



Республика Молдова ПРАВИТЕЛЬСТВО ПОСТАНОВЛЕНИЕ № 686
от 13.09.2012

**об утверждении некоторых методов
анализа по контролю за кормами**

Опубликован : 21.09.2012 в Monitorul Oficial Nr. 198-204 статья № : 741 Дата
вступления в силу : 21.12.2012

В соответствии с положениями Закона о ветеринарно-санитарной деятельности № 221-
XVI от 19 октября 2007 года (Официальный монитор Республики Молдова, 2008 г., № 51-
54, ст. 153), с последующими изменениями и дополнениями, а также в целях
практического применения положений Регламента Европейской комиссии № 152/2009 от
27 января 2009 года, устанавливающего методы взятия образцов и анализа для
официального контроля за кормами, опубликованного в Официальном журнале Совета
Европы L 54 от 26 февраля 2009 г., в национальной нормативной базе Правительство

ПОСТАНОВЛЯЕТ:

1. Утвердить:

Методы отбора проб для официального контроля кормов по определению компонентов,
добавок и нежелательных веществ, за исключением остатков пестицидов и
микроорганизмов, согласно приложению № 1;

Методы, касающиеся подготовки образцов для анализа и представления результатов,
согласно приложению № 2;

Методы анализа по контролю состава первичного кормового сырья и комбикормов
согласно приложению № 3;

Методы анализа по контролю допустимого уровня кормовых добавок согласно
приложению № 4;

Методы анализа по контролю нежелательных веществ в кормах согласно приложению
№ 5;

Методы анализа по определению компонентов животного происхождения для
официального контроля кормов согласно приложению № 6;

Методы по определению энергетической ценности комбикормов для домашних птиц
согласно приложению № 7.

2. Настоящее Постановление вступает в силу через 3 месяца с даты опубликования в
Официальном мониторе Республики Молдова.

3. Контроль за выполнением настоящего Постановления возложить на Министерство
сельского хозяйства и пищевой промышленности.

ПРЕМЬЕР-МИНИСТР

Владимир ФИЛАТ

и пищевой промышленности

**Контрасигнует:
министр сельского хозяйства
Василе БУМАКОВ**

№ 686. Кишинэу, 13 сентября 2012 г.

МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ
для официального контроля кормов по определению компонентов,
добавок и нежелательных веществ, за исключением остатков
пестицидов и микроорганизмов

1. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем нормативном акте используемые определения имеют следующие значения:

партия отборная – количество продукта, представляющего собой одно целое и имеющего характеристики, предполагающие его однородность;

обычная проба – количество, отобранное из одной точки отборной партии;

общая проба – совокупность обычных проб, отобранных из одной однородной партии;

уменьшенная проба – представительная часть общей пробы, полученная из нее путем сокращения;

конечная проба – часть из уменьшенной или из общей пробы гомогенизированной.

2. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

Для официального контроля кормов образцы принимаются квалифицированным персоналом и считаются представительными.

2.1. Измерительные приборы

Оборудование для отбора проб должно быть изготовлено из материалов, не загрязняющих продукты, подлежащие для отбора пробы. Данное оборудование, за исключением оборудования, указанного в подпунктах 2.2.1, 2.2.1.1 и 2.2.1.2, должно быть проверено Национальным метрологическим органом.

2.2. Устройства, рекомендованные для отбора проб сухих кормов

2.2.1. Ручной отбор

2.2.1.1. Плоская с вертикальным краями лопата.

2.2.1.2. Зонд для отбора проб с длинной или разделенной щелью. Размеры зонда для отбора проб должны быть адекватны показателям отборной партии (глубина емкости, размер мешка и т.д.) и размера частиц корма.

2.2.2. Ручной отбор

Для отбора проб из кормов, находящихся в движении, могут быть использованы проверяющие механические устройства.

2.2.3. Разделитель

Устройства для разделения образца на две приблизительно равные части могут быть использованы для отбора обычных проб и подготовки уменьшенных и конечных проб.

3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ТРЕБОВАНИЯ

А. По отношению к контролю веществ или продуктов, равномерно распределенных в кормах

3.1. Партия отборная

Размер партии должен позволять отбор проб для каждой составной части.

3.2. Общие пробы

3.2.1. Корма россыпью и минимальное количество обычных образцов:

- a) для отборных проб, не превышающих 2,5 метрической тонны, – семь;
- b) для отборных проб, превышающих 2,5 метрической тонны, – 20 умножить на количество метрических тонн, составляющих отборную пробу (если полученное число является дробью, оно округляется до ближайшего целого числа), до максимального количества – 40 отборных проб.

3.2.2. Упакованные корма и минимальное количество упаковок для отбора проб:

3.2.2.1. Упаковки, превышающие 1 кг:

- a) для отборных партий, состоящих из одного до четырех пакетов, – все пакеты;
- b) для отборных партий, состоящих из 5 до 16 пакетов, – четыре;
- c) для отборных партий, состоящих из более чем 16 пакетов – число пакетов, составляющих отборную партию (если полученное число является дробью, оно округляется до ближайшего целого числа), максимально до 20 упаковок.

3.2.2.2. Для упаковок, не превышающих 1 кг, минимальное количество образцов составляет четыре.

3.2.3. Жидкие или полужидкие корма и минимальное количество контейнеров для отбора проб (для упаковок или контейнеров, не превышающих 1 кг или одного литра, и для солевых блоков или брикетов весом не более 1 кг каждый отборная партия представляет содержание оригинальной упаковки или контейнера, солевого блока или брикета).

3.2.3.1. Контейнеры более одного литра:

- a) для отборных партий, состоящих из одного до четырех контейнеров – все контейнеры;
- b) для отборных партий, в которые входят от 5 до 16 контейнеров, – четыре;
- c) для отборных партий, состоящих из более чем 16 контейнеров, – количество контейнеров, составляющих отборную партию (если полученное число является дробью, оно округляется до ближайшего целого числа), максимум до 20 контейнеров.

3.2.3.2. Для контейнеров, не превышающих одного литра, минимальное количество образцов составляет четыре.

3.2.4. Блоки кормов и минеральные брикеты с минимальным количеством блоков или брикетов отобранных проб

Для блока или брикета каждой отборной партии из 25 единиц минимальное количество блоков или брикетов отборных проб не превышает четыре блока или брикета.

3.3. Общие пробы

3.3.1. Корма россыпью, общее количество обычных проб, включенных в общую пробу, составляет 4 кг.

3.3.2. Упакованные корма

- a) для пакетов, превышающих 1 кг, общее количество обычных проб, включенных в общую пробу, составляет 4 кг;
- b) для пакетов, не превышающих 1 кг, общее количество обычных проб, включенных в общую пробу, представляет массу содержимого в четырех оригинальных упаковках.

3.3.3. Жидкие или полужидкие корма:

- a) для контейнеров объемом более одного литра общее количество обычных проб, включенных в общую пробу, составляет 4 литра;

б) для контейнеров объемом, не превышающим одного литра, общее количество обычных проб, включенных в общую пробу, представляет объем содержимого четырех оригинальных упаковок.

3.3.4. Для блоков минеральных кормов или брикетов:

а) весом более 1 кг каждый общее количество обычных проб, включенных в общую пробу, составляет 4 кг;

б) весом менее 1 кг каждый общее количество обычных проб, включенных в общую пробу, составляет массу содержимого четырех оригинальных блоков или брикетов.

3.4. Конечные пробы

По возможности, конечная проба происходит из общей пробы путем уменьшения. Рассматривается, по крайней мере, одна конечная проба.

3.4.1. Сухие корма

Количество конечной пробы для анализа составляет 500 г.

3.4.2. Жидкие или полужидкие корма

Количество конечной пробы для анализа составляет 500 мл.

В. В зависимости от контроля нежелательных веществ или продуктов, которые могут быть неравномерно распределены в массовой доле кормов, такие как афлатоксин, спорынья, касторовое масло, кроталария из кормового сырья

3.1. Отборная проба

Размер отборной пробы должен позволить отбор проб каждой составляющей части.

3.2. Обычные пробы

3.2.1. Корма россыпью и минимальное количество обычных образцов:

а) для отборных проб, не превышающих 2,5 метрической тонны, – семь;

б) для отборных проб, превышающих 2,5 метрической тонны, – 20 умножить на количество метрических тонн, составляющих отборную пробу (если полученное число является дробью, оно округляется до ближайшего целого числа), максимально до 40 обычных проб.

3.2.2. Упакованные корма и минимальное количество упаковок для отбора проб:

а) для отборных партий, состоящих из одного до четырех пакетов, – все пакеты;

б) для отборных партий, состоящих из 5 до 16 пакетов, – четыре;

с) для отборных партий, состоящих из более чем 16 пакетов – число пакетов, составляющих отборную партию (если полученное число является дробью, оно округляется до ближайшего целого числа), максимально до 40 упаковок.

3.3. Общие пробы

Общая масса обычных проб, составляющих общую пробу, не может быть меньше 4 кг.

3.3.1. Корма россыпью

Масса отборной пробы в метрических тоннах:

а) до 1 тонны минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет одну;

б) от 1 до 10 минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет две;

с) от 10 до 40 минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет три;

д) более 40 минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет четыре.

3.3.2. Упакованные корма

Размеры отборных проб для упакованных кормов в количестве пакетов:

- a) от 1 до 16 – минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет одну;
- b) от 17 до 200 – минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет два;
- c) от 201 до 800 – минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет три;
- d) более 800 – минимальное количество общих проб, включенных в отборную пробу, составляет четыре.

3.4. Конечные пробы

Конечная проба происходит из каждой общей пробы путем сокращения. Требуется анализ не менее одной конечной пробы, исходящей из общей. Вес конечной пробы для анализа не должен быть меньше 500 г.

4. ИНСТРУКЦИИ ПО СБОРУ, ПОДГОТОВКЕ И УПАКОВКЕ ПРОБ

4.1. Общие требования

Отбор и приготовление проб осуществляется как можно скорее, во избежание изменения или загрязнения продукта.

Инструменты, рабочие поверхности и контейнеры, предназначенные для отбора проб, должны быть чистыми и сухими.

4.2. Обычные пробы

4.2.1. По отношению к контролю веществ или продуктов, равномерно распределенных в кормах

Обычные пробы должны отбираться случайным методом из всей отборной партии, а их размер должен быть примерно равным.

4.2.2. Корма россыпью

Отобранная проба разделяется на несколько примерно равных частей. Случайным методом отбирается число проб, соответствующее числу требуемых обычных проб, согласно пункту 3.2 буквы А раздела (3) настоящего приложения, и по крайней мере одна проба из каждой из этих частей.

При необходимости отбор проб может быть выполнен, когда партия передвигается (погрузка или разгрузка).

4.2.3. Упакованные корма

После выбора для отбора необходимого количества пакетов согласно указаниям пункта 3.2 буквы А раздела 3 настоящего приложения часть содержимого каждой упаковки извлекается с использованием пробоотборника или лопаты. В случае необходимости отбор проб производится после того, как пакеты были опорожнены отдельно. Любые скопления расформируются путем их разделения от партии, а затем осуществляется повторное включение в партию для каждой общей пробы в отдельности.

4.2.4. Жидкие или полужидкие корма, однородные или гомогенизированные

После выбора необходимого количества контейнеров для отбора проб, как указано в пункте 3.2 буквы А раздела 3 настоящего приложения, их содержимое гомогенизируется при необходимости и отбирается количество проб, взятых из каждого контейнера.

Обычные пробы могут быть отобраны при загрузке содержимого.

4.2.5. Жидкие или полужидкие корма негомогенизированные

После выбора необходимого числа контейнеров для отбора проб, как указано в пункте 3.2 буквы А раздела 3 настоящего приложения, пробы отбираются из различных уровней.

Образцы могут быть получены и при разгрузке содержимого, но первые части удаляются.

В любом случае общий отобранный объем не должен составлять менее 10 литров.

4.2.6. Кормоблоки и минеральные брикеты

После выбора необходимого количества блоков или брикетов для отбора проб согласно указаниям пункта 3.2 буквы А раздела 3 настоящего приложения отбирается часть из каждого блока или брикета.

4.2.7. В отношении контроля нежелательных веществ или продуктов, которые могут быть неравномерно распределены в массовой доле кормов, таких как афлатоксин, спорынья, касторовое масло и кроталария из кормового сырья

Отобранная партия должна быть разделена на несколько примерно равных мнимых частей, соответствующих количеству общих проб, предусмотренных в пункте 3.3 буквы В настоящего приложения. Если это число больше 1, общее количество обычных проб, предусмотренных в пункте 3.2 буквы В настоящего приложения, распределяется примерно поровну между различными частями.

Затем отбираются образцы примерно одинакового размера, а для упакованных кормов часть содержимого отобранных упаковок взимается с помощью зонда или лопаты после опорожнения пакетов по отдельности, если это необходимо, таким образом, чтобы общее количество образцов из каждой части составляло не менее 4 кг минимального количества, необходимого для каждой общей партии.

Обычные пробы, отобранные из разных уголков, не считаются общими.

4.3. Подготовка общих проб

4.3.1. В отношении контроля над веществами в продуктах с равномерным распределением в массовой доле корма

Общие пробы смешиваются в один общий образец.

4.3.2. В отношении контроля нежелательных веществ или продуктов, которые могут быть неравномерно распределены в массовой доле кормов, таких, как афлатоксин, спорынья, касторовое масло и кроталария из кормового сырья

Обычные пробы, отобранные из каждой части отборной пробы, смешиваются, и образуется количество общих проб, предусмотренное в пункте 3.3 буквы В настоящего приложения, с указанием происхождения каждой общей пробы.

4.4. Подготовка конечных проб

Содержимое каждой общей пробы тщательно смешивается для получения гомогенизированной пробы.

Любые скопления разрушаются (если необходимо путем отделения их от образца с последующим включением в образец) для каждой общей пробы в отдельности.

При необходимости общая проба уменьшается до менее 2 кг или двух литров (уменьшенная проба) либо с помощью механического или автоматического сепаратора или последовательных разделений.

Приготавливается не менее трех конечных проб, имеющих примерно то же количество, в соответствии с требованиями к количествам, предусмотренным в пункте 3.4 буквы А или пункте 3.4 буквы В настоящего приложения.

Каждый образец помещают в подходящую емкость. Принимаются все необходимые меры предосторожности во избежание любого изменения состава пробы, загрязнения или подделки, которые могут произойти во время транспортировки или хранения.

4.5. Упаковка конечных проб

Контейнеры или пакеты пломбируются и маркируются (этикетка полностью должна быть под печатью) таким образом, чтобы они не могли быть вскрыты без повреждения пломбы.

5. ПРОТОКОЛ ОТБОРА ПРОБ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ ПРОБ

Для каждой пробы составляется протокол, который позволяет определить отобранную партию.

Для каждой общей пробы направляют как можно быстрее в уполномоченную лабораторию по анализу не менее одной конечной пробы, сопровождаемой информацией, необходимой специалисту.

[анеха nr.2](#)

Приложение № 2
к Постановлению Правительства
№ 686 от 13 сентября 2012 г.

МЕТОДЫ, касающиеся подготовки образцов для анализа и представления результатов

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА

1.1. Общие требования

Изложенные процедуры относятся к подготовке для исследования конечных проб, направленных в уполномоченные лаборатории по контролю после отбора проб, согласно указаниям приложения № 1 к настоящему Постановлению.

Подготовка проб должна осуществляться таким образом, чтобы пробы, отобранные в соответствии с методом анализа, были однородными и представительными для конечных проб.

1.2. Меры предосторожности

Применяемый способ подготовки проб зависит от использованных методов для анализа и важно обеспечить его адекватность использованным методам для анализа.

Все необходимые операции выполняются таким образом, чтобы избежать загрязнения образца и изменения его состава.

Измельчение, перемешивание и отсеивание производится как можно скорее при минимальном воздействии воздуха и света на образец. Не используются шлифовальные и фрезерные станки, которые могут вызвать значительное нагревание образца.

Рекомендуется измельчать термочувствительные корма ручным способом. Кроме того, используемое оборудование не должно быть источником загрязнения микроэлементами.

Если подготовка не может быть произведена без существенных изменений показателя содержания влаги в образце, содержание влаги определяется до и после подготовки, в

соответствии с методом, указанным в главе I приложения № 3 к настоящему Постановлению.

1.3. Процедура подготовки

Проба разделяется на соответствующие подгруппы и направляется для анализа с использованием соответствующих методов разделения, таких как альтернативный отбор с помощью лопаты или отбор проб в стационарных или ротационных условиях.

Формирование конуса и выбор четверти не рекомендуется, поскольку это может сформировать подгруппы, приводящие к большим ошибкам разделения.

Направляемая проба хранится в соответствующем чистом, сухом, с герметической крышкой сосуде, а подгруппы для анализа весом не менее 100 г подготовлены способом, указанным в подпунктах 1.3.1-1.3.4 настоящего приложения.

1.3.1. Корма, которые могут быть измельчены

Если иное не оговорено в методах анализа, весь образец просеивают через решето с квадратными отверстиями шириной 1 мм после измельчения, если это необходимо. Следует избегать чрезмерного измельчения.

Проба, проходящая через решето, смешивается и помещается в подходящий чистый, сухой, с плотно закрывающей крышкой сосуд. Перемешивается повторно тотчас же перед приготовлением пробы для анализа.

1.3.2. Корма, измельченные после сушки

Если иное не оговорено в методах анализа, образец обезвоживается таким образом, чтобы влага сократилась до 8-12%, в соответствии с процедурой предварительной сушки, описанной в подпункте 1.4.3, методом определения влажности, указанным в главе I приложения № 3.

В дальнейшем выполняются предписания, указанные в подпункте 1.3.1 настоящего приложения.

1.3.3. Жидкие или полужидкие корма

Образцы отбираются в подходящий чистый, сухой, с плотно закрывающей крышкой сосуд. Тщательно перемешиваются непосредственно перед отбором проб для анализа.

1.3.4. Другие корма

Образцы, которые не могут быть получены в соответствии с процедурами, указанными выше, рассматриваются по любой другой процедуре, которая гарантирует, что образцы, отобранные для анализа, являются однородными и представительными для конечной пробы.

1.4. Хранение образцов

Образцы должны храниться при температуре, не изменяющей их состав. Пробы для анализа на наличие витаминов или веществ, чувствительных к свету, хранятся в коричневых стеклянных бутылках.

2. ТРЕБОВАНИЯ К РЕАГЕНТАМ И АППАРАТУРЕ, ИСПОЛЬЗУЕМЫМ В МЕТОДАХ АНАЛИЗА

2.1. Если иное не оговорено в методах анализа, все реагенты для анализа должны быть аналитически чистыми. Для анализа микроэлементов чистота реагентов проверяется контрольным исследованием. В зависимости от полученных результатов может потребоваться дополнительное очищение реактивов.

2.2. Для любой операции, связанной с приготовлением растворов, разбавлением, полосканием или промыванием, отмеченными в методах анализа и для которых нет никаких

обозначений относительно свойства растворителя или разбавителя, используется вода. Как общее правило, используется деминерализованная или дистиллированная вода. В особых случаях, которые указаны в методах анализа, вода должна подвергаться специальной процедуре очистки.

Учитывая оснащение лабораторий по контролю оборудованием, в методах анализа указываются только инструменты и оборудование, использованное для этих целей. Они должны быть чистыми, особенно в случае определения очень маленьких количеств вещества.

3. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА И ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Процедура экстракции

Существует несколько методов определения специфических процедур экстракции. Как правило, могут применяться другие методы экстракции, чем относящиеся к методу, если доказано, что использованная процедура экстракции для анализа массива имеет эффективность экстракции, эквивалентную процедуре, предусмотренной в методе.

3.2. Процедура очистки

Существует несколько методов определения специфических процедур очистки. Как правило, могут применяться другие методы очистки, чем относящиеся к методу, если доказано, что примененная процедура очистки для анализа массива определяет аналитические результаты, эквивалентные процедуре, предусмотренной в методе.

3.3. Отчетность метода анализа

Как правило, для определения каждого вещества в корме устанавливается единый метод анализа. В случае обозначения нескольких методов в протоколе испытаний указывается метод, примененный назначенной лабораторией по контролю.

3.4. Количество определений

Результат, указанный в протоколе испытаний, представляет среднее значение, полученное в результате не менее двух определений, выполненных на отдельных частях образца, с удовлетворительной повторяемостью.

Тем не менее, при анализе обнаружения нежелательных веществ, если первый результат измерения значительно меньше ($> 50\%$), чем в контрольной спецификации, дальнейшие определения не являются необходимыми, при условии, что применяются соответствующие процедуры контроля качества.

В случае контроля объявленного содержания на определенное вещество или конкретный ингредиент, если результат подтверждает объявленное содержимое первого определения, то есть результат анализа соответствует интервалу принятого отклонения, дальнейшие определения не являются необходимыми, при условии применения соответствующих процедур контроля качества.

3.5. Отчеты аналитических результатов

Аналитический результат выражается в порядке, указанном в методе анализа, с соответствующим количеством значащих цифр и подгоняется, при необходимости, к содержащейся влажности в пробе перед приготовлением.

3.6. Неопределенность измерений и скорость восстановления для обнаружения анализа нежелательных веществ

Что касается нежелательных веществ, включая диоксин и полихлорированные бифенилы (ПХБ), подобных диоксину, продукт, предназначенный для кормления, считается не соответствующим условию о максимально допустимом содержании, если в

результате анализа установлено, что он превышает максимально допустимую норму, с учетом расширенной неопределенности измерения и регулировки для восстановления. Для оценки соответствия проанализированная концентрация используется после ее исправления для восстановления и исключения расширенной неопределенности. Данная процедура применяется только в случаях, когда метод анализа позволяет оценить погрешности измерения и регулировки для восстановления (так, ее применение невозможно для микроскопического анализа).

Аналитический результат сообщается следующим образом (в той мере, в которой использованный метод позволяет оценить неопределенность измерений и скорость восстановления):

а) с учетом восстановления указывается уровень восстановления. Регулировка для восстановления не требуется, если скорость восстановления составляет от 90 до 110%;

б) как “ $x \pm U$ ”, где x – аналитический результат и U является расширенной неопределенностью измерения с использованием покрытия в 2 раза, что дает уровень уверенности примерно 95%.

Если результат анализа является значительно меньше ($> 50\%$), чем в контрольной спецификации, и при условии, что соответствующие процедуры качества были применены и анализ служит лишь для проверки соблюдения законодательства, аналитический результат мог бы быть представлен без корректировки на восстановление, а отчетность скорости восстановления и неопределенности измерений в этих случаях могут быть опущены.

[анеха nr.3](#)

Приложение № 3
к Постановлению Правительства
№ 686 от 13 сентября 2012 г.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА по контролю состава первичного кормового сырья и комбикормов

I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВЛАГИ

1.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить влажность корма. Если корм содержит легкоиспаряющиеся вещества, такие как органические кислоты, следует отметить, что при определении содержания влаги определяется и значительное количество легкоиспаряющихся веществ.

Этот метод не применяется для анализа молочных продуктов, используемых в качестве кормового сырья, анализа минеральных веществ и смеси, состоящей в основном из минералов, жиров и масел животного происхождения и при анализе маслячных овощей или фруктов.

1.2. Принцип применения

Образец обезвоживается при определенных условиях, которые изменяются в зависимости от характера корма. Снижение веса определяется путем взвешивания. При анализе сухих кормов с высоким содержанием влаги необходима предварительная сушка.

1.3. Измерительные приборы

1.3.1. Мельница, построенная из материала, не впитывающего влагу, легко моющаяся, которая позволяет быстрое и равномерное дробление, без заметного нагревания, не допускает по возможности контакта с внешним воздухом и соответствует требованиям, указанным в подпунктах 1.4.1.1 и 1.4.1.2 настоящего приложения (например, микромельницы молотковые или с водяным охлаждением, конические гибкие мельницы или мельницы с замедленным движением или с зубчатыми дисками).

1.3.2. Аналитические весы с допуском 1 мг.

1.3.3. Сухие металлические контейнеры, не подверженные коррозии, или стеклянные с герметичными крышками; рабочая поверхность позволяет рассеяние образца в пределах $0,3 \text{ г/см}^2$.

1.3.4. Изотермическая печь с электрообогревом ($\pm 2^\circ\text{C}$), с соответствующей вентиляцией, которая обеспечивает быструю настройку температуры (¹).

1.3.5. Вакуумная печь с электрическим подогревом, регулируемая, оснащенная масляным насосом и состоящая из:

- а) механизма подачи горячего сухого воздуха;
- б) сушильного состава (например, оксид кальция).

1.3.6. Эксицикатор с толстой решеткой металлической или фарфоровой пластинкой, содержащий эффективное средство для осушения.

1.4. Процедура анализа

Операции, изложенные в этом разделе, осуществляются сразу после вскрытия упаковок образцов. Анализ должен быть осуществлен по крайней мере в двух экземплярах.

Для сушки зерна, муки, отрубей и муки грубого помола печь должна иметь такую тепловую мощность, чтобы при установленной температуре 131°C возвращаться к соответствующей температуре менее чем за 45 минут после размещения внутри максимального количества испытываемых образцов для одновременной сушки. Вентиляция должна обеспечивать, чтобы при наибольшем количестве содержащихся образцов пшеницы, подвергающихся сушке в течение двух часов, результаты отличались от результатов, полученных после четырех часов сушки, менее чем на 0,15%.

1.4.1. Методы подготовки

1.4.1.1. Корма, не указанные в подпунктах 1.4.1.2 и 1.4.1.3

Отбирается не менее 50 г образца. При необходимости, он разбивается или разделяется таким образом, чтобы избежать любого изменения содержания влаги.

1.4.1.2. Зерновые и отруби

Отбирается не менее 50 г образца. Измельчается на частицы, из которых не менее 50% проходит через решето с отверстиями, составляющими 0,5 мм и не образующими остаток более 10% при использовании сита с круглыми отверстиями диаметром 1 мм.

1.4.1.3. Жидкие или пастообразные корма, корма, состоящие преимущественно из масел и жиров

Отбирают приблизительно 25 г образца, взвешивают с точностью до 10 мг, добавляют соответствующее количество безводного песка, взвешенного с точностью до 10 мг и перемешивают до получения однородного продукта.

1.4.2. Процесс сушки

1.4.2.1. Корма, не указанные в подпунктах 1.4.1.2 и 1.4.1.3

Взвешивается сосуд согласно описанию в подпункте 1.3.3 вместе с крышкой, с точностью до 1 мг. В соответствующем сосуде взвешивается с точностью до 1 мг 5 г образца

и распределяется равномерно. Сосуд без крышки помещается в предварительно разогретую духовку при 103°C. Для предотвращения несвойственного снижения температуры в печи сосуд помещается как можно скорее. Оставляется для сушки в течение четырех часов, рассчитываемых с момента возвращения температуры в печи к 103°C. На сосуд ставится крышка, он извлекается из духовки и оставляется для остывания в течение 30-45 минут в сушильном шкафу согласно описанию из подпункта 1.3.6 и взвешивается с отклонением в 1 мг.

Для кормов, состоящих преимущественно из масел и жиров, сушка в печи будет продлена на 30 минут при температуре 103°C. Разница между этими двумя взвешиваниями не должна превышать 0,1% влажности.

1.4.2.2. Зерно, мука, отруби и мука грубого помола

Взвешивается сосуд согласно описанию подпункта 1.3.3 вместе с крышкой с точностью до 0,5 мг. В соответствующем сосуде взвешивается с точностью до 1 мг 5 г перемолотого образца и равномерно распределяется.

Сосуд без крышки помещается в предварительно разогретую духовку при 130°C. Для предотвращения несвойственного снижения температуры в печи сосуд вставляется как можно скорее. Оставляется для высушивания в течение двух часов, рассчитываемых с момента возвращения температуры в печи к 130°C. Сосуд накрывается крышкой и извлекается из духовки, оставляется для остывания в течение 30-45 минут в сушильном шкафу согласно описанию из подпункта 1.3.6 и взвешивается с отклонением в 1 мг.

1.4.2.3. Комбинированные корма, содержащие свыше 4% сахарозы и лактозы: кормовое сырье семян рожкового дерева, гидролизованной крупы, семена солода, сушеные части свеклы, растворители рыбы и сахара; комбинированные корма, содержащие более 25% минеральных солей, включающие кристаллизованную воду.

Взвешивается сосуд согласно описанию, изложенному в подпункте 1.3.3, вместе с крышкой с точностью до 0,5 мг. В сосуде взвешивается с точностью до 1 мг 5 г образца и распределяется равномерно. Сосуд вставляется без крышки в вакуумную печь согласно описанию, приведенному в подпункте 1.3.5, предварительно разогретую до температуры от 80 до 85°C. Для предотвращения неадекватного снижения температуры в печи сосуд вставляется как можно скорее.

Давление доводится до 100 Тор и оставляют для сушки при этом давлении в течение четырех часов либо при помощи горячего и сухого воздуха или с помощью сушильного вещества (около 300 г для 20 образцов). Во втором случае вакуумный насос отключается после получения рекомендуемого давления. Время высыхания рассчитывается с момента возвращения температуры в разогретой печи от 80 до 85°C. Давление печи осторожно доводится до уровня атмосферного давления. Печь открывается, немедленно ставится крышка на сосуд, последний извлекается из духовки и оставляется для остывания в течение 30-45 минут в сушильном шкафу согласно описанию, приведенному в подпункте 1.3.6, и взвешивается с отклонением в 1 мг. Сушка в вакуумной печи продлевается еще на 30 минут при температуре между 80 и 85°C и взвешивается. Разница между этими двумя взвешиваниями не должна превышать 0,1% влажности.

1.4.3. Предварительная сушка

1.4.3.1. Корма, не перечисленные в подпункте 1.4.3.2

Сухие корма с высоким содержанием влажности, что затрудняет дробление, должны пройти предварительную сушку следующим образом:

взвешиваются с точностью до 10 мг 50 г неизмельченного образца (при необходимости сдавленные или накопленные корма могут быть приблизительно разделены) в подходящей емкости (например, алюминиевая пластина 20 × 12 см с бордюром 0,5 см). Высушиваются в духовке при температуре от 60 до 70°C, пока содержание влаги не уменьшится до величины от 8 до 12%. Вынимаются из духовки, оставляются для остывания без крышки в лабораторных условиях в течение одного часа и взвешиваются с точностью до 10 мг. Тотчас раздробляются согласно описанию, приведенному в подпункте 1.4.1.1, и сушатся согласно указаниям подпункта 1.4.2.1 или 1.4.2.3 исходя из характера кормов.

1.4.3.2. Зерно

Зерно влажностью более 17% должно пройти предварительную сушку следующим образом:

взвешиваются с отклонением в 10 мг 50 г неизмельченных зерен в подходящей емкости (например, алюминиевая пластина 20 × 12 см с бордюром 0,5 см). Высушивается в духовке в течение 5-7 минут при температуре 130°C. Вынимается из духовки, оставляется для остывания без крышки в лабораторных условиях в течение двух часов и взвешивается с точностью до 10 мг. Тотчас раздробляется, согласно описанию, приведенному в подпункте 1.4.1.2, и сушится согласно описанию подпункта 1.4.2.2.

1.5. Расчет результатов

Содержание влаги (X) образца в процентах рассчитывается с использованием следующих формул:

1.5.1. Высушивание без предварительной сушки

$$X = (m - m_0)/m \times 100,$$

где:

m = начальный вес в граммах испытываемого образца;

m₀ = вес в граммах высушенного испытываемого образца.

1.5.2. Высушивание с предварительной сушкой

$$X_p = [(m_2 - m_0) \times m_1 / m_2 + m - m_1] \times 100 / m = 100 \times (1 - m_1 \times m_0 / m \times m_2),$$

где:

m = начальный вес в граммах испытываемого образца;

m₁ = вес в граммах образца после предварительной сушки;

m₂ = вес в граммах образца после дробления или измельчения;

m₀ = вес в граммах сухого испытываемого образца.

1.5.3. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых для той же партии, не превышает 0,2% абсолютного значения для влажности.

1.6. Комментарии

Если дробление является необходимым и это действие может изменить содержание влаги в продукте, результаты анализа компонентов корма следует корректировать исходя из содержания влаги в образце в его первоначальном состоянии.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВЛАГИ В ЖИВОТНЫХ

И РАСТИТЕЛЬНЫХ ЖИРАХ И МАСЛАХ

2.1. Цель и область применения

Настоящий метод позволяет определение содержания влаги и легкоиспаряющихся веществ в животных и растительных жирах и маслах.

2.2. Принцип применения

Образец высушивают до достижения постоянной массы (потеря веса между двумя последовательными взвешиваниями меньше или равна 1 мг) до 103°C. Потеря веса определяется путем взвешивания.

2.3. Измерительные приборы

2.3.1. Сосуд с плоским дном из материала, стойкого к коррозии, диаметром 8-9 см и глубиной около 3 см.

2.3.2. Термометр с закрепленной луковицей и с расширенной трубкой в верхней части, градуированный приблизительно от 80°C до не менее 110°C и около 10 см в длину.

2.3.3. Кюветка с песком или плитка.

2.3.4. Эксикатор, содержащий эффективный осушитель.

2.3.5. Аналитические весы.

2.4. Процедура подготовки

Взвешиваются с точностью до 1 мг 20 г гомогенизированного образца во взвешенном сухом сосуде согласно описанию, приведенному в подпункте 2.3.1, содержащем термометр, согласно описанию, приведенному в подпункте 2.3.2. Образец нагревается в кюветке с песком или на плите согласно описанию, приведенному в подпункте 2.3.3, перемешивается постоянно с помощью термометра так, чтобы температура достигла 90°C в течение 7 минут.

Интенсивность тепла уменьшается в соответствии с частотой, с которой пузырьки поднимаются со дна сосуда. Температура не должна превышать 105°C. Продолжается перемешивание с очищением дна до тех пор, пока пузырьки перестанут образовываться.

