, у 12 лабораторіях. Кожну пробу перевіряли двічі. Результати наведені в таблиці нижче:

	Птиця		Кролики	
	Мілкий поміл	В гранулах	Мілкий поміл	В гранулах
Середнє арифметичне [мг/кг]	27,00	27,99	43,6	40,1
$C_З$ [мг/кг]	1,46	1,26	1,44	1,66
$КВ_З$ *[%]*	5,4	4,5	3,3	4,1
$C_Р$ [мг/кг]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R *[%]*	16,1	12,0	10,6	9,7
Відновлення [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

$C_З$ = Середнє квадратичне відхилення повторюваності

CV_r= коефіцієнт варіації повторюваності, %

$C_В$ = Середнє квадратичне відхилення відтворення,

$КВ_В$ = коефіцієнт варіації відтворення. %

E. ВИЗНАЧЕННЯ ДИКЛАЗУРІЛУ

(+) - 4-хлорфеніл [2,6-дихлор-4-(2,3,4,5-тетрагідро-3,5-діоксо-1,2,4-триазин-2-іл)феніл] ацетонітрил

1. **Мета і зміст**

Метод дозволяє визначати рівень диклазурілу в кормі та преміксах. Межа виявлення становить 0,1 мг/кг, межа кількісного визначення становить 0,5 мг/кг.

2. **Принцип**

Після додавання внутрішнього стандарту пробу екстрагують за допомогою підкисленого метанолу. Для корму аліквоту екстракту очищають на картриджі для твердофазної екстракції C_{18}. Диклазуріл елюірують з картриджа сумішшю підкисленого метанолу та води. Після випарювання залишок розчиняють у ДМФ/воді. Для преміксів екстракт випарюють і залишок розчиняють у ДМФ/воді. Вміст диклазурілу визначається обернено-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (ОфВРХ) з використанням УФ-детектора.

3. **Реактиви**

3.1. Вода, еквівалентна ступеню чистоти за «класифікацією ВЕРХ»

3.2. Ацетат амонію

3.3. Тетрабутиламонію гідросульфат (ТБГС)

3.4. Ацетонітрил, еквівалентний ступеню чистоти за «класифікацією ВЕРХ»

3.5. Вода, еквівалентна ступеню чистоти за «класифікацією ВЕРХ»

3.6. N, N-диметилформамід (ДМФ)

3.7. Соляна кислота, p_{20} = 1,19 г/мл

3.8. Стандартна речовина: диклазуріл II-24 (+)-4-хлорфеніл [2,6-дихлор-4-(2,3,4,5-тетрагідро-3,5-діоксо-1,2,4-триазин-2-іл)феніл] ацетонітрил з гарантованою чистотою, E771

3.8.1. Маточний стандартний розчин диклазурілу, 500 мкг/мл

25 мг стандартної речовини диклазурілу (3.8) зважують з точністю 0,1 мг у градуйовану колбу об'ємом 50 мл. Розчиняють у ДМФ (3.6), доводять до помітки за допомогою ДМФ (3.6) та перемішують. Колбу загортають в алюмінієву фольгу або використовують бурштинову колбу і зберігають у холодильнику. При температурі ≤ 4 °C розчин залишається стійким протягом 1 місяця.

3.8.2. Маточний стандартний розчин диклазурілу, 50 мкг/мл

5,00 мл маточного стандартного розчину (3.8.1) наливають у градуйовану колбу об'ємом 50 мл, доводять до позначки за допомогою ДМФ (3.6) і перемішують. Колбу загортають в алюмінієву фольгу або використовують бурштинову колбу і зберігають у холодильнику. При температурі ≤ 4 °C розчин залишається стійким протягом 1 місяця.

3.9. Внутрішня стандартна речовина: 2,6 дихлор-а-(4-хлорфеніл)-4-(4,5 дигідро-3,5-діоксо-1,2,4-триазин-2 (3H) — іл а-метилбензол-ацетонітрил

3.9.1. Маточний стандартний розчин диклазурілу, 500 мкг/мл

Відважте 25 мг внутрішнього стандарту (3.9) з точністю до 0,1 мг у градуйовану колбу об'ємом 50 мл. Розчиняють у ДМФ (3.6), доводять до помітки за допомогою ДМФ (3.6) та перемішують. Колбу загортають в алюмінієву фольгу або використовують бурштинову колбу і зберігають у холодильнику. При температурі ≤ 4 °C розчин залишається стійким протягом 1 місяця.

3.9.2. Внутрішній стандартний розчин, 50 мкг/мл

Налийте 5,00 мл внутрішнього стандарту (3.9.1) наливають у градуйовану колбу об'ємом 50 мл, доведіть до відмітки за допомогою ДМФ (3.6) і перемішайте. Колбу загортають в алюмінієву фольгу або використовують бурштинову колбу і зберігають у холодильнику. При температурі ≤ 4 °C розчин залишається стійким протягом 1 місяця.

3.9.3. Внутрішній стандартний розчин для преміксів, р/1 000 мг/мл

(р = номінальний вміст диклазурілу в преміксі в мг/кг)

р/10 мг внутрішнього стандарту зважують з точністю до 0,1 мг у градуйовану колбу об'ємом 100 мл, розчиняють в ДМФА (3.6) в ультразвуковій ванні (4.6), доводять до відмітки за допомогою DMF і перемішують. Колбу загортають в алюмінієву фольгу або використовують бурштинову колбу і зберігають у холодильнику. При температурі ≤ 4 °C розчин залишається стійким протягом 1 місяця.

3.10. Калібрувальний розчин, 2 мкг/мл.

Піпеткою набирають 2,00 мл стандартного розчину диклазурілу (3.8.2) і 2,00 мл внутрішнього стандартного розчину (3.9.2) у градуйовану колбу об'ємом 50 мл. Додають 16 мл ДМФ (3.6), доводять до помітки водою та перемішують. Цей розчин слід готувати безпосередньо перед застосуванням.

3.11. Картридж для твердофазної екстракції C_{18}, напр., «Бонд Елют», розміром: 1 сс, маса сорбенту 100 мг.

3.12. Екстракційний розчинник: Підкислений метанол.

Піпеткою додають 5,0 мл соляної кислоти (3.7) до 1 000 мл метанолу (3.5) та перемішують.

3.13. Рухома фаза для ВЕРХ

3.13.1. Елюент А: ацетат амонію — розчин гідросульфату тутрабутиламонію. 5 г ацетату амонію (3.2) та 3,4 г ТБГС (3.3) розчиняють у 1 000 мл води (3.1) та перемішують.

3.13.2. Елюент Б: ацетонітрил (3.4).

3.13.3. Елюент В: метанол (3.5).

4. **Обладнання**

4.1. Механічна мішалка

4.2. Обладнання для тернарної градуйованої ВЕРХ

4.2.1. Колонка для рідинної хроматографії, «Гіперсіл ОДС», 3 мкм упаковка, 100 мм х 4,6 мм, або її аналог

4.2.2. УФ-детектор зі змінною довжиною хвилі або діодно-матричний детектор

4.3. Роторно-плівковий випарний апарат

4.4. Мембранний фільтр, 0,45 мкм

4.5. Вакуумний колектор

4.6. Ультразвукова ванна

5. **Процедура**

5.1. *Загальна інформація*

5.1.1. «Холостий» корм

«Холостий» корм необхідно проаналізувати, щоб переконатися, що ані диклазуріл, ані інтерферуючі речовини в ньому не містяться. «Холостий» корм повинен бути того ж виду, що і проба, і при аналізі диклазуріл не повинен бути виявлений.

5.1.2. Випробування на відновлення

Випробування на відновлення проводять шляхом аналізу «холостого» корму, який був збагачений тією ж самою кількістю диклазурілу, що присутня у пробі. Для збагачення на рівні 1 мг/кг до 50 г «холостого» корму необхідно додати 0,1 мл маточного стандартного розчину (3.8.1), перемішати і почекати 10 хвилин, перемішавши ще декілька разів перш ніж приступити до стадії (5.2).

Як альтернативний спосіб, якщо «холостий» корм того ж виду, що і проба, не доступний (див. 5.1.1), випробування на відновлення може бути виконане за допомогою стандартного методу додавання. У цьому випадку проба для аналізу збагачується певною кількістю діклазурілу, того ж виду, який вже присутній у пробі. Цю пробу аналізують разом з незбагаченою пробою, а відновлення може бути розраховане шляхом віднімання.

5.2. *Екстрагування*

5.2.1. Корм

Зважують з точністю до 0,01 г приблизно 50 г проби. Поміщають у конічну колбу об'ємом 500 мл, додають 1,00 мл внутрішнього стандартного розчину (3.9.2), 200 мл екстракційного розчинника (3.12) та закривають колбу пробкою. Суміш струшують мішалкою (4.1) протягом ночі. Дають відстоятися протягом 10 хвилин. 20 мл аліквоти супернатанта набирають в підходящу скляну ємність і розбавляють 20 мл води. Цей розчин переливають на екстракційний картридж (3.11) і проціджують, застосовуючи вакуум (4.5). Картридж промивають 25 мл суміші екстракційного розчинника (3.12) і водою, 65 + 35 (V + V). Зібрані фракції відкидають і елюірують сполуки 25 мл суміші екстракційного розчинника (3.12) та водою, 80 + 20 (V + V). Цю фракцію випаровують, поки вона не просохне за допомогою роторного випарного апарату (4.3) при 60 ^{o}C. Залишок розчиняють в 1,0 мл ДМФ (3.6), додають 1,5 мл води (3.1) і перемішують. Суміш фільтрують через мембранний фільтр (4.4). Переходять до визначення методом ВЕРХ (5.3).

5.2.2. Премікси

Зважують з точністю до 0,001 г приблизно 1 г проби. Поміщають у конічну колбу об'ємом 500 мл, додають 1,00 мл внутрішнього стандартного розчину (3.9.3), 200 мл екстракційного розчинника (3.12) та закривають колбу пробкою. Суміш струшують мішалкою (4.1) протягом ночі. Дають відстоятися протягом 10 хвилин. Аліквоту 10000/p мл (p = номінальний вміст диклазурілу в преміксі, в мг/кг) супернатанта набирають у круглодонну колбу відповідного розміру. Випарюють, доки вона не підсохне, при зниженому тиску і температурі 60 ^{o}C за допомогою роторного випарного апарату (4.3). Залишок розчиняють в 10,0 мл ДМФ (3.6), додають 15,0 мл води (3.1) і перемішують. Переходять до визначення методом ВЕРХ (5.3).

5.3. *Визначення методом ВЕРХ*

5.3.1. Параметри

Для ознайомлення пропонуються наступні умови, інші умови можуть бути використані, якщо вони дають еквівалентні результати.

Колонка для рідинної хроматографії (4.2.1)	100 мм × 4,6 мм, «Гіперсіл ОДС», 3 **мк**м упаковка, або її аналог	
Мобільна фаза:	Елюент А (3.13.1):	Водний розчин ацетату амонію та гідросульфату тетрабутиламонію
	Елюент Б (3.13.2):	ацетонітрил
	Елюент В (3.13.3):	метанол
Режим елюювання:	— лінійний градієнтний — внутрішні умови: А + Б + В = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — після 10 хв. градієнтне елюювання протягом 30 хв. до: А + Б + В = 45 + 20 + 35 (V + V + V) Промивають елюентом Б протягом 10 хв.	
Швидкість потоку:	1,5-2 мл/хв.	
Об'єм введеної проби:	20 мкл	
Довжина хвилі детектування:	280 нм	

Стабільність хроматографічної системи перевіряють, вводячи кілька разів калібрувальний розчин (3.10) в об'ємі 2 мкг/мл, доки не будуть досягнуті постійна висота піків і час утримування.

5.3.2. Калібрувальний розчин

20 мкл калібрувального розчину (3.10) вводять кілька разів і визначають середню висоту (площу) піків диклазурілу та внутрішні стандартні піки.

5.3.3. Розчин проби

20 мкл розчину проби (5.2.1 або 5.2.2) вводять декілька разів і визначають середню висоту (площу) піків диклазурілу та внутрішні стандартні піки.

6. **Підрахунок результатів**

6.1. *Корми*

Вміст диклазурілу W (мг/кг) у пробі визначається за наступною формулою:

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

де:

$h_{d,s}$ = висота (площа) піку диклазурілу в розчині проби (5.2.1)

$h_{i,s}$ = висота (площа) піку внутрішнього стандарту в розчині проби (5.2.1)

$h_{d,c}$ = висота (площа) піку диклазурілу в калібрувальному розчині (3.10)

hi,c = висота (площа) піку внутрішнього стандарту в калібрувальному розчині (3.10)

$c_{d,c}$ = концентрація диклазурілу в калібрувальному розчині мкг/мл (3.10)

m = маса частини, що випробовується, в г.

V = об'єм екстракту проби відповідно до п. 5.2.1 (тобто 2,5 мл)

6.2. *Премікси*

Вміст диклазурілу W (мг/кг) у пробі визначається за наступною формулою:

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

де:

$h_{d,c}$ = висота (площа) піку диклазурілу в калібрувальному розчині (3.10)

hi,c = висота (площа) піку внутрішнього стандарту в калібрувальному розчині (3.10)

$h_{d,s}$ = висота (площа) піку диклазурілу в розчині проби (5.2.2)

$h_{i,s}$ = висота (площа) піку внутрішнього стандарту в розчині проби (5.2.2)

$c_{d,c}$ = концентрація диклазурілу в калібрувальному розчині мкг/мл (3.10)

м = вага тестової проби в г

V = об'єм екстракту проби відповідно до п. 5.2.2 (тобто 25 мл)

p = номінальний вміст диклазурілу в преміксі в мг/кг

7. **Перевірка результатів**

7.1. *Ідентичність*

Ідентичність аналіту може бути підтверджена шляхом сумісної хроматографії або шляхом використання діодно-матричного детектора, за допомогою якого порівнюються спектри екстракту проби (5.2.1 або 5.2.2) і калібрувального розчину (3.10).

7.1.1. Сумісна хроматографія

Екстракт проби (5.2.1 або 5.2.2) збагачується шляхом додавання відповідної кількості калібрувального розчину (3.10) Кількість доданого диклазурілу повинна співпадати з визначеною кількістю диклазурілу, знайденого в екстракті проби.

Тільки висота піку диклазурілу та внутрішнього стандарту повинні зростати після прийняття до уваги доданої кількості і розведення екстракту. Ширина піку посередині його висоти повинна знаходитися в межах ± 10% від початкової ширини піку диклазурілу або внутрішнього стандарту незбагаченого екстракту проби.

7.1.2. Діодно-матричне детектування

Результати обчислюються за такими критеріями:

(a) Довжина хвилі максимального поглинання проби і стандартних спектрів, записана на вершині піку на хроматограмі, повинна бути однаковою в межах зони, обумовленої роздільною здатністю системи детектування. Для діодно-матричного детектування, як правило, вона знаходиться в межах ± 2 нм;

(b) Між 230 і 320 нм спектри проби і стандартні спектри, записані на вершині піку на хроматограмі, не повинні відрізнятися для частин спектра в діапазоні від 10% до 100% відносного поглинання. Цей критерій задовольняється, якщо присутні однакові максимуми, і в точці спостереження відхилення між двома спектрами перевищує 15% від поглинання стандартного аналіту;

(c) Між 230 і 320 нм спектри підйому, вершини піку та спаду, які дає екстракт проби, не повинні відрізнятися один від одного для частини спектра в діапазоні від 10% до 100% відносного поглинання. Цей критерій задовольняється, якщо присутні однакові максимуми, і в точці спостереження відхилення між спектрами не перевищує 15% від поглинання спектру вершини піку;

Якщо один з цих критеріїв не задовольняється, наявність аналіту не підтверджується.

7.2. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з використанням тієї ж проби, не повинна перевищувати:

— 30% по відношенню до найбільшого значення при вмісті диклазурілу від 0,5 мг/кг до 2,5 мг/кг,

— 0,75 мг/кг при вмісті диклазурілу між 2,5 мг/кг і 5 мг/кг,

— 15% по відношенню до найбільшого значення при вмісті диклазурілу більше 5 мг/кг.

7.3. *Відновлення*

Для збагачення («холостого») проби відновлення має охоплювати не менше 80 %.

8. **Результати спільного дослідження**

Було проведене спільне дослідження, в якому 5 проб були проаналізовані в 11 лабораторіях. Ці проби складалися з двох преміксів; один був змішаний з органічною матрицею (O 100), а інший - з неорганічною матрицею (A 100). Теоретичний вміст складає 100 мг диклазурілу на кілограм. Три змішані комбікорми для птиці були виготовлені 3-ма різними виробниками (NL) (L1/Z1/K1). Теоретичний вміст складає 1 мг диклазурілу на кг. Лабораторії були проінструктовані, що необхідно проаналізувати кожен із проб один раз або двічі. (Більш детальну інформацію про це спільне дослідження можна знайти в *журналі «AOAC Интернешнл», том 77, № 6, 1994, с. 1359-1361)*. Результати наведені в таблиці нижче:

	Проба 1 A 100	Проба 2 O 100	Проба 3 L1	Проба 4 Z1	Проба 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Середнє арифметичне	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
Sr (мг/кг)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
$KB_З$ (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
SR (мг/кг)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
$KB_В$ (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Номінальний вміст (мг/кг)	100	100	1	1	1

L = кількість лабораторій

n = кількість одиничних значень

$C_З$ = середнє квадратичне відхилення повторюваності

CV_r = коефіцієнт варіації повторюваності

$C_В$ = середнє квадратичне відхилення відтворення

CV_R= коефіцієнт варіації відтворюваності.