Для обеспечения полного удаления влаги разогревается несколько раз при температуре 103±2°C, с охлаждением до 93°C между последовательными нагреваниями. В дальнейшем оставляется для остывания при комнатной температуре в эксикаторе согласно описанию, приведенному в подпункте 1.3.4, и взвешивается. Эта операция повторяется, пока потеря веса между двумя последовательными нагреваниями не будет превышать 2 мг.

Увеличение веса образца после повторного нагрева указывает на окисление жиров. В этом случае результат рассчитывается путем взвешивания непосредственно перед началом увеличения веса.

2.5. Расчет результатов

Содержание влаги (X) в процентах от образца определяется по следующей формуле:

$$X = (m_1 - m_2) \times 100/m,$$

где:

m = вес в граммах испытываемой пробы;

m₁ = вес в граммах сосуда вместе с его содержанием до нагревания;

m₂ = вес в граммах сосуда вместе с его содержанием после нагревания.

Результаты меньше 0,05% записываются как “менее 0,05%”.

Повторяемость

Разница влажности между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать 0,05% в абсолютном значении.

III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СЫРОГО ПРОТЕИНА

3.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определять содержание сырого протеина в кормах на основе содержания азота с использованием метода Кельдаля.

3.2. Принцип применения

Образец растворяют в серной кислоте в присутствии катализатора. Раствор кислоты ощелачивается с раствором гидроксида натрия. Аммиак дистиллируется и собирается в измерительном количестве серной кислоты, избыток которого титруется стандартным раствором гидроксида натрия.

В качестве альтернативы свободный аммиак отгоняют в раствор борной кислоты в избытке с последующим титрованием соляной или серной кислоты.

3.3. Применяемые реагенты

3.3.1. Сульфат калия.

3.3.2. Катализатор: оксид меди (II) CuO или сульфат меди (II), пентагидрат, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.3.3. Гранулированный цинк.

3.3.4. Серная кислота, $\rho_{20} = 1,84$ г/мл.

3.3.5. Серная кислота – стандартный объемный раствор, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ моль/л.

3.3.6. Серная кислота – стандартный объемный раствор, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1$ моль/л.

3.3.7. Серная кислота – стандартный объемный раствор, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ моль/л.

3.3.8. Индикатор метиловый красный – растворить 300 мг метилового красного в 100 мл этанола, $\alpha = 95-96\%$ (v/v).

3.3.9. Раствор гидроксида натрия (может быть использован в качестве технического решения)

$\beta = 40$ г/100 мл (m/v: 40%).

3.3.10. Гидроксид натрия – стандарт объемного раствора, $c(\text{NaOH}) = 0,25$ моль/л

3.3.11. Гидроксид натрия – стандарт объемного раствора, $c(\text{NaOH}) = 0,1$ моль/л

3.3.12. Гранулированная пемза, промытая в соляной кислоте и кальцинированная.

3.3.13. Ацетанилид ($m.p = 114^\circ\text{C}$, содержание N = 10,36%).

3.3.14. Сахароза (без азота).

3.3.15. Борная кислота (H_3BO_3).

3.3.16. Индикатор раствора метилового красного: растворяют 100 мг метилового красного в 100 мл этанола или метанола.

3.3.17. Бромкрезоловый зеленый раствор: растворяют 100 мг бромкрезолового зеленого раствора в 100 мл этанола или метанола.

3.3.18. Раствор борной кислоты (10-40 г/л, в зависимости от используемого оборудования).

При применении метода колориметрии для распознавания конечной точки показатели метилового красного и бромкрезола добавляются к раствору борной кислоты. Если готовится 1 литр раствора борной кислоты, до регулировки объема добавляется 7 мл индикатора метилового красного раствора согласно описанию, приведенному в подпункте 3.3.16, и 10 мл раствора зеленого бромкрезола согласно описанию, приведенному в подпункте 3.3.17.

С учетом используемой воды рН раствора борной кислоты отличается в зависимости от партии. Корректирование часто необходимо с небольшим количеством щелочного вещества для получения положительного контроля.

Добавление около 3-4 мл NaOH согласно описанию из подпункта 3.3.11 в 1 л борной кислоты 10 г/л борной дает обычно хорошее корректирование. Раствор хранится при комнатной температуре и на время хранения должен быть защищен от света и источников паров аммиака.

3.3.19. Соляная кислота – стандартный объемный раствор, $c(\text{HCl}) = 0,1$ моль/л

Если при расчетах производятся необходимые корректировки, можно использовать другие концентрации объемного раствора согласно описанию в подпунктах 3.3.5, 3.3.6, 3.3.7, 3.3.10, 3.3.11 и 3.3.19. Концентрации всегда выражаются в виде четырехзначных дробей после запятой.

3.4. Измерительные приборы

Соответствующий аппарат для проведения растворения, перегонки и титрования в соответствии с процедурой по Кьельдалю.

3.5. Процедура подготовки

3.5.1. Растворение

Взвешивается 1 г образца с отклонением в 0,001 г и переносится в колбу для растворения. Добавляются 15 г сульфата калия согласно описанию в подпункте 3.3.1, необходимое количество катализатора, как описано в подпункте 3.3.2 [0,3 до 0,4 г оксида меди (II) или от 0,9 до 1,2 г сульфата меди (II), пентагидрат], 25 мл серной кислоты, как описано в подпункте 3.3.4, и, если необходимо, несколько гранул пемзы, как описано в пункте 3.3.12, и смешивается.

Колба нагревается сначала умеренно, с кругообразным помешиванием, если это необходимо, до тех пор, пока материал обуглится и пена исчезнет, затем интенсивно нагревается, пока жидкость кипит постоянно. Нагревание является адекватным, если кипящая кислота конденсируется на стенках сосудов. Это предотвращает перегрев краев и прилипание к ним органических частиц.

Когда раствор станет прозрачным, а его цвет светло-зеленым, продолжается кипение в течение двух часов, затем он оставляется для остывания.

3.5.2. Дистилляция

Аккуратно добавляется достаточное количество воды, чтобы обеспечить полное растворение сульфатов. Оставляется для остывания, а затем добавляется, если это необходимо, несколько гранул цинка, в соответствии с описанием, изложенным в подпункте 3.3.3. Осуществляются действия в соответствии с описанием в подпунктах 3.5.2.1 или 3.5.2.2.

3.5.2.1. Дистилляция в серной кислоте

В сосуд для сбора перегонного аппарата заливают 25 мл серной кислоты, как описано в подпунктах 3.3.5 или 3.3.7, точно измеренной, в зависимости от определенного содержания азота. Добавляется несколько капель индикатора метилового красного, как описано в подпункте 3.3.8.

Колба для растворения подключается к конденсатору перегонного аппарата и конец конденсатора погружается в жидкость колбы на глубину не менее 1 см (см. наблюдения подпункта 3.8.3). Медленно вливаются 100 мл раствора гидроксид натрия, как изложено в подпункте 3.3.9, в колбу для растворения, без потери аммиака (см. наблюдения подпункта 3.8.1). Колба нагревается до полной дистилляции аммиака.

3.5.2.2. Дистилляция в борной кислоте

Если титрование аммиака, содержащегося в дистилляте, выполняется вручную, применяется указанная ниже процедура.

Если установка для дистилляции полностью автоматизирована, включая титрование содержания аммиака в дистилляте, применяются инструкции по эксплуатации дистилляционной установки, предоставляемой производителем.

В случае полуавтоматического устройства для дистилляции добавляется в избытке гидроксил натрия и паровая дистилляция осуществляется автоматически.

Под отверстием откачивания конденсатора находится емкость, содержащая 25-30 мл борной кислоты, как описано в подпункте 3.3.18, таким образом, чтобы трубка откачивания находилась под уровнем поверхности избытка раствора борной кислоты. Дистилляционная установка регулируется так, чтобы высвобождалось 50 мл раствора гидроксила натрия, как описано в подпункте 3.3.9. Дистилляционная установка работает в соответствии с инструкциями производителя для завершения дистилляции выпущенного аммиака путем добавления раствора гидроксила натрия. Дистиллят собирают в восприимчивом растворе борной кислоты. Количество дистиллята (время дистилляции под паром) зависит от количества азота в образце. Применяются инструкции производителя.

3.5.3. Титрование

Необходимо действовать как в случаях, описанных в подпункте 3.5.3.1 или 3.5.3.2.

3.5.3.1. Серная кислота

Титруется избыток серной кислоты в колбе с раствором гидроксида натрия, как описано в подпункте 3.3.10 или 3.3.11, в зависимости от концентрации используемой серной кислоты, пока он не достигнет окончательной точки.

3.5.3.2. Борная кислота

Титруется с помощью пробирки содержимое колбы со стандартным объемным раствором соляной кислоты, как описано в подпункте 3.3.19, или со стандартным объемным раствором серной кислоты, как описано в подпункте 3.3.6, и читается количество используемого титруемого раствора.

При применении колориметрического обнаружения конечной точки это достигается при первом появлении розового цвета в содержимом. Чтение пробирки оценивается отклонением в 0,05 мл. Просмотр конечной точки может быть облегчен магнитной мешалкой освещенной пластины или фотометрическим детектором.

Это можно сделать автоматическим методом с помощью дистилляционного аппарата с паром с автоматическим титрованием.

При использовании системы автоматического титрования оно начинается сразу после начала перегонки и используется 1% раствор борной кислоты, как описано в подпункте 3.3.18.

Подчеркивающая работа дистилляционной установки или установки по дистилляции/титрованию осуществляется в соответствии с инструкциями производителя.

Если используется полностью автоматическая дистилляционная установка, автоматическое титрование аммиака может быть осуществлено также с помощью обнаружения конечной точки при использовании потенциометрической системы рН.

В этом случае используется автоматический аппарат по титрованию с рН-метром. РН-метр соответствует промежутку рН 4-7, используя обычные лабораторные процедуры для калибровки рН.

Конечная точка титрования, выраженного в рН, достигает отметки 4.6, представляющей самую низкую точку изгиба титрования (точка изменения).

3.5.4. Контрольное испытание

Чтобы убедиться, что реагенты не содержат азота, осуществляется контрольное испытание (растворение, перегонка и титрование) с использованием 1 г сахарозы вместо образца.

3.6. Расчет результатов

Расчет осуществляется в соответствии с положениями подпункта 3.6.1 или 3.6.2.

3.6.1. Расчет титрования в соответствии с подпунктом 3.5.3.1

Содержание сырого белка, выраженное в процентах веса, рассчитывается с использованием следующей формулы:

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

где:

V_0 = объем (мл) NaOH (как описано в подпункте 3.3.10 или 3.3.11), используемый в контрольном тесте;

V_1 = объем (мл) NaOH (как описано в подпункте 3.3.10 или 3.3.11), используемый в титровании партии;

c = концентрация (моль/л) гидроксила натрия (как описано в подпункте 3.3.10 или 3.3.11);

m = вес (г) образца.

3.6.2. Расчет титрования в соответствии с подпунктом 3.5.3.2

3.6.2.1. Титрование соляной кислотой

Содержание сырого белка, выраженное в процентах веса, рассчитывается согласно следующей формуле:

$$(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25/m,$$

где:

m = вес (г) титрованной части;

c = концентрация (моль/л) объемного стандартного раствора соляной кислоты, как описано в подпункте 3.3.19;

V_0 = объем (в мл) соляной кислоты, используемой в контрольном тесте;

V_1 = объем (в мл) соляной кислоты, используемой в тесте.

3.6.2.2. Титрование с серной кислотой

Содержание сырого белка, выраженная в процентах по весу, рассчитывается с использованием следующей формулы:

$$(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25/m,$$

где:

m = вес (г) титрованной части;

c = концентрация (моль/л) объемного стандартного раствора серной кислоты, как описано в подпункте 3.3.6;

V_0 = объем (в мл) серной кислоты, как описано в подпункте 3.3.6, используемый в контрольном тесте;

V_1 = объем (в мл) серной кислоты, как описано в подпункте 3.3.6, используемый в контрольном тесте.

3.7. Проверка метода

3.7.1. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполненных на том же образце, не должна превышать:

- a) 0,2% в абсолютном значении для сырого белка составляет менее 20%;
- b) 1% по отношению к более высокому значению, при содержании сырого белка от 20 до 40%;
- c) 0,4% в абсолютном значении, для сырого белка более 40%.

3.7.2. Точность

Анализ (растворение, перегонка и титрование) осуществляется на 1,5-2 г ацетанилида, как описано в подпункте 3.3.13, при наличии 1 г сахарозы, как описано в подпункте 3.3.14, 1 г ацетанилида потребляет 14,8 мл серной кислоты. Восстановление должно быть не менее 99%.

3.8. Комментарии

3.8.1. Аппаратура может быть ручной, полуавтоматической или автоматической. Если оборудование нуждается в передаче между стадиями растворения и дистилляции, эта передача должна быть выполнена без потерь. Если сосуд дистилляционного аппарата не оснащен капельной воронкой, добавляют гидроксил натрия непосредственно перед подключением сосуда к конденсатору, аккуратно разливая жидкость по краям сосуда.

3.8.2. Если растворенный продукт затвердевает, возобновляется определение с использованием наибольшего количества серной кислоты, чем то, которое описано в подпункте 3.3.4.

3.8.3. Для продуктов с низким содержанием азота объем серной кислоты, описанный в подпункте 3.3.7, требуемый для введения в сосуд для сбора, может быть уменьшен при необходимости на 10 или 15 мл и заполнен до 25 мл водой.

3.8.4. Для рутинного анализа, чтобы определить содержание сырого белка, могут использоваться альтернативные методы анализа, а метод Кьельдаля, описанный в главе III настоящего приложения, является ориентировочным методом. Эквивалентность результатов, полученных альтернативным методом, а также ориентировочным методом, должна быть продемонстрирована для каждой матрицы индивидуально. Поскольку результаты, полученные альтернативным методом, даже после проверки эквивалентности могут несколько отличаться от результатов, полученных ориентировочным методом, в аналитическом отчете необходимо отметить метод используемого анализа для определения содержания сырого протеина.

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ

4.1. Цель и область применения

Настоящий метод позволяет определить мочевины в кормах.

4.2. Принцип применения

Образец помещают в суспензию в воде, добавляя продукт для очищения. Суспензию фильтруют.

Содержание мочевины в фильтрате определяется путем сложения 4-диметиламинобензальдегида (4-DMAВ) путем измерения оптической плотности при длине волны 420 нм.

4.3. Применяемые реагенты

4.3.1. Раствор 4-диметиламинобензальдегид: растворяют 1,6 г 4-DMAВ в 100 мл этанола, 96% и добавляют 10 мл соляной кислоты (ρ_{20} 1,19 г / мл). Этот реагент хранится в течение не более двух недель.

4.3.2. Раствор Cargez I: растворяются 21,9 г ацетата цинка, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ и 3 г ледяной уксусной кислоты в воде. Дополняется водой до 100 мл.

4.3.3. Раствор Cargez II: растворяется 10,6 г калия ферроцианида, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ в воде. Заполняется водой до 100 мл.

4.3.4. Активированный уголь, не поглощающий мочевины (контролирующий).

4.3.5. Раствор мочевины 0,1% (вес/объем).

4.4. Измерительные приборы

4.4.1. Мешалка (смеситель): около 35-40 об/мин.

4.4.2. Пробирки: 160 × 16 мм с притертыми пробками.

4.4.3. Спектрофотометр.

4.5. Процедура подготовки

4.5.1. Анализ образцов

Взвешиваются 2 г образца с отклонением в 1 мг и вместе с 1 г активированного угля вводятся, как указано в подподпункте 4.3.4, в 500 мл градуированную колбу. Добавляются 400 мл воды и 5 мл раствора Cargez I, как указано в подпункте 4.3.2, перемешиваются в течение примерно 30 секунд и добавляются 5 мл раствора Cargez II, как указано в пункте 4.3.3. Размешивается в течение тридцати минут в смесителе. Наполняется до нужного объема водой, встряхивается и фильтруется.

Отделяют 5 мл прозрачного и бесцветного фильтрата, вводят в пробирки с притертой к стеклу пробкой, добавляют 5 мл 4-DMAВ в соответствии с описанием подпункта 4.3.1 и перемешивают. Пробирки помещаются в водяную баню при температуре 20°C ($\pm 4^\circ C$). Через пятнадцать минут измеряется оптическая плотность образца раствора в спектрофотометре при 420 нм. Сравнивается с растворами реагентов контрольным тестом.

4.5.2. Калибровочная кривая

Отделяется объем в 1, 2, 4, 5 и 10 мл раствора мочевины в соответствии с описанием подпункта 4.3.5, вводится в 100 мл градуированные колбы и дополняется до нужного объема водой. Отделяются 5 мл из каждого раствора и добавляются в каждые 5 мл раствора 4-DMAВ, в соответствии с описанием в подпункте 4.3.1, перемешиваются и измеряется оптическая плотность при 420 нм с контрольным раствором, содержащим 5 мл 4-DMAВ и 5 мл воды, не содержащим мочевины. Прочерчивается калибровочная кривая.

4.6. Расчет результатов

Определяется количество мочевины в пробе по калибровочной кривой.

Результат выражается в процентах образцов.

4.7. Комментарии

4.7.1. Если содержание мочевины превышает 3%, уменьшается вес образца на 1 г или разбавляется первоначальный раствор таким образом, чтобы в 500 мл было не более 50 мг мочевины.

4.7.2. При низком содержании мочевины вес образца увеличивается до тех пор, пока фильтрат остается прозрачным и бесцветным.

4.7.3. Если образец содержит простые соединения азота, такие как аминокислоты, оптическую плотность измеряют при 435 нм.

V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИСПАРЯЮЩИХСЯ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ

A. Методом микродиффузии

5.1. Цель и область применения

Этот метод определяет содержание испаряющихся азотистых оснований, выраженных как аммиак, в корме.

5.2. Принцип применения

Образец подлежит экстрагированию водой, а раствор остается прозрачным и фильтрованным. Испаряющиеся азотистые основания вытесняются методом микродиффузии с использованием раствора карбоната калия, собираются в раствор борной кислоты и титруются серной кислотой.

5.3. Применяемые реагенты

5.3.1. Раствор трихлоруксусной кислоты 20% (вес/объем).

5.3.2. Индикатор: растворяются 33 мг бромкрезола зеленого и 65 мг метилового красного в 100 мл 95-96% этилового спирта (объем/объем).

5.3.3. Раствор борной кислоты: в литровой градуированной колбе растворяют 10 г борной кислоты в 200 мл 95-96% этилового спирта (объем/объем) и 700 мл воды. Добавляют 10 мл индикатора, как описано в подпункте 5.3.2. Перемешивают и при необходимости корректируют цвет раствора до светло-красного при добавлении раствора гидроксила натрия. 1 мл этого раствора позволяет фиксирование не более 300 мг NH_3 .

5.3.4. Насыщенный раствор карбоната калия: растворяют 100 г карбоната натрия в 100 мл кипящей воды. Оставляется для остывания и фильтруется.

5.3.5. Серная кислота 0,01 моль/л.

5.4. Измерительные приборы

5.4.1. Мешалка (смеситель): около 35-40 об/мин.

5.4.2. Ячейки Конвея из стекла или из гибкого пластика.

5.4.3. Микробюретки градуированные на 1/100 мл.

5.5. Процедура подготовки

Взвешивается 10 г образца с точностью до 1 мг и вместе вводится в 100 мл воды в калибровочную колбу объемом 200 мл. Перемешивают или встряхивают в смесителе в течение 30 минут. Добавляют 50 мл трихлоруксусной кислоты, как указано в подпункте 5.3.1, дополняют до нужного объема водой, интенсивно встряхивают и фильтруют через складчатый фильтр.

С помощью пипетки вводится 1 мл борной кислоты согласно описанию, приведенному в подпункте 5.3.3, в центр ячейки Конвея и 1 мл отфильтрованного образца в ободок ячейки. Частично прикрывается смазанной крышкой. Быстро наливается 1 мл насыщенного раствора карбоната калия согласно описанию, приведенному в подпункте 5.3.4, в ободок и крышка закрывается таким образом, чтобы ячейка была герметичной. Ячейка аккуратно поворачивается в горизонтальную плоскость таким образом, чтобы два реагента смешивались. Оставляется для выращивания в течение не менее четырех часов при комнатной температуре или в течение одного часа при температуре 40°C.

С помощью микробюретки, как указано в подпункте 5.4.3, титруются испаряющиеся основания из раствора борной кислоты с серной кислотой, как описано в подпункте 5.3.5.

Выполняется контрольное испытание с применением той же процедуры, но без анализа проб.

5.6. Расчет результатов

1 мл H_2SO_4 0,01 моль/л соответствуют 0,34 мг аммиака.

Результат выражается в процентах образцов.

Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на той же пробе, не должна превышать:

- a) 10% в относительном значении для содержания аммиака менее 1%;
- b) 0,1% в абсолютном значении для содержания аммиака 1% и более.

5.7. Комментарии

Если содержание аммиака в образце превышает 0,6%, первоначальный фильтрат разбавляется.

В. Методом дистилляции

5.1. Цель и область применения

Настоящий метод позволяет определить легкоиспаряющиеся азотистые основания, выраженные в виде аммиака, рыбной муки, которая практически не содержит мочевины. Она применима, только если содержание аммиака менее 0,25%.

5.2. Принцип применения

Образец подвергается водной экстракции, а вещество очищается и фильтруется. Легкоиспаряющиеся азотистые щелочи отделяются в точки кипения путем добавления оксида магния и собираются в определенное количество серной кислоты, избыток которой титруется раствором гидроксила натрия.

5.3. Применяемые реагенты

5.3.1. 20% трихлоруксусной кислоты (вес/объем).

5.3.2. Оксид магния.

5.3.3. Противопенная эмульсия (например, силикон).

5.3.4. Серная кислота 0,05 моль/л.

5.3.5. Раствор гидроксила натрия 0,1 моль/л.

5.3.6. 0,3% метил-красный раствор в 95-96% этанола (объем/объем).

5.4. Измерительные приборы

5.4.1. Смеситель (мешалка): около 35-40 об/мин.

5.4.2. Аппарат для дистилляции типа аппарата Кельдаля.

5.5. Процедура подготовки

Взвешивается 10 г образца с точностью до 1 мг и вводится со 100 мл воды в градуированную колбу объемом 200 мл. Перемешивается или взбалтывается в мешалке в течение 30 минут. Добавляется 50 мл трихлоруксусной кислоты согласно описанию, приведенному в подпункте 5.3.1, дополняется до объема водой, сильно встряхивается и фильтруется через складчатый фильтр.

Отбирается соответствующее количество прозрачного фильтрата для содержания предполагаемых легкоиспаряющихся азотистых оснований (100 мл обычно достаточно). Разбавляется в 200 мл и добавляется 2 г окиси магния и несколько капель пеногасителя. Раствор должен быть щелочным и определяется с использованием лакмусовой бумаги; если он не щелочной, то добавляется окись магния. Далее выполняется как описано в подпунктах

5.5.2 и 5.5.3 метода анализа для определения сырого протеина, описанного в главе III настоящего приложения.

Выполните контрольный тест с применением тех же процедур, но без анализа проб.

5.6. Расчет результатов

1 мл H_2SO_4 0,05 моль/л соответствуют 1,7 мг аммиака.

Результат выражается в процентах образцов.

Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на той же пробе, не должна превышать в относительном выражении 10% аммиака.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ (ЗА ИСКЛЮЧЕНИЕМ ТРИПТОФАНА)

6.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определять свободные аминокислоты (синтетические и натуральные) и общие (пептидосвязанные и свободные) в кормах с помощью аминокислотного анализатора. Это применимо к следующим аминокислотам: цист(е)ин, метионин, лизин, треонин, аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, пролин, серин, тирозин и валин.

Этот метод не различает соли аминокислот и не допускает различия между формами D и L аминокислот. Это не распространяется на определение триптофана или аналогов гидроксиминованных аминокислот.

6.2. Принцип применения

6.2.1. Свободные аминокислоты

Свободные аминокислоты экстрагируют разбавленной соляной кислотой. Совместно экстрагированные азотистые макромолекулы осаждаются с сульфосалициловой кислотой и отделяются методом фильтрования. Фильтрованный раствор доводится до pH 2,2. Аминокислоты разделяются ионообменной хроматографией и определяются взаимодействием с нингидрином с фотометрическим определением при 570 нм.

6.2.2. Общие аминокислоты

Выбор процедуры зависит от аминокислот, которые анализируются. Цист(е)ин и метионин окисляются с цистеиновой кислотой и, соответственно, метионин сульфид до гидролиза. Тирозин должен быть определен в гидролизатах неокисленных образцов. Все другие аминокислоты, перечисленные в пункте 6.1, могут быть определены либо в окисленной, либо в неокисленной пробе.

Окисление проводится при 0°C путем смешивания перформной кислоты и фенола. Избыточное окисление реагента разлагается натрием дисульфида. Окисленный или неокисленный образец гидролизуются соляной кислотой, как указано в подпункте 6.3.20, в течение 23 часов. Гидролизат доводится до pH 2,2. Аминокислоты разделяются ионообменной хроматографией и определяются взаимодействием с нингидринами, с фотометрическим определением при 570 нм (440 нм для пролина).

6.3. Применяемые реагенты

Используется дважды дистиллированная вода или вода эквивалентного качества (проводимостью < 10 μS).

6.3.1. Перекись водорода, г (г/г) = 30%.

6.3.2. Муравьиная кислота, г (г/г) = 98-100%.

6.3.3. Фенол.

6.3.4. Натрия дисульфид.

- 6.3.5. Гидроксил натрия.
- 6.3.6. Дигидрат 5-сульфосалициловой кислоты.
- 6.3.7. Соляная кислота плотностью около 1,18 г/мл.
- 6.3.8. Еринатрий цитрат дигидрат.
- 6.3.9. 2,2'- тиодигликоль (тиодигликоль).
- 6.3.10. Хлорид натрия.
- 6.3.11. Нингидрин.
- 6.3.12. Петролейный эфир, интервал кипения 40-60°C.
- 6.3.13. Норлейцин или другое соединение, пригодное для использования в качестве внутреннего стандарта.
- 6.3.14. Азот, газ (< 10 ppm кислорода).
- 6.3.15. 1-октанол.
- 6.3.16. Аминокислоты.
- 6.3.16.1. Стандартные вещества, перечисленные в пункте 6.1. Чистые соединения, не содержащие кристаллизованную воду. Перед употреблением высушивают в вакууме с использованием P₂O₅ или H₂SO₄ в течение одной недели.
- 6.3.16.2. Цистеиновая кислота.
- 6.3.16.3. Метионин сульфон.
- 6.3.17. Раствор гидроксила натрия, с = 7,5 моль/л
Растворяют 300 г NaOH в воде и дополняют до 1 л.
- 6.3.18. Раствор гидроксила натрия с = 1 моль/л
Растворяют 40 г NaOH в воде и доводят до 1 л.
- 6.3.19. Раствор муравьиной кислоты – фенол.
Смешивается 889 г муравьиной кислоты с 111 г воды и добавляется 4,73 г фенола.
- 6.3.20. Гидролизная настойка, с = 6 моль HCl/L, содержащая 1 г фенола/л:
Добавляется 1 г фенола в 492 мл соляной кислоты и дополняется водой до 1 л.
- 6.3.21. Экстрактная настойка, с = 0,1 моль HCl/L, содержащая 2% тиодигликоля:
отбирают 8,2 мл соляной кислоты, разбавленной в 900 мл воды, добавляют 20 мл тиодигликоля и дополняют водой до 1 литра (не смешиваются непосредственно соляная кислота и тиодигликоль).
- 6.3.22. Дигидрат 5-сульфосалициловой кислоты, β = 6%
60 г 5-сульфосалициловой кислоты растворяется в воде и дополняется водой до 1 литра.
- 6.3.23. Окисленная смесь (перформная кислота – фенол).
Смешивается 0,5 мл перекиси водорода с 4,5 мл муравьиной кислоты-фенола в небольшом лабораторном стакане. Инкубируют при 20-30°C в течение 1 часа, чтобы получить перформную кислоту, затем охлаждают в ледяной воде ванны (15 минут) перед добавлением образца.
- 6.3.24. Раствор буферного цитрата, с = 0,2 моль Na⁺/л, pH 2.2
Растворяют 19,61 г цитрата натрия, 5 мл тиодигликоля, 1 г фенола и 16,5 мл соляной кислоты, с плотностью около 1,18 г/мл в приблизительно 800 мл воды. Корректируется значение pH до 2,2. Дополняется водой до 1 л.
- 6.3.25. Раствор буферной элюции, подготовленной в соответствии с условиями для используемого анализатора в подпункте 6.4.9.
- Внимание! Избегать попадания на кожу и носить защитную одежду.*

6.3.26. Реагент нингидрин, приготовленный в соответствии с условиями для используемого анализатора в подпункте 6.4.9.

6.3.27. Стандартный аминокислотный раствор. Эти растворы хранятся при температуре ниже 5°C.

6.3.27.1. Запас стандартного аминокислотного раствора согласно описаниям в подпункте 6.3.16.1.

$c = 2,5$ ммоль/мл для каждого, в соляной кислоте.

Может быть получен из коммерческих источников.

6.3.27.2. Запас стандартного раствора цистеиновой кислоты и метионин сульфона, $c = 1,25$ ммоль/мл.

Растворяются 0,2115 г цистеиновой кислоты и 0,2265 г метионин сульфона в цитратном буферном растворе, как указано в подпункте 6.3.24, в литровой мерной колбе и доводится до объема буферным цитратным раствором. Хранится при температуре ниже 5°C не более 12 месяцев. Этот раствор не используется, если запас стандартного раствора содержит цистеиновую кислоту и метионин сульфон.

6.3.27.3. Запас стандартного раствора внутреннего стандарта, например, норлейцин, $c = 20$ моль/мл.

Растворяется 0,656 г норлейцина в цитратном буферном растворе в мерной колбе и дополняется цитратным буферным раствором до 250 мл. Хранится при температуре ниже 5°C не более шести месяцев.

6.3.27.4. Калибровочный стандартный аминокислотный раствор для использования с гидролизатами, $c = 5$ моль/50 мл цистеиновой кислоты и метионин сульфона и $c = 10$ моль/50 мл для других аминокислот. Растворяется 2,2 г хлористого натрия в 100 мл лабораторном стакане, который содержит 30 мл буферного цитратного раствора. Добавляются 4 мл запаса стандартного аминокислотного раствора, 4 мл запаса стандартного раствора цистеиновой кислоты и метионин сульфона и 0,5 мл запаса стандартного раствора внутреннего стандарта при необходимости. Корректируется значение рН до 2,2 гидроксидом натрия.

Переносится количественно в мерную колбу на 50 мл, добавляется при необходимости буферный цитратный раствор и перемешивается.

Хранится при температуре ниже 5°C не более трех месяцев.

6.3.27.5. Калибровочный стандартный аминокислотный раствор для использования с гидролизатами, подготовленный в соответствии с подпунктом 6.5.3.3.1, и для использования с экстрактами, как описано в подпункте 6.5.2. Калибровочный раствор готовится в соответствии с подпунктом 6.3.27.4, но исключая хлорид натрия.

Хранится при температуре ниже 5°C не более трех месяцев.

6.4. Измерительные приборы

6.4.1. Круглодонная колба на 100 или 250 мл, оснащенная конденсатором с обратным течением.

6.4.2. Боросиликатное стекло, 100 мл с резиновой пробкой с внутренней резьбой/тефлон для использования в духовке.

6.4.3. Духовка с принудительной вентиляцией и регулятор температуры с точностью более $\pm 2^\circ\text{C}$.

6.4.4. рН-метр (три цифры).

6.4.5. Мембранный фильтр (0,22 мм).

6.4.6. Центрифуга.

6.4.7. Вакуумный роторный испаритель.

6.4.8. Механическая или магнитная мешалка.

6.4.9. Аминокислотный анализатор или ВЭЖХ оборудование с ионообменными колонками, устройства для нингидрина, отклонение после колонки и фотометрический детектор.

Колонна заполнена сульфированной смолой полистирола, которая способна разделить аминокислоты друг от друга, а также материалы, содержащие нингидрин. Поток линий буферного раствора и нингидрина обеспечивается стабильностью насоса $\pm 0,5\%$ на период, который включает операции стандартной калибровки, а также анализ образцов.

Для некоторых аминокислотных анализаторов могут быть использованы процедуры по гидролизу, когда гидролизат имеет концентрацию натрия $c = 0,8$ моль/л и содержит всю остаточную муравьиную кислоту их стадии окисления.

Другие анализаторы не дают удовлетворительного разделения определенных аминокислот, если гидролизат содержит избыток муравьиной кислоты и/или высокие концентрации ионов натрия. В этом случае количество кислоты уменьшается испарением около 5 мл после гидролиза и перед регулированием pH. Испарение происходит в вакууме при температуре 40°C .

6.5. Процедура подготовки

6.5.1. Подготовка проб

Образец измельчается таким образом, чтобы он мог пройти через сито с ячейками 0,5 мм. Образцы с высоким содержанием влаги должны быть высушены воздушным путем при температуре не выше 50°C или лиофилизированы до помола. Образцы с высоким содержанием жиров экстрагируют петролийным эфиром до перемола.

6.5.2. Определение свободных аминокислот в кормах и премикса

Взвешивается с отклонением в 0,2 мг соответствующее количество (1-5 г) обработанной пробы в соответствии с положениями подпункта 6.5.1 в колбе Эрленмейера и добавляются 100 мл экстракта смеси. Встряхивается смесь в течение 60 минут с помощью механической или магнитной мешалки. Оставляется для осаждения осадка и добавляется 10 мл супернатантного раствора в 100 мл лабораторный стакан.

При перемешивании добавляется 5 мл сульфосалициловой кислоты с дальнейшим перемешиванием магнитной мешалкой в течение 5 минут. Супернатант фильтруют или центрифугируют для удаления осадка. Вводится 10 мл полученного раствора в 100 мл лабораторный стакан и с доведением pH до 2,2 раствором гидроксида натрия, перемещается в мерную колбу соответствующего объема с помощью раствора цитратного буфера и доводится до метки буферным раствором.

При использовании внутреннего стандарта добавляют 1 мл внутреннего стандарта на каждые 100 мл окончательного раствора и доводят до метки буферным раствором.

Переходят к этапу хроматографии согласно положениям подпункта 6.5.4.

Если экстракты не рассматриваются в тот же день, они должны храниться при температуре ниже 5°C .

6.5.3. Определение общего содержания аминокислот

6.5.3.1. Окисление

Взвешиваются с отклонением 0,2 мг от 0,1 до 1 г подготовленного образца в соответствии с положениями подпункта 6.5.1 в:

а) круглодонной колбе объемом 100 мл, как указано в подпункте 6.4.1, для гидролиза в открытой среде, согласно описаниям, приведенным в подпункте 6.5.3.2.3, или

б) круглодонной колбе на 250 мл, как указано в подпункте 1.4.1, в случае необходимости низкой концентрации натрия, в соответствии с положениями подпункта 6.5.3.3.1, или

с) 100 мл бутылке, снабженной винтовой пробкой в соответствии с положениями подпункта 6.4.2 для гидролиза в закрытой среде, как описано в подпункте 6.5.3.2.4.

Взвешенная порция образца имеет содержание азота около 10 мг, а содержание влаги не превышает 100 мг.

Колба/бутылка вводится в ванну с ледяной водой и охлаждается до 0°C, добавляется 5 мл окисленной смеси и перемешивается с помощью шпателя с изогнутым концом. Герметизируется колба/бутылка, содержащая шпатель, с помощью герметической пленки, ванна с ледяной водой, содержащая герметичный сосуд, помещается в холодильник при 0°C и оставляется на 16 часов. По истечении 16 часов вытаскивается из холодильника, а избыток окисленного реактива разлагается путем добавления 0,84 г дисульфида натрия.

Переходят к процедуре, отмеченной в подпункте 6.5.3.2.1.

6.5.3.2. Гидролиз

6.5.3.2.1. Гидролиз окисленных образцов

К окисленным образцам, изготовленным в соответствии с подпунктом 6.5.3.1, добавляется 25 мл гидролизной смеси, следя за тем, чтобы были смыты все остатки образца со стен сосуда и шпателя.

В зависимости от используемой процедуры гидролиза переходят к методу, описанному в подпунктах 6.5.3.2.3 или 6.5.3.2.4.

6.5.3.2.2. Гидролиз неокисленных образцов

Взвешивается 0,1-1 г подготовленного образца с точностью до 0,2 мг в круглодонной колбе объемом 100 мл или 250 мл либо бутылке на 100 мл с нарезной пробкой. Порция взвешенного образца должна иметь содержание азота в пределах 10 мг. Осторожно добавляется 25 мл гидролизной смеси и смешивается с образцом. Далее действуют согласно описаниям подпункта 6.5.3.2.3 или 6.5.3.2.4.

6.5.3.2.3. Гидролиз в открытой среде

Добавляют 3 стеклянных шарика в смесь в колбе (приготовленную согласно описаниям подпункта 6.5.3.2.1 или 6.5.3.2.2) и варят непрерывно при слабом кипении в течение 23 часов. В конце гидролиза уплотнитель промывается с 5 мл цитратного буфера. Колба отключается и охлаждается в ванной с ледяной водой.

Далее действуют согласно описаниям подпункта 6.5.3.3.

6.5.3.2.4. Гидролиз в закрытой среде

Бутылка, содержащая приготовленную смесь, в соответствии с положениями подпункта 6.5.3.2.1 или 6.5.3.2.2, вставляется в печь, как указано в подпункте 6.4.3, при 110°C.

В течение первого часа, чтобы предотвратить постепенное увеличение давления (за счет расширения газообразных веществ) и избежать взрыва, нарезная крышка ставится на верхнюю часть колбы. Колба не закрывается соответствующей крышкой. Через час колба закрывается пробкой и оставляется в духовке, как указано в подпункте 6.4.3, в течение 23 часов. В конце гидролиза бутылка удаляется из печи, осторожно снимается пробка с поверхности бутылки и она вводится в ванну с ледяной водой. Оставляется для остывания.

В зависимости от процедуры регулирования рН количественное содержимое бутылки переносится в стеклянный лабораторный стакан на 250 мл или круглодонную колбу с использованием раствора буферного цитрата.

Далее действуют согласно описаниям подпункта 6.5.3.3.

6.5.3.3. Регулировка рН

В зависимости от толерантности натрия к аминокислотному анализатору для регулировки рН действуют согласно методу, описанному в подпункте 6.5.3.3.1 или 6.5.3.3.2.

6.5.3.3.1. Для хроматографических систем аминокислотный анализатор требует малую концентрацию натрия

Желательно использовать внутренний запас стандартного раствора при использовании аминокислотных анализаторов, требующих малого содержания натрия (если количество кислоты должно быть уменьшено).

В этом случае к гидролизату добавляют 2 мл внутреннего запаса стандартного раствора до испарения.

К гидролизату, полученному в соответствии с положениями подпункта 6.5.3.2.3 или 6.5.2.3.4, добавляются 2 капли 1-октанола.

С помощью роторного испарителя уменьшается объем до 5-10 мл в вакууме при температуре 40°C. Если объем случайно сократился менее чем на 5 мл, гидролизат должен быть сброшен, а анализ необходимо повторить.

Значение рН корректируется до 2,2 раствором гидроксида натрия и осуществляются действия, как описано в подпункте 6.5.3.4.

6.5.3.3.2. Для всех остальных аминокислотных анализаторов кислоты

Гидролизаты, полученные в соответствии с подпунктом 6.5.3.2.3 или 6.5.3.2.4, частично нейтрализуются путем осторожного добавления при перемешивании 17 мл раствора гидроксида натрия, убедившись, что температура остается ниже 40°C.

Значение рН корректируется до 2,2 при комнатной температуре с использованием раствора гидроксида натрия в соответствии с положениями подпункта 6.3.17, а, в конце – раствора гидроксида натрия, согласно положениям подпункта 6.3.18. Затем переходят к положениям подпункта 6.5.3.4.

6.5.3.4. Раствор образца для хроматографии

Количественный гидролизат с откорректированным рН перемещается, в соответствии с положениями подпункта 6.5.3.3.1 или 6.5.3.3.2, с буферным цитратом в мерную колбу на 200 мл и доводится до метки буферным раствором.

При неиспользовании внутреннего стандарта добавляют 2 мл внутреннего стандарта и доводят до метки цитратом буферного раствора. Тщательно перемешивается.

Переходят к этапу хроматографии, как описано в подпункте 6.5.

Если отобранные образцы не рассматриваются в тот же день, они хранятся при температуре ниже 5°C.

6.5.4. Хроматография

Перед хроматографией приводится экстракт, описанный в подпункте 6.5.2, или гидролизат, указанный в подпункте 6.5.3.4, при комнатной температуре. Смесь встряхивается и фильтруется необходимое количество через мембранный фильтр с отверстиями 0,22 мм. Полученный прозрачный раствор подлежит ионообменной хроматографии с использованием аминокислотного анализатора.

Вливание осуществляется вручную или автоматически. Важно, чтобы такое же количество раствора $\pm 0,5\%$, добавленное в столбик для анализа стандартов и образцов, кроме случаев, когда используется в качестве внутреннего стандарта, и соотношение натрия и аминокислоты в стандартном растворе и образце должно быть приблизительно схожим.

В целом частота маневра калибровки зависит от стабильности реагента нингидрина и аналитической системы.

Стандартный образец или отобранную пробу разбавляют цитратным буферным раствором для создания пространства в конечной части для стандартного раствора в пределах 30-200% от пространства конечной части аминокислотного образца.

Хроматография аминокислот будет слегка меняться в зависимости от типа анализатора и используемой смолы. Выбранная система должна быть в состоянии отделить аминокислоты друг от друга и от материалов, содержащих нингидрин. Во время операции хроматографическая система порождает линейный ответ на изменения в количестве аминокислот, добавленных к столбику.

Во время хроматографической фазы применяются: отчеты, соответствующие минимальной точке высоты: конечной части, указанной ниже, при рассмотрении эквимольного раствора (анализ аминокислот). Эквимольный раствор должен содержать не менее 30% от максимального количества аминокислот и может быть точно измерен аминокислотным системным анализатором.

Для разделения серин-треонина в случае сопоставимости двух аминокислот отчет минимальной точки/наконечника соответствующих аминокислот на хроматограмме не должен превышать 2:10.

Если определяется только цист(е)ин, метионин, треонин и лизин, недостаточное разделение соседних конечных точек отрицательно скажется на определении.

Для всех остальных аминокислот разделение должно быть лучше чем 1:10.

Система должна гарантировать, что лизин отделен от “лизин артефактов” и орнитина.

6.6. Расчет результатов

Площадь конечной части стандартного образца и отобранной пробы измеряется для каждой аминокислоты отдельно, а величина (X) измеряется в г аминокислот на кг образца.

$$X = A \times c \times M \times V/B \times m \times 1000,$$

При использовании внутреннего стандарта умножить на D/C.

A = площадь наконечника, гидролизат или экстракт;

B = площадь наконечника, стандартный калибровочный раствор;

C = площадь наконечника, внутренний стандарт, гидролизат или экстракт;

D = площадь наконечника, внутренний стандарт, стандартный калибровочный раствор;

M = молярная масса установленной аминокислоты;

c = концентрация стандарта ммоль/мл;

m = вес образца (г) (исправлен для получения первоначального веса, если продукт сухой или обезжирен);

V = общий гидролизат в мл, согласно положениям, указанным в подпункте 6.5.3.4, или объем общего разбавления, подсчитанного для извлечения, в миллилитрах, в соответствии с положениями, указанными в подпункте 6.6.1.

Цистин и цистеин определяются как цистеиновая кислота в гидролизате окисленного образца, но рассчитываются как цистин ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 г/моль) с помощью M 120,15 г/моль (= $0,5 \times 240,30$ г/моль).

Метионин определяется как метионин-сульфон в гидролизатах окисленного образца, но рассчитывается с использованием M как метионин: 149,21 г/моль.

Добавленный свободный метионин определяется после извлечения как метионин для расчетов с использованием того же М.

6.6.1. Общий разбавленный экстракт (F) для определения свободных аминокислот в соответствии с положениями подпункта 6.5.2 определяется следующим образом:

$$F = 100 \text{ мл} \times (10 \text{ мл} + 5 \text{ мл}) / 10 \text{ мл} \times V/10,$$

где:

V = объем конечного экстракта.

6.7. Комментарии

6.7.1. Из-за различия аминокислотных анализаторов конечные концентрации калибровочного раствора для стандартных аминокислот, указанных в подпунктах 6.3.27.4 и 6.3.27.5, и для гидролизата, описанного в подпункте 6.5.3.4, считаются показательными.

Линейный диапазон реакции устройства должен быть проверен для всех аминокислот.

Стандартный раствор разбавляют цитратным буферным раствором для получения пика наконечников, расположенных в середине диапазона.

6.7.2. Если для анализа гидролизатов будет использоваться оборудование с высокоэффективной жидкостной хроматографии, экспериментальные условия должны быть оптимизированы в соответствии с рекомендациями производителя.

6.7.3. В процессе применения метода к кормам, содержащим более 1% хлорида (концентрат, минеральные корма, дополнительные корма), может появиться недооценка метионина, который требует специальной обработки.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПТОФАНА

7.1. Цель и область применения

Метод разрешает определение в кормах общего и свободного триптофана. Он не делает различия между типами D и L.

7.2. Принцип применения

Для определения общего триптофана образец подвергают гидролизу в щелочной среде с насыщенным раствором гидроксида бария и нагревают до 110°C в течение 20 часов. После гидролиза добавляют внутренний стандарт.

Для определения свободного триптофана проба экстрагируется в слабокислой среде в присутствии внутреннего стандарта.

Триптофан и внутренний стандарт из гидролизата или экстракта определяются с помощью ВЭЖХ выявлением флуоресцентным методом.

7.3. Применяемые реагенты

7.3.1. Используется дважды дистиллированная или эквивалентного качества вода (проводимостью < 10 μS/ см).

7.3.2. Стандартное вещество: триптофан (чистота/содержание ≥ 99%) сушат в вакууме с использованием пятиоксида фосфора.

7.3.3. Внутренний стандарт вещества: α-метил-триптофан (чистота/содержание ≥ 99%) сушат в вакууме с использованием пятиоксида фосфора.

7.3.4. Октагидрат гидроксида бария (избегают чрезмерного воздействия воздуха Ba(OH)₂ × 8 H₂O, во избежание образования BaCO₃, который может помешать определению) (см. указание подпункта 7.8.3).

7.3.5. Гидроксид натрия.

7.3.6. Ортофосфорная кислота, γ (г/г) = 85%.

7.3.7. Соляная кислота, ρ_{20} 1,19 г/мл.

7.3.8. Метанол ВЭЖХ качества.

7.3.9. Петролийный эфир, отрезок кипения 40-60°C.

7.3.10. Раствор гидроксида натрия, $c = 1$ моль/л:

Растворяется 40 г NaOH в воде и доводится до одного литра воды, как описано в подпункте 7.3.1.

7.3.11. Соляная кислота, $c = 6$ моль/л:

Берется 492 мл HCl, указанной в подпункте 7.3.7, и дополняется до одного литра воды.

7.3.12. Соляная кислота, $c = 1$ моль/л.

Берется 82 мл HCl, указанной в подпункте 7.3.7, и дополняется до одного литра воды.

7.3.13. Соляная кислота, $c = 0,1$ моль/л.

Берется 8,2 мл HCl, указанной в пункте 7.3.7, и дополняется до одного литра воды.

7.3.14. Ортофосфорная кислота, $c = 0,5$ моль/л.

Берется 34 мл ортофосфорной кислоты, указанной в подпункте 7.3.6, и дополняется до одного литра воды согласно описанию в подпункте 7.3.1.

7.3.15. Концентрированный раствор триптофана, указанный в подпункте 1.3.2, $c = 2,50$ ммоль/мл

в мерной колбе 500 мл растворяется 0,2553 г триптофана (см. упоминание из подпункта 1.3.2) в соляной кислоте, описанной в подпункте 7.3.13, и дополняется до метки соляной кислотой (см. указание в подпункте 3.7.13). Хранится при -18°C в течение 4 недель.

7.3.16. Концентрированный раствор внутреннего стандарта, $c = 2,50$ ммоль/мл:

в мерной колбе 500 мл растворяется 0,2728 г α -метил-триптофана (см. указание в подпункте 7.3.3) в соляной кислоте, описанной в подпункте 7.3.13, и дополняется до метки соляной кислотой (см. указание в подпункте 3.7.13). Хранится при -18°C в течение 4 недель.

7.3.17. Калибровка стандартного раствора триптофана и внутреннего стандарта

Отбирают 2 мл из концентрированного раствора триптофана, описанного в подпункте 7.3.15, и 2 мл концентрированного внутреннего стандарта (α -метил-триптофан), указанного в подпункте 1.3.16. Разбавляют водой, как описано в подпункте 7.3.1, и метанолом (см. указание в подпункте 7.3.8) до достижения примерно равного объема и примерно той же концентрации метанола (10-30%), как и окончательный гидролизат.

Этот раствор должен быть свежеприготовленным для каждого использования.

Во время приготовления защищается от прямых солнечных лучей.

7.3.18. Уксусная кислота.

7.3.19. 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанол.

7.3.20. Этаноламин γ (г/г) > 98%.

7.3.21. 1 г раствора 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанола в 100 мл метанола.

7.3.22. Подвижная фаза для высокоэффективной жидкостной хроматографии: 3 г уксусной кислоты + 900 мл воды, как описано в подпункте 1.3.1, + 50 мл (см. указание в подпункте 1.3.21) раствора 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанола в метанол (1 г/100 мл). Значение pH корректируется до значения 5 с помощью этаноламина, указанного в подпункте 7.3.20. Дополняется до 1000 мл водой, как описано в подпункте 7.3.1.

7.4. Измерительные приборы

7.4.1. Оборудование высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофлуорометрическим детектором.

7.4.2. Жидкая хроматографическая колонка, 125 мм × 4 мм, C₁₈, частицы 3 μm или эквивалентные частицы.

7.4.3. pH-метр.

7.4.4. Полипропиленовый сосуд вместимостью 125 мл с широким горлышком и завинчивающейся крышкой.

7.4.5. Мембранный фильтр, 0,45 мм.

7.4.6. Автоклав, 110 (± 2)°C, 1,4 (± 0,1) бар.

7.4.7. Механическая или магнитная мешалка.

7.4.8. Миксер Вортекс.

7.5. Процедура подготовки

7.5.1. Подготовка образцов

Образец перемешивается так, чтобы он мог проходить через решето с 0,5 мм ячейками. Перед измельчением образцы с высоким содержанием влаги должны высушиваться на воздухе при температуре не выше 50°C и лиофилизированы.

Перед измельчением образцы с высоким содержанием жиров экстрагируются петролийным эфиром, как описано в подпункте 7.3.9.

7.5.2. Определение свободного триптофана (извлечение)

Взвешивается с точностью до 1 мг соответствующее количество (1-5 г) подготовленной пробы, как описано в подпункте 7.5.1, в колбе Эрленмейера. Добавляется 100 мл соляной кислоты (см. указание согласно подпункту 7.3.13) и 5 мл концентрированного внутреннего стандарта. Встряхивается или перемешивается в течение 60 минут с помощью механической или магнитной мешалки. Оставляется для оседания осадка и капается 10 мл супернатантного вещества в лабораторный стакан. Добавляется 5 мл ортофосфорной кислоты. Подгоняется pH до значения 3 с помощью гидроксида натрия. Добавляется достаточное количество метанола с получением концентрации метанола в конечном объеме 10-30%. Помещается в мерную колбу соответствующего объема и разбавляется водой до объема, необходимого для хроматографии (примерно такой же объем, как калибровочный стандарт раствора, как описано в подпункте 7.3.17).

Фильтруются несколько мл раствора через мембранный фильтр с отверстиями 0,45 мм до введения в колонку высокоэффективной жидкостной хроматографии. После чего осуществляется этап хроматографии, как описано в подпункте 7.5.4.

Стандартный раствор и экстракты должны быть защищены от прямых солнечных лучей. Если анализ экстрактов не представляется возможным в тот же день, они могут храниться при 5°C не более 3 дней.

7.5.3. Определение общего содержания триптофана (гидролизат)

Взвешивается с точностью 0,2 мг от 0,1 до 1 г подготовленной пробы в соответствии с положениями подпункта 7.5.1 в полипропиленовой емкости (см. указание из подпункта 7.4.4). Взвешенная порция образца имеет содержание азота около 10 мг. Добавляются 8,4 г гидроксида бария окта и 10 мл воды. Смешивается миксером Вортекс или магнитной мешалкой. Магнит с тифлоновым покрытием остается в смеси. Промываются стенки сосуда с 4 мл воды. Вставляется защитный колпачок и колба закрывается негерметично. Помещается в автоклав (см. указание из подпункта 7.4.6) с кипящей водой и подвергается водяному пару в течение 30-60 минут. Закрывается автоклав и стерилизуется путем автоклавирования до 110 (±2)°C в течение 20 часов.

Перед открытием автоклава уменьшается температура до значения чуть ниже 100°C. Для того, чтобы избежать кристаллизации $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, добавляют в горячую смесь 30 мл воды при комнатной температуре. Встряхивают или осторожно перемешивают. Добавляют 2 мл концентрированного внутреннего стандарта (α -метил-триптофан), как указано в подпункте 7.3.16. Сосуды охлаждают в ванне воды/льда в течение 15 минут.

Затем добавляют 5 мл ортофосфорной кислоты. Выдерживают колбу в охлаждающей ванне и нейтрализуют HCl (см. указание согласно подпункту 7.3.11), непрерывно перемешивая, а затем подгоняют pH к 3 с помощью HCl согласно положениям подпункта 7.3.12. Добавляют достаточное количество метанола с получением концентрации метанола в конечном объеме 10-30%. Перемешивают в мерной колбе соответствующего объема и разбавляют водой до определенного объема, необходимого для хроматографии (например, 100 мл). Добавление метанола не вызывает осадка.

Фильтруются несколько мл раствора через мембранный фильтр с отверстиями 0,45 мм до введения в колонку высокоэффективной жидкостной хроматографии. После этого проводится хроматография, как описано в подпункте 7.5.4.

Стандартный раствор и экстракты должны быть защищены от прямых солнечных лучей. Если анализ экстрактов не представляется возможным в тот же день, они могут храниться при 5°C не более 3 дней.

7.5.4. Определение с помощью ВЭЖХ

Указанные ниже условия изократного элюирования даны для руководства, могут применяться другие условия, если они приводят к эквивалентным результатам (см. также указания подпунктов 7.8.1 и 7.8.2), как показано в таблице 1.

Таблица 1

Условия для получения изократного элюирования

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колонка, как указано в пункте 7.4.2	125 мм × 4 мм, C_{18} , частицы 3 мм или эквивалент
Температура колонки	Комнатная температура
Подвижная фаза (см. упоминание в подпункте 7.3.22)	3 г уксусной кислоты (7.3.18) + 900 мл воды (7.3.1) + 50 мл раствора (7.3.21), 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанол в метаноле (1 г/100 мл). Подгоняется pH до значения 5, с использованием этаноламина. Дополняется до 1000 мл водой, как описано в подпункте 7.3.1
Скорость потока	1 мл/мин
Общая продолжительность	Около 34 минут
Длина волны распознавания	Раздражение: 280 нм, эмиссия: 356 нм
Инъекционный объем	20 μl

7.6. Расчет результатов

Вычисляется количество триптофана (X) в г на 100 г образца.

$$X = A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M / C \times D \times V_3 \times 10000 \times m,$$

где:

A = площадь наконечника внутреннего стандарта, раствор стандартной калибровки (см. указание в подпункте 3.7.17);

B = поверхность наконечника для триптофана, экстракт в соответствии с положениями подпункта 7.5.2 или гидролизат согласно положениям подпункта 7.5.3;

V₁ = объем в мл (2 мл) концентрированного раствора триптофана, добавленного в калибровочный раствор (см. указания из подпункта 7.3.17);

c = концентрация в моль/мл (= 2.50) концентрированного раствора триптофана, добавленного в калибровочный раствор;

V₂ = объем в мл внутреннего стандартного образца, добавленного в экстракт в соответствии с положениями подпункта 7.5.2 (= 5 мл) или в гидролизат в соответствии с положениями подпункта 7.5.3 (= 2 мл);

C = площадь внутреннего стандартного наконечника, экстракт в соответствии с положениями подпункта 7.5.2 или гидролизат, согласно положениям подпункта 7.5.3;

D = площадь наконечника для триптофана, калибровочного стандартного раствора (см. указание из подпункта 3.7.17);

V₃ = объем в мл (= 2 мл) концентрированного раствора внутреннего стандарта, добавленного в стандартный калибровочный раствор (см. указание в подпункте 7.3.17);

m = вес образца в граммах (исправленный для получения первоначального веса, если продукт высушивают и/или обезжиривают);

M = молярная масса триптофана (= 204,23 г/моль).

7.7. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать 10% от наибольшего результата.

7.8. Комментарии

7.8.1. Соблюдение следующих специальных условий хроматографии, в соответствии с таблицей 2, может привести к лучшему разделению α-метил-триптофана от триптофана.

Изократное градиентное элюирование применяется для очистки колонны.

Таблица 2

Специальные условия для хроматографии

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колонка	125 мм × 4 мм, C ₁₈ , 5 мм или эквивалент частиц
Температура колонки	32°C
Подвижная фаза:	0,01 моль/л КН ₂ РО ₄ /метаном, 95 + 5 (V + V). В: метанол

Режим градиента	0 минут	100% A	0% B
	15 минут	100% A	0% B
	17 минут	60% A	40% B
	19 минут	60% A	40% B
	21 минут	100% A	0% B
	33 минут	100% A	0% B
Скорость потока:	1,2 мл/мин		
Общая продолжительность	около 33 минут		

7.8.2. Хроматография варьирует в зависимости от типа ВЭЖХ и материала, используемого для заполнения столбца. Выбранная система должна быть способна создать соответствующее исходное разделение между триптофаном и внутренним стандартом. Кроме того, важно, чтобы продукты распада хорошо отделялись от триптофана и внутреннего стандарта. Осуществляется проба действия гидролизованного образца без внутреннего стандарта для проверки наличия примесей в исходной точке соответствующего внутреннего стандарта. Важно, чтобы продолжительность элюирования для всех поврежденных продуктов была достаточно долгой, в противном случае наличие задержки пиков элюции может помешать последующим хроматографическим операциям.

Во время осуществления действий хроматографические системы обеспечивают линейную характеристику. Этот линейный отклик измеряется в условиях постоянной концентрации (нормальной) внутреннего стандарта и в различных концентрациях триптофана. Важно, чтобы высота пика для триптофана и внутреннего стандарта находились в пределах линейного диапазона системы ВЭЖХ/флуоресценции. Если пики для триптофана и/или внутреннего стандарта слишком низки или слишком высоки, анализ повторяется с выборками другого размера и/или измененного конечного объема

7.8.3. Гидроксид бария

Со временем гидроксид бария становится все труднее растворить. Это ведет к получению раствора, лишенного прозрачности для определения ВЭЖХ, что может привести к неудовлетворительным результатам для триптофана.

VIII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОЧИЩЕННЫХ МАСЕЛ И ЖИРОВ

8.1. Цель и область применения

Данный метод предназначен для определения в кормах содержания необработанных масел и жиров. Не применяется для анализа семян и плодов масличных культур.

Использование процедур, описанных в подпунктах 8.1.1 и 8.1.2, зависит от характера и состава корма и повода осуществления анализа.

8.1.1. Процедура А – необработанные масла и жиры, которые могут быть непосредственно извлечены

Этот метод применим к кормовому сырью растительного происхождения, за исключением случаев, описанных в подпункте 8.1.2.

8.1.2. Процедура В – общее количество необработанных масел и жиров

Этот метод применим к кормовому сырью животного происхождения и всем комбикормам. Он должен использоваться для всех материалов, из которых масла и жиры не могут быть полностью экстрагированы без предварительного гидролиза (например, глютен, дрожжи, картофельный белок и продукция, подлежащая таким процессам, как экструзия, превращение в хлопья и нагревание).

8.1.3. Интерпретация результатов

Во всех случаях, когда получен более высокий результат при помощи процедуры, указанной в подпункте 8.1.2, по сравнению с результатом, полученным путем использования процедуры, указанной в подпункте 8.1.1. Результат, полученный в результате процедуры, описанной в пункте 8.1.2, принимается как реальная стоимость.

8.2. Принцип применения

8.2.1. Процедура А

Образец извлекают петролийным эфиром. Растворитель отделяют путем дистилляции, а остаток высушивают и взвешивают.

8.2.2. Процедура В

Образец обрабатывают горячей соляной кислотой. Смесь охлаждают и фильтруют. Остаток промывают и сушат с последующим определением в соответствии с процедурой А.

8.3. Применяемые реагенты

8.3.1. Петролийный эфир, промежуток кипения: 40-60°C. Показатель брома должен быть менее 1, а остаток после испарения ниже 2 мг на 100 мл.

8.3.2. Сульфат натрия безводный.

8.3.3. Соляная кислота, $c = 3$ моль/л

8.3.4. Средства для фильтрации, такие как Кизельгур, Nuflo-supercel.

8.4. Измерительные приборы

8.4.1. Аппарат для экстрагирования. Если оснащен сифоном (аппарат Soxhlet), рефлюкс скорости должен обеспечить производительность около 10 циклов в час, если тип устройства не имеет сифонной трубки, рефлюкс скорости составляет около 10 мл в минуту.

8.4.2. Картридж для экстрагирования, лишенный растворимого содержания в петролийном эфире и с соответствующей пористостью к требованиям, установленным в подпункте 8.4.1.

8.4.3. Печь для сушки с отрегулированным вакуумом до $75 \pm 3^\circ\text{C}$ или с отрегулированным воздухом до $100 \pm 3^\circ\text{C}$.

8.5. Процедура применения

8.5.1. Процедура А (см. спецификацию в подпункте 8.8.1)

Взвешивается 5 г образца с точностью до 1 мг, перемещается в картуш для экстрагирования и прикрывается обезжиренной ватой.

Картридж помещают в экстрактор и экстрагируют в течение шести часов с петролийным эфиром. Экстракт петролийного эфира собирается в сухой и взвешенный сосуд, содержащий фрагменты пемзы.

Если масла или жиры должны подвергаться в дальнейшем тестам на качество, фрагменты пемзы заменяются стеклянными бусами.

Растворитель отделяют методом дистилляции. Осадок сушится с выдерживанием колбы в течение полутора часов в печи для сушки. Оставляется для остывания в десикаторе и взвешивается. Сушится снова в течение 30 минут для того, чтобы вес масел и жиров

оставался постоянным (потеря в весе между двумя последовательными взвешиваниями должна быть меньше или равна 1 мг).

8.5.2. Процедура В

Взвешивают 2,5 г образца с точностью до 1 мг (см. указание из подпункта 8.8.2), помещают в 400-миллилитровый лабораторный стакан или 300-миллилитровую колбу Эрленмейера и добавляют 100 мл соляной кислоты и фрагменты пемзы. Накрывают лабораторный стакан часовым стеклом или подключают циркулирующий конденсатор к колбе Эрленмейера. Смесь доводится до легкого кипения на слабом огне или на плите и поддерживается в таком состоянии в течение одного часа. Необходимо препятствовать прилипанию продукта к боковым частям сосуда.

Охлаждается и добавляется достаточное количество фильтрующего материала, чтобы избежать потери масла и жира во время фильтрации. Фильтрация производится через двойной бумажный фильтр, смоченный и обезжиренный. Остаток промывается в холодной воде до получения нейтрального фильтрата. Фильтрат проверяется, чтобы в нем не содержались масла и жиры.

Их наличие указывает на то, что образец должен быть извлечен с петролийным эфиром, с использованием процедуры А перед гидролизом.

Вставляется двойной бумажный фильтр, содержащий остатки, на часовое стекло и высушивается в течение полутора часов в печи при $100 \pm 3^\circ\text{C}$.

Вставляется двойной бумажный фильтр, содержащий высушенные остатки, в картридж и прикрывается обезжиренной ватой. Картридж помещается в экстрактор, и выполняются действия, как указано в подпункте 8.5.1.

8.6. Выражение результата

Масса остатка выражается в процентах от образца.

8.7. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце тем же лаборантом, не должна превышать:

- а) 0,2% в абсолютном значении на содержание необработанных масел и жиров менее 5%;
- б) 4% по отношению к более высоким результатам на содержание в пределах от 5 до 10%;
- с) 0,4% в абсолютном значении на содержание, превышающее 10%.

8.8. Комментарии

8.8.1. Для продуктов с высоким содержанием масел и жиров, которые трудно перемолоть или являются несвойственными для отбора проб для анализа однородно уменьшенного образца, выполняются изложенные ниже действия.

Взвешивают 20 г образца с точностью до 1 мг и смешивают с количеством 10 г или более безводного сульфата натрия. Экстрагируют петролийным эфиром, как описано в подпункте 8.5.1. Полученный экстракт доводится до 500 мл петролийным эфиром и смешивается. Берут 50 мл раствора и помещают в небольшую колбу, высушенную и взвешенную, содержащую фрагменты пемзы. Устраняют растворитель дистиллированным методом, сушат и осуществляют действия, как это указано в подпункте 8.5.1.

Выводится растворитель из экстракционного остатка, оставшегося в картридже, измельчается остаток до 1 мм, повторно вводится в картридж для экстрагирования (не добавляют сульфат натрия) и выполняют действия, как указано в подпункте 8.5.1.

Состав масел и жиров рассчитывается как процент от образца по следующей формуле:

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

где:

m_1 = вес в граммах остатка после первой экстракции (дробная часть экстракта);

m_2 = вес в граммах остатка после второй экстракции.

8.8.2. Для продуктов с низким содержанием масел и жиров масса образца может быть увеличена до 5 г.

8.8.3. Допускается, чтобы до гидролиза и экстракции корм для домашних животных с высоким содержанием воды смешивался с безводным сульфатом натрия согласно процедуре В, описанной в подпункте 8.5.2.

8.8.4. В подпункте 8.5.2 может быть более эффективным использование горячей воды вместо холодной для смывания остатков после фильтрации.

8.8.5. Допускается, чтобы время высыхания продолжительностью полтора часа могло быть при необходимости увеличено для некоторых кормов. Чрезмерной сушки избегают, поскольку это может привести к плохим результатам. Можно также использовать микроволновую печь.

8.8.6. Предварительная экстракция согласно процедуре А, описанной в подпункте 8.5.1, до гидролиза и предварительной экстракции процедурой В, указанной в подпункте 8.5.2, рекомендуется, если содержание необработанных масел/жиров превышает 15%. В определенной степени это зависит от природы и характера масел/жиров из корма.

IX. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЫРОЙ КЛЕТЧАТКИ

9.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определять обезжиренные органические вещества в корме, которые не растворяются в кислой и щелочной среде и обычно описываются как сырая клетчатка.

9.2. Принцип применения

Обезжиренный образец обрабатывают последовательно растворами серной кислоты и едкого калия определенной концентрации в состоянии кипения. Осадок отделяют путем фильтрации через промытый, высушенный, взвешенный и прокаленный синтезированный стеклянный фильтр при температуре в пределах от 475 до 500°C. Потеря веса в результате кальцинирования соответствует сырой клетчатке из контрольного образца.