9. **Результати спостереження**

Реакція диклазурілу, продемонстрована раніше, повинна була показати, що вона має лінійний характер в діапазоні концентрацій, що вимірюються.

Є. ВИЗНАЧЕННЯ ЛАЗАЛОЦИД НАТРІЮ

Натрієва сіль простого поліефіру монокарбонової кислоти, що виробляється бактеріями Streptomyces lasaliensis

1. **Мета і зміст**

Метод дозволяє визначати рівень лазалоциду натрію в кормі та преміксах. Межа виявлення становить 5 мг/кг, межа кількісного визначення становить 10 мг/кг.

2. **Принцип**

Лазалоцид натрію екстрагується із проби у підкислений метанол і визначається обернено-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (ОфВРХ) з використанням спектрофлуориметру.

3. **Реактиви**

3.1. Дигідрофосфат калію (KH_2PO_4).

3.2. Ортофосфорна кислота, w (w/w) = 85 %.

3.3. Розчин ортофосфорної кислоти, c = 20 %.

23,5 мл ортофосфорної кислоти (3.2) розводять у 100 мл води.

3.4. 6-метил-2-гептіламін (1,5-диметилгексиламін), w (w/w) = 99 %.

3.5. Метанол, еквівалентний ступеню чистоти за класифікацією ВЕРХ.

3.6. Соляна кислота, густиною = 1,19 г/мл.

3.7. Буферний фосфатний розчин, c = 0,01 моль/л.

1,36 г KH_2PO_4 (3.1) розчиняють у 500 мл води (3.11), додають 3,5 мл орортофсфорної кислоти (3.2) та 10,0 мл 6-метил-2-гептіламіну (3.4). Доводять pH до 4,0 за допомогою розчину ортофосфорної кислоти (3.3) і розчиняють до 1 000 мл водою (3.11).

3.8. Підкислений метанол.

5,0 мл соляної кислоти (3.6) переливають у градуйовану колбу об'ємом 1000 мл, доводять до позначки метанолом (3.5) та перемішують. Цей розчин слід готувати безпосередньо перед застосуванням.

3.9. Рухома фаза для ВЕРХ, метанол-фосфатний буферний розчин 5 + 95 (V + V). Змішують 5 мл фосфатного буферного розчину (3.7) з 95 мл метанолу (3.5).

3.10. Стандартна речовина лазалоциду натрію з гарантованою чистотою, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (натрієва сіль поліефіру монокарбонової кислоти, що виробляється бактеріями *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Маточний стандартний розчин лазалоциду натрію, 500 мкг/мл

50 мг лазалоциду натрію (3.10) зважують з точністю до 0,1 мг у градуйовану колбу об'ємом 100 мл, розчиняють в підкисленому метанолі (3.8), доводять до позначки за допомогою того ж розчинника та перемішують. Цей розчин повинен бути приготований перед використанням.

3.10.2. Проміжний стандартний розчин лазалоциду натрію, 50 мкг/мл

10,0 мл маточного стандартного розчину (3.10.1) набирають піпеткою у градуйовану колбу об'ємом 100 мл, доводять до відмітки підкисленим метанолом (3.8) і перемішують. Цей розчин слід готувати безпосередньо перед застосуванням.

3.10.3. Калібрувальні розчини

У низку градуйованих колб об'ємом 50 мл наливають 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 і 10,0 мл проміжного стандартного розчину (3.10.2). Доводять до позначки за підкисленим метанолом (3.8) і перемішують. Ці розчини відповідають 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 і 10,0 мкг/мл лазалоциду натрію відповідно. Ці розчини повинні бути приготовані безпосередньо перед використанням.

3.11. Вода, еквівалентна шкалі ВЕРХ.

4. **Обладнання**

4.1. Ультразвукова баня (або струшуюча водяна) баня з температурним контролем.

4.2. Мембранні фільтри, 0,45 мкм

4.3. Обладнання для ВЕРХ з системою введення проб, що підходить для введення об'ємів 20 мкл.

4.3.1. Колонка для рідинної хроматографії 125 мм х 4 мм, обернено-фазова C_{18}, 5 мкм упаковка, або її аналог.

4.3.2. Спектрофлуориметр з регулюванням довжини хвилі збудження і згасання.

5. **Процедура**

5.1. *Загальна інформація*

5.1.1. «Холостий» корм

Для виконання випробування на відновлення (5.1.2) необхідно проаналізувати «холостий» корм, щоб переконатися, що ані лазалоцид натрію, ані інтерферуючі речовини в ньому не містяться. «Холостий» корм повинен бути того ж виду, що і проба, і при аналізі лазалоцид натрію не повинен бути виявлений.

5.1.2. Випробування на відновлення

Випробування на відновлення проводять шляхом аналізу «холостого» корму, який був збагачений тією ж самою кількістю лазалоциду натрію, яка присутня у пробі. Для збагачення на рівні 100 мг/кг 10,0 мл маточного стандарту (3.10.1) наливають у конічну колбу об'ємом 250 мл та випарюють розчин приблизно до 0,5 мл. Додають 50 г «холостого» корму, ретельно перемішують і залишають на 10 хвилин, а потім знову перемішують декілька разів, перш ніж перейти до стадії екстракції (5.2).

Як альтернативний спосіб, якщо «холостий» корм того ж виду, що і проба, не доступний (див. 5.1.1), випробування на відновлення може бути виконане за допомогою стандартного методу додавання. У цьому випадку проба для аналізу збагачується такою ж кількістю лазалоциду натрію, яка присутня у пробі. Цю пробу аналізують разом з незбагаченою пробою, а відновлення розраховується шляхом віднімання.

5.2. *Екстрагування*

5.2.1. Корм

Від 5 до 10 г проби відважують з точністю до 0,01 г у конічну колбу об'ємом 250 мл з пробкою. Додають піпеткою 100,0 мл підкисленого метанолу (3.8). Легенько закривають пробкою і обертають для диспергування. Колбу ставлять в ультразвукову ванну (4.1) при температурі приблизно 40 ^{o} C на 20 хвилин, потім знімають та охолоджують до кімнатної температури. Дають відстоятися протягом приблизно 1 години, поки суспензія не осяде, потім фільтрують аліквотну частину через мембранний фільтр 0,45 мкм (4.2) у відповідну посудину Переходять до визначення методом ВЕРХ (5.3).

5.2.2. Премікси

Близько 2 г неподрібненого преміксу з точністю до 0,001 г відважують у градуйовану колбу об'ємом 250 мл. Додають 100,0 мл підкисленого метанолу (3.8) і диспергують шляхом обертання. Колбу поміщають в ультразвукову баню (4.1) при температурі приблизно 40 ^{o} C на 20 хвилин, потім знімають та охолоджують до кімнатної температури. Розводять до позначки підкисленим метанолом (3.8) і перемішують. Дають відстоятися протягом приблизно 1 години, поки суспензія не осяде, потім фільтрують аліквотну частину через мембранний фільтр 0,45 мкм (4.2). Розводять відповідний об'єм прозорого фільтрату з підкисленим метанолом (3.8) для отримання остаточного розчину, що містить близько 4 мкг/мл лазалоциду натрію. Переходять до визначення методом ВЕРХ (5.3).

5.3. *Визначення методом ВЕРХ*

5.3.1. Параметри

Для ознайомлення пропонуються наступні умови, інші умови можуть бути використані, якщо вони дають еквівалентні результати.

Колонка для рідинної хроматографії 125 мм × 4 мм, обернено-фазова $C1_8$, 5 **мк**м упаковка, або її аналог (4.3.1):

Рухома фаза (3.9): Суміш фосфатного буферного розчину (3.7) та метанолу (3.5), 5+95 (V+V)

Швидкість потоку: 1,2 мл/хв.

Довжина хвилі детектування:

Збудження: 310 нм

Згасання: 419 нм

Об'єм введеної проби: 20 мкл

Стабільність хроматографічної системи перевіряють, вводячи калібрувальний розчин (3.10.3) в об'ємі 4,0 мкг/мл кілька разів, доки не будуть досягнуті постійна висота (чи площа) піків і час утримування.

5.3.2. Калібрувальний графік

Кожен калібрувальний розчин (3.10.3) вводять декілька разів і вимірюють висоту (площу) піків для кожної концентрації. Калібрувальний графік розподіляють на ділянки, наносячи середню висоту, або площу, піків на вісь ординат, а відповідні концентрації в мкг/мл - на вісь абсцис.

5.3.3. Розчин проби

Екстракти проби, отримані у п. 5.2.1 або 5.2.2, вводять декілька разів, використовуючи той же об'єм, що і для калібрувального розчину, і визначають середню висоту (площу) піків лазалоциду натрію.

6. **Підрахунок результатів**

Концентрацію лазалоциду натрію визначають за середньоарифметичною висотою (площею) піків, які утворюються після введення розчину проби (5.3.3), у (мкг/мл), співвідносячи з калібрувальним графіком.

6.1. *Корм*

Вміст лазалоциду натрію, W (мг/кг) у пробі визначається за наступною формулою:

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

де:

c = концентрація лазалоциду натрію в розчині проби (5.2.1), в мкг/мл,
V_1 = об'єм екстракту проби відповідно до п. 5.2.1 (тобто 100)
m = маса частини, що випробовується, в г.

6.2. *Премікси*

Вміст лазалоциду натрію, W (мг/кг) у пробі визначається за наступною формулою:

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

де:
c = концентрація лазалоциду натрію в розчині проби (5.2.2), в мкг/мл,
V_2 = об'єм екстракту проби відповідно до п. 5.2.2 (тобто 250)
f = коефіцієнт розчинення відповідно до п. 5.2.2
m = маса частини, що випробовується, в г.

7. **Перевірка результатів**

7.1. *Ідентичність*

Методи, засновані на спектрофлуориметрії, менш схильні до інтерференції, ніж ті, в яких використовується УФ-детектування. Ідентичність аналіту може бути підтверджено шляхом сумісної хроматографії

7.1.1. Сумісна хроматографія

Екстракт проби (5.2.1 або 5.2.2) збагачується шляхом додавання відповідної кількості калібрувального розчину (3.10.3). Кількість доданого лазалоциду натрію повинна співпадати з кількістю лазалоциду натрію, виявленого в екстракті проби. Після прийняття до уваги доданої кількості і розведення екстракту повинна зростати тільки висота піку лазалоциду натрію. Ширина піку, посередині висоти, повинна бути в межах ± 10% від початкового ширини піків, що утворюються за допомогою незбагаченого екстракту проби.

7.2. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з використанням тієї ж проби, не повинна перевищувати:

— 15 % по відношенню до найбільшого значення при вмісті лазалоциду натрію від 30 мг/кг до 100 мг/кг,

— 15 мг/кг при вмісті лазалоциду натрію від 100 мг/кг до 200 мг/кг,

— 7,5 % по відношенню до найбільшого значення при вмісті лазалоциду натрію більше 200 мг/кг.

7.3. *Відновлення*

Для збагаченої «холостої» проби корму відновлення має охоплювати не менше 80%. Для збагачених проб преміксів відновлення має охоплювати не менше 90 %.

8. **Результати спільного дослідження**

Було організоване спільне дослідження (*), в якому 2 премікси (проби 1 і 2) та 5 кормів (проби 3-7) було проаналізовано у 12 лабораторіях. Кожну пробу перевіряли двічі. Результати наведені у таблиці нижче:

	Проба 1 Курячий премікс	Проба 2 Індичий премікс	Проба 3 Гранульований корм для індик	Проба 4 Подрібнений корм для курей	Проба 5 Індичий корм	Проба 6 Корм для птиці А	Проба 7 Корм для птиці Б
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Середнє арифметичне [мг/кг]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
$C_З$ [мг/кг]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
$КВ_З$ *[%]*	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
СР [мг/кг]	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
Номінальний вміст (мг/кг)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Вміст, заявлений виробником.
(**) Корм, приготований у лабораторії.

L = кількість лабораторій

n = кількість одиничних результатів

$C_З$ = Середнє квадратичне відхилення повторюваності

$C_В$ = середнє квадратичне відхилення відтворення

CV_r= коефіцієнт варіації повторюваності, %

CV_R= коефіцієнт варіації відтворюваності.

(*) *Лаборант*, 1995, 120, с. 2175-2180.

ДОДАТОК V

МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДЛЯ КОНТРОЛЮ НЕБАЖАНИХ РЕЧОВИН В КОРМАХ

А. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІЛЬНОГО ТА ЗАГАЛЬНОГО ГОСИПОЛУ

1. **Мета та зміст**

Цей метод дозволяє визначати рівень вільного госиполу, загального госиполу та хімічно пов'язаних з ними речовин у насінні бавовнику, бавовняному шроті і макусі та у комплексних кормах, що містять цю кормову сировину, в яких присутні більше 20 мг/кг вільного госиполу, загального госиполу чи хімічно пов'язаних з ними речовин.

2. **Принцип**

Госипол екстрагується за наявності 3-амінопропан-1-олу або суміші пропан-2-олу і гексану (для визначення вільного госиполу), або диметилформаміду (для визначення загального госиполу). Госипол перетворюється за допомогою аніліну у госипола-діанілін, оптична густина якого вимірюється при 440 нм.

3. **Реактиви**

3.1. Суміш пропан-2-ол-гексану: змішують 60 частин за об'ємом пропан-2-олу та 40 частин за об'ємом *н*-гексану.

3.2. Розчинник А: У 1- літрову мірну колбу набирають приблизно 500 мл суміші пропан-2-ол-гексану (3.1), 2 мл 3-амінопропан-1-олу, 8 мл крижаної оцтової кислоти та 50 мл води. Отриману суміш доводять до необхідного об'єму пропан-2-ол-гексаном (3.1). Цей реагент залишається стійким протягом одного тижня.

3.3. Розчинник Б: 2 мл 3-амінопропан-1-олу та 10 мл крижаної оцтової кислоти набирають піпеткою у 100 мл мірну колбу. Охолоджують до кімнатної температури і доводять до об'єму N, N-диметилформамідом. Цей реагент залишається стійким протягом одного тижня.

3.4. Анілін: *Якщо оптична густина у «холостому» випробуванні перевищує 0,022,* анілін перепускають через цинковий пил, відкидаючи при цьому перші і останні 10 % фракції дистиляту. При зберіганні у холодильнику та у темній закритій скляній колбі цей реагент буде стояти протягом декількох місяців.

3.5. Стандартний розчин госиполу А: Поміщають 27,9 мг ацетату госиполу у 250 мл мірну колбу. Розчиняють та доводять до необхідного об'єму розчинником А (3.2). 50 мл цього розчину набирають піпеткою у 250 мл мірну колбу і доводять до необхідного об'єму за допомогою розчинника А. Концентрація госиполу в цьому розчині складає 0,02 мг/мл. Перед використанням дають постояти протягом 1 години при кімнатній температурі.

3.6. Стандартний розчин госиполу Б: 27,9 мг ацетату госиполу поміщають у 50 мл мірну колбу. Розчиняють та доводять до необхідного об'єму за допомогою розчинника Б (3.3). Концентрація госиполу в цьому розчині становить 0,5 мг/мл.

Стандартні розчини госиполу А і Б залишаються стійкими протягом 24 годин при зберіганні у захищеному від світла місці.

4. **Обладнання**

4.1. Змішувач (барабанний): приблизно 35 об./хв.

4.2. Спектрофотометр.

5. **Процедура**

5.1. *Випробуваний зразок*

Кількість випробуваного зразка, який використовується, залежить від передбачуваного змісту госиполу у зразку. Бажано використовувати випробуваний зразок невеликого об'єму і відносно велику аліквотну частину фільтрату, щоб отримати достатню кількість госиполу для точного фотометричного вимірювання. *Для визначення вмісту вільного госиполу* в насінні бавовнику, бавовняному шроті та бавовняній макусі кількість випробовуваного зразка не повинна перевищувати 1 г; для комплексних кормів вона може складати 5 г. 10 мл аліквотної частини фільтрату підходить у більшості випадків; вона повинна містити від 50 до 100 мкг госиполу. *Для визначення вмісту загального госиполу* випробуваний зразок повинен складати 0,5-5 г, що є 2 мл аліквотною частиною фільтрату, яка міститиме від 40 до 200 мкг госиполу.

Аналіз повинен проводитися при кімнатній температурі близько 20 °C.

5.2. *Визначення вмісту вільного госиполу*

Випробуваний зразок поміщають у 250 мл колбу з притертим під пробку горлечком, дно колби вкрите битим склом. За допомогою піпетки додають 50 мл розчинника А (3.2), закривають колбу і перемішують протягом однієї години у змішувачі. Фільтрують через сухий фільтр і збирають фільтрат в невелику колбу з притертим під пробку горлечком. Під час фільтрації лійку закривають предметним склом.

Піпеткою набирають ідентичні аліквотні частини фільтрату, які містять від 50 до 100 мкг госиполу, в кожну з двох 25 мл мірних колб (А і Б). При необхідності, доводять об'єм до 10 мл за допомогою розчинника А (3.2). Потім доводять вміст колби (А) до необхідного об'єму сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1). Цей розчин буде використовуватися в якості контрольного розчину, відносно якого буде вимірюватися розчин зразка.