9.3. Применяемые реагенты

9.3.1. Серная кислота, $c = 0,13$ моль/л.

9.3.2. Противопенный агент (например, *n*-октанол).

9.3.3. Средство для фильтрации (целит 545 или эквивалент) нагревают до 500°C в течение четырех часов, как указано в подпункте 9.8.6.

9.3.4. Ацетон.

9.3.5. Петролийный эфир кипения с промежутком кипения от 40 до 60°C.

9.3.6. Соляная кислота, $c = 0,5$ моль/л.

9.3.7. Раствор гидроксида калия, $c = 0,23$ моль/л.

9.4. Измерительные приборы

9.4.1. Нагревательный прибор для растворения серной кислоты и раствора гидроксида калия, оснащенный подставкой для фильтрующего тигля (см. указание из подпункта 9.4.2) и выходной трубкой с крышкой на выходном отверстии для жидкости и создания вакуума

и возможно с кондиционированным воздухом. Перед ежедневным использованием устройство разогревается в воде, находящейся в состоянии кипения, в течение 5 минут.

9.4.2. Стеклоанный фильтрующий тигель с искусственной подсоединенной стеклянной фильтрующей пластинкой с порами 40-90 μm . Перед первым использованием нагревается при 500°C в течение нескольких минут, а затем охлаждается согласно указаниям подпункта 9.8.6.

9.4.3. Цилиндр не менее 270 мл с обратным конденсатором, который может быть подвергнут кипячению.

9.4.4. Сушильный шкаф с термостатом.

9.4.5. Муфельная печь с термостатом.

9.4.6. Устройство для экстракции, состоящее из поддерживающей пластины для фильтрующего тигля, как описано в подпункте 9.4.2, и выхлопной трубы, оснащенной пробкой в отверстии для создания вакуума и выхода жидкостей.

9.4.7. Подключенные кольца, используемые для соединения нагревательного прибора, тигля и цилиндра, а также для подключения устройства холодного отжима к тиглю.

9.5. Процедура подготовки

Взвешивают 1 г подготовленного образца с точностью до 1 мг, помещают в тигель (см. примечания, приведенные в подпунктах 9.8.1, 9.8.2 и 9.8.3), и добавляют 1 г фильтрованного адьюванта.

Монтируются нагревательный прибор и фильтрующий тигель, затем прикрепляется цилиндр к тиглю. Разливается 150 мл серной кислоты, находящейся в состоянии кипения, целиком в цилиндр и тигель и при необходимости добавляется несколько капель противопенного агента.

Жидкость доводят до кипения в течение 5 ± 2 минут и сильно кипятят ровно 30 минут.

Открывают крышку выхлопной трубы, указанной в подпункте 9.4.1, и в условиях вакуума фильтруют через стеклянный фильтрующий тигель серную кислоту, затем смывают остатки трех последовательных частей 30 мл водой, находящейся в состоянии кипения, удостоверившись в том, что остаток фильтруется сухим после каждого промывания.

Выходное отверстие закрывают пробкой и заливают 150 мл гидроксида калия, находящегося в состоянии кипения, целиком в цилиндр и тигель, затем добавляют несколько капель противопенного агента. Жидкость доводят до кипения в течение 5 ± 2 минут и сильно кипятят ровно 30 минут. Фильтруют и повторяют процедуру промывки, используемую в стадии с серной кислотой.

После окончательной промывки и сушки отключается тигель вместе с его содержимым и снова присоединяется к устройству по экстракции с холодным блоком. Создается вакуум, а остаток промывают в тигеле тремя последовательными частями 25 мл ацетона, удостоверившись, что остаток фильтруется в сухом состоянии после каждого промывания.

Тигель сушится в духовке при температуре 130°C до достижения постоянного веса. После каждой сушки охлаждают в десикаторе и быстро взвешивают. Помещают тигель в муфельную печь и прокалывают до достижения постоянной массы (потеря веса между двумя последовательными взвешиваниями должна быть меньше или равна 2 мг) при температуре в пределах между 475 и 500°C не менее 30 минут.

После каждого нагревания перед взвешиванием охлаждается в печи, а затем в эксикаторе.

Осуществляется контрольное испытание без образца. Потеря веса в результате прокаливания не должна превышать 4 мг.

9.6. Расчет результатов

Содержание сырой клетчатки в процентах от образца определяется по формуле:

$$X = (m_0 - m_1) \times 100/m,$$

где:

m = вес образца, в г;

m_0 = потеря веса после прокаливания при определении, в г;

m_1 = потеря веса после прокаливания при контрольном тесте, в г.

9.7. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать:

а) 0,6% в абсолютном значении – на содержание менее 10% необработанной сырой клетчатки;

б) 6% по отношению к более высоким результатам – на содержание сырой клетчатки, равное или превышающее 10%.

9.8. Комментарии

9.8.1. Корма, содержащие более 10% необработанных жиров, должны быть обезжирены до того, как они будут подвергнуты анализу петролийным эфиром. Фильтрующий тигель (см. примечания из подпункта 9.4.2) и его содержимое подключаются к устройству по холодному экстрагированию в соответствии с положениями подпункта 9.4.6 и создается вакуум, затем смываются остатки трех последовательных частей 30 мл петролийного эфира, убедившись в том, что остаток сухой. Тигель и его содержимое подключаются к нагревательному прибору и продолжают действия, как описано в пункте 9.5.

9.8.2. Корма, содержащие жиры, которые не могут быть извлечены непосредственно с петролийным эфиром, должны быть обезжирены, как описано в пункте 9.8.1, и обезжирены еще раз после кипячения с кислотой. После кипячения с кислотой и последующей промывки тигель и его содержимое подключаются к устройству по холодному экстрагированию, а затем три раза промывают 30 мл ацетона, после чего промывают еще три раза с 30 мл частями петролийного эфира. Фильтруют в вакууме до полного высыхания, а анализ продолжается, как описано в разделе 9.5, начиная с обработки гидроксида калия.

9.8.3. Если корм содержит более 5% карбоната, выраженного как карбонат кальция, подключается тигель со взвешенным образцом на нагревательный прибор. Образец трижды промывают 30 мл соляной кислоты. После каждого добавления образец оставляют оседать в течение 1 минуты перед фильтрацией.

Промывают один раз 30 мл воды, затем продолжают действия, как описано в пункте 9.5.

9.8.4. При использовании оборудования в виде подставки (ряд тиглей подключен к нагревательному прибору) не проводится два отдельных определения по той же анализируемой пробе в той же серии.

9.8.5. Если после кипячения трудно фильтровать кислый и щелочной раствор, используется сжатый воздух, который вводится через выхлопную трубу нагревательного прибора, а затем продолжается фильтрация.

9.8.6. Температура прокаливания не превышает 500°C, чтобы продлить время использования стеклянного фильтрующего тигля. Следует проявлять осторожность, чтобы избежать чрезмерного теплового нагрева в течение циклов нагрева и охлаждения.

X. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРА

10.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить количество восстанавливающих и общих сахаров после инверсии, выраженных как глюкоза, или, где это применимо, как сахароза, путем превращения с коэффициентом 0.95. Он применим к комбикормам. Для других видов кормов существуют специфические методы. Если необходимо, лактоза определяется отдельно и принимается во внимание при расчете результатов.

10.2. Принцип применения

Сахара извлекаются в разбавленном этаноле, раствор отстаивается раствором Carrez I и II. После удаления этанола количество до и после инверсии определяется методом Luff-Schoorl.

10.3. Применяемые реагенты

10.3.1. Раствор этанола с 40%-ной концентрацией (объем/объем): 0,948 г/мл при 20°C, нейтрализуют фенолфталеином.

10.3.2. Раствор Carrez I: растворяют 21,9 г ацетата цинка $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ и 3 г ледяной уксусной кислоты в воде. Заполняют водой до 100 мл.

10.3.3. Раствор Carrez II: растворяют 10,6 г калия ферроцианида, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ в воде. Заполняют водой до 100 мл.

10.3.4. Метилоранж, раствор 0,1% (вес/объем).

10.3.5. Соляная кислота, 4 моль/л.

10.3.6. Соляная кислота, 0,1 моль/л.

10.3.7. Раствор гидроксида натрия, 0,1 моль/л.

10.3.8. Реактив Luff-Schoorl.

Тщательно перемешивая, заливают раствор лимонной кислоты (см. примечания из подпункта 10.3.8.2) в раствор карбоната натрия, описанный в подпункте 10.3.8.3. Добавляют раствор сульфата меди согласно описаниям из подпункта 10.3.8.1 и дополняют до 1 литра водой. Отцеживается в течение ночи и фильтруется.

Проверяется концентрация получаемого реагента (Cu 0,05 моль/л; Na_2CO_3 1 моль/л), pH раствора составляет примерно 9,4.

10.3.8.1. Раствор медного купороса: растворяют 25 г медного купороса, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, не содержащего железа, в 100 мл воды.

10.3.8.2. Раствор лимонной кислоты: разводят 50 г лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot x H_2O$) в 50 мл воды.

10.3.8.3. Раствор карбоната натрия: растворяют 143,8 г безводного карбоната натрия в 300 мл горячей воды. Оставляют остыть.

10.3.9. Раствор натрия тиосульфата, 0,1 моль/л.

10.3.10. Раствор крахмала: добавляют смесь из 5 г растворимого крахмала с 30 мл воды на один литр кипящей воды. Отваривают в течение 3 минут, оставляют остыть и, если необходимо, добавляют 10 мг ртутного йода в качестве консерванта.

10.3.11. Серная кислота, 3 моль/л.

10.3.12. Раствор калия йодида, 30% (вес/объем).

10.3.13. Гранулы пемзы, кипяченые в соляной кислоте, промытые водой и высушенные.

10.3.14. 3-метилбутан-1-ол.

10.4. Измерительный прибор

Миксер (шейкер): около 35-40 об/мин.

10.5. Процедура подготовки

10.5.1. Экстракция образца

Взвешивают 2,5 г образца с точностью до 1 мг и вводят в 250-миллилитровую мерную колбу. Добавляют 200 мл этанола и перемешивают в течение одного часа в смесителе. Добавляют 5 мл раствора Carrez I и перемешивают в течение примерно 30 секунд. Добавляют приблизительно 5 мл раствора Carrez II и снова перемешивают в течение одной минуты. Заполняют до нужного объема этанолом, гомогенизируют и фильтруют. Удаляют 200 мл фильтрата и испаряют около половины объема для удаления большей части этанола. Оставшийся остаток после испарения переносят количественно в 200-миллилитровую колбу с горячей водой, охлаждают, заполняют до нужного объема водой, гомогенизируют и при необходимости, фильтруют. Этот раствор используется для определения количества восстанавливающего сахара и после инверсии – общего сахара.

10.5.2. Определение восстанавливающего сахара

С помощью пипетки удаляют до 25 мл раствора, содержащего менее 60 мг восстанавливающего сахара, выраженного в глюкозе. При необходимости дополняют до 25 мл дистиллированной воды и определяют содержание восстанавливающего сахара методом Luff-Schoorl. Результат выражается в процентах глюкозы в образце.

10.5.3. Определение общего содержания сахаров после инверсии

С помощью пипетки отбирают 50 мл раствора и переносят в 100-миллилитровую мерную колбу. Добавляют несколько капель метилоранжа, затем, непрерывно перемешивая, осторожно добавляют соляную кислоту (см. примечания из подпункта 10.3.5), пока жидкость не получается отчетливо красной. Добавляют 15 мл соляной кислоты (см. примечание из подпункта 10.3.6), колбу погружают в кипящую водяную баню и оставляют на 30 минут. Быстро охлаждают приблизительно при 20°C и добавляют 15 мл раствора гидроксида натрия. Заполняют водой до 100 мл и гомогенизируют. Удаляют до 25 мл раствора, содержащего менее 60 мг восстанавливающего сахара, выраженного в глюкозе. При необходимости дополняют до 25 мл дистиллированной воды и определяют содержание восстанавливающего сахара методом Luff-Schoorl. Результат выражается в процентах от глюкозы или при необходимости сахарозы путем умножения на коэффициент 0,95.

10.5.4. Титрование методом Luff-Schoorl

С помощью пипетки отбирают 25 мл реактива Luff-Schoorl и переносят в 300 мл мерную колбу; добавляют ровно 25 мл раствора очищенного сахара. Добавляют 2 гранулы пемзы, нагревают, помешивая вручную на открытом огне средней высоты, доводя жидкость до кипения примерно за 2 минуты. Колбу Эрленмейера немедленно помещают на проволочную сетку, покрытую асбестом, с отверстиями диаметром около 6 см, под которыми горит пламя. Пламя регулируется таким образом, чтобы нагревалась только основа колбы Эрленмейера. К колбе Эрленмейера монтируют рефлюксный конденсатор.

Кипятят ровно десять минут. Сразу охлаждают в холодной воде и примерно через 5 минут титруют следующим образом:

добавляют 10 мл йодистого калия и сразу после этого (осторожно, потому что есть риск образования большого количества пены) добавляют 25 мл серной кислоты. Затем титруют раствором тиосульфата натрия до появления стертой желтой окраски, добавляя как индикатор раствор крахмала и завершая титрование.

Такое же титрование проводится на смесь 25 мл реактива Luff-Schoorl с 25 мл воды, с точностью взвешивают после добавления 10 мл йодистого калия и 25 мл серной кислоты, не доводя до кипения.

10.6. Расчет результатов

С использованием данных, указанных в таблице 3, определяется количество глюкозы в мг, что соответствует разнице между двумя результатами титрования, выраженными в мг тиосульфата натрия 0,1 моль/л. Результаты выражаются в процентах от образца.

10.7. Специальные процедуры

10.7.1. Для корма, богатого патокой, и других кормов, которые не являются, в частности, однородными, взвешивают 20 г и помещают с 500 мл воды в 1-литровую мерную колбу. Смешивают в миксере в течение одного часа. Отстаивают с помощью раствора Carrez I и II, как это описано в подпункте 10.5.1, используя в этом случае количество, в четыре раза превышающее каждый реагент. Заполняют до объема 80% этанолом (об/об).

Гомогенизируют и фильтруют. Выводится этанол, как описано в подпункте 10.5.1. В отсутствие декстринизованного крахмала заполняют до объема дистиллированной водой.

10.7.2. Для патоки и исходных кормовых материалов, богатых сахаром и практически без крахмала (плод рожкового дерева, хлопья корней сухой свеклы и т.д.), взвешивают 5 г, помещают в 250 мл мерную колбу, добавляют 200 мл дистиллированной воды и смешивают в шейкере в течение одного часа или, если необходимо, дольше. Отстаивают с помощью раствора Carrez I и II, как описано в подпункте 10.5.1. Заполняют до нужного объема холодной водой, гомогенизируют и фильтруют. Для определения общего сахара продолжают действовать, как описано в подпункте 10.5.3.

10.8. Комментарии

10.8.1. В целях предотвращения появления пены рекомендуется добавлять (независимо от объема) около 1 мл 3-метилбутан-1-ол до кипения с реактивом Luff-Schoorl.

10.8.2. Разница между общим количеством сахаров после инверсии в виде глюкозы и содержанием восстанавливающих сахаров в виде глюкозы, умноженная на 0,95, составляет процентное содержание сахарозы.

10.8.3. Для определения содержания восстанавливающих сахаров, за исключением лактозы, могут быть применены два метода:

10.8.3.1. Примерный расчет – содержание лактозы, определенной разнообразным методом анализа, умножается на 0,675, а результат вычитается из содержания восстанавливающих сахаров.

10.8.3.2. Для точного расчета восстанавливающих сахаров, за исключением лактозы, используется тот же образец с двумя последними определениями. Один из анализов выполняется на части раствора, полученного в соответствии с положениями подпункта 10.5.1, другая часть полученного раствора при определении лактозы по методике, описанной в этом случае (как и другие виды ферментации сахара и отстаивания).

В обоих случаях количество присутствующего сахара определяется реактивом Luff-Schoorl и рассчитывается в мг глюкозы. Одна величина вычитается из другой, а разница выражается в процентах от образца.

Таблица 3

Таблица значений для 25 мл реактива Luff-Schoorl
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ мл 0,1 моль/л, нагревание в течение двух минут,
 кипение десять минут

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 моль/л	Глюкоза, фруктоза, инвертированный сахар $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Лактоза $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Мальтоза $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 моль/л
	мл	мг	разница	мг	разница	мг	
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

XI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАКТОЗЫ

11.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить лактозу в корме с содержанием лактозы более 0,5%.

11.2. Принцип применения

Сахара растворяются в воде. Раствор подвергается ферментации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которая не разлагает лактозу. После отстаивания и фильтрации содержание лактозы в фильтрате определяется реактивом Luff-Schoorl.

11.3. Применяемые реагенты

11.3.1. Суспензия *Saccharomyces cerevisiae*: растворить 25 г свежих дрожжей в 100 мл воды. Суспензия хранится в холодильнике в течение не более одной недели.

11.3.2. Раствор Carrez I: растворяют 21,9 г ацетата цинка, $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ и 3 г ледяной уксусной кислоты в воде. Заполняют водой до 100 мл.

11.3.3. Раствор Carrez II: растворяют 10,6 г калия ферроцианида $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$ в воде. Заполняют водой до 100 мл.

11.3.4. Реактив Luff-Schoorl:

Тщательно перемешивая, заливают раствор лимонной кислоты (см. примечания подпункта 11.3.4.2) в раствор карбоната натрия в соответствии с положениями подпункта 11.3.4.3. Добавляют раствор сульфата меди (см. примечания из подпункта 11.3.4.1) и дополняют до 1 литра водой. Отцеживают на ночь и фильтруют. Проверяется концентрация получаемого реагента (Cu 0,05 моль/л; Na_2CO_3 1 моль/л). pH раствора составляет примерно 9,4.

11.3.4.1. Раствор медного купороса: растворяют 25 г медного купороса, $CuSO_4 \times 5H_2O$, не содержащего железа, в 100 мл воды.

11.3.4.2. Раствор лимонной кислоты: растворяют 50 г лимонной кислоты, $C_6H_8O_7 \times H_2O$ в 50 мл воды.

11.3.4.3. Раствор карбоната натрия: растворяют 143,8 г безводного карбоната натрия в 300 мл горячей воды. Оставляют для остывания.

11.3.5. Гранулы пемзы, кипяченые в соляной кислоте, промытые водой и высушенные.

11.3.6. Раствор калия йодида, 30% (вес/объем).

11.3.7. Серная кислота 3 моль/л.

11.3.8. Раствор натрия тиосульфата 0,1 моль/л.

11.3.9. Раствор крахмала: добавляется смесь из 5 г растворимого крахмала с 30 мл воды на один литр кипящей воды. Варится в течение 3 минут, оставляется остыть и, если необходимо, добавляется 10 мг ртутного йода в качестве консерванта.

11.4. Измерительный прибор

Водяная баня с термостатом на 38-40°C.

11.5. Процедура подготовки

Взвешивают 1 г образца с точностью до 1 мг и помещают в 100 мл мерную колбу. Добавляют 25-30 мл воды. Колбу помещают в ванну с водой, доведенной до температуры кипения, на 30 минут, затем охлаждают до 35°C. Добавляют 5 мл дрожжевой суспензии (см. примечания подпункта 11.3.1) и гомогенизируют. Колбу оставляют на два часа в водяной бане при температуре 38-40°C. Охлаждают примерно до 20°C.

Добавляют 2,5 мл раствора Carrez I и перемешивают в течение тридцати секунд, затем добавляют 2,5 мл раствора Carrez II и снова перемешивают в течение тридцати секунд. Дополняют водой до 100 мл, перемешивают и фильтруют. При помощи пипетки удаляют количество фильтрата, не превышающее 25 мл и содержащие предпочтительно 40-80 мг лактозы, затем перемещают в 300 мл колбу Эрленмейера. Если необходимо, добавляют воду до 25 мл.

Осуществляют контрольный анализ таким же образом с 5 мл дрожжевой суспензией в соответствии с положениями подпункта 11.3.1. Определяют содержание лактозы методом Luff-Schoorl, а именно, добавляют ровно 25 мл реактива Luff-Schoorl и две гранулы пемзы. Смешивают вручную при нагревании на открытом пламени средней высоты, доводя жидкость до кипения примерно за две минуты. Колбу Эрленмейера немедленно помещают на проволочную сетку, покрытую асбестом, имеющим отверстие диаметром около 6 см, под которым горит пламя. Пламя регулируется таким образом, чтобы нагревалась только основа колбы Эрленмейера. К колбе Эрленмейера монтируют рефлюксовый конденсатор. Кипятят ровно десять минут. Охлаждают сразу холодной водой и примерно через 5 минут титруют следующим образом.

Добавляют 10 мл йодистого калия и сразу после этого (осторожно, потому что есть риск образования большого количества пены) добавляют 25 мл серной кислоты. Далее титруют раствором тиосульфата натрия до появления стертой желтой окраски, добавляя как индикатор раствор крахмала и завершая титрование.

То же титрование проводится на смесь 25 мл реактива Luff-Schoorl с 25 мл воды, с точностью взвешивают после добавления 10 мл йодистого калия и 25 мл серной кислоты, не доводя до кипения.

11.6. Расчет результатов

Используя данные, указанные в таблице 3, определяется количество лактозы в мг, что соответствует разнице между двумя результатами титрования, выраженными в мг тиосульфата натрия 0,1 моль/л.

Результат для лактозы выражается в процентах от образца.

11.7. Комментарии

Для продуктов, содержащих более 40% ферментированного сахара, используется более 5 мл дрожжевой суспензии, указанной в подпункте 11.3.1.

XII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА

Поляриметрический метод

12.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить в кормах содержание крахмала и продуктов расщепления крахмала с высоким молекулярным весом в целях проверки соответствия энергетической ценности, объявленной в соответствии с положениями, описанными в приложении № 7 к настоящему Постановлению.

12.2. Принцип применения

Метод состоит из двух определений. Первый образец обрабатывают разбавленной соляной кислотой. После отстаивания и фильтрации измеряется оптическое вращение раствора поляриметрическим методом.

Во втором примере извлекается 40% этанола. После окисления фильтрата с соляной кислотой, отстаивания и фильтрации измеряется оптическое вращение как в первом измерении.

Разница между этими двумя измерениями, умноженная на известный коэффициент, дает содержание крахмала в образце.

12.3. Применяемые реагенты

12.3.1. Раствор соляной кислоты с 25% концентрацией (в/в): 1,126 г/мл.

12.3.2. Раствор соляной кислоты 1,13% (вес/объем).

Концентрация проверяется путем титрования с использованием раствора гидроксида натрия 0,1 моль/л в присутствии 0,1% метилового красного (вес/объем) в этаноле 94% (объем/объем). Для нейтрализации 10 мл требуется 30,94 мл NaOH 0,1 моль/л.

12.3.3. Раствор Cargez I: растворяют 21,9 г ацетата цинка, $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ и 3 г ледяной уксусной кислоты в воде. Дополняют водой до 100 мл.

12.3.4. Раствор Cargez II: растворяют 10,6 г калия ферроцианида $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$ в воде. Дополняют водой до 100 мл.

12.3.5. Этанол, с 40% концентрацией раствора (объем/объем): 0,948 г/мл при 20°C.

12.4. Измерительные приборы

12.4.1. 250 мл колба Эрленмейера со стандартным сочетанием матового стекла и обратным конденсатором.

12.4.2. Поляриметр или сахариметр.

12.5. Процедура применения

12.5.1. Подготовка проб

Образец измельчается до тех пор, пока он не станет достаточно мелким, чтобы полностью пройти через сито с круглыми отверстиями 0,5 мм.

12.5.2. Определение общего оптического вращения (Р или S) (см. примечания подпункта 12.7.1)

Взвешивается 2,5 г образца с точностью до 1 мг и вводят в 100 мл мерную колбу. Добавляют 25 мл соляной кислоты в соответствии с положениями подпункта 12.3.2 и перемешивают, чтобы получить равномерное распределение образца, добавляя еще 25 мл соляной кислоты (см. примечания подпункта 12.3.2). Колбу погружают в кипящую водяную баню, энергично и постоянно помешивая в течение первых трех минут, чтобы предотвратить образование агломератов. Количество воды в водяной бане должно быть достаточным, чтобы ванна оставалась на точке кипения, когда баллон вводится в нее. Колба не должна извлекаться из ванны при встряхивании. Ровно через 15 минут достают из ванны, добавляют 30 мл холодной воды и тотчас же охлаждают при 20°C.

Добавляют 5 мл раствора Cargez I и перемешивают в течение примерно 30 секунд. Затем добавляют приблизительно 5 мл раствора Cargez II и снова перемешивают в течение 30 секунд. Заполняют водой до нужного объема, гомогенизируют и фильтруют. Если фильтрат не совсем прозрачный (это случается в редких случаях), повторяют определение с использованием большего количества раствора Cargez I и II, например, 10 мл.

Оптическое вращение раствора в 200 мл сосуде измеряется поляриметрическим методом или сахариметром.

12.5.3. Определение оптического вращения (P' или S') растворимых веществ в 40% этаноле

Взвешивают 5 г образца с точностью до 1 мг, вводят в 100 мл мерную колбу и добавляют примерно 80 мл этанола (см. примечание из подпункта 12.7.2). Колбу оставляют в течение часа при комнатной температуре; в течение этого времени энергично встряхивают шесть раз, чтобы образец полностью смешался с этанолом. Заполняется до нужного объема этанолом, перемешивается и фильтруется.

С помощью пипетки водится 50 мл фильтрата (соответствует 2,5 г образца) в 250 мл колбу Эрленмейера, добавляют 2,1 мл соляной кислоты (см. примечание подпункта 12.3.1) и сильно встряхивают. Колбу Эрленмейера оснащают обратным конденсатором, а сосуд погружают в кипящую водяную баню. Ровно через 15 минут вытаскивают колбу Эрленмейера из ванны, перемещая содержимое в 100 мл мерную колбу, промывают холодной водой и охлаждают при 20°C.

Отстаивают с использованием Carrez I и II, дополняют до нужного объема водой, перемешивают, фильтруют и измеряют оптическое вращение, как это указано в подпункте 12.5.2.

12.6. Расчет результатов

Содержание крахмала (%) рассчитывается с использованием следующей формулы:

12.6.1. Измерение поляриметром

$$\text{Содержание крахмала (\%)} = 2000 (P - P') / [\alpha]_D^{20^\circ},$$

где:

P = общее оптическое вращение угла в градусах;

P' = оптическое вращение угла в градусах веществ, растворимых в этаноле 40% (V/V);

$[\alpha]_D^{20}$ = удельное оптическое вращение чистого крахмала. Числовыми значениями, применяемыми обычно к этому фактору, являются:

+ 185,9°: рисовый крахмал

+ 185,7°: картофельный крахмал

+ 184,6°: кукурузный крахмал

+ 182,7°: пшеничный крахмал

+ 181,5°: крахмал из ячменя

+ 181,3°: овсяный крахмал

+ 184,0°: другие виды крахмала и крахмальных смесей в комбикормах.

12.6.2. Измерение сахариметром

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

где:

S = удельное оптическое вращение в сахариметрических градусах;

S' = оптическое вращение в сахариметрических градусах веществ, растворимых в этаноле 40% (объем/объем);

N = вес (г) сахарозы в 100 мл воды с оптическим вращением 100 сахариметрических градусов, измеренных с помощью трубки 200 мм;

16,29 г для французских сахариметров;

26 г для немецких сахариметров;
20 г для смешанных сахариметров;
 $[\alpha]_D^{20}$ = удельное оптическое вращение чистого крахмала (см. указания из подпункта 12.6.1).

12.6.3. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, осуществленных на том же образце, не должна превышать 0,4 в абсолютном значении для содержания крахмала менее 40% и 1% в относительном значении для содержания крахмала, равного или более 40%.

12.7. Комментарии

12.7.1. Если образец содержит более 6% карбонатов, вычисленных как карбонат кальция, то они должны быть уничтожены с помощью обработки с совершенно достаточным количеством разбавленной серной кислоты до определения общего оптического вращения.

12.7.2. Для продуктов с высоким содержанием лактозы, например, сыворотка или сухое обезжиренное молоко, выполняются следующие действия после добавления 80 мл этанола. Колбу оснащают обратным конденсатором, а сосуд погружают в водяную баню при 50°C в течение 30 минут. Оставляется для остывания и продолжается анализ, как описано в подпункте 12.5.3.

12.7.3. Если они присутствуют в значительных количествах в кормах, следующее сырье для кормов признается в качестве создающего интерференцию, когда содержание крахмала определяется поляризметрическим методом и, следовательно, могут быть получены неверные результаты:

продукты из свеклы (сахарной), такие как свекловичный жом (сахарный), свекольная патока (сахарная), патока свекольного жома (сахарная), свекольная барда (сахарная), сахар (свекловичный);

цитрусовая пульпа;

льняное семя, льняной шрок, льняной шрок в результате экстракции;

семена рапса: рапсовый шрот, рапсовый шрот, извлеченный после экстракции; рапсовая оболочка;

семена подсолнечника: шрот семян подсолнечника, извлеченный после экстракции, частично очищенные семена подсолнечника, извлеченные после экстракции;

шрот копры: шрот из копры, извлеченный после экстракции;

картофельная пульпа;

сухие дрожжи;

продукты, богатые инулином (например, хлопья и мука из топинамбура);

шкварки.

ХIII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СЫРОЙ ЗОЛЫ

13.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить в корме содержание необработанной золы.

13.2. Принцип применения

Образец обжигается до 550°C; остаток взвешивают.

13.3. Применяемый реагент

Раствор аммиачной селитры 20% (вес/объем).

13.4. Измерительные приборы

13.4.1. Плита.

13.4.2. Электрическая печь с блоком, оснащенная термостатом.

13.4.3. Тигли для прокаливания из кварца, фарфора или платины прямоугольной формы (примерно 60 × 40 × 25 мм) или круглой (диаметром 60-75 мм, высота: 20-40 мм).

13.5. Процедура подготовки

Взвешивают около 5 г образца с точностью до 1 мг (2,5 г на продукцию с тенденцией набухания) и помещают в тигель для прокаливания, который был предварительно нагрет до 550°C, охлажден и взвешен. Помещают тигель на горячую плиту и нагревают постепенно до обугливания материала. Прокаливают золу в соответствии с условиями подпункта 13.5.1 или 13.5.2.

13.5.1. Помещают тигель в муфельную калиброванную печь, установленную на уровне 550°C. Поддерживают эту температуру до получения белой, серой или красноватой золы, без видимых обугленных частиц. Помещают тигель в эксикатор, оставляют остыть и немедленно взвешивают.

13.5.2. Помещают тигель в муфельную калиброванную печь, установленную на уровне 550°C. Прокаливают в течение 3 часов. Помещают тигель в эксикатор, оставляют остыть и немедленно взвешивают. Снова прокаливают в течение 30 минут для того, чтобы вес золы остался постоянным (потеря в весе между двумя последовательными взвешиваниями должна быть меньше или равна 1 мг).

13.6. Расчет результатов

Вес остатка рассчитывается путем вычитания тары.

Результат выражается в процентах от образца.

13.7. Комментарии

13.7.1. Зола труднопрокаливаемых веществ подвергается начальному прокаливанию в течение не менее трех часов, с последующим охлаждением и добавлением нескольких капель 20% нитрата аммония и воды (осторожно, чтобы не допускать распыления золы и формирования скоплений). Прокаливание в печи продолжается после высыхания. Эта операция повторяется до конечного прокаливания.

13.7.2. В отношении веществ, устойчивых к обработке, описанной в подпункте 13.7.1, осуществляют следующие действия: после прокаливания в течение трех часов помещают золу в горячую воду и фильтруют через небольшой фильтр, свободный от золы. Фильтр и его содержимое прокаливают в первоначальном тигле. Фильтрат охлаждается в тигле, испаряется до высыхания, прокаливается и взвешивается.

13.7.3. Для масел и жиров взвешивают с точностью 25 г образца в тигле соответствующих размеров. Карбонизируется воспламенением материала с помощью беззольной фильтровальной бумаги. После сгорания увлажняется как можно меньшим количеством воды. Высушивается и кальцинируется, как описано в подпункте 13.5.

XIV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЗОЛЫ, НЕ РАСТВОРИМОЙ В СОЛЯНОЙ КИСЛОТЕ

14.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить в корме состав минеральных веществ, не растворимых в соляной кислоте.

Могут использоваться два способа в зависимости от природы образца.

14.1.1. Метод А: применим к питательным органическим веществам и большинству комбикормов.

14.1.2. Метод В: применим к соединениям и минеральным смесям комбикормов, которые содержат уровни веществ, не растворимых в соляной кислоте, определяется методом А и составляет менее 1%.

14.2. Принцип применения

14.2.1. Метод А: образец кальцинируется, золу кипятят в соляной кислоте, а нерастворимый остаток фильтруют и взвешивают.

14.2.2. Метод В: образец обрабатывают соляной кислотой. Раствор кальцинируют, остаток фильтруют, а зола, полученная таким образом, обрабатывается по методу А.

14.3. Применяемые реагенты

14.3.1. Соляная кислота 3 моль/л.

14.3.2. Трихлоруксусная кислота, 20% раствор (вес/объем).

14.3.3. Трихлоруксусная кислота, 1% раствор (вес/объем).

14.4. Измерительные приборы

14.4.1. Плита.

14.4.2. Электрическая печь с блоком, оснащенная термостатом.

14.4.3. Тигли для прокаливания из кварца, фарфора или платины прямоугольной (примерно 60 × 40 × 25 мм) или круглой формы (диаметром 60-75 мм, высота: 20-40 мм).

14.5. Процедура подготовки

14.5.1. Метод А.

Образец кальцинируется для определения сырой золы. Может быть использована и зола, полученная в результате данного анализа.

Вводится зола в 250-400 мл лабораторный стакан с использованием 75 мл соляной кислоты. Доводится медленно до кипения и кипятится на медленном огне в течение пятнадцати минут. Горячий раствор фильтруют через беззольную фильтровальную бумагу, а остаток промывают горячей водой до тех пор, пока реакция кислотой уже не видна. Фильтр, содержащий остаток, высушивают и кальцинируют в тарированном тигле при минимальной температуре 550°C и максимальной 700°C. Охлаждают в десикаторе и взвешивают.

14.5.2. Метод В

Взвешивают 5 г образца с точностью до 1 мг и помещают в лабораторный стакан на 250-400 мл. Добавляют последовательно 25 мл воды и 25 мл соляной кислоты, перемешивают и ждут, чтобы вскипание прекратилось. Добавляют еще 50 мл соляной кислоты. Ждут, чтобы выпуск газа прекратился, а затем вводят лабораторный стакан в водяную баню при температуре кипения и держат там в течение 30 минут или при необходимости более для того чтобы возможно присутствующий крахмал окончательно гидролизировался. Фильтруют еще теплым с помощью беззольного фильтра и промывают фильтр в 50 мл горячей воды (см. примечание из подпункта 14.7). Фильтр, содержащий остаток, помещается в тигель, высушивается и кальцинируется в тигле для озоления при температуре минимум 550°C и максимум до 700°C. Зола вводится в 250-400 мл лабораторный стакан, с использованием 75 мл соляной кислоты и в дальнейшем действуют, как описано в подпункте 14.5.1.

14.6. Расчет результатов

Вес остатка рассчитывается путем вычитания веса тары. Результат выражается в процентах от образца.

14.7. Примечание

Если фильтрация оказывается трудной, анализ возобновляется с заменой 50 мл соляной кислоты 50 мл 20% трихлоруксусной кислоты с промыванием фильтра в теплом растворе 1% трихлоруксусной кислоты.

XV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБОНАТОВ

15.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить в большинстве кормов количество карбонатов, обычно выраженных в виде карбоната кальция.

15.2. Принцип применения

Карбонаты разлагаются в соляной кислоте; выделившийся углекислый газ собирается в градуированной колбе, а его объем сравнивают с выпущенным на тех же условиях известным количеством карбоната кальция.

15.3. Применяемые реагенты

15.3.1. Соляная кислота концентрации 1,10 г/мл.

15.3.2. Карбонат кальция.

15.3.3. Серная кислота приблизительно 0,05 моль/л, окрашенная метиловым красным.

15.4. Измерительный прибор

Scheibler-Dietrich-устройство.

15.5. Расчет результатов

Содержание карбоната, выраженного как карбонат кальция, рассчитывается по следующей формуле:

$$X = V \times 100 / V_1 \times 2 m,$$

где:

X = % (г/г) карбонатов в образце, выраженных как карбонат кальция;

V = мл CO₂ освобожденной части образца;

V₁ = мл CO₂ освобожденной от 0,5 г CaCO₃;

m = вес в граммах части образца.

XVI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО ФОСФОРА

Фотометрический метод

16.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить общее содержание фосфора в корме. Это особенно подходит для анализа продуктов с низким содержанием фосфора. В некоторых случаях (продукт, богатый фосфором) можно использовать гравиметрический метод.

16.2. Принцип применения

Проба минерализуется либо сухим сгоранием (для органического корма), или путем растворения в кислоте (для минеральных и жидких комбикормов), а затем вводится в кислую среду.

Раствор обрабатывают молибдованадатным реактивом. Оптическая плотность образовавшегося желтого раствора измеряется спектрофотометром при 430 нм.

16.3. Применяемые реагенты

16.3.1. Карбонат кальция.

16.3.2. Соляная кислота, ρ₂₀ = 1,10 г/мл (около 6 моль/л).

16.3.3. Азотная кислота, ρ₂₀ = 1,045 г/мл.

16.3.4. Азотная кислота, $\rho_{20} = 1,38$ до $1,42$ г/мл.

16.3.5. Серная кислота, $\rho_{20} = 1,84$ г/мл.

16.3.6. Молибдованадатный реагент: смешивают в 1 л мерной колбе 200 мл аммиачного гептамолибдата (см. указание подпункта 16.3.6.1), 200 мл аммиачного монованадата, как описано в подпункте 16.3.6.2, и 134 мл азотной кислоты, обозначенных в подпункте 16.3.4. Заполняют до нужного объема водой.

16.3.6.1. Раствор гептамолибдатного аммония: растворяют в горячей воде 100 г аммиачного гептамолибдата $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$. Добавляют 10 мл аммиака (концентрация 0,91 г/мл) и разбавляют водой до 1 л.

16.3.6.2. Раствор монованадатного аммония: растворяют 2,35 г аммиачного монованадата NH_4VO_3 в 400 мл горячей воды. Постоянно помешивая, медленно добавляют 20 мл разбавленной азотной кислоты [7 мл HNO_3 , указанной в подпункте 16.3.4, + 13 мл H_2O], и заполняют водой до 1 л.

16.3.7. Стандартный раствор 1 мг фосфора в мл: растворяют 4,387 г калия дигидрофосфата KH_2PO_4 в воде. Заполняют водой до 1 л.

16.4. Измерительные приборы

16.4.1. Тигли для прокаливания из кремния, фарфора или платины.

16.4.2. Электрическая муфельная печь, оснащенная термостатом на 550°C .

16.4.3. Колба Кьельдаля 250 мл.

16.4.4. Мерные колбы и пипетки.

16.4.5. Спектрофотометр.

16.4.6. Пробирки диаметром около 16 мм, с градуированными пробками диаметром до 14,5 мм, вместимость: 25-30 мл.

16.5. Процедура подготовки

16.5.1. Приготовление раствора

В зависимости от образца раствор готовят, как описано в подпункте 16.5.1.1 или 16.5.1.2.

16.5.1.1. Обычная процедура

Взвешивают 1 г образца или более с точностью до 1 мг. Тестовый образец помещают в колбу Кьельдаля, добавляют 20 мл серной кислоты, встряхивают, чтобы полностью пропитать вещество кислотой и предотвратить прилипание вещества к сторонам флакона, нагревают и поддерживают при температуре кипения 10 минут. Оставляют немного остыть, добавляют 2 мл азотной кислоты (см. примечание из подпункта 16.3.4), немного нагревают, оставляют немного остыть, добавляют немного азотной кислоты, указанной в подпункте 16.3.4, и доводят до кипения. Повторяют эту процедуру до получения бесцветного раствора. Охлаждают, добавляют немного воды, декантируя жидкость в 500 мл градуированной колбу, ополаскивая колбу Кьельдаля горячей водой. Оставляют остыть, доводят до нужного объема водой, гомогенизируют и фильтруют.

16.5.1.2. Образцы, содержащие органические вещества и не содержащие дикислых фосфатов кальция и магния

Взвешивают около 2,5 г образца с точностью до 1 мг в тигле для прокаливания. Смешивают образец для исследования с 1 г карбоната кальция до получения полной однородной смеси. Кальцинируют в печи до 550°C до получения белой или серой золы (небольшое количество угля игнорируется). Зола перемешивается в 250 мл лабораторном стакане. Добавляют 20 мл воды и соляной кислоты до прекращения вскипания. Добавляют еще 10 мл соляной кислоты. Размещают лабораторный стакан в песчаной бане и

содержимое испаряется до полного высыхания, чтобы кремний стал нерастворимым. Повторно растворяют остаток в 10 мл азотной кислоты (см. примечание подпункта 16.3.3) и кипятят в песчаной ванне или на плите в течение 5 минут без испарения до полного высыхания. Жидкость декантируют в 500 мл мерную колбу, промывая стакан несколько раз горячей водой. Оставляют остыть, доводят до нужного объема водой, гомогенизируют и фильтруют.

16.5.2. Появление окраски и измерение оптической плотности

Разводят часть аликвотного фильтрата, полученного в подпункте 16.5.1.1 или 16.5.1.2, чтобы получить концентрацию фосфора не более 40 $\mu\text{г}/\text{мл}$. Помещают 10 мл этого раствора в пробирку, описанную в подпункте 16.4.6, и добавляют 10 мл молибдованадатного реагента. Гомогенизируют и оставляют постоять в течение 10 минут при температуре 20°C. Измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при 430 нм путем сравнения с раствором, полученным путем добавления 10 мл молибдованадатного реагента на 10 мл воды.

16.5.3. Калибровочная кривая

Из стандартного раствора (см. указание подпункта 16.3.7) готовят растворы, содержащие 5, 10, 20, 30 и 40 мг фосфора на мл, соответственно. Отбирают 10 мл из каждого из этих растворов и добавляют 10 мл молибдованадатного реагента. Гомогенизируют и оставляют постоять в течение 10 минут при температуре 20°C. Измеряют оптическую плотность, как указано в подпункте 16.5.2.

Нанегают калибровочную кривую путем включения графической оптической плотности в сравнении с соответствующими количествами фосфора. Для концентраций от 0 до 40 $\mu\text{г}/\text{мл}$ кривая будет линейной.

16.6. Расчет результатов

Количество фосфора в образце определяется с помощью калибровочной кривой.

Результат выражается в процентах от образца.

Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на той же пробе, не должна превышать:

3% по отношению к более высокому результату – для содержания фосфора, не превышающего 5%;

0,15% в абсолютном значении – для содержания фосфора, равного или превышающего 5%.

XVII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРА В ХЛОРИДАХ

17.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить содержание хлора в растворимых хлоридах, обычно выраженных как хлорид натрия. Применяется для всех кормов.

17.2. Принцип применения

Хлориды растворяются в воде. Если продукт содержит органические вещества, отстаивают. Раствор слегка подкисляют азотной кислотой, а хлориды осаждаются в виде хлорида серебра с помощью раствора нитрата серебра. Избыток нитрата серебра титруют раствором роданида аммония методом Фольгарда.

17.3. Используемые реагенты

17.3.1. Раствор аммония тиоцианатный 0,1 моль/л.

17.3.2. Раствор нитратного серебра 0,1 моль/л.

17.3.3. Насыщенный раствор аммония сульфатного железа $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.

17.3.4. Азотная кислота, концентрация: 1.38 г/мл.

17.3.5. Диэтиловый эфир.

17.3.6. Ацетон.

17.3.7. Раствор Carrez I: растворяются 21,9 г ацетата цинка, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 3 г ледяной уксусной кислоты в воде. Заполняется водой до 100 мл.

17.3.8. Раствор Carrez II: растворяются 10,6 г калия ферроцианида $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ в воде. Заполняется водой до 100 мл.

17.3.9. Активированный уголь, без хлора и без впитывания.

17.4. Измерительное устройство

Смеситель (шейкер): около 35-40 об/мин.

17.5. Процедура подготовки

17.5.1. Приготовление раствора

В зависимости от образца раствор приготавливают в соответствии с указаниями, приведенными в подпунктах 17.5.1.1, 17.5.1.2 или 17.5.1.3.

В то же время проводится контрольный тест без анализируемого образца.

17.5.1.1. Образцы, не содержащие органических веществ

Взвешивают до 10 г образца с точностью до 1 мг, содержащие до 3 г хлора, в форме хлорида. Вводятся с 400 мл воды в 500 мл мерную колбу приблизительно при 20°C. Перемешивают в течение тридцати минут в шейкере, доводя до объема, гомогенизируют и фильтруют.

17.5.1.2. Образцы, содержащие органические вещества, за исключением продуктов, указанных в подпункте 17.5.1.3

Взвешивают около 5 г образца с точностью до 1 мг и помещают вместе с 1 г активированного угля в 500 мл мерную колбу. Добавляют 400 мл воды при температуре около 20°C и 5 мл раствора Carrez I, перемешивают в течение 30 секунд, затем добавляют 5 мл раствора Carrez II. Перемешивают в течение тридцати минут в шейкере, доводят до объема, гомогенизируют и фильтруют.

17.5.1.3. Термически обработанные корма, лепешки и льняная мука, продукты, богатые льняной мукой, и другие продукты, богатые слизью и коллоидными веществами (например, крахмал декстрин).

Подготавливается раствор, как описано в подпункте 17.5.1.2, но не фильтруется. Декантируют (при необходимости центрифугируют), отнимают 100 мл супернатантной жидкости и перемещают в мерную колбу объемом 200 мл.

Смешивают с ацетоном и доводят до нужного объема с этим растворителем, гомогенизируют и фильтруют.

17.5.2. Титрование

С помощью пипетки переносится в колбу Эрленмейера количество в пределах от 25 до 100 мл фильтрата (в зависимости от ожидаемого содержания хлора), полученного, как описано в подпунктах 17.5.1.1, 17.5.1.2 и 17.5.1.3. Делительная часть не должна содержать более 150 мг хлора (Cl). При необходимости разбавляют до 50 мл воды, добавляя 5 мл азотной кислоты, 20 мл насыщенного аммония сульфатного железа и две капли раствора роданида аммония, перемещаемого с помощью бюретки, заполненной до нулевой отметки. С помощью бюретки перемещают раствор нитратного серебра, чтобы получить избыток 5 мл. Добавляют 5 мл диэтилового эфира и сильно взбалтывают для коагуляции осадка.

Избыток нитратного серебра титруют аммиачным роданидом до красновато-коричневой окраски, сохраняющейся в течение одной минуты.

17.6. Расчет результатов

Количество хлора (X), выраженного в % натрия хлоридного раствора, рассчитывается по следующей формуле:

$$X = 5,845 \times (V_1 - V_2) / m,$$

где:

V_1 = мл раствора нитратного серебра 0,1 моль/л добавленного,

V_2 = мл раствора роданида аммония 0,1 моль/л, используемого в титровании;

m = вес образца.

Если контрольный тест показывает потребление раствора нитратного серебра 0,1 моль/л, эта величина вычитается из объема ($V_1 - V_2$).

17.7. Примечания

17.7.1. Титрование может быть сделано путем потенциометрии.

17.7.2. Для продуктов, богатых маслами и жирами, сначала приступают к обезжириванию диэтиловым или петролевым эфиром.

17.7.3. Для рыбной муки титрование может быть осуществлено методом Мора.

[anexa nr.4](#)

Приложение № 4
к Постановлению Правительства
№ 686 от 13 сентября 2012 г.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА по контролю допустимого уровня кормовых добавок

I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А

1.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить уровень витамина А (ретинола) в корме и премиксах. Витамин А включает в себя алкоголь All-trans-ретинол и его цис-изомеры, которые определяются с помощью этого метода. Содержание витамина А выражается в международных единицах (МЕ) на кг. Одна МЕ соответствует деятельности 0,3 мкг алкоголя All-trans-витамина А или 0,344 мкг ацетата All-trans -витамина А, или 0,550 мг пальмитата All-trans-витамина А.

Предел квантификации составляет 2000 МЕ витамина А/кг.

1.2. Принцип применения

Образец подвергают гидролизу со спиртовым раствором гидроксида калия, а витамин А экстрагируют петролевым эфиром.

Растворитель отделяют испарением, а остаток растворяют в метаноле и при необходимости разбавляют до нужной концентрации. Содержание витамина А определяется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC), с использованием УФ-детектора или флуоресценции. Параметры

хроматографии подобраны так, чтобы не существовало разделения между алкогалем All-trans-витамина А и его цис-изомерами.

1.3. Применяемые реагенты

1.3.1. Этанол, = 96%.

1.3.2. Петролейный эфир, промежуток кипения 40-60°C.

1.3.3. Метанол.

1.3.4. Раствор гидроокиси калия, $c = 50$ г/100 мл.

1.3.5. Раствор аскорбата натрия, $c = 10$ г/100 мл (см. примечания из подпункта 1.7.7).

1.3.6. Сульфид натрия, $\text{Na}_2\text{S} \times x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).

1.3.6.1. Раствор сульфида натрия $c = 0,5$ моль/л глицерина, $\beta = 120$ г/л ($x = 9$) (см. примечания из подпункта 1.7.8).

1.3.7. Раствор фенолфталеина, $c = 2$ г/100 мл в этаноле.

1.3.8. 2-пропанол.

1.3.9. Подвижная фаза для высокоэффективной жидкостной хроматографии: смесь метанола и воды, например, 980 + 20 (V + V). Точная пропорция определяется характеристиками используемой колонки.

1.3.10. Азот, лишенный кислорода

1.3.11. All-trans-витамин А ацетата, особо чистый, с сертифицированной деятельностью, например $2,80 \times 10^6$ МЕ/г

1.3.11.1. Основной раствор All-trans-витамина А ацетата: взвешивают 50 мг ацетатного витамина А с точностью до 0,1 мг в 100-миллиметровой мерной колбе. Растворяют в 2-пропанолe и доводят до объема тем же растворителем.

Номинальная концентрация этого раствора составляет 1400 МЕ витамина на миллилитр. Точное содержание определяется в соответствии с обозначениями из подпункта 1.5.6.3.1.

1.3.12. All-trans-витамин А пальмитат, особо чистый, с сертифицированной деятельностью, например $1,80 \times 10^6$ МЕ/г.

1.3.12.1. Основной раствор All-trans-витамина А пальмитата: взвешивают 80 мг витамина А пальмитата с отклонением 0,1 мг в 100 мл мерной колбе. Растворяют в 2-пропанолe и доводят до объема тем же растворителем. Номинальная концентрация этого раствора составляет 1400 МЕ витамина на миллилитр. Точное содержание определяется в соответствии с обозначениями из подпункта 1.5.6.3.2.

1.3.13. 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (ВНТ) (см. примечания из подпункта 1.7.5).

1.4. Измерительные приборы

1.4.1. Вакуумный роторный испаритель.

1.4.2. Коричневая лабораторная посуда.

1.4.2.1. Плоская колба и флакон типа Эрленмейера 500 мл, с шлифованным стеклянным отверстием.

1.4.2.2. Мерные колбы с шлифованными стеклянными пробками, с узким горлышком 10, 25, 100 и 500 мл.

1.4.2.3. Делительные воронки конические, 1000 мл, с шлифованными стеклянными пробками.

1.4.2.4. Колба грушевидной формы 250 мл, с отверстием из шлифованного стекла.

1.4.3. Конденсатор Allihn, с 300 мм длиной кожуха, с сочетанием матового стекла и адаптером для поставок газа.

1.4.4. Плиссированная фильтровальная бумага для разделения фаз диаметром 185 мм (например, Schleicher & Schuell 597 NY 1/2).

1.4.5. ВЭЖХ оборудование с впрыскивательной системой.

1.4.5.1. Жидкая хроматографическая колонка, 250 мм × 4 мм, C₁₈, с частицами от 5 до 10 мм, или эквивалентными (показатели: один пик на все изомеры ретинола в условиях ВЭЖХ).

1.4.5.2. УФ-детектор или для флуоресценции, с регулировкой длины волны.

1.4.6. Спектрофотометр с 10 мм кварцевыми клетками.

1.4.7. Водяная баня с магнитным шейкером.

1.4.8. Аппарат для экстракции, состоящий из:

1.4.8.1. Стеклоцилиндра 1 л емкостью, предусмотренной с горлышком и притертой стеклянной пробкой.

1.4.8.2. Матовой стеклянной части, имеющей боковой рычаг и регулируемую трубку, проходящую через центр. Регулируемая трубка имеет нижнюю часть в форме “U” и насадку на другом конце так, чтобы верхний слой жидкости в цилиндре мог быть перемещен в делительную воронку.

1.5. Процедура подготовки

Витамин А чувствителен к свету (УФ) и окислению. Все операции выполняются при отсутствии света (используют коричневое стекло или защищенную алюминиевую фольгу) и кислорода (с азотным питанием). Во время экстракции воздух над жидкостью заменен азотом (избегать избыточного давления, ослабляя раз за разом крышку).

1.5.1. Подготовка проб

Измельчают образец таким образом, чтобы он мог пройти через 1 мм сита, избегая образования тепла. Измельчение осуществляется непосредственно перед взвешиванием и омылением, в противном случае могут возникнуть потери витамина А.

1.5.2. Омыление

В зависимости от содержания витамина А взвешивают 2-25 г образца с точностью до 1 мг в колбе с плоским дном или в 500 мл колбе Эрленмейера. Добавляют, с круговым взбалтыванием, 130 мл этилового спирта, около 100 мг 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола (ВНТ), 2 мл аскорбата натрия и 2 мл раствора сульфида натрия. Устанавливают конденсатор (см. примечание из подпункта 1.4.3) к колбе и погружают его в водяную баню с магнитной мешалкой. Доводят до кипения и оставляют на 5 минут для обратного течения. Затем добавляют 25 мл раствора гидроксида калия через конденсатор Allihn и оставляют еще на 25 мин для обратного течения, непрерывно перемешивая под слабой струей азота. Затем промывают конденсатор с 20 мл воды, а содержимое колбы охлаждают при комнатной температуре.

1.5.3. Процедура экстракции

Количественно перемещают омыленный раствор путем декантирования с промыванием общим объемом 250 мл воды в 1000 мл делительную воронку или аппарат для экстракции. Промывают колбу, используемую для омыления, последовательно 25 мл этанола и 100 мл петролейным эфиром, а жидкость для промывания перемещают в делительную воронку или аппарат для извлечения. Соотношение воды и этанола в комбинированных растворах должно быть примерно 2:1. Сильно встряхивают в течение 2 минут и оставляют для отстаивания в течение 2 минут.

1.5.3.1. Экстракция с помощью разделения воронки (см. положения подпункта 1.4.2.3)

Когда слои отделились (см. примечание из подпункта 1.7.3), перемещают слой петролейного эфира в другую делительную воронку. Повторяют эту экстракцию два раза с 100 мл петролейного эфира, а затем еще два раза с 50 мл петролейного эфира.

Объединенные экстракты промывают два раза осторожно круговым перемешиванием в делительной воронке (чтобы избежать образования эмульсии) со 100 мл воды, повторяя то же с другими 100 мл воды, пока вода не станет бесцветной при добавлении раствора фенолфталеина (четырёхкратного промывания, как правило, достаточно). Промытый экстракт фильтруют сухим многослойным фильтром для разделения фаз в целях удаления отстоянной воды в 500 мл мерной колбе. Промывают делительную воронку и фильтр с 50 мл петролейного эфира, доводят до объема петролейным эфиром и хорошо перемешивают.

1.5.3.2. Экстракция с использованием аппарата для экстракции (см. примечание из подпункта 1.4.8)

Когда слои отделились (см. примечание из подпункта 1.7.3), заменяют пробку стеклянного цилиндра с частью обработанного стекла и помещают нижнюю часть в форме “U” в регулируемую трубку таким образом, чтобы находиться непосредственно над поверхностью. Применив давление над боковым стержнем при помощи азота, перемещают верхний слой петролейного эфира в делительную 1000 мл воронку. Добавляют 100 мл петролейного эфира в стеклянный цилиндр, вставляют пробку и сильно взбалтывают. Оставляют, чтобы слои отделились и перемещают верхний слой в делительную воронку, как раньше. Повторяют процедуру извлечения еще 100 мл петролейного эфира, а затем дважды порциями по 50 мл петролейного эфира и добавляют слои петролейного эфира в делительную воронку.

Объединенные экстракты промывают петролейным эфиром, как описано в подпункте 1.5.3.1, и осуществляют действия, как описано в соответствующем подпункте.

1.5.4. Подготовка раствора пробы для ВЭЖХ

С помощью пипетки вводят аликвотную часть из раствора петролейного эфира (из подпункта 1.5.3.1 или 1.5.3.2) в 250 мл грушевидную колбу. Растворитель испаряется почти до высыхания при пониженном давлении в ротормном испарителе при температуре бани, не превышающей 40°C. Восстанавливается атмосферное давление путем допущения азота и устраняют колбу из ротормного испарителя. Удаляют оставшийся растворитель струей азота, а остаток незамедлительно растворяют в известном объеме (10-100 мл) метанола (концентрация витамина А должна быть в пределах 5-30 МЕ/мл).

1.5.5. Определение с помощью ВЭЖХ

Витамин А разделяется колонной с обратной фазой C₁₈ (см. примечание из подпункта 1.4.5.1), а концентрация измеряется с УФ-детектором (325 нм) или детектором флуоресценции (раздражение: 325 нм, эмиссия: 475 нм) (1.4.5.2).

Вводят аликвотную часть (например, 20 μ л) раствора метанола, полученную в подпункте 1.5.4, и разбавляют подвижной фазой, описанной в подпункте 1.3.9. Вычисляют среднюю высоту конечной части (площадь) нескольких вводов одного и того же образца раствора и средней высоты (площади) конечной части нескольких вводов калибровочных растворов, в соответствии с положениями подпункта 1.5.6.2.

Условия ВЭЖХ

Условия, указанные в таблице 1 настоящего приложения, предназначены для руководства; могут быть использованы другие условия, если они дают идентичные результаты.

Условия ВЭЖХ

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колонка, как указано в подпункте 1.4.5.1	250 мм × 4 мм, C ₁₈ , 5 мкм или 10 мкм или эквивалентные частицы
Подвижная фаза (см. примечание из подпункта 1.3.9)	Смесь метанола (см. примечание из подпункта 1.3.3) и воды, например, 980 + 20 (V + V)
Расход	1-2 мл/мин
Детектор (см. примечание из подпункта 1.4.5.2)	УФ-детектор (325 нм) или детектор флуоресценции (раздражение: 325 нм/излучение: 475 нм).

1.5.6. Калибровка

1.5.6.1. Подготовка стандартных рабочих растворов

Вводят 20 мл остаточного ацетатного раствора витамина А и 20 мл остаточного пальмитатного раствора витамина А в колбу с плоским дном или в 500 мл колбу Эрленмейера, и подвергают гидролизу, как описано в подпункте 1.5.2, но без добавления 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола (ВНТ). Далее экстрагируют петролийным эфиром в соответствии с положениями, указанными в подпункте 1.5.3, и доводят до 500 мл петролейным эфиром. Ставят для испарения 100 мл этого экстракта в роторный испаритель (см. примечание подпункта 1.5.4) почти до высушивания, отделяют остатки растворителя потоком азота и вновь растворяют остаток в 10 мл метанола. Номинальная концентрация этого раствора составляет 560 МЕ витамина А на миллилитр. Точное содержание определяется, как указано в подпункте 1.5.6.3.3.

Рабочий стандартный раствор должен быть свежеприготовленным перед использованием.

Вводят 2 мл рабочего стандартного раствора в 20 мл мерную колбу, доводят до объема метанолом и перемешивают. Номинальная концентрация этого разбавленного рабочего стандартного раствора составляет 56 МЕ витамина А на миллилитр.

1.5.6.2. Подготовка калибровочных растворов и калибровочной кривой

Перемещаются 1, 2, 5 и 10 мл из разбавленного рабочего стандартного раствора в ряд 20 мл градуированных колб, доводят до метки метанолом и перемешивают. Номинальные концентрации этих растворов составляют 2.8, 5.6, 14 и 28 МЕ витамина А на миллилитр.

Вводят несколько раз по 20 мкл из каждого калибровочного раствора и определяют среднюю высоту (площадь) кончиков. В зависимости от средней высоты (площади) кончика рисуется калибровочная кривая, с учетом результатов, полученных контрольным УФ-раствором (см. указания из подпункта 1.5.6.3.3).

1.5.6.3. УФ стандартизация (под воздействием ультрафиолетовых лучей) типовых растворов

1.5.6.3.1. Остаточный ацетатный раствор витамина А

Вводят 2 мл остаточного ацетатного раствора витамина А в 50 мл мерную колбу и доводят до метки 2-пропанолом. Номинальная концентрация этого раствора составляет 56 МЕ витамина А на миллилитр. Вводят 3 мл этого ацетатного раствора витамина А в 25 мл

мерную колбу и доводят до метки 2-пропанолом. Номинальная концентрация этого раствора составляет 6,72 МЕ витамина А на миллилитр. Измеряют УФ-спектр этого раствора в сравнении с раствором 2-пропанола в спектрофотометре, в диапазоне 300-400 нм. Предел распространения составляет от 325 до 327 нм.

Расчет витамина А:

$$\text{МЕ витамина А/мл} = E_{326} \times 19,$$

$$(E_1^{1\%} \text{ см. витамина А ацетат} = 1530 \text{ при } 326 \text{ нм в 2-пропанол})$$

1.5.6.3.2. Остаточный пальмитатный раствор витамина А

Вводят 2 мл остаточного пальмитатного раствора витамина А в 50 мл мерную колбу и доводят до метки 2-пропанолом. Номинальная концентрация этого раствора составляет 56 МЕ витамина А на миллилитр. Вводят 3 мл этого пальмитатного раствора витамина А в 25 мл мерную колбу и доводят до метки 2-пропанолом. Номинальная концентрация этого раствора составляет 6,72 МЕ витамина А на миллилитр. Измеряют УФ-спектр этого раствора в сравнении с раствором 2-пропанола в спектрофотометре, в диапазоне 300-400 нм. Предел распространения составляет от 325 до 327 нм.

Расчет витамина А:

$$\text{МЕ витамина А/мл} = E_{326} \times 19,$$

$$(E_1^{1\%} \text{ см. витамин А пальмитат} = 957 \text{ при } 326 \text{ нм в 2-пропанол})$$

1.5.6.3.3. Стандартный рабочий раствор витамина А

Вводят 3 мл неразбавленного стандартного рабочего раствора витамина А, подготовленного в соответствии с положениями, указанными в подпункте 1.5.6.1, в 50 мл мерную колбу и доводят до метки 2-пропанолом. Вводят 5 мл этого раствора в 25 мл мерную колбу и доводят до метки 2-пропанолом. Номинальная концентрация этого раствора составляет 6,72 МЕ витамина А на миллилитр. Измеряют УФ-спектр этого раствора в сравнении с раствором 2-пропанола в спектрофотометре, в диапазоне 300-400 нм.

Предел распространения составляет от 325 до 327 нм.

Расчет витамина А:

$$\text{МЕ витамина А/мл} = 18,3 \times E_{326},$$

$$(E_1^{1\%} \text{ см. витамин А алкоголь} = 1821 \text{ при } 325 \text{ нм в 2-пропанол})$$

1.6. Расчет результатов

Из высоты (площади) средней конечной части витамина А анализируемых растворов определяют концентрацию анализируемого раствора в МЕ/мл со ссылкой на калибровочную кривую.

Содержание w витамина А в образце в МЕ/кг определяется по следующей формуле:

$$w = 500 \times c \times V_2 \times 1000 / V_1 \times m \text{ [МЕ/кг]},$$

где:

c = концентрации витамина А растворного образца (см. примечание подпункта 1.5.4), в МЕ/мл;

V_1 = объем анализируемого раствора (см. примечание подпункта 1.5.4), в мл;

V_2 = отобранный аликвотный объем в подпункте 1.5.4, в мл;

m = вес пробы в г.

1.7. Комментарии

1.7.1. Для образцов с низким содержанием витамина А может применяться сочетание экстрактов петролейного эфира, происходящего из двух операций омыления (взвешенная масса: 25 г) в анализируемом растворе для определения с помощью ВЭЖХ.

1.7.2. Масса отобранной пробы для анализа содержит не более 2 г жира.

1.7.3. Если не происходит разделение фаз, добавляют около 10 мл этанола для раздробления эмульсии.

1.7.4. Для печеночного жира и других чистых жиров период омыления продлевается на 45-60 минут.

1.7.5. Гидрохинон может быть использован вместо 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола (ВНТ).

1.7.6. Используя колонну с нормальной фазой, разделение изомеров ретинола возможно. В этом случае высота (площадь) пиков all- цис- и all-трансизомеров должна суммироваться для проведения расчетов.

1.7.7. Могут использоваться около 150 мг аскорбиновой кислоты вместо раствора аскорбата натрия.

1.7.8. Могут использоваться около 50 мг ЭДТА вместо раствора сульфида натрия.

1.7.9. В случае анализа витамина А в заменителях молока особое внимание уделяется:

Омылению – по причине количества жира в образце может оказаться необходимым увеличение объема раствора гидроксида калия;

Экстракции – при наличии эмульсии может оказаться необходимым принять соотношение 2:1 для воды/этанола.

Чтобы проверить, получаются ли в результате применения данного метода анализа надежные результаты для соответствующей матрицы (ЗЦМ), применяется восстановительный тест на дополнительную тестированную порцию. Если предел восстановления менее 80%, результат анализа должен быть исправлен в зависимости от восстановления.

1.8. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать 15% по отношению к более высокому результату.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е

2.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить уровень витамина Е в кормах и премиксах. Содержание витамина Е выражается в мг DL- α -токоферола ацетата на килограмм. 1 мг DL- α -токоферола ацетата соответствует 0,91 мг DL- α -токоферола (витамина Е).

Предел квантификации составляет 2 мг витамина Е/кг. Предел квантификации достигается только с флуоресцентным детектором. С УФ-детектором, предел квантификации составляет 10 мг/кг.

2.2. Принцип применения

Образец подвергают гидролизу со спиртовым раствором гидроксида калия, а витамин Е экстрагируют петролейным эфиром. Растворитель отделяют испарением, а остаток растворяют в метаноле и, при необходимости, разбавляют до нужной концентрации. Содержание витамина Е определяется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC), с использованием УФ-детектора или флуоресценции.

2.3. Применяемые реагенты

2.3.1. Этанол, = 96%.

2.3.2. Петролейный эфир, промежуток кипения 40-60°C.

2.3.3. Метанол.

2.3.4. Раствор гидроксида калия, $c = 50$ г/100 мл.

2.3.5. Раствор аскорбата натрия, $c = 10$ г/100 мл (см. примечания из подпункта 2.7.7).

2.3.6. Сульфид натрия, $\text{Na}_2\text{S} \times x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).

2.3.6.1. Раствор сульфида натрия $c = 0,5$ моль/л глицерина, $\beta = 120$ г/л ($x = 9$) (см. примечания из подпункта 2.7.8).