Піпеткою набирають 10 мл розчинника А (3.2) у дві інші 25 мл мірні колби (В і Г). Вміст колби (В) доводять до необхідного об'єму сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1). Цей розчин буде використовуватися в якості контрольного розчину, відносно якого буде вимірюватися «холостий» випробуваний розчин.

Додають 2 мл аніліну (3.4) у колби (Г) і (Б). Нагрівають протягом 30 хвилин на киплячій водяній бані до набуття кольору. Охолоджують до кімнатної температури, доводять до необхідного об'єму сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1), гомогенізують та залишають відстоятися протягом 1 години.

Визначають оптичну густину «холостого» випробуваного розчину (Г) в порівнянні з контрольним розчином (В) і оптичну густину розчину зразка (Б) в порівнянні з контрольним розчином (А) у спектрофотометрі при 440 нм з використанням 1 см скляних комірок.

Віднімають оптичну густину «холостого» випробуваного розчину від густини розчину зразка (= скоригована оптична густина). На основі цієї величини обчислюють вміст вільного госиполу, як зазначено в п. 6.

5.3. *Визначення вмісту загального госиполу*

Випробований зразок, що містить від 1 до 5 мг госиполу, поміщають у 50 мл мірну колбу і додають 10 мл розчинника Б (3.3). У той же час підготовують «холосте» випробування, поміщаючи 10 мл розчинника Б (3.3) в іншу 50 мл мірну колбу. Дві колби нагрівають протягом 30 хвилин на киплячій водяній бані. Охолоджують до кімнатної температури та доводять вміст кожної колби до необхідного об'єму сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1). Гомогенізують і дають відстоятися протягом 10-15 хвилин, потім проціджують і збирають фільтрати в колби з притертим під пробку горлечком.

Піпеткою набирають 2 мл фільтрату зразка у дві 25 мл мірні колби та 2 мл «холостого» випробуваного фільтрату у дві інші 25 мл колби. Вміст однієї колб з кожної сурії доводять до 25 мл сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1). Ці розчини будуть використані в якості контрольних.

Додають 2 мл аніліну (3.4) у другу колбу з кожного серії. Нагрівають протягом 30 хвилин на киплячій водяній бані до набуття кольору. Охолоджують до кімнатної температури, доводять до об'єму 25 мл сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1), гомогенізують та залишають відстоятися протягом 1 години.

Визначають оптичну густину, як зазначено в п. 5.2 для вільного госиполу. На основі цієї величини обчислюють вміст загального госиполу, як зазначено в п. 6.

6. **Підрахунок результатів**

Результати можуть бути обчислені, або на основі конкретної оптичної густини (6.1), або за калібрувальною кривою (6.2).

6.1. *На основі конкретної оптичної густини*

Конкретна оптична густина, за описаних умов, становитиме:

Вільний госипол: $E\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 625$

Загальний госипол: $E\frac{1\,\%}{1\ \text{cm}} = 600$

Вміст вільного або загального госиполу у зразку обчислюють за допомогою наступної формули:

$$\% \text{ госиполу: } \frac{E \times 1\,250}{E^{1\%}_{1cm} \times p \times a}$$

де:

E = скоригована оптична густина, визначена як зазначено в п. 5.2,

p = випробований зразок, у г,

a = аліквотна частина фільтрату, у мл.

6.2. *За калібрувальною кривою*

6.2.1. Вільний госипол:

Підготовують 2 серії 25 мл мірних колб по п’ять штук у кожній. Піпеткою набирають аліквоти по 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 і 10,0 мл стандартного розчину госиполу А (3.5) для кожної серії колб. При необхідності, доводять об’єм до 10 мл за допомогою розчинника А (3.2). Доповнюють кожну серію 25 мл мірною колбою, що містить тільки 10 мл розчинника А (3.2) («холосте» випробування).

Доводять до необхідного об’єму колби першої серії (у тому числі колбу для «холостого» випробування) до 25 мл за допомогою суміші пропан-2-ол-гексану (3.1) (контрольна серія).

Додають 2 мл аніліну (3.4) в кожну колбу в другій серії (у тому числі в колбу для «холостого» випробування). Нагрівають протягом 30 хвилин на киплячій водяній бані до набуття кольору. Охолоджують до кімнатної температури, доводять до необхідного об’єму сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1), гомогенізують та залишають відстоятися протягом 1 години (стандартна серія).

Визначають оптичну густину розчинів, як зазначено в п. 5.2, в стандартній серії в порівнянні з відповідними розчинами в контрольній серії. Будують калібрувальну криву, наносячи точки оптичної густини проти кількості госиполу (в мкг).

6.2.2. Загальний госипол

Підготовують шість 50 мл мірних колб. У першу колбу набирають 10 мл розчинника Б (3.3), а в решту - 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 і 10,0 мл стандартного розчину госиполу Б (3.6) відповідно. Доводять вміст кожної колби до 10 мл розчинником Б (3.3). Нагрівають протягом 30 хвилин на киплячій водяній бані. Охолоджують до кімнатної температури, доводять до необхідного об’єму сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1) та гомогенізують.

По 2,0 мл цих розчинів набирають у кожну з шести 25 мл мірних колб кожної серії. Вміст колб першої серії доводять до 25 мл за допомогою суміші пропан-2-ол-гексану (3.1) (контрольна серія).

Додають по 2 мл аніліну (3.4) у кожну колбу другої серії. Нагрівають протягом 30 хвилин на киплячій водяній бані. Охолоджують до кімнатної температури, доводять до необхідного об’єму сумішшю пропан-2-ол-гексану (3.1), гомогенізують та залишають відстоятися протягом 1 години (стандартна серія).

Визначають оптичну густину розчинів в стандартній серії, як зазначено в п. 5.2, в порівнянні з відповідними розчинами в контрольній серії. Будують калібрувальну криву, наносячи точки оптичної густини проти кількості госиполу (в мкг).

6.3. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з використанням тієї ж проби, не повинна перевищувати:

— 15 %, у відносному значенні до більш високого рівня, при вмісті госиполу менше, ніж 500 м.д.,

— 75 частин на мільйон, за абсолютною величиною, при вмісті не менше 500 м.д. і не більше 750 м.д.,

— 10 %, у відносному значенні до більшого значення, при вмісті більше, ніж 750 м.д.

(B) ВИЗНАЧЕННЯ РІВНІВ ДІОКСИНІВ (ПХДД/ПХДФ) І ДІОКСИНОПОДІБНИХ ПХБ

I. *МЕТОДИ ВІДБОРУ ЗРАЗКІВ ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ.*

1. **Мета і зміст**

Зразки, призначені для офіційного контролю рівнів діоксинів (поліхлорованого дибензо-п-діоксинів (ПХДД) і поліхлорованого дибензофуранів (ПХДФ)) та діоксино-подібних поліхлорованих біфенілів (ПХБ) ([1]) в кормах, повинні братися відповідно до положень Додатку I. Кількісні вимоги щодо контролю речовин або продуктів рівномірно розподілених по всьому корму повинні застосовуватися, як це передбачено в пункті 5.A. Додатку I. Отримані таким чином сукупні зразки повинні вважатися зразками партій або частини партій, з яких вони взяті. Відповідність до максимальних рівнів, викладених у Директиві 2002/32/ЕС Європейського Парламенту і Ради ([2]), встановлюється на основі рівнів, визначених у лабораторних зразках.

2. **Відповідність партії або частини партії до специфікації**

Партія приймається, якщо аналітичний результат одного аналізу не перевищує відповідний максимальний рівень, викладений у Директиві 2002/32/ЕС, враховуючи похибку вимірювання.

Партія не відповідає максимальному рівню, зазначеному в Директиві 2002/32/ЕС, якщо аналітичний результат верхньої межі ([3]), підтверджений повторним аналізом ([4]), перевищує поза усіма розумними сумнівами максимальний рівень, враховуючи похибку вимірювання.

([1]) Таблиця ФТЕ (= факторів токсичної еквівалентності) для діоксинів, фуранів і діоксиноподібних ПХБ:

Конгенер	Значення ФТЕ	Конгенер	Значення ФТЕ
Дибензо-п-діоксини (ТХДД)		«Діоксіноподобні» ПХБ:	
2,3,7,8-ТХДД	1		
1,2,3,7,8-ПеХДД	1	***Неорто-ПХБ***	
1,2,3,4,7,8-ГкХДД	0,1	ПХБ 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-ГкХДД	0,1	ПХБ 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-ГпХДД	0,1	ПХБ 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	0,01	ПХБ 169	0,01
ОХДД	0,0001	***Моноорто-ПХБ***	
		ПХБ 105	0,0001
Дибензофурани (ПХДФ)		ПХБ 114	0,0005
2,3,7,8-ТХДФ	0,1	ПХБ 118	0,0001
1,2,3,7,8-ПеХДФ	0,05	ПХБ 123	0,0001
2,3,4,7,8-ПеХДФ	0,5	ПХБ 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-ГкХДФ	0,1	ПХБ 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-ГкХДФ	0,1	ПХБ 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-ГкХДФ	0,1	ПХБ 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-ГкХДФ	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДФ	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-ГпХДФ	0,01		
ОХДФ	0,0001		

Використані скорочення: «Т» = тетра; «Пе» = пента; «Гк» = гекса; «Гп» = гепта; «О» = окта; «ХДД» = хлордибензо-п-діоксин; «ХДФ» = хлордибензофуран; «ХБ» = хлорбіфеніл.

([2]) OJ L 140, 30.5.2002, с. 10.

([3]) Поняття «верхньої межі» вимагає використання обмеження у визначенні кількості для внесення кожного конгенера, що не підлягав кількісному визначенню, у токсичний еквівалент (ТЕ).
Поняття «нижньої межі» вимагає використання нульового значення для внесення кожного конгенера, що не підлягав кількісному визначенню, у ТЕ.
Поняття «середньої межі» вимагає використання половини обмеження у визначенні кількості для розрахунку внесення кожного конгенера, що не підлягав кількісному визначенню, у ТЕ.

([4]) При повторному аналізі необхідно виключити можливість внутрішнього перехресного забруднення або випадкової плутанини зразків. Перший аналіз, з урахуванням похибок вимірювання, використовується для перевірки відповідності.
У випадку, якщо аналіз проводиться в межах випадку забруднення діоксинами, підтвердженням результатів за допомогою повторного аналізу можна знехтувати, якщо зразки, відібрані для аналізу, пов'язані із даним випадком забруднення діоксинами за даними відстежування.

Похибка вимірювань може бути прийнята до уваги відповідно до одного з наступних підходів:

— шляхом обчислення розширеної невизначеності з використанням коефіцієнта охоплення 2, який забезпечує рівень довіри приблизно 95 %. Партія є невідповідною, якщо виміряне значення мінус U перевищує максимальний рівень. У разі окремого визначення діоксинів і діоксиноподібних ПХБ сума припусканої розширеної невизначеності певних аналітичних результатів діоксинів і діоксиноподібних ПХБ повинна використовуватися для суми діоксинів і діоксиноподібних ПХБ,

— при встановленні обмеження прийняття рішення (ССα), відповідно до Рішення Комісії 2002/657/ЕС ([1]) (пункт 3.1.2.5 Додатку — речовини зі встановленим дозволеним рівнем). Партія є невідповідною, якщо виміряне значення дорівнює або вище ССα.

Ці правила інтерпретації застосовуються для аналітичного результату, отриманого на зразку для офіційного контролю. Це не впливає на право держав-членів застосовувати національні правила для аналізу з метою захисту чи заперечення позову.

II. *ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ І ВИМОГИ ДО МЕТОДІВ АНАЛІЗУ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ОФІЦІЙНОГО КОНТРОЛЮ РІВНЯ ДІОКСИНІВ (ПХДД/ПХДФ) ТА ДІОКСИНОПОДІБНИХ ПХБ*

1. Предмет та сфера застосування

Ці вимоги слід застосовувати у випадку аналізу кормової сировини і кормів на наявність діоксинів (поліхлорованих дибензо-п-діоксинів (ПХДД) і поліхлорованих дибензофуранів (ПХДФ)) та діоксиноподібних поліхлорованих біфенілів (ПХБ) .

Контроль на наявність діоксинів в кормах може проводитись з використанням стратегії, що передбачає метод скринінгу з метою відбору зразків, в яких рівень вмісту діоксинів і діоксиноподібних ПХБ є меншим, ніж 25% або перевищує рівень відсотку. Концентрація діоксинів у зразках зі значним рівнем повинна бути визначена/підтверджена підтверджувальним методом.

Скринінгові методи – це методи, які використовуються для виявлення наявності діоксинів і діоксиноподібних ПХБ на рівні відсотку. Ці методи високоефективні в роботі зі зразками та використовуються для аналізу великої кількості зразків для потенційного підтвердження результатів. Вони спеціально розроблені для уникнення помилкових від'ємних результатів.

Підтверджувальні методи – це методи, які надають повну або додаткову інформацію, що робить можливим визначення наявності діоксинів і діоксиноподібних ПХБ та їх точної кількості на рівні відсотку.

2. Історія питання

Так як екологічні та біологічні зразки (у тому числі зразки кормової сировини/кормів) в основному містять складні суміші різних конгенерів діоксинів, для спрощення оцінки ризику було розроблено поняття «факторів токсичної еквівалентності токсичності» (ФТЕ). Ці ФТЕ встановлено для вираження концентрації сумішей 2,3,7,8-заміщених ПХДД і ПХДФ та деяких неорто- і моноорто-хлорозаміщених ПХБ, які мають подібну до діоксинів 2,3,7,8-ТХДД дію в токсичних еквівалентах (ТЕ). Концентрації окремих речовин в певному зразку помножують на відповідні ФТЕ, а потім підсумовують для отримання загальної концентрації діоксиноподібних сполук, виражених в ТЕ.

Тільки в цілях цього Регламенту, прийнятним спеціальним обмеженням у визначенні кількості окремих конгенерів є концентрація аналіту в екстракті зразка, який викликає аналітичну реакцію у двох різних іонах, що контролюється завдяки відношенню С/Ш (сигнал/шум) 3:1 для менш чутливого сигналу, і дотриманню основних вимог, таких як час утримування і відношення ізотопів, відповідно до процедури визначення, викладеної в методі EPA 1613, переглянутої версії B.

3. Вимоги до забезпечення якості, яких слід дотримуватися під час приготування зразка

Застосовуються загальні положення щодо приготування зразків для аналізу, викладені у Додатку II.

Крім того, необхідно дотримуватися наступних вимог:

— Зразки повинні зберігатися та транспортуватися у скляних, алюмінієвих, поліпропіленових чи поліетиленових ємностях. Сліди паперового пилу повинні бути видалені з ємності для зберігання зразка. Скляну тару необхідно промити розчинниками, попередньо перевіреними на наявність діоксинів.

([1]) OJ L 221, 17.8.2002, с. 8.

— «Холостий» аналіз проводять, виконуючи весь хід аналітичних робіт, опускаючи лише застосування зразка.

— Вага зразка, що використовується для екстракції, повинна бути достатньою для виконання вимог щодо чутливості.

4. **Вимоги для лабораторій**

— Лабораторії повинні демонструвати продуктивність методу в межах рівня відсотку, напр., 0,5x, 1x та 2x рівня відсотку з прийнятним коефіцієнтом варіації у повторному аналізі. Для отримання детальної інформації про критерії прийнятності, див. пункт 5.

— Обмеження у визначенні кількості при виконанні підтверджувального методу може коливатися у діапазоні близько однієї п'ятої рівня відсотку, що забезпечує відповідність прийнятних коефіцієнтів варіації межам рівня відсотку.

— Регулярний «холостий» контроль та експерименти з використанням модельних сумішей або аналізи контролю зразків (бажано, при наявності сертифікованої первинної сировини) повинні проводитися як заходи внутрішнього контролю якості.

— Успішна участь у міжлабораторних дослідженнях, за допомогою яких оцінюється професійний рівень лабораторій, є найкращим способом довести компетентність конкретних аналізів. Однак успішна участь в міжлабораторних дослідженнях, предметом яких є, наприклад, зразки ґрунту або стічних вод, не завжди доводить компетентність також і в області зразків продуктів харчування або кормів, які мають більш низькі рівні забруднення. Таким чином, постійна участь у міжлабораторних дослідженнях щодо визначення діоксинів і діоксиноподібних ПХБ у відповідних матрицях корму/харчових продуктів є обов'язковою.

— Лабораторії мають бути акредитовані визнаним органом і в своїй роботі спиратися на стандарти ISO Guide 58 щодо забезпечення контролю якості аналітичних визначень. Лабораторії повинні бути акредитовані відповідно до стандарту ISO/IEC/17025.

5. **Вимоги, яких слід дотримуватися при аналітичній процедурі визначення діоксинів та діоксиноподібних ПХБ**

Основні вимоги до прийнятності аналітичних процедур:

— **Висока чутливість та низькі межі виявлення**. Для ПХДД і ПХДФ виявлена кількість повинна бути в межах піктограму ТЕ (10^{-12} г), зважаючи на надзвичайну токсичність деяких з цих сполук. Відомо, що ПХБ зустрічаються на більш високих рівнях, ніж ПХДД і ПХДФ. Для більшості конгенерів ПХБ чутливість в межах нанограму (10^{-9} г) вже є достатньою. Тим не менш, для вимірювання більш токсичних діоксиноподібних ПХБ (зокрема, неорто-заміщених конгенерів) необхідно досягти такої ж чутливості, що і для ПХДД і ПХДФ.