2.3.7. Раствор фенолфталеина, $c = 2$ г/100 мл в этаноле.

2.3.8. Подвижная фаза для высокоэффективной жидкостной хроматографии: смесь метанола и воды, например, 980 + 20 (V + V). Точная пропорция определяется характеристиками используемой колонки.

2.3.9. Азот, лишенный кислорода

2.3.10. DL- α -токоферола ацетата, особо чистого, с сертифицированной деятельностью

2.3.10.1. Основной раствор DL- α -токоферола ацетата: взвешивают 100 мг ацетатного DL- α -токоферола с точностью до 0,1 мг в 100 мл мерной колбе. Растворяют в этаноле и доводят до объема тем же растворителем. 1 мл этого раствора содержит 1 мг DL- α -токоферола ацетата (для УФ-контроля см. описание из подпункта 2.5.6.1.3; для устойчивости см. описание из подпункта 2.7.4).

2.3.11. DL- α -токоферол, особо чистый, с сертифицированной деятельностью.

2.3.11.1. Основной раствор DL- α -токоферол: взвешивают 100 мг DL- α -токоферола с отклонением 0,1 мг в 100 мл мерной колбе. Растворяют в этаноле и доводят до объема тем же растворителем. 1 мл этого раствора содержит 1 мг DL- α -токоферола ацетата (для УФ-контроля см. описание из подпункта 2.5.6.1.3; для устойчивости см. описание из подпункта 2.7.4).

2.3.12. 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (ВНТ) (см. примечания из подпункта 2.7.5).

2.4. Измерительные приборы

2.4.1. Роторный испаритель с записывающим устройством.

2.4.2. Лабораторная посуда коричневая.

2.4.2.1. Плоская колба и флакон типа Эрленмейера 500 мл, с шлифованным стеклянным отверстием.

2.4.2.2. Мерные колбы с шлифованными стеклянными пробками, с узким горлышком 10, 25, 100 и 500 мл.

2.4.2.3. Делительные воронки конические 1 000 мл, с шлифованными стеклянными пробками.

2.4.2.4. Колба грушевидной формы 250 мл, с отверстием из шлифованного стекла.

2.4.3. Конденсатор Allihn, с 300 мм длиной кожуха, с сочетанием матового стекла и адаптером для поставок газа.

2.4.4. Плиссированная фильтровальная бумага для разделения фаз диаметром 185 мм (например, Schleicher & Schuell 597 NY 1/2).

2.4.5. ВЭЖХ оборудование с впрыскивательной системой

2.4.5.1. Жидкая хроматографическая колонка, 250 мм x 4 мм, C₁₈, с частицами от 5 до 10 мм или эквивалентными.

2.4.5.2. УФ-детектор или для флуоресценции, с регулятором длины волны.

2.4.6. Спектрофотометр с 10 мм кварцевыми клетками.

2.4.7. Водяная баня с магнитным шейкером.

2.4.8. Аппарат для экстракции

2.5. Процедура подготовки

Витамин Е чувствителен к свету (УФ) и окислению. Все операции выполняются в отсутствие света (в сосудах из коричневого стекла или защищенных алюминиевой фольгой) и кислорода (с азотным питанием). Во время экстракции воздух над жидкостью заменяется азотом (избегать избыточного давления, ослабляя раз за разом крышку).

2.5.1. Подготовка проб

Измельчают образец таким образом, чтобы он мог пройти через 1 мм сита, избегая образования тепла. Измельчение осуществляется непосредственно перед взвешиванием и омылением, в противном случае могут возникнуть потери витамина Е.

2.5.2. Омыление

В зависимости от содержания витамина Е взвешивают 2-25 г образца с точностью до 0,01 мг в колбе с плоским дном или в 500 мл колбе Эрленмейера. Добавляют, взбалтывая кругами, 130 мл этилового спирта, около 100 мг 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола (ВНТ), 2 мл аскорбата натрия и 2 мл раствора сульфида натрия (см. примечание из подпункта 2.3.6). Устанавливают конденсатор к колбе и погружают его в водяную баню с магнитной мешалкой. Доводят до кипения и оставляют на 5 минут для обратного течения. Затем добавляют 25 мл раствора гидроксида калия через конденсатор Allihn и оставляют еще на 25 мин. для обратного течения, непрерывно перемешивая под слабой струей азота. Затем промывают конденсатор с 20 мл воды, а содержимое колбы охлаждают при комнатной температуре.

2.5.3. Процедура экстракции

Количественно перемешивают омыленный раствор путем декантирования, промывая общим объемом 250 мл воды в 1000 мл делительную воронку или аппарат для экстракции. Промывают колбу, используемую для омыления, последовательно 25 мл этанола и 100 мл петролейного эфира, а жидкость для промывания перемешивают в делительной воронке или аппарате для извлечения. Соотношение воды и этанола в комбинированных растворах должно быть примерно 2:1. Сильно встряхивают в течение 2 минут и оставляют для отстаивания в течение 2 минут.

2.5.3.1. Экстракция с помощью разделения воронки (см. положения из подпункта 2.4.2.3)

Когда слои отделились (см. примечание из подпункта 2.7.3), перемешивают слой петролейного эфира в другой делительной воронке. Повторяют эту экстракцию два раза с 100 мл петролейного эфира, а затем еще два раза с 50 мл петролейного эфира.

Объединенные экстракты промывают два раза осторожно круговым перемешиванием в делительную воронку (чтобы избежать образования эмульсии) с 100 мл воды, повторяя то же с другими 100 мл воды, до тех пор, пока вода не станет бесцветной при добавлении раствора фенолфталеина (четырёхкратного промывания, как правило, достаточно).

Промытый экстракт фильтруют сухим многослойным фильтром для разделения фаз в целях удаления воды в суспензии и перемешивают в 500 мл мерной колбе. Промывают делительную воронку и фильтр с 50 мл петролийного эфира, доводят до объема петролийным эфиром и хорошо перемешивают.

2.5.3.2. Экстракция с использованием аппарата для экстракции (см. примечание из подпункта 2.4.8)

Когда слои отделились (см. примечание из подпункта 2.7.3), заменяют пробку стеклянного цилиндра вставкой обработанного стекла и помещают нижнюю часть формы “U” в регулируемую трубку таким образом, чтобы она находилась непосредственно над поверхностью. Путем применения давления над боковым стержнем при помощи азота перемешивают верхний слой петролейного эфира в делительной 1000 мл воронке. Добавляют 100 мл петролейного эфира в стеклянный цилиндр, вставляют пробку и сильно взбалтывают. Оставляют, чтобы слои отделились, и перемещают верхний слой в делительную воронку. Повторяют процедуру извлечения еще 100 мл петролейного эфира, а затем дважды порциями по 50 мл петролийного эфира и добавляет слои петролейного эфира в делительную воронку.

Объединенные экстракты промывают петролейным эфиром, как описано в подпункте 2.5.3.1, и действуют, как описано в соответствующем подпункте.

2.5.4. Подготовка раствора пробы для ВЭЖХ

С помощью пипетки вводят аликвотную часть из раствора петролийного эфира (из подпункта 2.5.3.1 или 2.5.3.2) в 250 мл грушевидную колбу. Растворитель испаряется почти до высыхания при пониженном давлении в роторном испарителе при температуре бани, не превышающей 40°C. Атмосферное давление восстанавливают путем допущения азота, согласно положениям подпункта 2.3.9, и устраняют колбу из роторного испарителя. Удаляют оставшийся растворитель струей азота (см. примечание из подпункта 2.3.9.), а остаток незамедлительно растворяют в известном объеме (10-100 мл) метанола (концентрация DL- α -токоферола должна быть в пределах 5-30 $\mu\text{г}/\text{мл}$).

2.5.5. Определение с помощью ВЭЖХ

Витамин E разделяется колонной с обратной фазой C₁₈ (см. примечание из подпункта 2.4.5.1), а концентрация измеряется УФ-детектором (раздражение: 295 нм, эмиссия: 330 нм), согласно положениям, описанным в подпункте 2.4.5.2.

Вводят аликвотную часть (например, 20 $\mu\text{л}$) раствора метанола, полученного в соответствии с положениями подпункта 2.5.4, и разбавляют подвижной фазой (см. положения подпункта 2.3.8.). Вычисляют среднюю высоту конечной части (площадь) нескольких инъекций одного и того же образца раствора и среднюю высоту (площадь) конечной части нескольких калибровочных растворителей в соответствии с положениями подпункта 2.5.6.2.

Условия ВЭЖХ

Условия, приведенные в таблице 2 настоящего приложения, предназначены для руководства; могут быть использованы и другие условия, если они дают идентичные результаты.

Таблица 2

Условия ВЭЖХ

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колонка, как указано в подпункте 2.4.5.1	250 мм × 4 мм, C ₁₈ , 5 мкм или 10 мкм или эквивалентные частицы
Подвижная фаза (см. примечание из подпункта 2.3.8)	Смесь метанола и воды, например, 980 + 20 (V + V)
Расход	1-2 мл/мин
Детектор (см. примечание из подпункта 2.4.5.2)	УФ-детектор (раздражение: 295 нм/излучения: 475 нм) или УФ-детектор (292 нм).

2.5.6. Калибровка (DL-α-токоферола ацетата или DL-α-токоферол)

2.5.6.1. Стандарт DL-α-токоферола ацетата

2.5.6.1.1. Подготовка рабочего стандартного раствора

Вводят 25 мл остаточного DL-α-токоферола ацетата (см. примечание из подпункта 2.3.10.1.) в колбу с плоским дном или в 500 мл колбу Эрленмейера и подвергают гидролизу, как описано в подпункте 2.5.2. Далее экстрагируют петролейным эфиром в соответствии с положениями, указанными в подпункте 2.5.3, и доводят до 500 мл петролейным эфиром. Помещают для испарения 25 мл этого экстракта в роторный испаритель (см. примечание из подпункта 2.5.4), отделяют остаток растворителя с потоком азота и вновь растворяют остаток в 25 мл метанола. Номинальная концентрация этого раствора составляет 45,5 мкг DL-α-токоферола на миллилитр, что эквивалентно 50 мкг DL-α-токоферола на миллилитр. Рабочий стандартный раствор должен быть свежеприготовленным перед использованием.

2.5.6.1.2. Подготовка калибровочных растворов и калибровочной кривой

Перемещаются 1, 2, 5 и 10 мл из разбавленного рабочего стандартного раствора в ряд 20 мл градуированных колб, доводят до метки метанолом и перемешивают. Номинальные концентрации этих растворов составляют 2,5, 5, 10 и 25 мкг/мл DL-α-токоферола ацетата, что эквивалентно 2,28, 4,55, 9,1 мкг/мл и 22,8 мкг/мл DL-α-токоферола.

Вводят по несколько раз по 20 мкл из каждого калибровочного раствора и определяют среднюю высоту (площадь) кончиков. В зависимости от средней высоты (площади) кончика рисуется калибровочная кривая.

2.5.6.1.3. УФ-стандартизация (под воздействием ультрафиолетовых лучей) остаточного раствора DL-α-токоферола ацетата (см. примечание из подпункта 2.3.10.1)

Разбавляют 5 мл остаточного раствора DL-α-токоферола ацетата в 25 мл этанола и измеряют УФ-спектр этого раствора в сравнении с раствором этанола в спектрофотометре, в диапазоне 250 нм и 320 нм. Предел распространения составляет 284 нм.

$$E_1^{1\%} 1 \text{ см} = 43,6 \text{ при } 284 \text{ нм в этаноле.}$$

При этом разбавлении должно получиться значение расширения между 0,84 и 0,88.

2.5.6.2. Стандартный DL-α-токоферола

2.5.6.2.1. Приготовление рабочего стандартного раствора

Вводят 2 мл остаточного раствора DL-α-токоферола в 50 мл мерную колбу, растворяют в метаноле и доводят до объема метанолом. Номинальная концентрация этого раствора составляет 40 мкг DL-α-токоферола на мл, что эквивалентно 44 мкг DL-α-токоферола

ацетата на мл. Рабочий стандартный раствор следует готовить непосредственно перед употреблением.

2.5.6.2.2. Подготовка калибровочных растворов и калибровочной кривой

Перемещают 1, 2, 4 и 10 мл из рабочего стандартного раствора в ряд 20 мл градуированных колб, доводят до метки метанолом и перемешивают. Номинальные концентрации этих растворов составляют 2, 4, 8 и 20 $\mu\text{г/мл}$ DL- α -токоферола, что эквивалентно 2,2, 4,4, 8,79 $\mu\text{г/мл}$ и 22 $\mu\text{г/мл}$ DL- α -токоферола ацетата.

Вводят по несколько раз по 20 $\mu\text{л}$ из каждого калибровочного раствора и определяют среднюю высоту (площадь) кончиков. В зависимости от средней высоты (площади) кончика рисуется калибровочная кривая.

2.5.6.2.3. УФ стандартизация (под воздействием ультрафиолетовых лучей) остаточного раствора DL- α -токоферола (см. примечание из подпункта 2.3.11.1)

Разбавляют 2 мл остаточного раствора DL- α -токоферола в 25 мл этанола и измеряют УФ-спектр этого раствора в сравнении с раствором этанола в спектрофотометре, в диапазоне 250 нм и 320 нм.

Предел распространения составляет 292 нм.

$$E_1^{1\%} 1 \text{ см} = 75,8 \text{ при } 292 \text{ нм в этаноле.}$$

При этом разбавлении должно получиться значение расширения, составляющее 0,6.

2.6. Расчет результатов

Из средней высоты (площади) конечной части витамина E анализируемых растворов определяют концентрацию анализируемого раствора в $\mu\text{г/мл}$ (подсчитанной как DL- α -токоферола ацетата) со ссылкой на калибровочную кривую (см. подпункт 2.5.6.1.2 или 2.5.6.2.2.).

W содержание витамина E в образце, выраженное в $\mu\text{г/кг}$, определяется по следующей формуле:

$$w = 500 \times c \times V_2 \times 1000 / V_1 \times m [\mu\text{г/кг}],$$

где:

c = концентрация витамина E (как DL- α -токоферола ацетата) раствора образца (см. примечание из подпункта 2.5.4), в $\mu\text{г/мл}$;

V_1 = объем анализируемого раствора (см. примечание из подпункта 2.5.4), в мл;

V_2 = отобранный аликвотный объем в подпункте 1.5.4, в мл;

m = вес пробы в г.

2.7. Комментарии

2.7.1. Для образцов с низким содержанием витамина E может быть полезно сочетание экстрактов петролейного эфира, происходящего из двух вычислений омыления (взвешенная масса: 25 г) в анализируемом растворе для определения с помощью ВЭЖХ.

2.7.2. Масса отобранной пробы для анализа содержит не более 2 г жира.

2.7.3. Если не происходит разделения фаз, добавляют около 10 мл этанола для раздробления эмульсии.

2.7.4. Сразу же осуществляется спектрофотометрическое измерение раствора DL- α -токоферола ацетата или DL- α -токоферол, в соответствии с положениями подпункта 2.5.6.1.3 или 2.5.6.2.3, добавляют около 10 мг 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола (ВНТ) в

растворе (см. примечание из подпункта 2.3.10.1), раствор хранится в холодильнике (срок хранения не превышает четыре недели).

2.7.5. 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (ВНТ) может быть заменен гидрохиноном.

2.7.6. При использовании колонны с нормальной фазой возможно разделение токоферолов α , β , γ и δ .

2.7.7. Раствор натрия аскорбата можно заменить приблизительно 150 мг аскорбиновой кислоты.

2.7.8. Раствор сульфида натрия можно заменить приблизительно 50 мг ЭДТА.

2.7.9. Ацетат витамина Е быстро гидролизует в щелочной среде, следовательно, очень чувствителен к окислению, особенно при наличии таких микроэлементов, как железо или медь. Определение витамина Е в премиксе на уровне более 5000 мг/кг может привести к деградации витамина Е. Таким образом, для подтверждения рекомендован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который включает в себя формулу для ферментного растворения витамина Е в отсутствие фазы щелочного омыления.

2.8. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать 15% по отношению к более высокому результату.

III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ЖЕЛЕЗА, МЕДИ, МАРГАНЦА И ЦИНКА

3.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определять микроэлементы железа, меди, марганца и цинка в корме. Пределы квантификации составляют для:

железа (Fe): 20 мг/кг;

меди (Cu): 10 мг/кг;

марганца (Mn): 20 мг/кг;

цинка (Zn): 20 мг/кг.

3.2. Принцип применения

Образец помещается в раствор соляной кислоты после уничтожения органического вещества, если таковые имеются. Определяются элементы железа, меди, марганца и цинка после соответствующего разбавления методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

3.3. Применяемые реагенты

Для приготовления реагентов и аналитических растворов используется вода, свободная от катионов, которые будут определены, полученная либо двойной перегонкой в стеклянном боросиликатном или кварцевом аквадистилляторе или двойной обработкой ионообменной смолой.

Реагенты должны быть подходящими для аналитической оценки. Отсутствие элемента, который следует определить, проверяется контрольным тестом. Если необходимо, очищение реагентов должно быть продолжено.

3.3.1. Соляная кислота (d: 1,19 г/мл).

3.3.2. Соляная кислота (6 моль/л).

3.3.3. Соляная кислота (0,5 моль/л).

3.3.4. Фтористоводородная кислота 38-40% (объем/объем), содержащая железо (Fe) менее 1 мг/л и остаток после испарения менее 10 мг (в виде сульфата)/л.

3.3.5. Серная кислота (d: 1,84 г/мл).

3.3.6. Перекись водорода [около 100 объемов кислорода (30% по массе)].

3.3.7. Стандартный раствор железа (1000 $\mu\text{g Fe/ml}$), подготовленный в соответствии с положениями, указанными в подпункте 3.3.7.1, или эквивалентный раствор, использованный в торговле: растворяют 1 г железной проволоки в 200 мл соляной кислоты 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2), добавляют 16 мл перекиси водорода и доводят до одного литра водой.

3.3.7.1. Стандартный рабочий раствор железа (100 $\mu\text{g Fe/ml}$), подготовленный путем разбавления одной части стандартного раствора 9 частями воды.

3.3.8. Стандартный рабочий раствор меди (Cu 1000 $\mu\text{g/ml}$), подготовленный согласно описаниям из подпункта 3.3.8.1, или эквивалентный раствор, используемый в торговле: растворяют 1 г медного порошка в 25 мл соляной кислоты 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2), добавляя 5 мл перекиси водорода и доводя до одного литра водой.

3.3.8.1. Стандартный рабочий раствор меди (Cu 10 $\mu\text{g/ml}$), подготовленный путем разбавления одной части стандартного раствора (см. примечание из подпункта 3.3.8) 9 частями воды, и затем разбавляя часть полученного раствора с 9 частями воды.

3.3.9. Стандартный раствор марганца (1000 $\mu\text{g Mn/ml}$), подготовленный в соответствии с положениями, указанными в подпункте 3.3.9.1, или эквивалентный раствор, используемый в торговле: растворяют 1 г марганцевой пыли в 25 мл соляной кислоты 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2) и доводят до одного литра водой.

3.3.9.1. Стандартный рабочий раствор марганца (Mn 10 $\mu\text{g/ml}$), подготовленный путем разбавления одной части стандартного раствора 9 частями воды и затем разбавляя часть полученного раствора с 9 частями воды.

3.3.10. Стандартный раствор цинка (1000 $\mu\text{g Zn/ml}$), подготовленный согласно указаниям, описанным в подпункте 3.3.10.1, или эквивалентный раствор, используемый в торговле: растворяют 1 г цинка в виде полоски или листка в 25 мл соляной кислоты 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2) и доводят до одного литра водой.

3.3.10.1. Стандартный рабочий раствор цинка (10 $\mu\text{g Zn/ml}$), подготовленный путем разбавления одной части стандартного раствора 9 частями воды, а затем разбавления части полученного раствора с 9 частями воды.

3.3.11. Раствор хлоридного лантана: растворяют 12 г оксида лантана в 150 мл воды, добавляют 100 мл соляной кислоты 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2) и доводят до одного литра водой.

3.4. Измерительные приборы

3.4.1. Муфельная печь с регулируемой температурой и, желательно, с записывающим устройством.

3.4.2. Стекло должно быть боросиликатное, прочное и рекомендуется использование оборудования, предназначенного исключительно для определения олигоэлементов.

3.4.3. Спектрофотометр для атомного поглощения, который отвечает требованиям чувствительности и точности в необходимом диапазоне.

3.5. Процедура подготовки

Важно, чтобы при измерении микроэлементов учитывался риск загрязнения, в частности, цинком, медью и железом. Поэтому оборудование, используемое при подготовке образцов, не должно содержать эти металлы.

Для снижения общего риска загрязнения работают в среде, не содержащей пыли, используется очень осторожно чистое оборудование и тщательно вымытая посуда. Определение цинка является особенно чувствительным ко многим типам загрязнений, например, через посуду, реактивы, пыль и т.д.

Вес образца, который предстоит кальцинировать, вытекает из приблизительного количества микроэлементов в кормах, в зависимости от чувствительности используемого спектрофотометра. Для некоторых видов кормов, бедных микроэлементами, может быть необходимо начать с образца 10-20 г и дополнить окончательный раствор до 100 мл.

Сжигание должно осуществляться в закрытой печи без введения воздуха или кислорода.

Температура, показываемая пирометром, не должна превышать 475°C.

3.5.1. Образец, содержащий органическое вещество

3.5.1.1. Сжигание и приготовление раствора для анализа

3.5.1.1.1. Соблюдая положения пункта 3.5 вводят 5-10 г взвешенной пробы с точностью до 0,2 мг в кварцевый или платиновый тигель, сушат в духовке при температуре 105°C и вводят тигель в ненагретую муфельную печь. Закрывают печь и постепенно повышают температуру до 450-475°C в течение примерно 90 минут. Поддерживают эту температуру в течение 4-16 часов (например, ночью), чтобы удалить углеродистый материал, а затем открывают духовку и дают ему остыть.

Увлажняют золу водой и переносят полученное вещество в 250 мл лабораторный стакан. Промывают тигель общим количеством около 5 мл соляной кислоты (см. примечание из подпункта 3.3.1), добавляя ее медленно и аккуратно в лабораторный стакан (может быть сильная реакция в связи с образованием CO₂). Добавляют соляную кислоту (см. примечание из подпункта 3.3.1) капля за каплей, перемешивая, пока кипение не прекратится. Испаряется до полного высыхания, захватывая его время от времени стеклянной палочкой.

Затем добавляют 15 мл соляной кислоты 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2) к остатку и около 120 мл воды. Смешивают стеклянной палочкой, которая оставляется в лабораторном стакане, и прикрывают стакан часовым стеклом. Доводят медленно до кипения и оставляют до точки кипения пока пепел полностью не растворится. Фильтруют беззольной фильтровальной бумагой и собирают фильтрат в 250 мл мерную колбу. Промывают лабораторный стакан и фильтруют 5 мл горячей соляной кислотой 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2) и дважды кипятком. Наполняют мерную колбу водой до метки (концентрация HCl: около 0,5 моль/л).

3.5.1.1.2. Если остаток из фильтра черный (уголь), вновь помещается в печь и кальцинируется снова при 450-475°C.

Кальцинирование, которое требует только несколько часов (3-5 часа), считается завершенным, когда пепел становится белым или почти белым.

Остаток растворяется с приблизительно 2 мл соляной кислоты, в соответствии с положениями подпункта 3.3.1, подвергается испарению до высушивания и добавляется 5 мл соляной кислоты 6 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.2). Нагревают, фильтруют раствор в мерную колбу и заливают водой до отметки (концентрация HCl: приблизительно 0,5 моль/л).

3.5.1.2. Спектрофотометрическое определение

3.5.1.2.1. Подготовка калибровочных растворов

Для каждого из элементов, которые будут определены, подготавливается рабочий стандартный раствор, описанный в подпунктах 3.3.7.1, 3.3.8.1, 3.3.9.1 и 3.3.10.1 ряда калибровочных растворов, каждый калибровочный раствор, имеющий концентрацию HCl, составляющую около 0,5 моль/л и (для железа, марганца и цинка) концентрацию хлоридного лантана, равнозначную 0,1% (вес/объем).

Концентрации отдельных микроэлементов должны быть в пределах чувствительности используемого спектрофотометра. В таблицах 3, 4, 5 и 6 представлены композиции типичных наборов калибровочных растворов.

Таблица 3

Концентрация железа

Единица измерения	Указанные значения						
	0	0,5	1	2	3	4	5
µг Fe/мл	0	0,5	1	2	3	4	5
мл рабочего стандартного раствора (см. примечание из подпункта 3.3.7.1) (1 мл = 100 µг железа)	0	0,5	1	2	3	4	5
мл HCl (см. примечание из подпункта 1.3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 мл раствора хлорида лантана (описанного в подпункте 3.3.11) и доводят до 100 мл водой							

Таблица 4

Концентрация меди

Единица измерения	Указанные значения						
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
µг Cu/мл	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
мл рабочего стандартного раствора (см. примечание из подпункта 3.3.8.1) (1 мл = 10 µг меди)	0	1	2	4	6	8	10
мл HCl (см. примечание из подпункта 1.3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Таблица 5

Концентрация марганца

Единица измерения	Указанные значения						
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
µг Mn/мл	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
мл рабочего стандартного раствора (см. примечание из подпункта 3.3.9.1) (1 мл = 10 µг Mn)	0	1	2	4	6	8	10
мл HCl (см. примечание из подпункта 1.3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 мл раствора хлорида лантана (описанного в подпункте 3.3.11) и доводят до 100 мл водой							

Таблица 6

Концентрация цинка

Единица измерения	Указанные значения						
µг Zn/мл	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
мл рабочего стандартного раствора (см. примечание из подпункта 3.3.10.1) (1 мл = 10 µг Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
мл HCl (см. примечание из подпункта 1.3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 мл раствора хлорида лантана (описанного в подпункте 3.3.11) и доводят до 100 мл водой							

3.5.1.2.2. Приготовление раствора для анализа

Для определения меди раствор, приготовленный согласно подпункту 3.5.1.1, обычно можно использовать напрямую. При необходимости получения концентрации в пределах калибровочных растворов, аликвотную часть можно перенести в 100 мл мерную колбу и заполнить до отметки соляной кислотой 0,5 моль/л (см. примечание из подпункта 3.3.3).

Для определения железа, марганца и цинка можно перенести аликвотную часть из раствора, приготовленного в подпункте 3.5.1.1 в 100 мл мерную колбу, добавить 10 мл раствора хлорида лантана и заполнить до отметки соляной кислотой 0,5 моль/л, указанной в подпункте 3.3.3 (см. также подпункт 3.8 настоящего приложения).

3.5.1.2.3. Контрольный тест

Контрольный тест должен включать в себя все действия, описанные в процедуре подготовки, за исключением случаев, когда образец материала пропущен. Калибровочный раствор "0" не должен использоваться в качестве контрольного.

3.5.1.2.4. Измерение атомного поглощения

Измеряется атомное поглощение калибровочного раствора и раствора, подлежащего анализу с помощью окислительно-воздушного пламени ацетилен на следующих длинах волн:

Fe: 248,3 нм

C: 324,8 нм

M: 279,5 нм

Zn: 213,8 нм.

Каждое измерение производится четыре раза.

3.5.2. Минеральные корма

Если образец не содержит органических веществ, предварительное кальцинирование не является необходимым. Действуют согласно описаниям из подпункта 3.5.1.1.1. Испарение с фтористоводородной кислотой может быть пропущено.

3.6. Расчет результатов

С помощью калибровочной кривой подсчитывается концентрация микроэлементов в растворе, подлежащем анализу, и результат выражается в мг микроэлементов на кг пробы (ppm).

3.7. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце тем же лаборантом, не должна превышать:

- a) 5 мг/кг в абсолютной величине, при содержании данных микроэлементов до 50 мг/кг;
- b) 10 мг/кг в верхнем указании, при содержании данных микроэлементов от 50 до 100 мг/кг;
- c) 10 мг/кг, в абсолютной величине, при содержании данных микроэлементов от 100 до 200 мг/кг;
- d) 5%, в верхнем указании, при содержании данных микроэлементов свыше 200 мг/кг.

3.8. Комментарии

Наличие большого количества фосфатов может влиять на определение железа, марганца и цинка. Такая интерференция должна корректироваться путем добавления раствора хлоридного лантана. Однако если в образце соотношение веса $Ca + Mg/P > 2$, добавление раствора хлорида лантана в анализируемый раствор и калибровочный раствор можно пропустить.

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГАЛОФУГИНОНА

DL-транс-7-бром-6-хлор-3-[3-(3-гидрокси-2-пиперидинил)ацетонил]- киназолин-4-3H)-он-гидробромид

4.1. Цель и область применения

Метод позволяет определить содержание галофугинона в корме. Предел квантификации составляет 1 мг/кг.

4.2. Принцип применения

После обработки горячей водой галофугинон извлекается в виде свободного основания в этилацетате, а затем отделяется в виде гидрохлорида в водном растворе кислоты. Экстракт очищают ионообменной хроматографией. Содержание галофугинона определяется высокоэффективной жидкостной хроматографией с обращенной фазой (RP-HPLC), с использованием УФ-детектора.

4.3. Применяемые реагенты

4.3.1. Ацетонитрил ВЭЖХ качества.

4.3.2. Смола Amberlite XAD-2.

4.3.3. Ацетат аммония.

4.3.4. Этилацетат.

4.3.5. Ледяная уксусная кислота.

4.3.6. Стандартный раствор галофугинона (DL-транс-7-бром-6-хлор-3-[3-(3-гидрокси-2-пиперидинил)ацетонил]-киназолин-4-3H)-он-гидробромид, E 764)

4.3.6.1. Стандартный остаточный раствор галофугинона, 100 мкг/мл

Взвешивают, с точностью до 0,1 мг, 50 мг галофугинона в 500 мл мерной колбе, растворяют в аммиачном буферном растворе уксусной кислоты, заполняют до знака буферным раствором и перемешивают. Этот раствор является стабильным в течение трех недель при 5°C, при хранении в темном месте.

4.3.6.2. Калибровочный раствор

Переводят 1, 2, 3, 4 и 6 мл из рабочего стандартного остаточного раствора в ряд 100 мл градуированных колб. Заполняют до метки подвижной фазой (см. примечание из подпункта 4.3.21) и перемешивают. Растворы имеют концентрацию, составляющую 1, 2, 3,

4 и 6 мг/мл галофугинона. Эти растворы приготавливают непосредственно перед использованием.

4.3.7. Соляная кислота (ρ_{20} около 1,16 г/мл).

4.3.8. Метанол.

4.3.9. Нитрат серебра.

4.3.10. Натрий аскорбат.

4.3.11. Карбонат натрия.

4.3.12. Хлорид натрия.

4.3.13. ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль).

4.3.14. Вода ВЭЖХ качества.

4.3.15. Раствор карбоната натрия, $c = 10$ г/100 мл.

4.3.16. Раствор карбоната натрия, насыщенный хлоридом натрия, $c = 5$ г/100 мл

Растворяют 50 г карбоната натрия в воде, разбавляют на 1 л и добавляют раствор хлорида натрия до полного насыщения.

4.3.17. Соляная кислота, примерно 0,1 моль/л

Разбавляют 10 мл соляной кислоты в воде до 1 литра.

4.3.18. Буферный раствор ацетата аммония, 0,25 моль/л

Растворяют 19,3 г ацетата аммония и 30 мл ледяной уксусной кислоты в воде ВЭЖХ качества и разбавляют до 1 л.

4.3.19. Подготовка смолы Amberlite XAD-2

Промывают водой соответствующее количество Amberlite до удаления всех ионов хлорида, как показывает анализ нитратом серебра, в соответствии с положениями подпункта 4.3.20, проводимый на выведенной водяной фазе. Затем промывают смолу с 50 мл метанола, удаляют метанол и хранят смолу в свежем метаноле.

4.3.20. Раствор нитрата серебра, 0,1 моль/л

Растворяют 0,17 г нитрата серебра в 10 мл воды.

4.3.21. ВЭЖХ с подвижной фазой

Смешивают 500 мл ацетонитрила качества ВЭЖХ с 300 мл буферным раствором ацетатного аммония и 1200 мл воды ВЭЖХ качества. Корректируется значение pH до 4,3 с использованием ледяной уксусной кислоты. Пропускают через фильтр, состоящий из 0,22 μm (см. примечание из подпункта 4.4.8) и подвергают раствор сухой перегонке (например, ультразвуком в течение 10 минут). Этот раствор является стабильным в течение одного месяца, при хранении в закрытой посуде в темном месте.

4.4. Измерительные приборы

4.4.1. Ультразвуковая ванна.

4.4.2. Роторный испаритель с записывающим устройством.

4.4.3. Центрифуга.

4.4.4. ВЭЖХ оборудование с УФ-детектором с переменной длиной волны или детектор с диодной матрицей

4.4.4.1. Жидкая хроматографическая колонка, 300 мм \times 4 мм, C_{18} 10 μm частицы или эквивалентная колонна.

4.4.5. Стеклопластиковая колонка (300 мм \times 10 мм), оснащенная стеклянным фильтром и закрывающимся краном.

4.4.6. Стекловолоконный фильтр диаметром 150 мм.

4.4.7. Мембранный фильтр 0,45 мм.

4.4.8. Мембранный фильтр 0,22 мм.

4.5. Процедура подготовки

Галофугинон в виде свободного основания нестабилен в щелочном растворе или этилацетате. Он не должен оставаться в этилацетате более 30 минут.

4.5.1. Общие принципы

4.5.1.1. Рассматриваются контрольные корма, чтобы убедиться в отсутствии галофугинона и интерферентных веществ.

4.5.1.2. Выполняется тест для восстановления путем анализа контрольного корма, который был обогащен путем добавления количества галофугинона, подобного тому, который присутствует в образце. Для получения концентрации, состоящей из 3 мг/кг, добавляют 300 μ л из стандартного остаточного раствора к 10 г контрольного корма, перемешивают и оставляют на 10 минут перед началом экстракции, в соответствии с положениями, указанными в подпункте 4.5.2.

Согласно этому методу, контрольный корм по типу аналогичен образцу, а при анализе галофугинон не выявлен.

4.5.2. Процедура экстракции

Взвешивают, с точностью до 0,1 г, 10 г подготовленного образца в 200 мл центрифужную пробирку, добавляют 0,5 г натрия аскорбата, 0,5 г ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты, соли натрия) и 20 мл воды, затем перемешивают. Помещают колбу в водяную баню на 5 мин (80°C). После охлаждения при комнатной температуре добавляют 20 мл раствора карбоната натрия и перемешивают. Добавляют тотчас 100 мл этилацетата и сильно взбалтывают вручную в течение 15 секунд. Затем колбу помещают в ультразвуковую ванну на 3 минуты и ослабляют пробку. Центрифугируют в течение 2 минут и отстаивают этиловую фазу ацетата через фильтр из стекловолокна в 500 мл делительную воронку. Повторяют экстракцию образца со вторым количеством, составляющим 100 мл этилацетата. Промывают объединенные экстракты в течение 1 минуты с 50 мл насыщенного карбоната натрия и хлорида натрия и удаляют водяной слой.

Экстрагируют органический слой в течение 1 минуты с 50 мл соляной кислоты. Нижний слой кислоты проходит через 250 мл делительную воронку. Заново экстрагируют органический слой в течение 1,5 мин с другим количеством 50 мл соляной кислоты, а затем соединяют с первым экстрактом. Промывают объединенные экстракты кислотой круговым встряхиванием в течение 10 секунд с 10 мл этилацетата.

Количественно переводят водяной слой в 250 мл круглодонную колбу и отклоняют органическую фазу. Из кислого раствора испаряется весь остаток этилового ацетата, с использованием роторного испарителя с записывающим устройством.

Температура ванны не должна превышать 40°C. Под давлением, составляющим 25 мбар, все остаточное количество этилового ацетата отделяют в течение 5 минут при температуре 38°C.

4.5.3. Очистка

4.5.3.1. Подготовка колонки Amberlite

Для каждого экстрактного образца подготавливают по данной колонке XAD-2. Перемещают 10 г подготовленного Amberlite в стеклянную колонку с метанолом. Вставляют маленькую ватную пробку над смоловой подушкой. Сливают метанол из колонки и промывают смолу с 100 мл воды, останавливая поток по мере поступления жидкости в верхнюю часть смоловой подушки. Оставляют колонку для уравнивания в течение 10 минут перед использованием. Никогда не оставляют колонку для просушки.

4.5.3.2. Очистка образца

Переводится количество экстракта, полученного в соответствии с положениями подпункта 4.5.2, в верхнюю часть подготовленной колонки Amberlite и элюируют, затем удаляется элюат. Процент разбавления не должен превышать 20 мл/мин. Промывается круглодонная колба 20 мл соляной кислоты, а затем она используется для мытья смоловой колонки. Продуваются оставшиеся следы кислотного раствора потоком воздуха. Удаляют промывочную жидкость. Добавляют 100 мл метанола в колонну и разбавляют 5-10 мл; собирают элюат в круглодонную колбу на 250 мл. Оставляют остаток метанола в течение 10 минут для уравнивания со смолой и продолжают элюирование, пока процент разбавления не превысит 20 мл/мин, собирая элюат в ту же круглодонную колбу. Метанол выпаривается на роторном испарителе с записывающим устройством; температура водяной бани не должна превышать 40°C. Количество остатка переводится в 10 мл мерную колбу, с использованием ВЭЖХ подвижной фазой. Заполняют до метки подвижной фазой и перемешивают. Фильтруют аликвотную часть через мембранный фильтр.

Этот раствор хранится для определения с помощью ВЭЖХ (см. примечание из подпункта 4.5.4).

4.5.4. Определение с помощью ВЭЖХ

4.5.4.1. Допустимые параметры

Условия, указанные в таблице 7, предлагаются в качестве руководства: могут применяться и другие условия, если они дают эквивалентные результаты.

Таблица 7

ВЭЖХ условия

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колонна	300 мм × 4 мм, C ₁₈ , 10 мкм или эквивалентные частицы
Мобильная фаза	Смесь, описанная в подпункте 1.3.21
Поток	1,5 – 2 мл/мин
Определение длины волны	243 нм
Объем инъекции	40 – 100 мкл.

Стабильность хроматографической системы проверяется путем введения несколько раз калибровочного раствора, содержащего 3 мкг/мл, до получения высоты (площади) кончиков и постоянного времени удержания.

4.5.4.2. Калибровочная кривая

Вводят каждый калибровочный раствор по несколько раз и определяют высоту (площадь) пиков для каждой концентрации. Рисунок калибровочную кривую, используя высоты (площади) пиков средних калибровочных растворов, как ординаты и соответствующую концентрацию в мкг/мл, как абсциссы.

4.5.4.3. Растворный образец

Вводят образец экстракта (см. примечание подпункта 4.5.3.2) несколько раз, используя тот же объем, который используется для калибровки раствора и определяются высоты (площади) пиков, средних для пиков галофугинона.

4.6. Расчет результатов

Концентрация растворного образца в $\mu\text{г}/\text{мл}$ определяется, начиная со средней высоты (площади) пиков галофугинона анализируемого раствора со ссылкой на калибровочную кривую.

Содержание галофугинона w ($\text{мг}/\text{кг}$) образца определяется следующим образом:

$$w = c \times 10/m,$$

где:

c = концентрация галофугинона растворного образца в $\text{мг}/\text{мл}$;

m = вес пробы в граммах.

4.7. Проверка результатов

4.7.1. Идентификация

Идентификация аналита может быть подтверждена кохроматографией или с использованием детектора группы диодов, с которым сравнивается спектр извлечения образца при калибровке раствора, содержащий $6 \mu\text{г}/\text{мл}$.

4.7.1.1. Кохроматография

Образец экстракта обогащен путем добавления соответствующего количества калибровочного раствора. Количество добавленного галофугинона должно быть идентично предполагаемому количеству галофугинона, обнаруженного в пробе экстракта.

Принимая во внимание количество добавленного, а также разбавленного экстракта, увеличивается только пик галофугинона. Ширина конечников на половине максимальной высоты должна быть в пределах $\pm 10\%$ от исходной ширины.

4.7.1.2. Обнаружения с помощью группы диодов

Результаты оцениваются по следующим критериям:

а) длина волны максимального поглощения образца и стандартных спектров, зарегистрированная на максимальном пике хроматограммы, не должна быть одинаковой в пределах маржи, установленной силой разрешения системы обнаружения. Для диодно-матричного обнаружения она составляет порядка $\pm 2 \text{ нм}$;

б) между 225 и 300 нм стандартные образцы и спектры, зарегистрированные на максимальном пике хроматограммы, не должны отличаться для частей спектра, расположенных между 10 и 100% из относительной абсорбции. Этот показатель считается выполненным при наличии того же максимального уровня и если отклонение между двумя спектрами не превышает в любой обнаруженной точке 15% от поглощения стандартного аналита;

с) между 225 и 300 нм спектры восходящей кривой максимального уровня и пика восходящей кривой, созданного экстрактом образца, не должны отличаться для частей спектра, расположенных между 10 и 100% из относительной абсорбции. Этот показатель считается выполненным при наличии того же максимального уровня и если отклонение между двумя спектрами не превышает в любой обнаруженной точке 15% от поглощения спектра максимальной точки.

Если один из этих критериев не выполняется, наличие аналита не подтверждается.

4.7.2. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать $0,5 \text{ мг}/\text{кг}$ на содержание галофугинона до $3 \text{ мг}/\text{кг}$.

4.7.3. Процедура восстановления

Для обогащенного контрольного образца восстановление составляет менее 80%.

V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РОБЕНИДИНА

Гидрохлорид 1,3-бис [(4-хлорбензилиден) амино] гуанидина

5.1. Цель и область применения

Метод позволяет определить робенидин в корме. Предел квантификации составляет 5 мг/кг.

5.2. Принцип применения

Образец извлекается подкисленным метанолом. Экстракт сушат и одна аликвотная часть очищается в колонне, состоящей из оксида алюминия. Робенидин промывается из колонки с метанолом, накапливается и заливается до соответствующего объема с подвижной фазой. Содержание робенидина определяется высокоэффективной жидкостной хроматографией с обращенной фазой (RP-ВЭЖХ), с использованием УФ-детектора.

5.3. Применяемые реагенты

5.3.1. Метанол.

5.3.2. Подкисленный метанол

Перемещают 4 мл соляной кислоты ($\rho_{20} = 1,18$ г/мл) в 500 мл мерную колбу, заполняют до нужного объема метанолом и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

5.3.3. Ацетонитрил ВЭЖХ-качества.

5.3.4. Молекулярное сито

Тип 3А, 8-12 узлов сетки (узлы от 1,6 до 2,5 мм, кристаллический алюмосиликат, диаметр пор составляет 0,3 мм).

5.3.5. Оксид алюминия, деятельность кислоты, уровень I для колоночной хроматографии

Перемещают 100 г оксида алюминия в подходящую емкость и добавляют 2 мл воды. Закрывают и встряхивают в течение 20 минут. Хранят в плотно закрытой таре.

5.3.6. Раствор дигидрофосфата калия, $c = 0,025$ моль/л

Растворяют 3,4 г дигидрофосфата калия в воде (ВЭЖХ-качества) в мерной колбе на 1000 мл, дополняют до нужного уровня и перемешивают.

5.3.7. Кислотный динатрийфосфатный раствор, $c = 0,025$ моль/л

Растворяют 3,55 г безводной динатрийфосфатной кислоты (4,45 г дегидрата или 8,95 г додекагидрата) в воде (ВЭЖХ качества) в 1 л мерной колбе, доводят до метки и перемешивают.

5.3.8. ВЭЖХ подвижной фазы

Смешиваются следующие реагенты:

650 мл ацетонитрила, ВЭЖХ качества;

250 мл воды (ВЭЖХ качества);

50 мл калия дигидрофосфата;

50 мл кислого раствора фосфата динатрия.

Пропускают через фильтр 0,22 μm (см. примечание из подпункта 5.4.6) и подвергают раствор дегазации (например, ультразвуковым способом в течение 10 минут).

5.3.9. Стандартное вещество

Чистый робенидин: гидрохлорид 1,3-бис [(4-хлорбензилиден) амино] гуанидина.

5.3.9.1. Стандартный остаточный раствор робенидина: 300 $\mu\text{g/ml}$

Взвешивают, с точностью до 0,1 мг, 30 мг чистого стандартного вещества робенидина. Растворяют в подкисленном метаноле в 100 мл мерной колбе, заполняют до метки тем же растворителем и перемешивают. Обертывают колбу алюминиевой фольгой и хранят в темном месте.

5.3.9.2. Стандартный промежуточный раствор робенидина: 12 мкг/мл

Перемещают 10 мл стандартного остаточного раствора в 250 мл мерную колбу, заполняют до объема подвижной фазы ВЭЖХ и перемешивают. Обертывают колбу алюминиевой фольгой и хранят в темном месте.

5.3.9.3. Калибровочный раствор

Переносят 5, 10, 15, 20 и 25 мл стандартного промежуточного раствора в серию мерных флаконов по 50 мл.

Заполняют до объема подвижной фазы ВЭЖХ и перемешивают. Этот раствор соответствует концентрации 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 и 6 мкг/мл робенидина. Растворы готовят непосредственно перед употреблением.

5.3.10. Вода качества ВЭЖХ.

5.4. Измерительные приборы

5.4.1. Стеклоаналитическая колонка

Изготовлена из коричневого стекла, оснащена краном и резервуаром емкостью около 150 мл, диаметр 10-15 мм, длина 250 мм.

5.4.2. Механический или магнитный шейкер.

5.4.3. Роторный испаритель с записывающим устройством.

5.4.4. ВЭЖХ оборудование с УФ-детектором с переменной длиной волны или диодно-матричным детектором, работающим в диапазоне 250-400 нм

5.4.4.1. Жидкая хроматографическая колонка, 300 мм × 4 мм, C₁₈, 10 мкм частицы или эквивалентная колонна.

5.4.5. Бумажный фильтр из стекловолокна (Ватман GF/или эквивалент).

5.4.6. Мембранный фильтр, 0,22 мкм.

5.4.7. Мембранный фильтр, 0,45 мкм.

5.5. Процедура подготовки

Робенидин чувствителен к свету. Для всех операций с использованием коричневого стекла.

5.5.1. Общие принципы

5.5.1.1. Рассматриваются контрольные корма, чтобы убедиться в отсутствии робенидина и интерферентных веществ.

5.5.1.2. Выполняется тест для восстановления путем анализа контрольного корма, который был обогащен путем добавления количества робенидина, подобного тому, который присутствует в образце. Для получения концентрации 60 мкг/кг перемещают 3 мл из стандартного остаточного раствора в 250 мл колбу Эрленмейера. Раствор испаряется примерно до 0,5 мл потоком азота. Добавляют 15 г контрольного корма, перемешивают и ждут 10 минут до начала этапа по экстракции, в соответствии с положениями подпункта 5.5.2.

Для этого метода контрольный корм аналогичен по типу образцу, а при анализе робенидин не выявляется.

5.5.2. Процедура экстракции

Взвешивают, с точностью до 0,01 г, около 15 г образца препарата. Перемещают в 250 мл колбу Эрленмейера и добавляют 100 мл подкисленного метанола, закрывают пробкой и

встряхивают в течение 1 часа в шейкере. Фильтруют раствор через бумажный фильтр из стекловолокна и собирают весь фильтрат в 150 мл колбе Эрленмейера. Добавляют 7,5 г молекулярного сита, закрывают пробкой и встряхивают в течение 5 минут. Фильтруют сразу через бумажный фильтр из стекловолокна. Хранят этот раствор для стадии очистки (см. примечание из подпункта 5.5.3).

5.5.3. Процедура очистки

5.5.3.1. Подготовка колонки окиси алюминия

Вставляют небольшой тампон ваты в нижнюю часть стекла колонки и толкают с помощью стеклянной палочки. Взвешивают 11 г подготовленной окиси алюминия и перемещают в колонку. На этом этапе важно, чтобы воздействие воздуха было сведено к минимуму. Слегка ударяют загруженную колонку на нижнем конце, чтобы позволить урегулировать окись алюминия.

5.5.3.2. Очистка образца

Перемещают в колонку пипеткой 5 мл экстракта подготовленного образца в соответствии с положениями, указанными в подпункте 5.5.2. Кончик пипетки поддерживают вблизи стенки колонки, чтобы раствор мог быть поглощен оксидом алюминия. Робенидин разбавляют из колонки, используя 100 мл метанола, со скоростью 2-3 мл/мин. и собирают раствор в круглодонную колбу на 250 мл. Выпаривают раствор метанола до высушивания при пониженном давлении до 40°C с помощью роторного испарителя с записывающим устройством. Повторно растворяют остаток в 3-4 мл мобильной фазой ВЭЖХ и перемещают количественно в мерную колбу объемом 10 мл. Промывают колбу несколько раз количеством 1-2 мл подвижной фазы и перемещают разбавленную жидкость в мерную колбу. Заполняют до объема тем же растворителем и перемешивают. Фильтруют аликвотную часть через мембранный фильтр 0,45 мкм. Этот раствор хранят для определения с помощью ВЭЖХ.

5.5.4. Определение с помощью ВЭЖХ

5.5.4.1. Допустимые параметры

Условия, указанные в таблице 8, предлагаются в качестве руководства. Могут применяться и другие условия, если они дают эквивалентные результаты.

Таблица 8

ВЭЖХ условия

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колонна	300 мм × 4 мм, C ₁₈ , 10 мкм или эквивалентные частицы
Мобильная фаза	Смесь, описанная в подпункте 5.3.8
Поток	1,5-2 мл/мин
Длина волны определения	317 нм
Объем инъекции	20-50 мкл.

Стабильность хроматографической системы проверяется путем введения несколько раз калибровочного раствора, содержащего 3,6 мкг/мл, до получения высоты (площади) кончиков и постоянного времени удержания.

5.5.4.2. Калибровочная кривая

Вводят каждый калибровочный раствор по несколько раз и определяют высоту (площадь) пиков для каждой концентрации. Рисуют калибровочную кривую, используя высоту (площадь) пиков средних калибровочных растворов, как ординаты и соответствующей концентрации в мкг/мл как абсциссы.

5.5.4.3. Растворный образец

Вводят несколько раз образец экстракта, полученный в соответствии с положениями подпункта 5.5.3.2, используя тот же объем, как в случае калибровочных растворов и определяют среднюю высоту (площадь) пиков для кончиков робенидина.

5.6. Расчет результатов

Из средней высоты (площади) кончиков робенидина из растворного образца определяется концентрация в мкг/мл растворного образца со ссылкой на калибровочную кривую.

Содержание робенидина в (мг/кг) в образце определяется следующей формулой:

$$W = c \times 200/m,$$

где:

c = концентрация робенидина из растворного образца в мкг/мл;

m = вес пробы в граммах.

5.7. Проверка результатов

5.7.1. Идентификация

Идентификация аналита может быть подтверждена кохроматографией или с использованием детектора группы диодов, с которым сравнивается спектр извлеченного образца при калибровке раствора, содержащего 6 мкг/мл.

5.7.1.1. Кохроматография

Образец экстракта обогащен путем добавления соответствующего количества калибровочного раствора.

Количество добавленного робенидина должно быть идентично предполагаемому количеству робенидина, обнаруженного в пробе экстракта.

Только высота кончиков робенидина увеличивается с учетом добавленного количества, а также разбавленного экстракта. Ширина кончиков на половине максимальной высоты должна находиться в пределах $\pm 10\%$ от исходной ширины.

5.7.1.2. Обнаружения с помощью группы диодов

Результаты оцениваются по следующим критериям:

а) длина волны максимального поглощения образца и стандартных спектров, зарегистрированная на максимальном пике хроматограммы, должна быть одинаковой в пределах маржи, установленной силой разрешения системы обнаружения. Для диодно-матричного обнаружения составляет порядка ± 2 нм;

б) между 225 и 400 нм стандартные образцы и спектры, зарегистрированные на максимальном пике хроматограммы, не должны отличаться для частей спектра, расположенных между 10 и 100% относительной абсорбции. Этот показатель считается выполненным при наличии того же максимального уровня и когда отклонение между двумя

спектрами не превышает в любой обнаруженной точке 15% от поглощения стандартного аналита;

с) между 225 и 400 нм спектры восходящей кривой, максимального уровня и пика восходящей кривой, созданные экстрактом образца, не должны отличаться для частей спектра, расположенных между 10 и 100% относительной абсорбции. Этот показатель считается выполненным при наличии того же максимального уровня и когда отклонение между двумя спектрами не превышает в любой обнаруженной точке 15% от поглощения спектра максимальной точки.

Если один из этих критериев не выполняется, наличие аналита не подтверждается.

5.7.2. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать 10% наибольшего значения на содержание робенидина, превышающего 15 мг/кг.

5.7.3. Процедура восстановления

Для обогащенного контрольного образца восстановление составляет менее 85%.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДИКЛАЗУРИЛА

(+)-4-хлорфенил [2,6-дихлор-4-(2,3,4,5-тетрагидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2-ил) фенил]-ацетонитрила

6.1. Цель и область применения

Метод позволяет определить содержание диклазурила в кормах и премиксах. Предел обнаружения составляет 0,1 мг/кг, а предел квантификации составляет 0,5 мг/кг.

6.2. Принцип применения

После добавления внутреннего стандарта образец экстрагируют подкисленным метанолом. Для кормов часть аликвотного экстракта очищена картриджем C₁₈ для твердофазной экстракции. Диклазурил вымывается из картриджа подкисленным метанолом и водой. После выпаривания остаток растворяют в смеси DMF/вода. Для премиксов экстракт выпаривается, а остаток растворяют в смеси DMF/вода. Содержание диклазурила определяется высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с тройным градиентом и обратной фазой с использованием УФ-детектора.

6.3. Применяемые реагенты

6.3.1. Вода качества ВЭЖХ.

6.3.2. Ацетат аммония.

6.3.3. Тетрабутиламония водорода сульфат (TBHS).

6.3.4. Ацетонитрил качества ВЭЖХ.

6.3.5. Метанол, ВЭЖХ качества.

6.3.6. N,N-диметилформамид (DMF).

6.3.7. Соляная кислота, ρ₂₀ = 1,19 г / мл.

6.3.8. Калибратор: диклазурил П-24: (+)-4-хлорфенил [2,6 дихлор-4-(2,3,4,5-тетрагидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2-ил) фенил] ацетонитрила с гарантированной чистотой, E771

6.3.8.1. Стандартный остаточный раствор диклазурила, 500 µг/мл

Взвешивают, с точностью до 0,1 мг, 25 мг стандартного вещества диклазурила в 50 мл мерной колбе.

Растворяют в N,N-диметилформамиде (DMF), доводят до объема N,N-диметилформамидом (DMF) и перемешивают. Обертывают колбу алюминиевой фольгой и хранят в холодильнике. При температуре $\leq 4^{\circ}\text{C}$ раствор устойчив в течение одного месяца.

6.3.8.2. Стандартный раствор диклазурила: 50 μg / мл

Перемещают 5 мл стандартного остаточного раствора диклазурила в 50 мл мерной колбе, доводят до объема N,N-диметилформамидом (DMF) и перемешивают. Обертывают колбу алюминиевой фольгой или используют колбу из коричневого стекла и хранят в холодильнике. При температуре $\leq 4^{\circ}\text{C}$ раствор устойчив в течение одного месяца.

6.3.9. Внутреннее стандартное вещество: 2,6 дихлор- α -(4-хлорфенил) -4- [4,5-дигидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2 (3H)-ил]- α -метилбен-зен-ацетонитрил

6.3.9.1. Стандартный остаточный внутренний раствор диклазурила, 500 μg / мл

Взвешивают, с точностью до 0,1 мг, 25 мг внутреннего стандарта вещества в 50 мл мерной колбе. Растворяют в N,N-диметилформамиде (DMF), доводят до объема N,N-диметилформамидом (DMF) и перемешивают. Обертывают колбу алюминиевой фольгой или используют колбу из коричневого стекла и хранят в холодильнике. При температуре $\leq 4^{\circ}\text{C}$ раствор устойчив в течение одного месяца.

6.3.9.2. Стандартный внутренний раствор, 50 μg /мл

Перемещают 5 мл из стандартного остаточного внутреннего раствора (см. примечание из подпункта 6.3.9.1) в 50 мл мерную колбу, доводят до объема N,N-диметилформамидом (DMF) и перемешивают. Обертывают колбу алюминиевой фольгой или используют колбу из коричневого стекла и хранят в холодильнике. При температуре $\leq 4^{\circ}\text{C}$ раствор устойчив в течение одного месяца.

6.3.9.3. Стандартный внутренний раствор для премиксов, р/1 000 мг/мл

(P = номинальное содержание в премикс диклазурила в мг/кг)

Взвешивают, с точностью до 0,1 мг, стандартное внутреннее вещество р/10 мг в 100 мл мерной колбе, растворяют в N,N-диметилформамиде (DMF), с использованием ультразвуковой ванны, согласно положениям подпункта 6.4.6, доводят до объема N,N-диметилформамидом (DMF) и перемешивают. Обертывают колбу алюминиевой фольгой или используют колбу из коричневого стекла и хранят в холодильнике. При температуре $\leq 4^{\circ}\text{C}$ раствор устойчив в течение одного месяца.

6.3.10. Калибровочный раствор, 2 мг/мл

Вводят 2 мл стандартного диклазурила (см. примечание из подпункта 6.3.8.2) и 2 мл стандартного внутреннего образца, указанного в подпункте 6.3.9.2, в 50 мл мерную колбу. Добавляют 16 мл N,N-диметилформамида (DMF), заливают до объема водой и перемешивают. Раствор следует готовить непосредственно перед употреблением.

6.3.11. Картридж C_{18} для твердофазной экстракции, например Bond Elut, размер: 1 куб.см, вес абсорбента: 100 мг.

6.3.12. Жидкостная экстракция: подкисленный метанол

Вводят 5 мл соляной кислоты в 1000 мл метанола, ВЭЖХ качества и перемешивают.

6.3.13. Подвижная фаза для жидкостной хроматографии

6.3.13.1. Разбавитель А: ацетат аммония – раствор сульфата тетрабутиламмония водорода.

Растворяют 5 г ацетата аммония и 3,4 г сульфата тетрабутиламмония водорода (TBHS) в 1000 мл воды ВЭЖХ качества и перемешивают.

6.3.13.2. Разбавитель В: ацетонитрил ВЭЖХ качества.

6.3.13.3. Разбавитель С: метанол ВЭЖХ качества.

6.4. Измерительные приборы

6.4.1. Механический шейкер.

6.4.2. Трехступенчатое оборудование ВЭЖХ

6.4.2.1. Жидкая хроматографическая колонка, Hypersil ODS, 3 μm частицы, 100 мм \times 4,6 мм или эквивалентные.

6.4.2.2. УФ-детектор с регулировкой длины волны или детекторная группа диодов.

6.4.3. Роторный испаритель с записывающим устройством.

6.4.4. Мембранные фильтры, 0,45 μm .

6.4.5. Вакуумный распределитель.

6.4.6. Ультразвуковая ванна.

6.5. Процедура подготовки

6.5.1. Общие принципы

6.5.1.1. Контрольный корм

Анализируется контрольный корм в целях проверки отсутствия диклазурила и интерферентных веществ. Контрольный корм похож, как тип, на образец, а при анализе не выявляется диклазурил и интерферентные вещества.

6.5.1.2. Тест по восстановлению

Осуществляется тест по восстановлению с помощью анализа контрольного корма, обогащенного путем добавления количества диклазурила, подобного представленному в образце. Для получения концентрации 1 мг/кг добавляют 0,1 мл из стандартного остаточного раствора, согласно положениям подпункта 6.3.8.1, к 50 г контрольного корма, хорошо перемешивают и оставляют на 10 минут, с повторным перемешиванием несколько раз, прежде чем продолжить (см. приложение из подпункта 6.5.2).

При недоступности контрольного корма, подобного образцу (см. приложения, описанные в подпункте 6.5.1.1), альтернативой может быть стандартный метод стандартного дополнения. В этом случае анализируемый образец обогащается путем добавления количества диклазурила, подобного присутствующему в образце. Этот образец анализируется с небогащенным образцом, а восстановление может быть рассчитано путем вычитания.

6.5.2. Процедура по экстракции

6.5.2.1. Корма

Взвешивают, с точностью до 0,01 г, примерно 50 г образца. Переводят в 500 мл колбу Эрленмейера, добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта (см. подпункт 6.3.9.2), 200 мл из растворителя для экстракции и закрывают флакон. Взбалтывают смесь в механическом шейкере в течение ночи. Оставляют для отстаивания в течение 10 минут. Переводят аликвотную часть, состоящую из 20 мл, из супернатанта в подходящую стеклянную тару и разбавляют в 20 мл воды.

Переводят этот раствор в картридж для экстракции, указанный в подпункте 6.3.11, и проводят через него путем применения вакуума (см. подпункт 6.4.5). Промывают картридж 25 мл смесью растворителя для экстракции: подкисленный метанол и вода, 65 + 35 (V + V). Удаляют собранные фракции и растворяют соединения при помощи 25 мл смеси растворителя для экстракции воды, 80 + 20 (V + V). Эта часть выпаривается до высушивания роторного испарителя при 60°C. Растворяют остаток в 1 мл N,N-диметилформамида (DMF), добавляют 1,5 мл воды ВЭЖХ качества и перемешивают. Фильтруют с помощью мембранного фильтра. Продолжают определением ВЭЖХ согласно положениям подпункта 6.5.3.

6.5.2.2. Премиксы

Взвешивают, с точностью до 0001 г, около 1 г пробы. Переводят в 500 мл колбу Эрленмейера, добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта (см. подпункт 6.3.9.3) и 200 мл из растворителя для экстракции и закрывают флакон. Взбалтывают смесь в механическом шейкере в течение ночи. Оставляют для отстаивания в течение 10 минут. Переводят аликвотную часть, состоящую из 10000/ρ мл (ρ = номинальное содержание в премиксе диклазурила в мг/кг), из супернатанта в круглодонную колбу подходящего размера. Смесь испаряется до высушивания при пониженном давлении и при 60°C, с использованием роторного испарителя. Растворяют повторно остаток в 1 мл N,N-диметилформамида (DMF), добавляют 1,5 мл воды ВЭЖХ качества и перемешивают. Продолжают определением ВЭЖХ, согласно положениям подпункта 6.5.3.

6.5.3. Определение с помощью ВЭЖХ

6.5.3.1. Допустимые параметры

Условия, указанные в таблице 9, предлагаются в качестве руководства. Могут применяться и другие условия, если они дают эквивалентные результаты.

Таблица 9

ВЭЖХ условия

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колонка	Hypersil ODS, 3 μм частицы, 100 мм × 4,6 мм или эквивалентные
Мобильная фаза	Разбавитель А: водный раствор ацетата аммония и сульфатного тетрабутиламмонного водорода; Разбавитель В: ацетонитрил, ВЭЖХ качества; Разбавитель С: метанол, ВЭЖХ качества
Способ разбавления	Одноступенчатое разбавление; Исходные условия: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V); Через 10 минут, ступенчатое разбавление в течение 30 мин: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Промывают с В в течение 10 минут
Поток	1,5-2 мл/мин
Инъекционный объем	20 μл
Длина волны определения	280 нм

Проверяется стабильность хроматографической системы при вливании несколькими порциями калибровочного раствора, содержащего 2 μг/мл, до достижения пиковых значений и постоянных сроков выдержки.

6.5.3.2. Калибровочный раствор

Вводят 20 μл калибровочного раствора несколько раз и определяют среднюю высоту (площадь) кончиков диклазурила и пиков внутреннего стандарта.

6.5.3.3. Растворный образец

Вводят 20 мл растворной пробы, полученной в соответствии с положениями подпункта 6.5.2.1 или 6.5.2.2, несколько раз и определяют среднюю высоту (площадь) кончиков диклазурила и пиков внутреннего стандарта.

6.6. Расчет результатов

6.6.1. Корма

Содержание в диклазуриле w (в мг/кг) образца определяется по следующей формуле:

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

где:

$h_{d,s}$ = высота (площадь) кончиков диклазурила из растворного образца, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.5.2.1;

$h_{i,s}$ = высота (площадь) пика внутреннего образца из растворного образца, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.5.2.1;

$h_{d,c}$ = высота (площадь) кончиков диклазурила из калибровочного раствора, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.3.10;

$h_{i,c}$ = высота (площадь) пика внутреннего образца из калибровочного раствора, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.3.10;

$c_{d,c}$ = концентрация диклазурила в калибровочном растворе в $\mu\text{г/мл}$ (см. примечание из подпункта 6.3.10);

m = вес тестируемой части, г;

V = объем экстракционной пробы в соответствии с положениями, указанными в подпункте 6.5.2.1 (то есть 2,5 мл).

6.6.2. Премиксы

Содержание в диклазуриле w (в мг/кг) образца определяется по следующей формуле:

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

где:

$h_{d,s}$ = высота (площадь) кончиков диклазурила из образца раствора, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.5.2.1;

$h_{i,s}$ = высота (площадь) пика внутреннего образца из растворного образца, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.5.2.1;

$h_{d,c}$ = высота (площадь) кончиков диклазурила из калибровочного раствора, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.3.10;

$h_{i,c}$ = высота (площадь) пика внутреннего образца из калибровочного раствора, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.3.10;

$c_{d,c}$ = концентрация диклазурила в калибровочном растворе в $\mu\text{г/мл}$ (см. примечание из подпункта 6.3.10);

m = вес пробы в г;

V = объем экстракционной пробы в соответствии с положениями, указанными в подпункте 6.5.2.1 (то есть 25 мл);

p = номинальное содержание диклазурила в премиксе в мг/кг.

6.7. Проверка результатов

6.7.1. Идентификация

Идентификация аналита может быть подтверждена кохроматографией или путем использования детектора группы диодов, который позволяет сравнение спектров извлеченного образца, полученного согласно положениям, описанным в подпунктах 6.5.2.1. и 6.5.2.2., и калибровочного раствора, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.3.10.

6.7.1.1. Кохроматография

Образец экстракта, полученный согласно положениям, описанным в подпунктах 6.5.2.1. и 6.5.2.2., обогащен путем добавления соответствующего количества калибровочного раствора, подготовленного в соответствии с положениями подпункта 6.3.10. Количество добавленного диклазурила должно быть идентично предполагаемому количеству диклазурила, обнаруженного в пробе экстракта.

Только высота кончиков диклазурила и пика внутреннего образца увеличивается с учетом добавленного количества, а также разбавленного экстракта. Ширина конечников на половине максимальной высоты должна быть в пределах $\pm 10\%$ от исходной ширины наконечников диклазурила или наконечников внутреннего образца извлеченного необогащенного образца.

6.7.1.2. Обнаружения с помощью группы диодов

Результаты оцениваются по следующим критериям:

а) длина волны максимального поглощения образца и стандартных спектров, зарегистрированная на максимальном пике хроматограммы, должна быть одинаковой в пределах маржи, установленной силой разрешения системы обнаружения. Для диодно-матричного обнаружения составляет порядка ± 2 нм;

б) между 230 и 320 нм стандартные образцы и спектры, зарегистрированные на максимальном пике хроматограммы, не должны отличаться для частей спектра, расположенных в пределах от 10 до 100% относительной абсорбции. Этот показатель считается выполненным при наличии того же максимального уровня и если отклонение между двумя спектрами не превышает в любой обнаруженной точке 15% от поглощения стандартного аналита;

с) между 230 и 320 нм спектры восходящей кривой максимального уровня и пика восходящей кривой, порожденные экстрактом образца, не должны отличаться для частей спектра, расположенных в пределах от 10 до 100% относительной абсорбции. Этот показатель считается выполненным при наличии того же максимального уровня и если отклонение между двумя спектрами не превышает в любой обнаруженной точке 15% от поглощенного спектра на максимальном пике хроматограммы.