— **Висока вибірковість (специфічність).** Необхідно відрізняти ПХДД, ПХДФ та діоксиноподібні ПХБ від безлічі інших коекстративних і, вірогідно, інтерферуючих сполук, які присутні в концентраціях, у декілька разів вищих, ніж відсоткові аналіти. У методах газової хроматографії/масспектрометрії (ГХ/ МС) диференціація між різними конгенерами, такими як токсичні (наприклад, 17 2,3,7,8-заміщених ПХДД і ПХДФ та діоксиноподібних ПХБ) та інші конгенери, є обов'язковою. Біоаналіз повинен вибірково визначати значення ЕТ як сумарний вміст ПХДД, ПХДФ і діоксиноподібних ПХБ.

— **Висока точність (достовірність та прецизійність)**. Визначення має забезпечувати достовірну та надійну оцінку справжньої концентрації у зразку. Висока точність (точність вимірювання: подібність між результатом вимірювання та справжнім або заданим значенням вимірювання) є необхідною, щоб уникнути непогодження з результатом аналізу зразка на підставі низької достовірності оцінки ТЕ, Точність виражається як достовірність (різниця між середнім значенням, виміряним для аналіту в сертифікованій сировині та його сертифікованою оцінкою, що виражена як відсоток цієї оцінки) і як точність ($ВСВ_{В.}$ – відносне стандартне відхилення, яке обчислюється, використовуючи результати, отримані за умов відтворення)

Скринінгові методи можуть включати біопроби і методи ГХ/МС; підтверджувальними методами є методи газової хроматографії високого допуску та масс-спектрометрії високого допуску (ГХВД/МСВД):

Наступні критерії мають відповідати загальній значенню ТЕ:

	Скринінгові методи	Підтверджувальні методи
Частота помилкових негативних результатів	< 1 %	
Достовірність		від - 20 % до + 20 %
Точність $ВСВ_В$	< 30%	< 15%

6. **Особливі вимоги для методів ГХ/МС, яких слід дотримуватись для скринінгу і підтвердження**

— Необхідно додатково встановити внутрішні стандарти для речовин ^{13}C-маркованих 2,3,7,8-хлорозаміщених ПХДД/Ф та ^{13}C-маркованих діоксиноподібних ПХБ від самого початку або на початку застосування аналітичного методу, наприклад, перед екстракцією, з метою ухвалення аналітичної процедури. Необхідно додати принаймні один конгенер до кожної від тетра- до окта-хлорованої однорідної групи для ПХДД/Ф і принаймні один конгенер до кожної з однорідних груп для діоксиноподібних ПХБ (або принаймні один конгенер до кожної відібраної методом масс-спектрометрії функції запису іонів, що використовується для контролю ПХДД/Ф і діоксиноподібних ПХБ). Чітка перевага повинна надаватися, зокрема, у випадку підтверджувальних методів, використанню всіх 17 внутрішніх стандартів для ^{13}C-маркованих 2,3,7,8-хлорозаміщених ПХДД/Ф та всіх 12 внутрішніх стандартів для ^{13}C-маркованих діоксиноподібних ПХБ.

— Потрібно також визначити відносні фактори реакції для тих конгенерів, для яких ^{13}C-маркований аналог не додається, шляхом використання відповідних калібрувальних розчинів.

— Для кормів рослинного походження та тваринного походження, які містять менше, ніж 10% жиру, обов’язковим є додавання внутрішніх стандартів перед екстракцією. Для кормів тваринного походження, які містять більше, ніж 10% жиру, внутрішні стандарти можна додавати або перед екстракцією, або після екстракції жиру. Необхідно провести відповідне ухвалення ефективності екстракції залежно від стадії, на якій впроваджені внутрішні стандарти і від того, які надані результати щодо продукту або жиру.

— Перед аналізами ГХ/МС потрібно додати 1 або 2 стандарти відновлення (заміщення).

— Контроль за відновленням є обов’язковим. Для підтверджувальних методів відновлення окремих внутрішніх стандартів має бути в межах від 60% до 120%. Нижчі або вищі ступені відновлення для окремих конгенерів, зокрема, для деяких гепта- та окта-хлорованих дибензодіоксинів і дибензофуранів, є прийнятними за умови, що їхній вплив на значення ТЕ не перевищує 10% від загального значення ТЕ (що базується на сумі ПХДД/Ф та ПХБ). Для скринінгових методів відновлення має бути в межах від 30% до 140%.

— Відокремлення діоксинів від інтерферуючих хлорованих сполук, таких як недіоксиноподібні ПХБ та хлоровані дифенілові ефіри, необхідно проводити із застосуванням відповідних хроматографічних методів (бажано, з колонкою з флорізілом, окисом алюмінію та/або вуглеводом)

— Гастроматографічне відокремлення ізомерів має бути достатнім (<25% між амплітудами 1,2,3,4,7,8-ГкХДФ та 1,2,3,6,7,8-ГкХДФ).

— Визначення необхідно виконувати відповідно до методу EPA 1613, переглянутої версії B: Отримання від тетра- до окта-хлорованих діоксинів та фуранів шляхом ізотопного розведення при застосуванні методів ГХВД/МСВД або в інший спосіб з еквівалентними критеріями ефективності.

— Різниця між рівнем верхньої межі та рівнем нижньої межі не повинна перевищувати 20% для кормів із забрудненням діоксинами в межах або вище максимального рівня. Для кормів з рівнем забруднення меншим максимального рівня різниця може складати в межах від 25 до 40%.

7. **Скринінгові методи аналізу**

7.1. *Вступ*

При використанні скринінгового методу можливе застосування різних аналітичних підходів: чистий скринінговий підхід та кількісний підхід.

Скринінговий підхід

Реакцію зразків порівнюють з реакцією контрольного зразка на рівні відсотку. Зразки з меншою реакцією, ніж у контрольного зразка, називають негативними, зразки з більшою реакцією вважають позитивними. Вимоги:

— «Холостий» та а контрольний зразок(-и) необхідно включати в кожну серію випробування, їх отримують та випробовують одночасно в однакових умовах. Контрольний зразок має показувати чітко підвищену реакцію в порівнянні із «холостим».

— Додаткові контрольні зразки з рівнем відсотку 0,5x і 2x потрібно включати для демонстрації належної ефективності випробування в межах відсотку для контролю рівня відсотку.

— Під час випробування інших матриць повинна бути продемонстрована придатність контрольного(-их) зразка(-ів), переважно включаючи зразки, які при застосуванні методів ГХВД/МСВД показали, що вони мають рівень ТЕ близький до показника контрольного зразка, або «холостий» зразок закріпився на цьому рівні.

— Оскільки застосування жодних внутрішніх стандартів неможливо при виконанні біопроб, випробування на повторюваність результатів є дуже важливим для отримання інформації щодо відхилення від стандарту в рамках однієї серії випробування. Коефіцієнт варіації повинен бути нижче 30%.

— Для біопроб необхідно визначити цільові сполуки, можливі інтерферуючі речовини та максимально допустимі рівні «холостих» дослідів.

Кількісний підхід

Кількісний підхід вимагає серії стандартного розведення, подвійну або потрійну чистку та вимірювання, а також контроль «холостого» досліду та відновлення. Результат може бути вираженим у формі ТЕ, при цьому допускається, що сполуки, відповідальні за сигнал, відповідають принципу ТЕ. Це можна зробити, використовуючи ТХДД (або стандартну суміш діоксину/фурану/діоксиноподібного ПХБ) для створення калібрувальної кривої з метою обчислення рівня ТЕ в екстракті, а отже, і в зразку. Цей рівень потім виправляють на рівень ТЕ, підрахований для «холостого» зразку (беручи до уваги домішки розчинів та хімікатів, що використовуються), та для відновлення (підрахований на основі рівня ТЕ в зразку контролю якості по рівню відсотку). Важливо відзначити, що частина очевидних втрат при відновленні може бути наслідком дії матриць та/або різниць між значеннями ТЕ в біопробах та офіційними значеннями ТЕ, встановленими ВОЗ.

7.2. *Вимоги до методів аналізу, що використовуються для скринінгу*

— Методи аналізу ГХ/МС та біопроб можливо застосовувати для скринінгу. Для методів ГХ/МС слід застосовувати вимоги, викладені в пункті 6. Особливі вимоги для біопроб, взятих з одного елементу, викладені в пункті 7.3, а для біопроб, взятих з набору елементів – в пункті 7.4

— Інформація про кількість помилкових позитивних та помилкових негативних результатів великої партії зразків, рівень яких нижче або вище максимального або наявного рівня, є необхідною в порівнянні з вмістом ТЕ, що визначається підтверджувальним методом аналізу. Фактичний відсоток помилкових негативних результатів має бути нижче 1%. Відсоток помилково позитивних зразків має бути досить низьким, щоб використання інструменту скринінгу було ефективним.

— Позитивні результати необхідно завжди підтверджувати підтверджувальним методом аналізу (ГХВД/МСВД). Крім того, потрібно підтверджувати методами ГХВД/МСВД зразки з широкого спектру ТЕ (приблизно від 2% до 10% негативних зразків). Необхідно надавати інформацію про відповідність між результатами біопробного методу та методів ГХВД/МСВД.

7.3. *Спеціальні вимоги для біопроб, взятих з одного елементу*

— У випадку роботи з біопробами кожне випробування вимагає серію контрольних концентрацій ТХДД або суміші діоксину/фурану (повну криву залежності реакції від дози з $R^2 > 0,95$). Однак для скринінгу можна використовувати розтягнуту криву низького рівня для аналізу зразків низького рівня.

— Контрольну концентрацію ТХДД (приблизно 3 x обмеження у визначеній кількості), зазначену в таблиці контролю якості, потрібно використовувати для визначення результату біопробного методу за сталий проміжок часу. Альтернативою можна вважати відповідну реакцію контрольного зразка в порівнянні з калібрувальною прямою ТХДД, оскільки реакція елементів може залежати від багатьох факторів.

— Графіки контролю якості (КЯ) на кожний тип контрольного матеріалу потрібно вносити в звіт та перевіряти для впевненості, що результат відповідає встановленим рекомендаціям.

— Зокрема, для кількісних підрахувань індукція розведення зразка, що використовується, повинна бути в межах лінійної частини кривої реакції. Зразки, індукція яких знаходиться вище лінійної частини кривої реакції, повинні бути розбавлені та перевірені повторно. Тому принаймні три або більше послідовних розведень рекомендовано для випробувань.

— Відсоток стандартного відхилення не повинен становити більше 15 % у потрійному визначені для кожного зразка і не може становити більше 30% між трьома незалежними експериментами.

— Обмеження у виявлені можна встановити як 3х стандартного відхилення «холостого» досліду з розчинником або фонової реакції. Іншим підходом є застосування реакції, рівень якої вище фонової (індуктивний фактор 5 х «холостого» досліду з розчином), що обчислюється на основі калібрувальної кривої дня. Обмеження у визначенні кількості можливо встановити як 5 х - 6 х стандартне відхилення «холостого» досліду з розчином або рівня фонової реакції чи при застосуванні рівня вищого за фоновий (індуктивний фактор 10 х «холостого» досліду з розчином), що обчислюється на основі калібрувальної кривої дня.

7.4. *Спеціальні вимоги для біопроб, взятих з декількох елементів*

— Необхідно переконатися, що біопроби, взяті з декількох елементів, мають достатню чутливість та надійність для застосування у перевірці кормів.

— Необхідно виконувати інструкції виробника щодо підготовки зразка та проведення аналізів.

— Набір елементів для випробування не слід використовувати після закінчення строку дії.

— Матеріали чи компоненти, призначені для використання з іншими наборами елементів, не повинні використовуватись.

— Набір елементів потрібно зберігати при заданому діапазоні температур та використовувати при вказаній робочій температурі.

— Обмеження у виявлені для імунологічних аналізів визначається як сума середнього та 3х стандартного відхилення, що базується на 10 повторних аналізах «холостого» досліду, поділена на спадне значення лінійного рівняння регресії.

— Контрольні стандарти слід використовувати для проведення випробувань у лабораторії для впевненості в тому, що реактивність до стандарту знаходиться в прийнятних межах.

8. **Звітування про результати**

Якщо аналітична процедура, що використовується, дозволяє, аналітичні результати повинні містити рівні окремих конгенерів ПХДД/Ф і ПХБ з зазначенням нижньої, верхньої та середньої межі для внесення максимальної кількості інформації у звіт про результати і, таким чином, надаючи можливість аналізувати результати відповідно до спеціальних вимог.

Звіт має також включати вміст ліпідів зразка, а також метод, що використовується для екстракції ліпідів.

Необхідно оновлювати окремі внутрішні стандарти у випадку, якщо відновлення виходить за межі, зазначені в пункті 6, у випадку перевищення максимального рівня та за необхідністю в інших випадках.

Так як похибку вимірювання необхідно прийняти до уваги при вирішенні питання про відповідність зразка, цей параметр також повинна бути доступним. Таким чином, необхідно звітувати про аналітичні результати, такі як х +/- U, де х є аналітичним результатом, а U є розширеною невизначеністю вимірювань, з використанням коефіцієнта охоплення 2, який забезпечує рівень довіри приблизно 95%. У разі окремого визначення діоксинів і діоксиноподібних ПХБ сума припусканої розширеної невизначеності певних аналітичних результатів діоксинів і діоксиноподібних ПХБ повинна використовуватися для суми діоксинів і діоксиноподібних ПХБ.

Якщо похибка вимірювання буде прийматися до уваги, застосовуючи ССα (як описано в п. 1.2 цієї Частини Б), необхідно вказувати цей параметр.

ДОДАТОК VI

МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДОВИХ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ПРИ ОФІЦІЙНОМУ КОНТРОЛЮ КОРМІВ

Умови мікроскопічного виявлення, ідентифікації або оцінки складових тваринного походження в кормах

1. **Предмет та сфера застосування**

Ці умови слід застосовувати, коли виявлення складових тваринного походження (які визначаються як продукти переробки органів і частини тіла ссавців, птиці та риби) в кормах здійснюється за допомогою мікроскопічного дослідження в рамках узгодженої програми перевірки в області харчування тварин відповідно до Регламенту (ЄС) 882/2004 Європейського Парламенту і Ради ([1]). За умови, що методи, описані у цьому Додатку, використовуються у всіх офіційних випробуваннях, також можна провести друге випробування з використанням варіативних або альтернативних методів для того, щоб поліпшити виявлення деяких типів складових тваринного походження або додатково конкретизувати походження цих складових. Крім того, може бути використаний інший варіант протоколу при дослідженні деяких конкретних складових тваринного походження, таких як плазма або кістки в жирі (див. також п 9), за умови, що ці аналізи будуть виконані як додаткові, окрім аналізів, передбачених узгодженою програмою перевірки.

2. **Чутливість**

Залежно від характеру складових тваринного походження, в кормі може бути виявлена дуже невелика кількість (<0,1%).

3. **Принцип**

Для ідентифікації використовується репрезентативний зразок, взятий відповідно до положень, викладених в Додатку I, який пройшов відповідну підготовку. Наступний протокол є придатним для обробки сировини з низьким вмістом вологи. Корми з кількістю вологи вище 14% перед обробкою потрібно висушити (конденсувати). Спеціальні корми або кормова сировина (наприклад, жири, олія) потребують застосування спеціальної процедури (див. пункт 9). Складові тваринного походження визначаються на основі типових, ідентифікованих мікроскопічним аналізом характеристик (тобто м’язових волокон та інших частинок м’яса, хрящів, кісток, рогів, шерсти, щетини, крові, пір’я, яєчної шкаралупи, рибних кісток, луски). Ідентифікація повинна проводитися як на ситовій фракції (6.1), так і на концентрованому осаді (6.2) зразка.

4. **Реактиви**

4.1. *Заливні агенти*

4.1.1. Хлорадгідрат (водний, 60 % маса/об’єм)

4.1.2. Луг (NaOH 2,5 % маса/об’єм або KOH 2,5 % маса/об’єм) для ситових фракцій

4.1.3. Гас або гліцерин (в’язкість: 68-81) для мікроскопічних спостережень в осаді

4.2. *Промивні агенти*

4.2.1. Спирт, 96 %

4.2.2. Ацетон

4.3. *Концентруючий агент*

4.3.1. Тетрахлоретилен (густина 1,62)

([1]) OJ L 165, 30.4.2004 с. 1; виправлено OJ L 191, 28.5.2004, с. 1.

4.4. *Фарбуючі реагенти*

4.4.1. Розчин йоду/йодистого калію (розчиніть 2 г йодистого калію в 100 мл води і додайте 1 г йоду, часто збовтуючи)

4.4.2. Алізарин червоний (Розведіть 2,5 мл 1М соляної кислоти в 100 мл води і додайте 200 мг алізарину червоного до цього розчину)

4.4.3. Цистиновий реагент (2 г ацетату свинцю, 10 г NaOH/100 мл H_2O)

4.4.4. Розчин йоду/йодистого калію (розчиніть в 70 % етанолі)

4,5. *Відбілюючий реагент*

4.5.1 Комерційний розчин гіпохлориту натрію (9,6% активного хлору)

5. **Обладнання і аксесуари**

5.1. Аналітичні ваги (точність 0,01 г, крім концентрованого осаду: 0,001 г).

5.2. Матеріал для подрібнення (млини або ступки, особливо для сировини, що містить > 15% жиру для аналізу).

5.3. Сито, оснащене сіткою з квадратними осередками, шириною 0,50 мм максимум.

5.4. Роздільна воронка або склянка з конічним дном.

5.5. Стереомікроскоп (мінімум 40-разове збільшення).

5.6. Біологічний мікроскоп (мінімум 400-разове збільшення), прохідне або поляризоване світло.

5.7. Стандартний лабораторний посуд.

Все обладнання повинно бути ретельно очищене. Роздільна воронка та посуд повинні очищуватись в мийній машині. Сита потрібно почистити за допомогою щітки з жорсткими ворсинками.

6. **Процедура**

Гранульований корм може бути попередньо просіяний, якщо обидві фракції аналізуються як окрема проба.

Принаймні 50 г проби повинні оброблятися (обережно подрібнені, використовуючи відповідне шліфувальне обладнання (5.2), якщо необхідно досягти належної структури). З подрібненого матеріалу відберіть дві репрезентативні частини, одну для ситової фракції (принаймні 5 г) (6.1), а іншу - для концентрованого осаду (принаймні 5 г) (6.2). Забарвлення фарбуючими реагентами (6,3) може бути додатково застосовуване для визначення.

Для того, щоб вказати характер тваринних білків і походження часток, може бути використана система підтримки прийняття рішень, така як ARIES, і контрольні проби можуть бути задокументовані.

6.1. *Визначення компонентів тваринного походження в ситових фракціях*

Принаймні 5 г проби просівають через сито (5.3) на дві фракції

Ситова фракція(ї) з великими частками (або репрезентативна частина фракції) застосовується як тонкий шар на підходящій підкладці і просівають систематично під стереомікроскопом (5.5) при різних збільшеннях для складових тваринного походження.

Аналіз на предметному склі, зроблений ситовою фракцією(ями) з дрібними частинками, піддається систематичному огляду під біологічним мікроскопом (5.6) при різних збільшеннях для складових тваринного походження.

6.2. *Визначення компонентів тваринного походження з концентрованого осаду*

Принаймні 5 г (з точністю до 0,01 г) проби повинні бути перенесені в ділильну воронку або в склянку з конічним дном і оброблені, щонайменше, 50 мл тетрахлоретилену (4.3.1). Суміш необхідно постійно збовтувати або перемішувати.

— Якщо використовується закрита ділильна воронка, осад повинен залишитись для відстоювання протягом достатнього часу (принаймні, 3 хвилини), перш буде відокремлений. Збовтування необхідно повторити, а осад знову залишити відстоюватись принаймні на 3 хвилини. Осад знову необхідно відділити.

— Якщо використовується відкрита склянка, осад повинен відстоюватись протягом принаймні 5 хвилин до відокремлення.

Загальний осад висушують і зважують (з точністю до 0,001 г). Зважування необхідне тільки у випадку, коли потрібна оцінка. Якщо осад складається з безлічі великих часток, він може бути просіяний через сито (5.3) на дві фракції. Висушений осад необхідно дослідити на наявність компонентів кісток під стереомікроскопом (5.5) и біологічним мікроскопом (5.6)

6.3. *Використання заливальних речовин і фарбуючих реагентів.*

Мікроскопічне визначення компонентів тваринного походження може бути підтримане використанням спеціальних заливальних речовин і фарбуючих реагентів.

Хлоралгідрат (4.1.1): При ретельному нагріві клітинні структури можна бачити більш чітко, оскільки крохмальні зерна желатинизуються, а вміст небажаних клітин видаляється.

Луг (4.1.2): або гідроксид натрію, або гідроксид калію очищає матеріал корму, допомагаючи виявляти м’язові волокна, волосся та інші кератинові структури.

Парафінова олія та гліцерин (4.1.3): Компоненти кісток можуть бути добре визначені в даній заливальній речовині, тому що більшість лакун залишаються заповненими повітрям і відображаються як чорні діри розміром приблизно 5-15 мкм.

Розчин йоду/йодистого калію (4.4.1): Використовується для виявлення крохмалю (синє-фіолетовий колір) і білку (жовто-оранжевий колір). Розчини можуть бути розведені, якщо це необхідно.

Розчин алізарину червоного (4.4.2): Червоне/рожеве забарвлення кісток, рибних кісток та луски. Перед висушуванням осаду (див. розділ 6.2) загальний осад повинен бути перенесений в скляну пробірку і промитий двічі приблизно 5 мл спирту (4.2.1) (кожного раз, коли використовується вортекс, розчиннику необхідно дати час осісти протягом однієї хвилини, а потім його необхідно злити). Перед використанням цього фарбуючого реагенту осад повинен бути відбілений додаванням, щонайменше, 1 мл розчину гіпохлориту натрію (4.5.1). Реакція повинна продовжуватись протягом 10 хвилин. Трубка повинна бути заповнена водою, осад повинен осісти протягом 2-3 хвилин, а вода і зважені частинки повинні бути злиті. Осад необхідно промити ще двічі близько 10 мл води (коли використовується вортекс, дайте час осісти, а потім його необхідно злити). Необхідно додати від двох до 10 і більше крапель (залежно від кількості залишку) розчину алізарину червоного. Суміш необхідно збовтати, реакція повинна відбутися протягом кількох секунд. Пофарбований осад має бути двічі промитий приблизно 5 мл спирту (4.2.1), після цього, промийте його ацетоном (4.2.2) (кожного раз, коли використовується вортекс, розчиннику необхідно дати час осісти протягом однієї хвилини, а потім його необхідно злити). Після цього осад готовий для висушування.

Цистиновий реагент: (4.4.3): При помірному нагріванні, компоненти, що містять цистин (волосся, пір’я тощо), стають чорно-коричневими.

6.4. *Експертиза кормів, що, можливо, містять рибну муку*

Принаймні, одна вибірка повинна пройти експертизу ситом з дрібною фракцією і осадом тонкої фракції під біологічним мікроскопом (див. розділи 6.1 та 6.2).

Якщо мітка вказує, що інгредієнти включають рибне борошно або якщо присутність рибного борошна підозрюється чи виявлена під час початкової експертизи, принаймні, дві додаткових вибірки ситом з дрібною фракцією вихідної проби і загальна частка осаду повинні бути досліджені.

7. **Розрахунок і оцінка**

Держави-члени повинні гарантувати, що процедури, описані в цьому пункті, використовуються у випадках, коли проводиться офіційний аналіз з метою оцінки кількості (а не просто присутності) компонентів тваринного походження.

Розрахунок може бути зроблено, тільки якщо компоненти тваринного походження містять фрагменти кісток.

Кісткові фрагменти наземних теплокровних (тобто ссавців і птахів) можна відрізнити від різних видів рибних кісток на предметному склі за допомогою типових лакун. Частка компонентів тваринного походження в матеріалі проби оцінюється з урахуванням:

— розрахункової частки (% маси) кісткових фрагментів в концентрованому осаді, і

— частки (% маси) компонентів кістки тваринного походження.

Оцінка повинна бути заснована, щонайменше, на трьох (якщо це можливо) перевірках і, принаймні, на п'яти пунктах на одну перевірку. У комбікормі концентрований осад, як правило, містить не тільки кістки наземних тварин і рибні кісткові фрагменти, але й інші частинки з високою питомою вагою, наприклад, мінерали, пісок, здеревілі фрагменти рослин тощо.

7.1. Розрахункове значення процентного співвідношення фрагментів кісток

Фрагменти кісток наземних тварин, % = (S × c)/W

Риби кістки і масштабні фрагменти = (S × d)/W

(S = вага осаду (мг), c = поправочний коефіцієнт (%) для розрахункової частини кісток наземних тварин в осаді, d = поправочний коефіцієнт (%) для розрахункової частини риб'ячих кісток і масштабних фрагментів в осаді, W = вага проби матеріалу для осадження (мг)).

7.2. *Розрахункове значення компонентів тваринного походження*

Частка кістки в продуктах тваринного походження може сильно відрізнятися. (Відсоток кістки у випадку кісткової муки становить порядку 50%-60%, у випадку м'ясного борошна порядку 20%-30%, а у випадку борошна з рибних кісток і масштабного вмісту змінюється відповідно до категорії і походження рибного борошна, як правило, в порядку 10-20%).

Якщо тип тваринного борошна, присутнього у пробі, відомий, можна розрахувати вміст:

Розрахунковий вміст компонентів продуктів наземних тварин (%) = (S × c)/(W × f) × 100

Розрахунковий вміст компонентів рибних продуктів (%) = (S × d)/(W × f) × 100

(S = вага осаду (мг), c = поправочний коефіцієнт (%) для розрахункової частини кісткових компонентів наземних тварин в осаді, d = поправочний коефіцієнт (%) для розрахункової частини риб'ячих кісток і масштабних фрагментів в осаді, f = поправочний коефіцієнт на частку кістки в компонентах тваринного походження в досліджуваній пробі, W = вага проби матеріалу для осадження (мг)).

8. **Вираження результатів експертизи**

Звіт повинен містити, щонайменше, інформацію про наявність компонентів, отриманих з наземних тварин і від рибного борошна. Різні випадки мають бути представлені таким чином:

8.1. Щодо присутності компонентів, отриманих з наземних тварин:

- наскільки було можливим розрізнити із використанням мікроскопа, компонентів з походженням з наземних тварин в представленій пробі знайдено не було,

  або

- наскільки було можливим розрізнити із використанням мікроскопа, були знайдені компоненти з походженням з наземних тварин в представленій пробі,

8.2. і, у зв'язку з наявністю рибного борошна:

- наскільки було можливим розрізнити із використанням мікроскопа, компонентів з рибним походженням в представленій пробі знайдено не було,

  або

- наскільки було можливим розрізнити із використанням мікроскопа, були знайдені компоненти з рибним походженням в представленій пробі,

У разі якщо знайдені компоненти, отримані з риби або наземних тварин, в доповіді про результати експертизи, при необхідності, може також вказуватись оцінка кількості виявлених компонентів (x%, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % або > 5 %), докладний опис типу наземної тварини, якщо це можливо, і виявлені тваринні компоненти (м'язові волокна, хрящі, кістки, роги, волосся, щетина, пір'я, кров, яєчна шкаралупа, рибні кістки, кокциди).

У випадку, коли розраховується кількість компонентів тваринного походження, використаний поправочний коефіцієнт повинен бути вказаний.

У випадках, коли виявляються компоненти кісток наземних тварин, доповідь повинна містити додатковий пункт:

«Можливість того, що вищевказані компоненти є похідними від ссавців не може бути виключена».

Цей додатковий пункт не є необхідним у тих випадках, коли кісткові фрагменти наземних тварин були визначені як кісткові фрагменти птахів або ссавців.

9. **Факультативний протокол для аналізу жиру або масла**

Наступний протокол може бути використаний для аналізу жиру або масла:

— Якщо жир є твердим, його треба нагріти, наприклад, у мікрохвильовій печі до тих пір, поки він не перетвориться на рідину.

— Використовуючи піпетку, 40 мл жиру переноситься із дна проби до центрифужної пробірки.

— Центрифугуйте протягом 10 хвилин при 4000 обертах на хвилину

— Якщо жир є твердим після центрифугування, його треба нагріти у печі до тих пір, поки він не перетвориться на рідину. Повторіть центрифугування протягом 5 хвилин при 4000 обертах на хвилину

— Використовуючи невелику ложку або шпатель, перенесіть одну половину відфільтрованих домішок у невелику чашку Петрі або на предметне скло для мікроскопічного визначення можливого вмісту компонентів тваринного походження (волокна м'яса, пір'я, кісткові фрагментів, **...**). В якості заливальною речовини для мікроскопії рекомендується парафінова олія або гліцерин.

— Решта домішок використовуються для осідання, як описано у пункті 6.2.

Додаток VII

МЕТОД РОЗРАХУНКУ ЕНЕРГЕТИЧНОЇ ЦІННОСТІ КОРМУ ПТИЦІ

1. Метод розрахунку і вираження енергетичної цінності

Енергетична цінність комбікормів птиці повинна бути розрахована відповідно до формули, викладеної нижче, на основі процентних значень деяких аналітичних компонентів корму. Це значення має бути вираженим в мегаджоулях (МДж) метаболічної енергії (МЕ), скоригованої азотом на кілограм комбікорму:

МДж/кг МЕ = 0,1551 × % сирого протеїну + 0,3431 × % сирого жиру + 0,1669 × % крохмалю + 0,1301 × % загального цукру (виражений сахарозою).

2. **Допуски, застосовні до заявлених значень**

Якщо офіційний огляд показує невідповідність (збільшене або зменшене значення енергетичної цінності корму) між результатом інспекції та заявленою енергетичною цінністю, мінімальний допуск 0,4 МДж/кг МЕ дозволяється.

3. **Запис результатів**

Після застосування вищезгаданої формули, отриманий результату повинен містити одну цифру після коми.

4. **Методи відбору проб і аналізу**

Відбір проб комбікорму та визначення вмісту аналітичних компонентів, зазначених в методі розрахунку, повинні виконуватися згідно з методами відбору проб і аналізу Співтовариства для офіційного контролю корму, відповідно.

Нижчезгадане повинно застосовуватись:

— для визначення вмісту сирого жиру: Процедура B методу для визначення неочищених масел і жирів, викладених у частині H Додатку III.

— для визначення вмісту крохмалю: поляриметричний метод, викладений в частині L Додатку III.

ДОДАТОК VIII:

МЕТОДИ АНАЛІЗУ КОНТРОЛЮ ЗАБОРОНЕНИХ АБО ВЖЕ НЕ ДОЗВОЛЕНИХ ДОБАВОК У КОРМІ

Важливі примітки:

Більш чутливі методи аналізу, ніж методи аналізу, згадані у цьому додатку, можуть використовуватися для знаходження заборонених або вже не дозволених добавок у кормі.

Методи аналізу, згадані у цьому Додатку, повинні бути використані для цілей підтвердження.

А. ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЛБЕНЗОКВАТУ

7-бензілоксі-6-бутил-3-метоксикарбоніл-4-хінолон

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити рівень метилбензоквату в кормі. Межа кількісного визначення становить 1 мг/кг.

2. **Принцип**

Метилбензокват екстрагується із проби метанольним розчином метансульфокислоти. Екстракт очищується дихлорметаном за допомогою іонообмінної хроматографії, а потім знову дихлорметаном. Вміст метилбензоквату визначається зворотньо-фазовою високо-ефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) з УФ-детектором.

3. **Реактиви**

3.1. Дихлорметан

3.2. Метанол, еквівалентний шкалі ВЕРХ

3.3. Мобільна фаза ВЕРХ

Суміш метанолу (3.2) і води (еквівалент по шкалі ВЕРХ) 75 + 25 (об’єм + об’єм).

Відфільтруйте через 0,22 мкм фільтр (4,5) і дегазуйте розчин (наприклад, шляхом обробки ультразвуком протягом 10 хвилин).

3.4. Розчин метансульфокислоти, c = 2%

Розбавте 20,0 мл метансульфокислоти до 1 000 мл метанолом (3.2).

3.5. Розчин соляної кислоти, c = 10%

Розведіть 100 мл соляної кислоти (ρ_{20} 1,18 г/мл) до 1 000 мл водою.

3.6. Катіон-обмінна смола амберліту CG-120 (Na), сітка 100x200

Смоли попередньо обробляються перед використанням. Суспендуйте 100 г смоли 500 мл розчину соляної кислоти (3.5) і нагрійте на плиті до кипіння, постійно помішуючи. Дайте охолонути і відцідіть кислоту. Відфільтруйте через фільтрувальний папір у вакуумі. Двічі вимийте смолу 500 мл порціями води, а потім 250 мл метанолу (3.2). Промийте смолу додатковою порцією 250 мл метанолу і висушіть, пропустивши повітря через кек фільтрування. Зберігайте висушену смолу в пляшці з пробкою.

3.7. Стандартна речовина: чистий метилбензокват (7-бензілоксі-6-бутил-3-метоксикарбоніл-4-хінолон)

3.7.1. Похідний стандартний розчин метилбензоквату, 500 мкг/мл

Зважте з точністю до 0,1 мг 50 мг стандартної речовини (3.7), розчиніть в розчині метансульфокислоти (3,4) в градуйованій колбі об'ємом 100 мл, доведіть до позначки і перемішайте.

3.7.2. Проміжний стандартний розчин метилбензоквату, 50 мкг/мл

Перенесіть 5,0 мл похідного стандартного розчину метилбензоквату (3.7.1) в градуйовану колбу об'ємом 50 мл, доведіть до позначки метанолом (3.2) і перемішайте.

3.7.3. Калібрувальні розчини

Перенесіть 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 і 5,0 мл проміжного стандартного розчину метилбензоквату (3.7.2) в декілька градуйованих колб об'ємом 25 мл. Доведіть до позначки мобільною фазою (3.3) і перемішайте. Ці розчини мають концентрації 2,0 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 мкг/мл метилбензоквату відповідно. Ці розчини слід готувати безпосередньо перед використанням.

4. **Обладнання**

4.1. Лабораторний струшувач

4.2. Роторний плівковий випарник

4.3. Скляна колонка (250 мм × 15 мм), оснащена запірним краном і резервуаром приблизно 200 мл ємності

4.4. Обладнання ВЕРХ з перемінною довжиною хвиль ультрафіолетового детектора або діод-матричним детектором

4.4.1. Колонка для рідинної хроматографії: 300 мм × 4 мм, C_{18}, 10 мкм упаковка або еквівалент

4.5. Мембранний фільтр, 0,22 мкм

4.6. Мембранний фільтр, 0,45 мкм

5. **Процедура**

5.1. *Загальна інформація*

5.1.1. Контрольний корм повинен бути проаналізований, щоб гарантувати, що ні метилбензокват, ні інтерферуючі речовини не присутні.

5.1.2. Тест відновлення проводять шляхом аналізу контрольного корму, який був укріплений додаванням деякої кількості метилбензоквату, подібного до того, що присутній у пробі. Для зміцнення до рівня 15 мг/кг додайте 600 мкл похідного стандартного розчину (3.7.1) до 20 г контрольного корму, перемішайте і зачекайте 10 хвилин, перш ніж приступити до стадії екстракції (5.2).

Примітка: для цілей цього методу контрольний корм повинен бути того ж типу, що й проба, а результат аналізу на метилбензовкват повинен бути негативним.

5.2. *Екстрагування*

Зважте з точністю до 0,01 г приблизно 20 г підготовленої проби та перенесіть у конічну колбу об'ємом 250 мл. Додайте 100,0 мл розчину метансульфонової кислоти (3.4) і збовтуйте на обладнанні (4.1) протягом 30 хвилин. Відфільтруйте розчин через фільтрувальний папір і збережіть фільтрат для стадії розділу рідина-рідина (5.3).

5.3. *Розділ рідина-рідина*

Перенесіть в 500 мл ділильну воронку, яка містить 100 мл розчину соляної кислоти (3.5), 25,0 мл фільтрату, отриманого згідно з пунктом (5.2). Додайте 100 мл дихлорметану (3.1) у воронку і збовтуйте протягом однієї хвилини. Дозвольте шарам відокремитись і дозвольте нижньому шару (дихлорметану) витекти в круглу колбу об'ємом 500 мл. Повторіть екстракцію водної фази з двома додатковими 40 мл порціями дихлорметану і об'єднайте їх з першим екстрактом в круглій колбі. Випаруйте екстракт дихлорметану до сухості на роторному випарнику (4.2), що працює при зниженому тиску при 40 °C. Розчиніть залишок в від 20 до 25 мл метанолу (3.2), закрийте колбу пробкою і збережіть весь екстракт для іонно-обмінної хроматографії (5.4).

5.4. *Іоно-обмінна хроматографія*

5.4.1. Підготовка катіоно-обмінної колонни

Вставте затичку зі скловати у нижній кінець скляної колонни (4.3). Підготуйте суспензію 5,0 г обробленої катіоно-обмінної смоли (3.6) з 50 мл соляної кислоти (3.5), налийте в скляну колонну і дайте час осісти. Дозвольте надлишку кислоти вийти трохи вище поверхні смоли і промийте колонну водою, поки випуск не буде нейтральним на лакмусовому папірці. Перенесіть 50 мл метанолу (3.2) на колонну і дозвольте пройти до поверхні смоли.

5.4.2. Колонкова хроматографія

За допомогою піпетки, обережно перенесіть екстракт, отриманий згідно з пунктом (5.3), на колонну. Промийте круглу колбу двома порціями 5-10 мл метанолу (3.2) і перенесіть ці обмилки до колонки. Пропустіть екстракт до поверхні смоли і промийте колонну 50 мл метанолу, переконавшись, що швидкість потоку не перевищує 5 мл/хв. Злийте викиди. Змийте метилбензокват з колонки, використовуючи 150 мл розчину метансульфонової кислоти (3.4), і зберіть елюат колонки в конічну колбу об'ємом 250 мл.

5.5. *Розділ рідина-рідина*

Перенесіть елюат, отриманий згідно з пунктом (5.4.2), в 1-літрову ділильну воронку. Промийте конічну колбу 5-10 мл метанолу (3.2) і зберіть обмилки з вмістом ділильної воронки. Додайте 300 мл розчину соляної кислоти (3.5) і 130 мл дихлорметану (3.1). Збовтуйте протягом 1 хвилини і дозвольте фазам розділитись. Дозвольте нижньому шару (дихлорметан) витекти до круглої колби об'ємом 500 мл. Повторіть екстракцію водної фази з двома додатковими 70 мл порціями дихлорметану і об'єднайте ці екстракти з першим в круглій колбі.

Випаруйте екстракт дихлорметану до сухості на роторному випарнику (4.2), що працює при зниженому тиску при 40 °C. Розчиніть залишки у колбі з приблизно 5 мл метанолу (3.2) і кількісно перенесіть цей розчин у градуйовану колбу об'ємом 10 мл. Промийте круглу колбу двома додатковими порціями 1-2 мл метанолу і перенесіть їх у градуйовану колбу. Доведіть до позначки метанолом і перемішайте. Кратна частина фільтрується через мембранний фільтр (4.6). Залиште цей розчин для визначення ВЕРХ (5.6).

5.6. *Визначення ВЕРХ*

5.6.1. Параметри

Наступні умови пропонуються як керівні принципи, інші умови також можуть бути використані за умови, що вони дають еквівалентні результати:

— колонка рідинної хроматографії (4.4.1),

— Мобільна фаза ВЕРХ: суміш метанол-вода (3.3),

— швидкість потоку: від 1 до 1,5 мл/хв,

— довжина хвилі виявлення: 265 нм,

— Об'єм вприскування: від 20 до 50 мкл.

Перевірте стабільність хроматографічної системи, кілька разів вприснувши калібрувальний розчин (3.7.3), що містить 4 мкг/мл, поки постійні показники висоти піку або площі і утримування не будуть досягнуті.

5.6.2. Калібрувальна крива

Вприсніть кожен калібрувальний розчин (3.7.3) кілька разів і виміряйте висоту (площу) піку для кожної концентрації. Зобразіть калібрувальну криву, використовуючи середню висоту або площу піку калібрувального розчину як ординату і відповідні концентрації в мкг/мл як абсцису.

5.6.3. Розчин проби

Вприсніть екстракт проби (5.5) кілька разів, використовуючи той же об'єм, який був відібраний для калібрувального розчину, і визначте середню висоту (площу) піків метилбензоквату.

6. **Підрахунок результатів**

Визначте концентрації розчину проби в мкг/мл від середньої висоти (площі) піків метилбензоквату у розчині проби з посиланням на калібрувальну криву (5.6.2).

Вміст метилбензоквату w (мг/кг) проби визначається за формулою:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

де:

c = концентрація метилбензоквату у розчині проби мкг/мл,

m = вага тестової частини в грамах.

7. **Перевірка результатів**

7.1. *Ідентичність*

Ідентичність аналізованого матеріалу може бути підтверджена спільною хроматографією, або використовуючи діод-матричний детектор, за допомогою якого порівнюються спектри екстракту проби та калібрувального розчину (3.7.3), що містять 10 мкг/мл.

7.1.1. Сумісна хроматографія

Екстракт проби укріплюється шляхом додавання відповідної кількості проміжного стандартного розчину (3.7.2). Кількість доданого метилбензоквату має бути подібною до приблизного обсягу метилбензоквату в екстракті проби.

Тільки висота піку метилбензоквату повинна бути посилена після зауваження як доданої суми, так і розбавлення екстракту. Ширина піку, на половині його максимальної висоти, повинна бути в межах приблизно 10% від похідної ширини.

7.1.2. Діодно-матричне детектування

Результати обчислюються за такими критеріями:

(a) довжина хвилі максимальної абсорбції проби і стандартні спектри, записані на апексі піку на хроматограмі, також мають бути в межах, визначених вирішенням потужності системи виявлення. Для діод-матричного детектування, це значення зазвичай знаходиться в межах приблизно 2 нм;

(b) між 220 та 350 нм проба і стандартні спектри, записані на апексі піку на хроматограмі, не повинні відрізнятися у тих частинах спектру, що знаходяться в межах діапазону від 10% до 100% відносної абсорбції. Цей критерій виконується, коли присутні такі ж максимальні значення, і відхилення, що перевищують 15% абсорбції стандартного аналізованого матеріалу, не спостерігається в жодній точці між двома спектрами;

(c) між 220 та 350 нм спектри підйому, апексу та спуску піку, що виробляється екстрактом проби, не повинні відрізнятися один від одного у тих частинах спектру, що знаходяться в межах діапазону від 10% до 100% відносної абсорбції. Цей критерій виконується, коли присутні такі ж максимальні значення і коли відхилення, що перевищують 15% абсорбції спектру апексу, не спостерігається в жодній точці між спектрами;

Якщо один із наведених нижче критеріїв не виконується, присутність аналізованого матеріалу не підтверджена.

7.2. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, отриманих з використанням тієї ж проби, не повинна перевищувати: 10% відносно високого результату для вмісту метилбензоквату від 4 до 20 мг/кг.

7.3. *Відновлення*

Для укріпленої контрольної проби відновлення повинне бути не менше 90%.

8. **Результати спільного дослідження**

П’ять проб були проаналізовані в 10 лабораторіях. Кожну пробу перевіряли двічі.

	Контроль	Мука 1	Гранула 1	Мука 2	Гранула 2
Середнє арифметичне [мг/кг]	Не виявлено	4,50	4,50	8,90	8,70
sr [мг/кг]	—	0,30	0,20	0,60	0,50

	Контроль	Мука 1	Гранула 1	Мука 2	Гранула 2
CV_r *[%]*	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s [мг/кг]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R *[%]*	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Відновлення [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = не виявлено

s_r = стандартне відхилення повторюваності

CV_r = коефіцієнт варіації повторюваності, %

s_R = стандартне відхилення відтворюваності

CV_R = коефіцієнт варіації відтворюваності, %

В. ВИЗНАЧЕННЯ ОЛАКВІНДОКСУ

2-[N-2'-(гідроксіетил)карбамоїл]-3-метілхіноксалін-N\N^4-діоксид

1. **Мета і зміст**

Цей метод дає можливість визначити рівень олаквіндоксу в кормі. Обмеження кількісної оцінки становить 5 мг/кг.

2. **Принцип**

Проба екстрагується сумішшю води і метанолу. Вміст олаквіндоксу визначається зворотньо-фазовою високо-ефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ), використовуючи УФ-детектор.

3. **Реактиви**

3.1. Метанол.

3.2. Метиловий спирт, еквівалент за класифікацією ВЕРХ.

3.3. Вода, еквівалентна шкалі ВЕРХ.

3.4. Мобільна фаза для ВЕРХ.

Суміш вода (3.3)-метанол (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Стандартна речовина: чистий олаквіндокс 2-[N-2'-(гідроксіетил)карбамоїл]-3-метілхіноксалін-N^1, N^4 - діоксид, E 851.

3.5.1. Похідний стандартний розчин олаквіндоксу, 250 мкг/мл

Зважте з точністю до 0,1 мг 50 мг олаквіндоксу (3.5) у градуйованій колбі об'ємом 200 мл і додайте приблизно 190 мл води. Потім помістіть колбу на 20 хвилин в ультразвукову ванну (4.1). Після ультразвукової обробки доведіть розчин до кімнатної температури, доведіть до позначки водою і перемішайте. Загорніть колбу алюмінієвою фольгою і помістіть в холодильник. Цей розчин повинен бути свіжопідготовленим кожного місяця.

3.5.2. Проміжний стандартний розчин олаквіндоксу, 25 мкг/мл

Перенесіть 10,0 мл похідного стандартного розчину (3.5.1) в градуйовану колбу об'ємом 100 мл, доведіть до позначки мобільною фазою (3.4) і перемішайте. Загорніть колбу алюмінієвою фольгою і помістіть в холодильник. Цей розчин повинен бути свіжопідготовленим кожного дня.

3.5.3. Калібрувальні розчини

В серію градуйованих колб об'ємом 50 мл перенесіть 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 та 20,0 мл проміжного стандартного розчину (3.5.2). Доведіть до позначки мобільною фазою (3.4) і перемішайте. Загорніть колбу алюмінієвою фольгою. Ці розчини відповідають 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 та 10,0 мкг олаквіндоксу на мл відповідно.

Ці розчини повинні бути свіжопідготовленими кожного дня.

4. **Обладнання**

4.1. Ультразвукова ванна

4.2. Механічний класифікатор

4.3. Обладнання ВЕРХ з перемінною довжиною хвиль ультрафіолетового детектора або діод-матричним детектором

4.3.1. Колонка рідинної хроматографії 250 мм × 4 мм, C_{18}, 10 мкм упаковка або еквівалент

4.4. Мембранний фільтр, 0,45 мкм

5. **Процедура**

Примітка: Олаквіндокс є світлочутливим. Виконуйте всі процедури під приглушеним світлом або використовуйте посуд янтарного кольору.

5.1. *Загальна інформація*

5.1.1. Контрольний корм повинен бути проаналізований, щоб гарантувати, що ні олаквіндокс, ні інтерферуючі речовини не присутні.

5.1.2. Тест відновлення проводять шляхом аналізу контрольного корму, який був укріплений додаванням деякої кількості олаквіндоксу, подібного до того, що присутній у пробі. Для зміцнення на рівні 50 мг/кг перенесіть 10,0 мл похідного стандартного розчину (3.5.1) у конічну колбу об'ємом 250 мл і випаруйте розчин до прибл. 0,5 мл. Додайте 50 г чистого корму, ретельно перемішайте і залиште на 10 хв., знову перемішавши кілька разів, перш ніж приступити до стадії екстракції (5.2).

Примітка: Для цілей цього методу, контрольний корм повинен бути того ж типу, що й проба, а результат аналізу на олаквіндокс повинен бути негативним.

5.2. *Екстрагування*

Зважте з точністю до 0,01 г приблизно 50 г проби. Перенесіть до конічної колби об'ємом 1 000 мл, додайте 100 мл метилового спирту (3.1) і помістіть колбу на 5 хв. в ультразвукову ванну (4.1). Додайте 410 мл води і залиште в ультразвуковій ванні на додаткові 15 хв., вийміть колбу з ультразвукової ванночки, збовтуйте протягом 30 хв. на класифікаторі (4.2) і відфільтруйте через складений фільтр. Перенесіть 10,0 мл фільтрату в градуйовану колбу об'ємом 20 мл, доведіть до позначки водою і перемішайте. Кратна частина фільтрується через мембранний фільтр (4.4). (див. Спостереження 9.) Переходьте до визначення ВЕРХ (5.3).

5.3. *Визначення ВЕРХ*

5.3.1. Параметри:

Наступні умови пропонуються як керівні принципи, інші умови також можуть бути використані за умови, що вони дають еквівалентні результати.

Аналітична колонка
(4.3.1)
Мобільна фаза (3.4): суміш вода (3.3)-метанол (3.2), 900 + 100 (V + V).
Швидкість потоку: 1,5-2 мл/хв.
Довжина хвилі виявлення: 380 нм
Об'єм введеної проби: від 20 до 100 мкл.

Перевірте стабільність хроматографічної системи, кілька разів вприснувши калібрувальний розчин (3.5.3), що містить 2,5 мкг/мл, поки постійні показники висоти і утримування піку не будуть досягнуті.

5.3.2. Калібрувальна крива

Вприсніть кожен калібрувальний розчин (3.5.3) кілька разів і визначте середню висоту (площу) піку для кожної концентрації. Зобразіть калібрувальну криву, використовуючи середню висоту (площу) піку калібрувального розчину як ординату і відповідні концентрації в мкг/мл як абсцису.

5.3.3. Розчин проби

Вприсніть екстракт проби (5.2) кілька разів, використовуючи той же об'єм, що був відібраний для калібрувального розчину, і визначте середню висоту (площу) піків олаквіндоксу.

6. **Підрахунок результатів**

З середньої висоти (площі) піків олаквіндоксу розчину проби визначте концентрацію розчину проби в мкг/мл з посиланням на калібрувальну криву (5.3.2).

Вміст олаквіндоксу w в мг/кг проби визначається за формулою:

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

де:

c = концентрації олаквіндоксу екстракту проби (5.2) в мкг/мл

m = вага тестової частини в грамах (5.2).

7. **Перевірка результатів**

7.1. *Ідентичність*

Ідентичність аналізованого матеріалу може бути підтверджена спільною хроматографією, або використовуючи діод-матричний детектор, за допомогою якого порівнюються спектри екстракту проби (5.2) та калібрувального розчину (3.5.3), що містять 5,0 мкг/мл.

7.1.1. Сумісна хроматографія

Екстракт проби (5.2) укріплюється шляхом додавання відповідної кількості калібрувального розчину (3.5.3). Кількість доданого олаквіндоксу має бути схожа на обсяг олаквіндоксу, визначеного в екстракті проби.

Тільки висота піку олаквіндоксу повинна бути посилена після зауваження як доданої суми, так і розбавлення екстракту. Ширина піку, на половині своєї висоти, має бути в межах ± 10% від похідної ширини піку олаквіндоксу неукріпленого екстракту проби.

7.1.2. Діод-матричне детектування

Результати обчислюються за такими критеріями:

(a) Довжина хвилі максимальної абсорбції проби і стандартні спектри, записані на апексі піку на хроматограмі, також мають бути в межах, визначених вирішенням потужності системи виявлення. Для діод-матричного детектування це значення зазвичай знаходиться в межах ± 2 нм.

(b) Між 220 та 400 нм проба і стандартні спектри, записані на апексі піку на хроматограмі, не повинні відрізнятися у тих частинах спектру, що знаходяться в межах діапазону від 10% до 100 % відносної абсорбції. Цей критерій виконується, коли присутні такі ж максимальні значення і відхилення, що перевищує 15% абсорбції стандартного аналізованого матеріалу, не спостерігається в жодній точці між двома спектрами.

(c) Між 220 та 400 нм спектри підйому, апексу та спуску піку, що який виробляється екстрактом проби, не повинні відрізнятися один від одного у тих частинах спектру, що знаходяться в межах діапазону від 10% до - 100 % відносної абсорбції. Цей критерій виконується, коли присутні такі ж максимальні значення і коли відхилення, що перевищує 15% абсорбції спектру апексу піку, не спостерігається в жодній точці між спектрами;

Якщо один із наведених нижче критеріїв не виконується, присутність аналізованого матеріалу не підтверджена.

7.2. *Повторюваність*

Різниця між результатами двох паралельних визначень, проведених на тій самій пробі, не має перевищувати 15% відносно високого результату аналізу на вміст олаквіндоксу в межах від 10 до 200 мг/кг.

7.3. *Відновлення*

Для укріпленого контрольної проби відновлення повинне бути не менше *90 %*.

8. **Результати спільного дослідження**

ЄК було організоване спільне дослідження, в якому було проаналізовано чотири проби корму для поросят, в тому числі одна холоста проба корму, 13 лабораторіями. Результати наведені нижче:

	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
L	13	10	11	11
N	40	40	44	44
середнє [мг/кг]	—	14,6	48,0	95,4
$S_П$ [мг/кг]	—	0,82	2,05	6,36
$S_В$ [мг/кг]	—	1,62	4,28	8,42
$CV_П$ [%]	—	5,6	4,3	6,7
$CV_В$ [%]	—	11,1	8,9	8,8
Номінальний вміст [мг/кг]	—	15	50	100
відновлення %	—	97,3	96,0	95,4

L = кількість лабораторій

n = кількість окремих значень

S_r = стандартне відхилення повторюваності

S_R = стандартне відхилення відтворюваності

$CV_П$ = коефіцієнт варіації повторюваності

$CV_В$ = коефіцієнт варіації відтворюваності.

9. **Результати спостереження**

Хоча метод не був підтверджений для кормів, що містять більше 100 мг/кг олаквідоксу, отримання задовільних результатів є можливим беручи меншу вагу проби та / або розбавляючи екстракт (5.2) до концентрації в межах калібровального графіку (5.3.2).

C. ВИЗНАЧЕННЯ АМПРОЛІУМУ

1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridinium chloride hydrochloride

1. **Мета та зміст**

Цей метод дозволяє визначити рівень ампроліуму в кормах і преміксах. Межа виявлення становить 1 мг/кг, межа кількісного значення 5 мг/кг.

2. **Принцип**

Пробу екстрагують сумішшю метанолу і води. Після розчинення в рухомій фазі і фільтрації мембрани вміст ампроліуму визначається катіонообмінною високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) з використанням УФ-детектора.

3. **Реагенти**

3.1. Метанол.

3.2. Ацетоннітрил, еквівалентно до шкали ВЕРХ.

3.3. Вода, еквівалентно до шкали ВЕРХ.

3.4. Натрію дигідрофосфату розчин, c = 0,1 моль/л.

Розчинити 13,80 г дигідрофосфату натрію моногідрату у воді (3,3) в мірній колбі об’ємом 1000 мл, наповнити до позначки водою (3.3) і перемішати.

3.5. Перхлорату натрію розчин, c = 1,6 моль/л.

Розчинити 224,74 г перхлорату натрію моногідрату у воді (3.3) в мірній колбі об'ємом 1000 мл, наповнити до позначки водою (3.3) і перемішати.

3.6. Мобільна фаза для ВЕРХ (див. зауваження 9.1).

Суміш ацетонітрилу (3.2), розчину натрію дигідрофосфату (3.4) і розчину перхлорату натрію (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Перед використанням профільтруйте через 0,22 мкм мембранний фільтр (4.3) і дегазуйте розчин (наприклад, в ультразвуковій ванні (4.4) щонайменше 15 хвилин).

3.7. Стандартна речовина: чистий ампроліум, 1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridinium chloride hydrochloride, E 750 (дивитись 9.2).

3.7.1. Ампроліуму маточний стандартний розчин, 500 мкг/мл

Зважити з точністю до 0,1 мг, 50 мг ампроліуму (3.7) в мірну колбу об'ємом 100 мл, розчинити в 80 мл метанолу (3.1) і помістити колбу на 10 хв. в ультразвукову ванну (4.4). Після ультразвукової обробки довести розчин до кімнатної температури, наповнити до мітки водою і перемішати. При температурі ≤ 4 °C розчин стабільний протягом 1 місяця.

3.7.2. Ампроліуму проміжний стандартний розчин, 50 мкг/мл

Внести 5,0 мл базового стандартного розчину (3.7.1) в мірну колбу об'ємом 50 мл, довести до відмітки екстракційним розчинником (3.8) і перемішати. При температурі ≤ 4 °C розчин стабільний протягом 1 місяця.

3.7.3. Калібрувальні розчини

Перенести 0,5, 1,0 і 2,0 мл проміжного стандартного розчину (3.7.2) в ряд градуйованих колб об'ємом 50 мл. Наповнити до позначки рухомою фазою (3.6) і перемішати. Ці розчини відповідають 0,5, 1,0 і 2,0 мкг на мл ампроліуму, відповідно. Ці розчини повинні бути свіжо приготовані перед використанням.

3.8. Екстракційний розчинник.

Суміш метанолу (3.1) і води 2 + 1 (V + V).

4. **Обладнання**

4.1. Обладнання ВЕРХ з системою впорскування, з обсягами закачування в 100 мкл.

4.1.1. Рідинна хроматографічна колонка 125 мм × 4 мм, катіонообмінний Nucleosil 10 C.A., 5 або 10 мкм упаковка, або еквівалент.

4.1.2. УФ-детектор зі регулюванням змінних довжин хвиль або з детектором на діодній матриці.

4.2. Мембранний фільтр, матеріал ПТФЕ, 0,45 мкм.

4.3. Мембранний фільтр, 0,22 мкм.

4.4. Ультразвукова ванна.

4.5. Механічний змішувач або магнітна мішалка.

5. **Процедура**

5.1. *Загальне*

5.1.1. Холоста проба корму

Для виконання тесту відновлення (5.1.2) холоста проба корму повинна бути проаналізована, щоб переконатися, що ні ампроліум, ні сторонні речовини не присутні. Холоста проба корму повинна бути за типом як і проба, і ампроліум або сторонні речовини не повинні бути виявлені.

5.1.2. Тест відновлення

Тест відновлення проводять шляхом аналізу холостої проби корму, збагаченої додаванням деякої кількості ампроліуму, аналогічного наявному у пробі. Для збагачення на рівні 100 мг/кг, перенести 10,0 мл базового стандартного розчину (3.7.1) в конічну колбу об'ємом 250 мл і випаровувати розчин до приблизно 0,5 мл. Додати 50 г холостої проби корму, ретельно перемішати і залишити на 10 хв., змішувати знову кілька разів перш ніж приступити до стадії екстракції (5.2).

В якості альтернативи, якщо холоста проба корму, схожа на типу до проби, не доступна (5.1.1), тест відновлення може бути виконаний за допомогою стандартного методу складання. У цьому випадку проба для аналізу збагачується деякою кількістю ампроліуму аналогічного наявному в пробі. Дану пробу аналізують разом з незбагаченою пробою і відновлення може бути розраховане шляхом вирахування.

5.2. *Екстрагування*

5.2.1. Премікси (вміст < 1 % ампроліуму) і корми

Зважити з точністю до 0,01 г, 5-40 г проби залежно від вмісту ампроліуму в конічну колбу об'ємом 500 мл і додати 200 мл екстракційного розчинника (3.8). Помістити колбу в ультразвукову ванну (4.4) і залишити на 15 хвилин. Вийняти колбу з ультразвукової ванни і трусити її протягом 1 год в змішувачі або перемішати в магнітній мішалці (4.5). Розвести аліквотну частину екстракту з мобільною фазою (3.6) до вмісту ампроліуму в 0,5-2 мкг/мл і перемішати (див зауваження 9.3). Профільтрувати 5-10 мл цього розведеного розчину на мембранному фільтрі (4.2). Приступити до визначення ВЕРХ (5.3).

5.2.2. Премікси (вміст ≥ 1 % ампроліуму)

Зважити з точністю до 0,001 г, 1-4 г попередньо приготованої суміші в залежності від вмісту ампроліуму в конічну колбу об'ємом 500 мл і додати 200 мл екстракційного розчинника (3.8). Помістити колбу в ультразвуковій ванні (4.4) і залишити на 15 хвилин. Вийняти колбу з ультразвукової ванни і трусити її протягом 1 год на мішалці або перемішати на магнітній мішалці (4.5). Розвести аліквоту екстракту з рухомою фазою (3.6) до вмісту ампроліуму в 0,5-2 мкг/мл і перемішати. Профільтрувати 5-10 мл цього розведеного розчину на мембранному фільтрі (4.2). Приступити до визначення ВЕРХ (5.3).

5.3. *Визначення ВЕРХ*

5.3.1. Параметри:

Наступні умови пропонуються для ознайомлення, інші умови можуть бути використані за умови, що вони дають еквівалентні результати.

Колонка рідинної хроматографії (4.1.1):	125 мм × 4 мм, катіонообмінний Nucleosil 10 C.A., 5 або 10 мкм упаковка або еквівалент
Рухома фаза (3.6):	Суміш ацетонітрилу (3.2), розчину натрію дигідрофосфат (3.4) і розчину перхлорат натрію (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V).
Витрата:	0,7-1 мл/хв
Довжина хвилі детектування:	264 нм
Обсяг вприскування:	100 мкл

Перевірити стійкість хроматографічної системи, впорскуючи кілька разів калібрувальний розчин (3.7.3) місткістю 1,0 мкг/мл до досягнення стабільної висоти піків і часу утримування.

5.3.2. Калібрувальний графік

Вводьте кожен калібрувальний розчин (3.7.3) кілька разів і визначте середні висоти піків (зони) для кожної концентрації. Накресліть калібрувальний графік, використовуючи середні висоти піків (зон) калібрувальних розчинів як ординат і відповідні концентрації в мкг/мл як абсцис.

5.3.3. Розчин проби

Вводьте екстракт проби (5.2) декілька разів, використовуючи такий же обсяг, що і для калібрувальних розчинів, і визначте середню висоту піка (зону) ампроліумних піків.

6. **Розрахунок результатів**

Із середньої висоти (зон) ампроліумних піків розчину проби визначити концентрацію розчину проби в мкг/мл з посиланням на калібрувальний графік (5.3.2)

Вміст ампроліуму w в мг/кг проби визначається наступною формулою:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \quad [мг/кг]$$

де:

V = об'єм екстракційного розчинника (3.8) в мл відповідно до 5.2 (тобто 200 мл)

c = концентрація ампроліуму в екстракту проби (5.2) в мкг / мл

f = коефіцієнт розбавлення відповідно до 5.2

m = вага аналізованої проби в г.

7. Перевірка результатів

7.1. *Ідентичність*

Ідентичність аналіту може бути підтверджено шляхом спільної хроматографії або використовуючи діод-матричний детектор, за допомогою чого порівнюються спектри екстракту проби (5.2) і калібрувального розчину (3.7.3) місткістю 2,0 мкг/мл.

7.1.1. Спільна хроматографія

Екстракт проби (5.2) збагачується шляхом додавання відповідної кількості калібрувального розчину (3.7.3). Кількість доданого ампроліуму повинна дорівнювати кількості ампроліуму, знайденого у екстракті проби.

Тільки висота піку ампроліуму може наростати після прийняття до уваги як кількості додавання, так і розчинення екстракту. Ширина піку на половині його висоти повинна бути в межах ± 10% від початкової ширини піку ампроліуму незбагаченого екстракту проби.

7.1.2. Діодно-матричне виявлення

Результати оцінюють у відповідності з наступними критеріями:

(a) Довжина хвилі максимального поглинання проби і стандартного спектру, записаного на піку вершини хроматограми, повинна бути такою ж в межах краю, обумовленого роздільною здатністю системи виявлення. Для діодно-матричного виявлення, зазвичай, це в межах ± 2 нм.

(b) Між 210 і 320 нм проба і стандартні спектри, записані на піку вершини хроматограми, не повинні бути різними для частин спектра в діапазоні 10% -100% відносної оптичної щільності. Цей критерій виконується, якщо одинакові максимуми присутні і в жодній спостережуваній точці відхилення між двома спектрами не перевищує 15% від оптичної щільності стандартного аналіту.

(c) Між 210 і 320 нм, спектри наростання, вершина і низ піку виробленого екстрактом проби не повинні відрізнятися один від одного щодо частин спектра в діапазоні 10% -100% відносної оптичної щільності. Цей критерій виконується, коли одинакові максимуми присутні і у всіх спостережних точках відхилення між спектрами не перевищує 15% оптичної щільності спектра піку вершини..

Якщо один з цих критеріїв не виконується, то наявність аналіту не була підтверджена..

7.2. *Стабільність*

Різниця між результатами двох паралельних аналізів, проведених на тій же пробі, не повинна перевищувати::

— 15% по відносно більшого значення для вмісту ампроліуму від 25 мг/кг до 500 мг/кг,

— 75 мг/кг для вмісту ампроліуму між 500 мг/кг і 1000 мг/кг,

— 7,5% відносно більшого значення для вмісту ампроліуму більше 1000 мг/кг.

7.3. *Відновлення*

Для збагаченої (холостої) проби відновлення має бути не менше 90%.

8. **Результати спільного дослідження**

Було організовано спільне дослідження, в якому проаналізовано три види корму для птиці (проба 1-3), один мінеральний корм (проба 4) і один премікс (проба 5). Результати наведені в наступній таблиці:

	Проба 1 (холоста)	Проба 2	Проба 3	Проба 4	Проба 5
L	14	14	14	14	15
N	56	56	56	56	60
середнє [мг/кг]	—	45,5	188	5 129	25 140
$S_п$ [мг/кг]	—	2,26	3,57	178	550
CVп *[%]*	—	4,95	1,90	3,46	2,20
$s_в$ [мг/кг]	—	2,95	11,8	266	760
$CV_в$ [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Номінальна вміст [мг/кг]		50	200	5 000	25 000

L = кількість лабораторій

n = число окремих значень

$s_п$ = стандартне відхилення повторюваності

$CV_п$ = коефіцієнт варіації повторюваності

$S_в$ = стандартне відхилення відтворюваності

$CV_в$ = коефіцієнт варіації відтворюваності.

9. **Спостереження**

9.1. Якщо проба містить тіамін, пік тіаміну на хроматограмі з'являється незадовго до піку ампроліуму. Слідуючи цьому методу ампроліум і тіамін повинні бути розділені. Якщо ампроліум і тіамін не розділені колонкою (4.1.1), яка використовується в даному способі, замінити до 50% порції ацетонітрилу рухомої фази (3.6) метанолом.

9.2. За даними Британської Фармакопеї, спектр розчину ампроліуму (c = 0,02 моль/л) в соляній кислоті (C = 0,1 моль/л) демонструє максимуми на 246 нм і 262 нм. Оптична щільність має становити 0,84 на 246 нм і 0,80 на 262 нм.

9.3. Екстракт завжди повинен бути розведений з рухомою фазою, оскільки в іншому випадку час утримання піку ампроліуму може значно зміщуватися у зв'язку зі зміною іонної сили.

D. ВИЯВЛЕННЯ КАРБАДОКСУ

Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate N^1,N^4-dioxide

1. **Призначення та сфера**

Цей метод дозволяє визначити рівень карбадоксу в кормах, преміксах, і препаратах. Межа виявлення становить 1 мг/кг. Кількісна межа становить 5 мг/кг.

2. **Принцип**

Проба відстоюється водою і виділяється метанол-ацетонітрилом. Для корму порція аліквоти відфільтрованого екстракту піддається очищенню на колонці оксиду алюмінію. Для преміксів і препаратів порція аліквоти відфільтрованого екстракту розбавляють до відповідної концентрації з водою, метанолом і ацетонітрилом. Зміст карбадоксу визначається обернено-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) з використанням УФ-детектора.

3. **Реагенти**

3.1. Метанол.

3.2. Ацетоннітрил, еквівалентно до шкали ВЕРХ.

3.3. Оцтова кислота, W = 100%.

3.4. Оксид алюмінію: нейтральний, коефіцієнт активності I.

3.5. Метанол-ацетонітрил 1 + 1 (v + v).

Змішати 500 мл метанолу (3.1) з 500 мл ацетонітрилу (3.2).

3.6. Оцтова кислота, σ = 10 %.

Розбавити 10 мл оцтової кислоти (3.3) в 100 мл води.

3.7. Ацетат натрію..

3.8. Вода, еквівалентна ВЕРХ.

3.9. Ацетатний буферний розчин, c = 0,01 моль/л, pH = 6,0.

Розчинити 0,82 г ацетату натрію (3.7) в 700 мл води (3.8) і відрегулювати pH до 6,0 за допомогою оцтової кислоти (3.6). Перемістити в мірну колбу об'ємом 1000 мл, заповнити до мітки водою (3.8) і перемішати.

3.10. Рухома фаза для ВЕРХ..

Змішайте 825 мл буферного розчину ацетату (3.9) з 175 мл ацетонітрилу (3.2).

Профільтрувати через0,22 мкм фільтр (4.5) і дегазувати розчин (наприклад, шляхом ультразвукової обробки протягом 10 хвилин).

3.11. Стандартна речовина.

Чистий карбадокс: Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate N^1,N^4-dioxide, E 850.

3.11.1. Карбадокс у складі стандартної речовини, 100 мкг/мл (див Примітка 5 Порядоку):

Зважити з точністю до 0,1 мг 25 мг карбадоксу стандартної речовини (3.11) в мірну колбу об'ємом 250 мл. Розчинити в суміші метанол-ацетонітрилу (3,5) ультразвуком (4.7). Після ультразвукової обробки довести розчин до кімнатної температури, наповнити до позначки метанол-ацетонітрилом (3.5) і перемішати. Обгорнути колбу алюмінієвою фольгою або використати бурштиновий скляний посуд і зберігати в холодильнику. При температурі ≤ 4 °C розчин стабільний протягом 1 місяця.

3.11.2. Калібрувальні розчини

Помістити 2,0, 5,0, 10,0 і 20,0 мл стандартного розчину (3.11.1) в ряд каліброваних колб об'ємом 100 мл. Додати 30 мл води, наповнити до позначки метанол-ацетонітрилом (3.5) і перемішати. Обгорнути колби алюмінієвою фольгою. Ці розчини відповідають відповідно 2,0, 5,0, 10,0 і 20,0 мкг/мл карбадоксу.

Калібрувальні розчини повинні бути свіжоприготовленими перед використанням.

Примітка: Для визначення карбадоксу в кормі міститю менше 10 мг / кг, калібрувальні розчини повинні бути концентрацією нижче 2,0 мкг / мл.

3.12. Води-[метанолу-ацетонітрилу] (3,5) суміш, 300 + 700 (v + v).

Змішайте 300 мл води 700 мл суміші метанол-ацетонітрилу (3.5).

4. **Апарат**

4.1. Лабораторний змішувач або магнітна мішалка.

4.2. Фільтрувальний папір зі скловолокна (Whatman GF/A або ідентичний).

4.3. Скляна колонка (довжиною від 300 до 400 мм, внутрішній діаметр приблизно 10 мм) з скляною фритою і клапаном відведення.

Примітка: можна також використовувати скляну колонку, забезпечену запірним краном або скляну колонку з конічним кінцем; у цьому випадку невеликий штекер зі скловати вставляється в нижній кінець, і злегка ущільнюється за допомогою скляної палички.

4.4. Обладнання ВЕРХ з системою впорскування для обсягів закачування 20 мкл.

4.4.1. Рідинна хроматографічна колонка: 300 мм x 4 мм, C18, 10 мкм упаковка або еквівалентн.

4.4.2. УФ-детектор зі змінною довжиною хвилі або з детектором на діодній матриці, з роботою в діапазоні від 225 до 400 нм.

4.5. Мембранний фільтр, 0.22 мкм.

4.6. Мембранний фільтр, 0.45 мкм.

4.7. Ультразвукова ванна.

5. **Процедура**

Примітка: карбадокс світлочутливий. Виконуйте всі процедури під приглушеним світлом чи з використанням бурштинового посуду або посуду, загорнутого в алюмінієву фольгу.

5.1. *Загальне*

5.1.1. Холоста проба корму

Для виконання тесту відновлення (5.1.2) холоста проба корму повинна бути проаналізована, щоб переконатися, що ні карбадокс ні сторонні речовини не присутні. Холоста проба корму повинна бути за типом як і проба, і карбадокс або сторонні речовини не повинні бути виявлені.

5.1.2. Тест відновлення

Тест відновлення проводять шляхом аналізу холостої проби корму (5.1.1), збагаченого додаванням деякої кількості карбадоксу, подібно до того, який присутній у пробі. Для збагачення на рівні 50 мг/кг помістити 5,0 мл базового стандартного розчину (3.11.1) в конічну колбу об’ємом 200 мл. Випарювати розчин до приблизно 0,5 мл у потоці азоту. Додати 10 г холостої проби корму, перемішати і почекати 10 хвилин, перш ніж приступити до стадії екстракції (5.2).

В якості альтернативи, якщо холоста проба корму, схожа на типу до проби, не доступна (5.1.1), тест відновлення може бути виконаний за допомогою стандартного методу складання. У цьому випадку проба для аналізу збагачується деякою кількістю карбадоксу, аналогічного наявному у пробі. Дану пробу аналізують разом з незбагаченою пробою і відновлення може бути розраховане шляхом вирахування.

5.2. *Виділення*

5.2.1. Корм

Зважити з точністю до 0,01 г 10 г проби і поместити в конічну колбу об’ємом 200 мл. Додати 15,0 мл води, перемішати і відстояти протягом 5 хв. Додати 35,0 мл метанолу-ацетонітрилу (3.5), закупорити і перемішувати протягом 30 хв. на змішувачі або розмішати на магнітній мішалці (4.1). Профільтрувати розчин через паперовий фільтр зі скловолокна (4.2). Залишити розчин для стадії очищення (5.3).

5.2.2. Премікси (0,1 %-2,0 %)

Зважити з точністю до 0,001 г, 1 г нерозмеленої проби і помістити в конічну колбу об’ємом 200 мл. Додати 15,0 мл води, перемішати і відстоювати протягом 5 хв. Додати 35,0 мл метанолу-ацетонітрилу (3.5), закупорити і пермішувати протягом 30 хв. на змішувачі або розмішати на магнітній мішалці (4.1). Профільтрувати розчин через паперовий фільтр зі скловолокна (4.2).

Внести піпеткою аліквоту фільтрату в мірну колбу об'ємом 50 мл. Додати 15,0 мл води, заповнити до позначки метанол-ацетонітрилом (3.5) і перемішати. Концентрація карбадоксу у кінцевому розчині повинна бути приблизно 10 мкг/мл. Аліквоту фільтрують через 0,45 мкм фільтр (4.6).

Приступити до визначення ВЕРХ (5.4).

5.2.3. Препарати (> 2 %)

Зважити з точністю до 0,001 г 0,2 г неподрібнену пробу та помістити в конічну колбу об'ємом 250 мл. Додати 45,0 мл води, перемішати і відстояти протягом 5 хв. Додати 105,0 мл суміші метанол-ацетонітрилу (3,5), закупорити і гомогенізувати. Піддати ультразвуку (4,7) пробу протягом 15 хв. з подальшим струшуванням або перемішуванням протягом 15 хв. (4.1). Профільтрувати розчин через фільтрувальний папір зі скловолокна (4.2).

Розвести аліквоту фільтрату з сумішшю води-ацетонітрил-метанолу (3.12) до кінцевої концентрації карбадоксу 10-15 мкг/мл (для приготування 10%, коефіцієнт розчинення 10). Аліквоту фільтрують через 0,45 мкм фільтр (4.6).

Приступити до визначення ВЕРХ (5.4).

5.3. *Очищення*

5.3.1. Приготування колонки оксиду алюмінію

Зважити 4 г оксиду алюмінію (3.4) і перемістити його в скляну колонку (4.3).

5.3.2. Очищення проби

Застосувати 15 мл відфільтрованого екстракту (5.2.1) в колонку оксиду алюмінію і відкинути перші 2 мл елюату. Зібрати наступні 5 мл і профільтрувати аліквоту через 0,45 мкм фільтр (4.6).

Приступити до визначення ВЕРХ (5.4).

5.4. *Визначення ВЕРХ*

5.4.1. Параметри

Наступні умови пропонуються для ознайомлення, інші умови можуть бути використані за умови, що вони дають еквівалентні результати:

Колонка рідинної хроматографії (4.4.1):	300 мм × 4 мм, C_{18}, 10 мкм упаковка або еквівалент
Рухома фаза (3.10):	Суміш ацетатного буферного розчину (3,9) і ацетонітрилу (3.2), 825 + 175 (v+v)
Витрата:	1,5-2 мл/хв.
Довжина хвилі детектування:	365 нм
Обсяг вприскування:	20 мкл

Перевірити стійкість хроматографічної системи, впорскуючи кілька разів калібрувальний розчин (3.11.2) місткістю 5,0 мкг/мл до досягнення стабільної висоти піків і часу утримування.

5.4.2. Калібрувальний графік

Вводьте кожен калібрувальний розчин (3.11.2) кілька разів, і визначте висоти піків (зони) для кожної концентрації. Накресліть калібрувальний графік, використовуючи середні висоти піків (зон) калібрувальних розчинів як ординат і відповідні концентрації в мкг/мл як абсцис.

5.4.3. Розчин проби

Вводьте екстракт проби [(5.3.2) для корму, (5.2.2) для преміксів (5.2.3) для препаратів] декілька разів і визначте середню висоту піків (зон) карбадоксу.

6. **Розрахунок результатів**

З середньої висоти (зони) піку карбадоксу розчину проби визначити концентрацію карбадоксу в розчині проби в мкг/мл з посиланням на калібрувальний графік (5.4.2).

6.1. *Корм*

Вміст карбадоксу w (mg/kg) в пробі визначається наступною формулою:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [мг/кг]}$$

де:

c = концентрація карбадоксу в екстракті проби (5.3.2) в мкг/мл

V_1 = об'єм екстракційного розчинника в мл (тобто 50)

m = вага аналізованої порції в г.

6.2. *Префікси і препарати*

Вміст карбадоксу w (mg/kg) в пробі визначається наступною формулою:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [мг/кг]}$$

де:

c = концентрація карбадоксу в екстракті проби (5.2.2 або 5.2.3) в мкг/мл

V_2= об'єм екстракційного розчинника в мл (тобто 50 для преміксів; 150 для препаратів)

f = коефіцієнт розбавлення відповідно до 5.2.2 (премікси) або 5.2.3 (препарати)

m = вага аналізованої порції в г.

7. Перевірка результатів

7.1. *Ідентичність*

Ідентичність аналіту може бути підтверджено шляхом спільної хроматографії або використовуючи діод-матричний детектор, за допомогою яких порівнюються спектри екстракту проби і калібрувального розчину (3.11.2) місткістю 10,0 мкг/мл.

7.1.1. Спільна хроматографія

Екстрат проби збагачується шляхом додавання відповідної кількості калібрувального розчину (3.11.2). Кількість доданого карбалоксу повинна дорівнювати кількості карбадоксу, виявленого у екстракті проби.

Тільки висота піку карбадоксу може наростати після прийняття до уваги як кількості додавання, так і розчинення екстракту. Ширина піку на половині його висоти повинна бути в межах 10 % від початкової ширини.

7.1.2. Діодно-матричне виявлення

Результати оцінюють у відповідності з наступними критеріями:

(a) довжина хвилі максимального поглинання проби і стандартного спектру, записаного на піку вершини хроматограми, повинна бути такою ж в межах краю, обумовленого роздільною здатністю системи виявлення. Для діодно-матричного виявлення, зазвичай, це в межах + 2 нм;

(b) між 225 і 400 нм проба і стандартні спектри, записані на піку вершини хроматограми, не повинні бути різними для частин спектра в діапазоні від 10 % до 100 % відносної оптичної щільності. Цей критерій виконується, якщо одинакові максимуми присутні і в жодній спостережуваній точці відхилення між двома спектрами не перевищує 15 % від оптичної щільності стандартного аналізу;

(c) між 225 і 400 нм спектри наростання, вершина і низ піку виробленого екстрактом проби не повинні відрізнятися один від одного щодо частин спектра в діапазоні 10 %-100 % відносної оптичної щільності. Цей критерій виконується, коли одинакові максимуми присутні і у всіх спостережних точках відхилення між спектрами не перевищує 15 % оптичної щільності спектра піку вершини.

Якщо один з цих критеріїв не виконується, то наявність аналіту не була підтверджена..

7.2. *Стабільність*

Для вмісту 10 мг/кг і вище, різниця між результатами двох паралельних аналізів, проведених на тій самій пробі, не повинна перевищувати 15% по відносно вищого результату.

7.3. *Відновлення*

Для збагаченої (холостої) проби відновлення має бути не менше 90%..

8. **Результати спільного дослідження**

Було організовано спільне дослідження, в якому проаналізовано 6 кормів, 4 премікси і 3 препарати у 8 лабораторіях. Повторні аналізи були виконані на кожній пробі. (Більш детальну інформацію про це спільне дослідження можна знайти в «The Journal of the AOAC», том 71, 1988, стор. 484-490). Результати (без урахування викидів), наведені нижче:

Таблиця 1

Результати спільного дослідження для корму

	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4	Проба 5	Проба 6
L	8	8	8	8	8	8
N	15	14	15	15	15	15
Середнє (мг/кг)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
Sп (мг/кг)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVп (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
Sв (мг/кг)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CVв (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Номінальний вміст (мг/кг)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Таблиця 2

Результати спільного дослідження для префіксів і препаратів

	Премікси				Препарати		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Середнє (г/кг)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
Sп (г/кг)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVп (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
Sв (г/кг)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CVв (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Номінальний вміст (г/кг)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = кількість лабораторій

n = число окремих значень

Sп = стандартне відхилення повторюваності

CVп = коефіцієнт варіації повторюваності

Sв = стандартне відхилення відтворюваності

CVв = коефіцієнт варіації відтворюваності..

ДОДАТОК IX

КОРЕЛЯЦІЙНІ ТАБЛИЦІ, ЗГАДАНІ У СТАТТІ 6

1. **Директива 71/250/ЄЕС**

Директива 71/250/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1 перший підпункт	Стаття 3
Стаття 1 другий підпункт	Стаття 2
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток, частина 1	Додаток II
Додаток, частина 2	—
Додаток, частина 3	—
Додаток, частина 4	Додаток III, частина O
Додаток, частина 5	Додаток III, частина M
Додаток, частина 6	Додаток III, частина N
Додаток, частина 7	Додаток III, частина Q
Додаток, частина 9	Додаток III, частина K
Додаток, частина 10	—
Додаток, частина 11	—
Додаток, частина 12	Додаток III, частина J
Додаток, частина 14	Додаток III, частина D
Додаток, частина 16	—

2. **Директива 71/393/ЄЕС**

Директива 71/393/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток, частина I	Додаток III, частина A
Додаток, частина II	Додаток III, частина E
Додаток, частина III	Додаток III, частина P
Додаток, частина IV	Додаток III, частина H

3. **Директива 72/199/ЄЕС**

Директива 72/199/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Додаток I, частина 1	Додаток III, частина L
Додаток I, частина 2	Додаток III, частина C
Додаток I, частина 3	—
Додаток I, частина 4	—
Додаток I, частина 5	Додаток V, частина A
Додаток II	—

4. **Директива 73/46/ЄЕС**

Директива 73/46/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Додаток I, частина 1	Додаток III, частина B
Додаток I, частина 2	—
Додаток I, частина 3	Додаток III, частина I

5. **Директива 76/371/ЄЕС**

Директива 76/371/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 1
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток	Додаток I

6. **Директива 76/372/ЄЕС**

Директива 76/372/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	—
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток	—

7. **Директива 78/633/ЄЕС**

Директива 78/633/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток, частина 1	—
Додаток, частина 2	—
Додаток, частина 3	Додаток IV, частина C

8. **Директива 81/715/ЄЕС**

Директива 81/715/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	—
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток	—

9. **Директива 84/425/ЄЕС**

Директива 84/425/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	—
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток	—

10. **Директива 86/174/ЄЕС**

Директива 86/174/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 4
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток	Додаток VII

11. **Директива 93/70/ЄЕС**

Директива 93/70/ЄЕС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток	Додаток IV, частина D

12. **Директива 93/117/ЄС**

Директива 93/117/ЄС	Дане Положення
Стаття 1	Статті 3 і 5
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Додаток, частина 1	Додаток IV, частина E
Додаток, частина 2	Додаток VIII, частина A

13. **Директива 98/64/ЄС**

Директива 98/64/ЄС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 3 і 5
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Додаток, частина A	Додаток III, частина F
Додаток, частина C	Додаток VIII, частина B

14. **Директива 1999/27/ЄС**

Директива 1999/27/ЄС	Дане Положення
Стаття 1	Статті 3 і 5
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Стаття 5	—
Стаття 6	—
Стаття 7	—
Додаток, частина A	Додаток VIII, частина C
Додаток, частина B	Додаток IV, частина F
Додаток, частина C	Додаток VIII, частина D

15. **Директива 1999/76/ЄС**

Директива 1999/76/ЄС	Дане положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Додаток	Додаток IV, частина G

16. **Директива 2000/45/ЄС**

Директива 2000/45/ЄС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Додаток, частина A	Додаток IV, частина A
Додаток, частина B	Додаток IV, частина B
Додаток, частина C	Додаток III, частина G

17. **Директива 2002/70/ЄС**

Директива 2002/70/ЄС	Дане Положення
Стаття 1	Стаття 1
Стаття 2	Додатки 2 і 3
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Стаття 5	—
Додаток I	Додаток I і Додаток V частина B(I)
Додаток II	Додаток II і Додаток V частина B(II)

18. **Директива 2003/126/ЄС**

Директива 2003/126/ЄС	Дане положення
Стаття 1	Стаття 3
Стаття 2	—
Стаття 3	—
Стаття 4	—
Стаття 5	—
Стаття 6	—
Додаток	Додаток VI