Если один из этих критериев не выполняется, наличие аналита не подтверждается.

6.7.2. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать:

а) 30% от наибольшего значения на содержание диклазурила, расположенного в пределах 0,5 и 2,5 мг/кг;

б) 0,75 мг/кг на содержание диклазурила, расположенного в пределах 2,5 и 5 мг/кг;

с) 15% из наибольшего значения на содержание диклазурила, превышающего 5 мг/кг.

6.7.3. Процедура восстановления

Для обогащенного контрольного образца восстановление составляет менее 80%.

6.8. Комментарии

Предварительно должно показываться, что реакция диклазурила линейна в диапазоне измеряемых концентраций.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛАСОЛОЦИДА НАТРИЯ

Натриевая соль полиэфирной монокарбоновой кислоты, произведенная Streptomyces lasaliensis

7.1. Цель и область применения

Метод позволяет определить содержание ласолоцида натрия в корме и премиксах. Предел обнаружения составляет 5 мг/кг, а количественный предел составляет 10 мг/кг.

7.2. Принцип применения

Ласолоцид натрия извлекают из образца подкисленным и дозированным метанолом с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) с помощью спектрофлуориметрического детектора.

7.3. Применяемые реагенты

7.3.1. Дигидрофосфат калия (K_2HPO_4).

7.3.2. Ортофосфорная кислота, г (г/г) = 85%.

7.3.3. Раствор ортофосфорной кислоты, с = 20%.

Растворяют 23,5 мл ортофосфорной кислоты в 100 мл воды.

7.3.4. 6-метил-2-гептиламин (1,5-диметилгексиламин), г (г/г) = 99%.

7.3.5. Метанол ВЭЖХ качества.

7.3.6. Соляная кислота, плотность 1,19 г/мл.

7.3.7. Фосфатный буферный раствор, с = 0,01 моль/л

Растворяют 1,36 г дигидрофосфата калия (K_2HPO_4) в 500 мл воды ВЭЖХ качества, добавляют 3,5 мл ортофосфорной кислоты и 10 мл 6-метил-2-гептиламина. Подгоняют рН до 4 с помощью ортофосфорной кислоты и разбавляют водой ВЭЖХ качества, заполняя его до 1000 мл.

7.3.8. Подкисленный метанол

Переводят 5 мл соляной кислоты в 1000 мл мерную колбу, заполняют до метки метанолом ВЭЖХ качества и перемешивают. Раствор следует готовить непосредственно перед употреблением.

7.3.9. ВЭЖХ подвижная фаза, буферный раствор фосфата и метанола 5 + 95 (V + V)

Смешивают 5 мл фосфатного буферного раствора с 95 мл метанола.

7.3.10. Стандартное вещество ласолоцида натрия с гарантированной чистотой, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (натриевая соль полиэфирной монокарбоновой кислоты, произведенная *Streptomyces lasaliensis*), E 763

7.3.10.1. Стандартный остаточный раствор ласолоцида натрия, 500 $\mu\text{g}/\text{мл}$

Взвешивают, с точностью до 0,1 мг, 50 мг ласолоцида натрия, описанного в подпункте 7.3.10, в 100 мл мерную колбу, растворяют в подкисленном метаноле, заполняют до метки тем же растворителем и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

7.3.10.2. Стандартный промежуточный раствор ласолоцида натрия, 50 $\mu\text{g}/\text{мл}$

Вводят 10 мл из стандартного остаточного вещества (см. примечание из подпункта 7.3.10.1) в 100 мл мерную колбу, доводят до объема подкисленным метанолом и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

7.3.10.3. Калибровочный раствор

Переводят 1, 2, 4, 5 и 10 мл из рабочего стандартного промежуточного раствора в ряд 100 мл градуированных колб. Заполняют до метки подкисленным метанолом и перемешивают. Эти растворы соответствуют концентрациям 1, 2, 4, 5 и 10 мкг ласолоцида натрия на мл. Они приготавливаются непосредственно перед употреблением.

7.3.11. Вода ВЭЖХ качества.

7.4. Измерительные приборы

7.4.1. Ультразвуковая ванна (или водяная баня с перемешиванием) с регулирующей температурой

7.4.2. Мембранный фильтр, 0,45 мм

7.4.3. ВЭЖХ оборудование с впрыскивательной системой, что позволяет введение до 20 мл объема

7.4.3.1. Жидкая хроматографическая колонка 125 мм x 4 мм с обращенной фазой C₁₈, частицы 5 мкм или эквивалентные

7.4.3.2. Спектрофлуориметр с переменной поправкой длины волны раздражения и излучения

7.5. Процедура подготовки

7.5.1. Общие принципы

7.5.1.1. Контрольный корм

Для осуществления восстановительного анализа (см. примечание из подпункта 7.5.1.2) рассматривают контрольный корм для проверки отсутствия ласолоцида натрия и интерферентных веществ. Контрольный корм похож по типу на образец и при анализе не выявляется ласолоцид натрия и интерферентные вещества.

7.5.1.2. Тест по восстановлению

Осуществляется тест по восстановлению с помощью анализа контрольного корма, обогащенного путем добавления количества ласолоцида натрия, подобного представленному в образце. Для получения концентрации 100 мг/кг добавляют 10 мл из стандартного остаточного раствора (см. положения из подпункта 7.3.10.1) в 250 мл колбу Эрленмейера и испаряют раствор примерно до 0,5 мл. Добавляют 50 г контрольного корма, хорошо перемешивают и оставляют на 10 минут, повторно перемешивая по нескольку раз, прежде чем перейти к этапу экстракции, согласно положениям подпункта 7.5.2.

При недоступности контрольного корма, подобного образцу (см. положения, описанные в подпункте 7.5.1.1), альтернативно может быть осуществлен стандартный метод стандартного дополнения. В этом случае анализируемый образец обогащен путем добавления количества ласолоцида натрия, подобного представленному в образце. Этот образец анализируется с небогащенным образцом, а восстановление может быть рассчитано путем вычитания.

7.5.2. Процедура по экстракции

7.5.2.1. Корма

Взвешивают, с точностью до 0,01 г, от 5 до 10 г образца в 250 мл колбе Эрленмейера.

Добавляют 100 мл подкисленного метанола. Аккуратно закрывают и встряхивают круговыми движениями для рассеивания.

Флаконт помещают в ультразвуковую ванну приблизительно при 40°C на 20 минут, достают и оставляют остыть при комнатной температуре. Отстаивают в течение часа до оседания взвешенных веществ, затем процеживают аликвотную часть через 0,45 мм мембранный фильтр в подходящую емкость. Продолжают путем определения с помощью ВЭЖХ, согласно положениям подпункта 7.5.3.

7.5.2.2. Премиксы

Взвешивают, с точностью до 0001 г, 2 г неизмельченного премикса в 250 мл мерной колбе. Добавляют 100 мл подкисленного метанола и перемешивают путем кругового вращения в горизонтальной плоскости для разделения. Помещают колбу и ее содержимое в ультразвуковую ванну приблизительно при 40°C на 20 минут, затем достают и оставляют остыть при комнатной температуре. Заполняют до отметки подкисленным метанолом и хорошо перемешивают. Оставляют около часа до сцеживания веществ в суспензии, затем фильтруют аликвотную часть через мембранный фильтр 0,45 мкм. Разбавляют соответствующий объем прозрачного фильтрата с подкисленным метанолом для получения конечного раствора для исследования, содержащего около 4 мг/мл ласалоцида натрия. Продолжают путем определения с помощью ВЭЖХ, согласно положениям подпункта 7.5.3.

7.5.3. Определение с помощью ВЭЖХ

6.5.3.1. Допустимые параметры

Условия, указанные в таблице 9, предлагаются в качестве руководства. Могут применяться и другие условия, если они дают эквивалентные результаты.

Таблица 10

ВЭЖХ условия

Измерительная техника	Указанные значения
Жидкая хроматографическая колона	125 мм × 4 мм, обратная фаза C ₁₈ , 5 мкм или эквивалентные частицы
Мобильная фаза	Смесь фосфатно-буферного раствора, полученная в соответствии с положениями подпункта 7.3.7 и метанола, 5 + 95 (V + V)
Поток	1-2 мл/мин
Объем инъекции	20 мкл.
Длина волны определения	раздражение: 310 нм излучение: 419 нм.

Проверяется стабильность хроматографической системы при вливании по несколько раз калибровочного раствора, содержащего 4 мкг/мл, до достижения пиковых значений и постоянных сроков выдержки.

7.5.3.2. Калибровочный раствор

Вводят каждый калибровочный раствор по несколько раз и определяют среднюю высоту (площадь) пиков для каждой концентрации. Рисуют калибровочную кривую, используя высоту (площадь) пиков средних калибровочных растворов как ординаты и соответствующие концентрации в мкг/мл как абсциссы.

7.5.3.3. Растворный образец

Вводят несколько раз образец экстракта, полученный в соответствии с положениями подпунктов 7.5.2.1 и 7.5.2.2, используя объем, аналогичный удержанному калибровочному раствору, и определяют среднюю высоту (площадь) пиков для пиков ласалоцида натрия.

7.6. Расчет результатов

Начиная со средней высоты (площади) пиков растворного образца определяется концентрация ласалоцида натрия ($\mu\text{г}/\text{мл}$) со ссылкой на калибровочную кривую.

7.6.1. Корма

Содержание ласалоцида натрия w (в $\text{мг}/\text{кг}$) в образце определяется по следующей формуле:

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

где:

c = концентрация ласалоцида натрия в растворном образце, подготовленном в соответствии с положениями подпункта 7.5.2.1, в $\mu\text{г}/\text{мл}$;

V_1 = объем экстрактной пробы в соответствии с положениями, описанными в подпункте 7.5.2.1, в мл (например, 100);

m = вес исследуемой пробы, в г .

7.6.2. Премиксы

Содержание ласалоцида натрия w (в $\text{мг} / \text{кг}$) в образце определяется по следующей формуле:

$$w = c \times V_2 \times f/m [\text{mg/kg}],$$

где:

c = концентрация ласалоцида натрия в растворном образце, подготовленном в соответствии с положениями подпункта 7.5.2.2, в $\mu\text{г}/\text{мл}$;

V_2 = объем экстрактной пробы в соответствии с положениями, описанными в подпункте 7.5.2.2, в мл (например, 250);

f = коэффициент разбавления (см. примечание из подпункта 7.5.2.2);

m = вес исследуемой пробы, в г

7.7. Проверка результатов

7.7.1. Идентификация

Методы, основанные на спектрофлуорометрии, менее подвержены интерференциям, чем те, которые используют УФ-детектор. Идентификация аналита может быть подтверждена кохроматографией.

7.7.1.1. Кохроматография

Образец экстракта, полученный согласно положениям подпункта 7.5.2.1. или 7.5.2.2., обогащен путем добавления соответствующего количества калибровочного раствора. Количество добавленного ласалоцида натрия должно быть идентично предполагаемому количеству ласалоцида натрия, обнаруженного в экстрактной пробе. Только высота соответствующего пика ласалоцида натрия увеличивается с учетом добавленного количества ласалоцида натрия, а также разбавленного экстракта. Ширина конечников на половине максимальной высоты должна находиться в пределах $\pm 10\%$ от исходной ширины конечников, полученных из извлеченного необогащенного образца.

7.7.2. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать:

а) 15% наибольшего значения для содержания ласалоцида натрия, расположенного в пределах 0,5 и 2,5 $\text{мг}/\text{кг}$;

b) 15 мг/кг для содержания ласолоцида натрия, расположенного в пределах 2,5 и 5 мг/кг;

c) 7,5% наибольшего значения на содержание ласолоцида натрия, превышающего 200 мг/кг.

7.7.3. Процедура восстановления

Для обогащенного контрольного образца восстановление составляет не менее 80%. Для образцов обогащенных премиксов восстановление составляет не менее 90%.

[анеха nr.5](#)

Приложение № 5
к Постановлению Правительства
№ 686 от 13 сентября 2012 г.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА **по контролю нежелательных веществ в корме**

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО И ОБЩЕГО ГОССИПОЛА

1.1. Цель и область применения

Этот метод позволяет определить уровень свободного госсипола, общего госсипола и родственных ему химических веществ из семян хлопчатника, муки из семян хлопчатника и брикетов семян хлопчатника и комбикорма, содержащих это сырье, когда свободный госсипол, общий госсипол и химические вещества, связанные с ним, присутствуют в концентрации, превышающей 20 мг/кг.

1.2. Принцип применения

Госсипол добывается в присутствии 3-аминопропан-1-ола либо с помощью смеси пропан-2-ола и гексана, для определения свободного госсипола или диметилформамида, для определения общего госсипола. Госсипол преобразуется с помощью анилина в госсипол-дианилин, оптическую плотность которого измеряют при длине волны 440 нм.

1.3. Применяемые реагенты

1.3.1. Смесь пропан-2-ола-гексана: смешивают 60 объемных частей пропан-2-ола 40 с объемными частями н-гексана.

1.3.2. Растворитель А: вводят в 1 л мерную колбу 500 мл пропан-2-ола-гексана, 2 мл 3-аминопропан-1-ола, 8 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл воды. Довести до объема смесью пропан-2-ола-гексана. Этот реагент стабилен в течение одной недели.

1.3.3. Растворитель В: вводят 2 мл 3-аминопропан-1-ола и 10 мл ледяной уксусной кислоты в мерную колбу объемом 100 мл.

Охлаждают при комнатной температуре и доводят до объема N,N-диметилформамидом. Этот реагент стабилен в течение одной недели.

1.3.4. Анилин: если оптическая плотность контрольной пробы превышает 0,022, анилин дистиллируется над цинковой пылью, с удалением первых и последних долей 10% дистиллята. Охлажденный в холодильнике и сохраненный в сосуде из коричневого стекла с пробкой, этот реагент сохраняется в течение нескольких месяцев.

1.3.5. Стандартный раствор госсипола А: помещают 27,9 мг ацетатного госсипола в 250 мл мерную колбу. Растворяют и доводят до нужного объема растворителем А. Вводят

50 мл этого раствора в 250 мл мерную колбу и доводят до объема растворителем А. Концентрация госсипола этого раствора составляет 0,02 мг/мл. Перед использованием оставляют в течение часа при комнатной температуре.

1.3.6. Стандартный раствор госсипола В: вводят 27,9 мг ацетатного госсипола в 50 мл мерную колбу, растворяют и доводят до нужного объема с помощью растворителя В. Концентрация госсипола из данного раствора составляет 0,5 мг/мл.

Стандартные растворы госсипола А и В остаются стабильными в течение 24 часов, если они защищены от воздействия света.

1.4. Измерительные приборы

1.4.1. Смеситель (шейкер): около 35 об/мин.

1.4.2. Спектрофотометр.

1.5. Процедура подготовки

1.5.1. Исследуемый образец

Количество используемого исследуемого образца зависит от предполагаемого содержания госсипола в образце. Желательно работать с небольшим образцом и относительно большой аликвотной частью фильтрата, чтобы получить достаточно госсипола для точного фотометрического измерения. Для определения свободного госсипола в семенах хлопчатника, муки семян хлопчатника и брикетов семян хлопчатника, исследуемый образец не превышает 1 г. Для комбикормов он может составлять не более 5 г. 10 мл аликвотная часть фильтрата достаточна в большинстве случаев; она содержит от 50 до 100 мкг госсипола. Для определения общего госсипола исследуемый образец составляет от 0,5 до 5 г, для того, чтобы 2 мл аликвотная часть фильтрата содержала от 40 до 200 мкг госсипола.

Анализ осуществляется при комнатной температуре около 20°C.

1.5.2. Определение свободного госсипола

Помещают исследуемый образец в колбу на 250 мл, дно колбы должно быть покрыто дробленным стеклом. С помощью пипетки добавляют 50 мл растворителя А, закрывают пробкой колбу и перемешивают в течение одного часа в смесителе. Фильтруют через сухой фильтр и собирают фильтрат в небольшую колбу со шлифованным горлышком. В процессе фильтрации покрывают воронку часовым стеклом.

Вводят одинаковые аликвотные части фильтрата, содержащие 50-100 мкг госсипола в каждой из двух 25 мл (А и В) колб. При необходимости доводят объем до 10 мл растворителем А. Затем содержимое колбы (А) дополняют до объема смесью пропан-2-ол-гексана. Этот раствор используется в качестве ориентировочного раствора, по которому можно измерить растворный образец.

Вводят 10 мл растворителя А в каждую из двух других 25 мл мерных колб (С и D). Содержимое колбы (С) доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана. Этот раствор будет использоваться в качестве ориентировочного раствора, по которому можно измерить исследуемое контрольное вещество.

Добавляют 2 мл анилина в каждую из колб (D) и (B). Нагревают в течение 30 минут на кипящей водяной бане до появления цвета. Охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа.

Определяют оптическую плотность контрольного исследуемого вещества (D) в сравнении с ориентировочным раствором (С), а также оптическую плотность исследуемого раствора (B) в сравнении с ориентировочным раствором (А), спектрофотометром при 440 нм с использованием стеклянных клеток 1 см.

Вычитают оптическую плотность контрольного вещества из исследуемого раствора (= исправленная оптическая плотность). Из этого значения рассчитывают содержание свободного госсипола, как описано в пункте 1.6.

1.5.3. Определение общего госсипола

Помещают исследуемый образец, содержащий 1-5 мг госсипола, в 50 мл мерную колбу и добавляют 10 мл растворителя В. В это же время подготавливают контрольный образец, помещая 10 мл растворителя В в другую 50 мл мерную колбу. Нагревают обе колбы в течение 30 минут на кипящей водяной бане. Охлаждают при комнатной температуре и содержимое каждой колбы доводят до объема с помощью смеси пропан-2-ол-гексана. Стабилизируют и оставляют оседать в течение 10-15 минут, затем фильтруют и собирают фильтраты в колбах со шлифованным горлышком.

Вводят 2 мл фильтрата образца в каждую из двух 25 мл колб и 2 мл фильтрата контрольного теста в каждую из двух других 25 мл колб. Дополняют содержимое одной колбы из каждой серии до 25 мл пропан-2-ол-гексаном. Эти растворы используются в качестве ориентировочных растворов.

Добавляют 2 мл анилина в каждую из двух других колб. Нагревают в течение 30 минут на кипящей водяной бане до появления цвета. Охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема 25 мл смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа.

Определяют оптическую плотность в соответствии с указаниями из подпункта 1.5.2 для свободного госсипола. Из этого значения рассчитывают содержание общего госсипола, как указано в пункте 1.6.

1.6. Расчет результатов

Результаты могут быть пересчитаны на основании удельной оптической плотности (см. примечание из подпункта 1.6.1), либо ссылаясь на калибровочную кривую, в соответствии с положениями, описанными в подпункте 1.6.2.

1.6.1. С помощью удельной оптической плотности

Удельной оптической плотностью, как описано выше, являются:

Свободный госсипол $E \times 1\%/1 \text{ см} = 625$

Общий госсипол $E \times 1\%/1 \text{ см} = 600$

Содержание свободного и общего госсипола в образце рассчитывается по следующей формуле:

$$\% \text{ госсипола: } E \times 1250 / E^{1\%}_{1 \text{ см}} \times p \times a,$$

где:

E = скорректированная оптическая плотность, определенная согласно указаниям подпункта 1.5.2;

p = исследуемый образец, в г;

a = аликвотная часть фильтрата, в мл.

1.6.2. С помощью калибровочной кривой

1.6.2.1. Свободный госсипол

Подготавливают две серии из пяти 25 мл градуированных колб. Титруется 2, 4, 6, 8 и 10 мл стандартного раствора госсипола А в каждой серии колб. Доводят до объема 10 мл растворителем А. Заполняют каждую серию с 25 мл мерной колбой, содержащей только 10 мл растворителя (контрольный тест).

Доводят до 25 мл объем колб из первой серии (в том числе колбу контрольного теста) смесью пропан-2-ол-гексана (ориентировочные серии).

Добавляют 2 мл анилина в каждую колбу из второй серии (в том числе колбу контрольного образца). Нагревают в течение 30 минут в кипящей водяной бане до появления цвета. Охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа (стандартные серии).

Определяют, согласно указаниям из подпункта 1.5.2, оптическую плотность растворов из стандартных серий, в сравнении с соответствующими растворами из ориентировочных серий. Рисуют калибровочную кривую путем графического изображения оптической плотности в сравнении с количеством госсипола (в мкг).

1.6.2.2. Общий госсипол

Подготавливают шесть градуированных колб по 50 мл. В первую колбу вводится 10 мл растворителя В, в остальные по 2, 4, 6, 8 и 10 мл стандартного раствора госсипола В. Дополняют содержание каждой колбы до 10 мл растворителем В. Нагревают в течение 30 минут в кипящей водяной бане. Охлаждают при комнатной температуре, заполняют объем смесью пропан-2-ол-гексана и стабилизируют.

Помещают 2 мл этого раствора в каждую из двух серий, состоящих из шести колб, каждая по 25 мл. Дополняют содержимое колб из первой серии приблизительно 25 мл смеси пропан-2-ол-гексана (ориентировочные серии).

Добавляют 2 мл анилина в каждую колбу из второй серии. Нагревают в течение 30 минут в кипящей водяной бане. Охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа (стандартные серии).

Определяют, согласно указаниям из подпункта 1.5.2, оптическую плотность растворов из стандартных серий в сравнении с соответствующими растворами из ориентировочных серий. Рисуют калибровочную кривую путем графического изображения оптической плотности в сравнении с количеством госсипола (в мкг).

1.6.3. Повторяемость

Разница между результатами двух параллельных измерений, выполняемых на том же образце, не должна превышать:

15% в относительной величине, при содержании госсипола менее 500 частей;

75 частей на миллион в абсолютной величине, при содержании госсипола минимум 500 и максимум 750 частей на миллион;

10% в относительной величине до самого высокого значения при содержании госсипола более чем 750 частей.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ДИОКСИНА (ПХДД/ПХДФ) И УРОВНЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННОГО БИФЕНИЛА (ПХБ), СХОЖИХ С ДИОКСИНОМ

1. МЕТОДЫ ОТБОРА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

2.1. Цель и область применения

Пробы, предназначенные для официального контроля уровня диоксинов [полихлорированных дибензо-п-диоксин (ПХДД) и полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ)] и полихлорированных бифенилов (ПХБ), указанных в таблице 1 настоящего приложения, схожие с диоксином в кормах, отбираются в соответствии с указаниями приложения № 1. Необходимо применять количественные требования к контролю вещества

или продуктов, равномерно распределенных в корме, как указано в главе 3 раздела I приложения № 1. Коллективные образцы, полученные таким образом, считаются представительными для партий или подпартий, из которых они отбираются. Соблюдение максимальных уровней, установленных в Постановлении Правительства № 1405 от 10 декабря 2008 года, устанавливается на основании уровней, определенных в лабораторных образцах.

2.2. Соответствие партии или подпартии характеристикам

Партия допускается, если аналитический результат одного анализа не превышает максимальное содержание, установленное Постановлением Правительства № 1405 от 10 декабря 2008 года “Об утверждении Ветеринарно-санитарной нормы по гигиене кормов и содержанию нежелательных веществ в кормах”, с учетом погрешности измерения.

Партия не соответствует максимальному уровню, установленному в Постановлении Правительства № 1405 от 10 декабря 2008 года, если аналитический результат по максимальному пределу, подтвержденный параллельным исследованием, превышает с допустимой степенью достоверности максимальное содержание, с учетом погрешности измерения.

Таблица 1

Таблица токсичных равнозначных факторов, TEF (= toxic equivalency factors) для диоксинов, фуранов и диоксиноподобных соединений ПХД

Схожие (та же группа)	Значение TEF	Схожие (та же группа)	Значение TEF
Дибензо-п-диоксин (“PCDD”)		диоксиноподобные соединения ПХД	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-орто ПХБ	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001	Моно-орто ПХБ	
Дибензофураны (“ПХДФ”)		PCB 105	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,0005
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 118	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 123	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005

1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Примечание:

Использованные сокращения: Т = тетра; Ре = пента; Нх = гекса; Нр = гепта, О = окта, CDD = хлордibenзо-п-диоксин; CDF = хлордibenзофуран; СВ = хлорированные бифенилы.

Погрешность измерения можно рассчитать одним из двух способов:

а) подсчитывая расширенную погрешность при помощи коэффициента покрытия 2, который дает примерную достоверность 95%. Партия не считается соответствующей, если измеренное значение минус U больше максимального уровня.

В случае отдельного определения диоксинов и диоксиноподобных ПХБ определенная сумма расширенной погрешности отдельных аналитических результатов диоксина и диоксиноподобных ПХБ используется для суммы диоксинов и диоксиноподобных ПХБ;

б) установленный предел определения ($CC\alpha$) – уровень, при котором и от которого разрешается сделать вывод с вероятностью ошибки α , что образец не соответствует.

Предел определения устанавливается в соответствии с требованиями для идентификации или идентификации и квантификации определения.

Партия является несоответствующей, если измеренное значение равно или превышает $CC\alpha$.

II. ПОДГОТОВКА ПРОБ И ТРЕБОВАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАННЫМ МЕТОДАМ ПО АНАЛИЗУ ДЛЯ ОФИЦИАЛЬНОГО КОНТРОЛЯ УРОВНЯ ДИОКСИНОВ (ПХДД/ПХДФ) И ДИОКСИНОПОДОБНЫХ ПХБ

2.1. Цель и область применения

Эти требования применяются, когда корма и сырье для кормов исследованы для выявления диоксинов [полихлорированных дибензо-п-диоксин (ПХДД) и полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ)] и полихлорированных бифенилов (ПХБ).

Мониторинг присутствия диоксинов в кормах может быть достигнут посредством стратегии, предусматривающей утвержденный метод, в целях отбора тех же образцов с уровнем диоксинов и диоксиноподобных ПХБ, имеющих значения менее чем на 25% выше или ниже интересующего уровня. Концентрация диоксинов в образцах, в которых выявлен значительный уровень, определяется/подтверждается утвержденным методом.

Утвержденными методами являются методы, используемые для обнаружения присутствия диоксинов и диоксиноподобных ПХБ в концентрациях, представляющих интерес. Эти методы обладают высокой способностью к обработке образцов и используются для сортировки (по категориям) большого количества потенциально

положительных образцов. Предназначены специально для предотвращения ложных отрицательных результатов.

Утвержденными методами являются методы, которые предоставляют полную или дополнительную информацию, позволяющую обнаружение и достоверную квантификацию диоксинов и диоксиноподобных ПХБ в концентрациях, представляющих интерес.

2.2. Контекст

Учитывая, что экологические и биологические образцы (в том числе отбор проб из корма/сырья), как правило, содержат комплексное соединение смесей различных соединений диоксина, была разработана концепция “факторы токсической эквивалентности” (КТЭ) для содействия оценки рисков. Эти КТЭ были созданы для выражения концентрации смесей 2,3,7,8-замещенных ПХДД и ПХДФ и неорто ПХБ и моно-орто-замещенных хлором с аналогичной деятельностью диоксина в токсичных эквивалентах (ТЭ) 2, 3, 7, 8-ТХДД. Концентрации отдельных веществ в данном образце значения умножаются на ТEF, а затем суммируются для получения общей концентрации соединений диоксин-подобных ПХБ, выраженной в ТЭ.

Принятый специальный уровень квантификации для отдельных соединений является концентрацией аналита в пробе экстракта, производящей инструментальный ответ для двух различных ионов, которые должны быть рассмотрены на соотношение S/Z (сигнал/шум) как 3:1 для наименее чувствительного сигнала, и отвечает основным условиям, например таким, как время удержания и изотопное соотношение.

2.3. Требования по контролю за качеством, которые должны быть соблюдены при подготовке проб

Применяются общие положения по подготовке образцов для анализа, изложенных в приложении № 2 к настоящему Постановлению.

Также должны выполняться следующие требования:

а) образцы хранятся и транспортируются в сосудах из стекла, алюминия, полипропилена или полиэтилена. Из контейнеров, содержащих образцы, должны быть удалены остатки бумажной пыли. Посуда промывается с предварительно контролируруемыми растворителями для обнаружения диоксина;

б) осуществляется контрольный анализ путем проведения всей аналитической процедуры, с исключением только образца;

с) вес использованного для экстракции образца должен быть достаточным для выполнения требований относительно чувствительности.

2.4. Требования, примененные к назначенной (назначенным) лаборатории (лабораториям)

1) Лаборатория (лаборатории) должна доказать эффективность метода на уровне интересов, например, 0,5 x, 1x и 2x уровень интереса с приемлемым коэффициентом вариации при повторном анализе.

2) Уровень квантификации для подтверждающего метода должен находиться в пределах одной пятой от уровня интереса для гарантирования того, что на уровне заинтересованности будут выполнены приемлемые коэффициенты изменения.

3) Чтобы внутренние меры контроля качества были осуществлены должны регулярно проводиться контрольные исследования с зараженными образцами или анализ некоторых контрольных проб (сертифицированный ориентировочный материал).

4) Участие в межлабораторных исследованиях для определения постоянных диоксинов и диоксиноподобных ПХБ в структуре питания/корма.

5) Назначенные лаборатории для анализа проб, отобранных во время официального контроля, должны быть аккредитованы в соответствии с национальным стандартом МС ИСО/МЭК 17025 “Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий”.

2.5. Требования к аналитическим процедурам для диоксинов и диоксиноподобных ПХБ

Основные требования для принятия аналитических процедур:

1) Высокая чувствительность и низкий предел обнаружения. Для ПХДД и ПХДФ обнаруживаемые количества должны быть в пикограммах ТЭ (10-12 г), по причине крайней токсичности некоторых из этих соединений. Известно, что ПХБ находятся на более высоком уровне, чем ПХДД и ПХДФ. Для большинства ПХБ-подобных чувствительность разряда нанограмм (10⁻⁹ г) считается удовлетворительной. Тем не менее для измерения более токсичных диоксиноподобных ПХБ (в частности, неорто-замещенных того же вида) должна быть достигнута идентичная чувствительность, как и для ПХДД и ПХДФ.

2) Повышенная избирательность (специфичность). Следует различать ПХДД, ПХДФ и диоксиноподобные ПХБ в связи с множеством других выявленных соединений и возможных интерференций, присутствующих в концентрациях, до нескольких порядков значений, превышающих присутствующие в исследуемых анализах. Для методов газовой хроматографии/масс-спектрометрии (GC/MS) необходимо различие между различными соединениями, например, между токсичными соединениями (например, семнадцать ПХДД, ПХДФ, замещенные 2,3,7,8 и диоксиноподобными ПХБ) и другие. Биопробы должны позволить определение выборочных значений ТЕQ, как сумма ПХДД, ПХДФ и диоксиноподобных ПХБ.

3) Высокая тщательность (точность и достоверность). Необходимо, чтобы определение обеспечивало достоверную и надежную оценку действительной концентрации в образце. Высокая тщательность (точность измерений: степень приближения результатов измерений и действительных значений или присвоение значения измерения) необходима, чтобы избежать отклонения результатов анализа образцов ввиду уменьшенной надежности оценки ТЕQ. Тщательность выражается в точности (разница между средним значением измеряемой для аналита из сертифицированного материала и сертифицированного значения, выраженная в процентах от этой величины) и достоверности (RSDR, стандартное относительное отклонение рассчитывается на основании результатов, полученных в условиях воспроизводимости).

Методы отбора биопроб включают в себя и методы GC/MS; подтверждающие методы включают газовую хроматографию высокого разрешения/высокую разрешенную масс-спектрометрию (HRGC/HRMS).

Для общего значения ТЕQ должны соблюдаться следующие критерии, указанные в таблице 2 настоящего приложения:

Таблица 2

Общее значение ТЕQ

	Методы обнаружения	Подтверждающие методы
Ложные отрицательные темпы	< 1%	

Точность		-20% до +20%
Достоверность RSD _R	< 30%	< 15%

2.6. Специальные требования для GC/MS методов, которым необходимо следовать в целях скрининга или подтверждения

1) Добавление внутренних стандартов ПХДД/Ф 2,3,7,8-замещенных хлора и диоксиноподобных ПХБ, отмеченных ¹³C, необходимо осуществить в начале проведения метода анализа, например, в начале экстракции, для признания аналитической процедуры. Необходимо добавить не менее чем одно соединение для каждой группы, соответствующей тетра-окта-хлорированным ПХДД/Ф и не менее чем одно соединение для каждой из утвержденных групп диоксиноподобных ПХБ (альтернативно не менее чем одно соединение для каждого выбранного режима регистрирования выбранного иона методом масс-спектрометрии, использованным для мониторинга ПХДД/Ф и диоксиноподобных ПХБ).

Необходимо, чтобы существовало явное предпочтение, особенно для подтверждающих методов, для использования всех 17 внутренних стандартов ПХДД/Ф замещенных 2,3,7,8-хлор и отмеченных ¹³C, и всех 12 внутренних стандартов диоксиноподобных ПХБ, отмеченных ¹³C.

2) Определяются также относительные отвечающие факторы для тех соединений, в которые не добавляют ¹³C-меченных аналогов, используя соответствующие растворы для калибровки.

3) Для кормов растительного происхождения и кормов животного происхождения, содержащих менее 10% жира, обязательно добавление внутренних стандартов перед экстракцией. Для кормов животного происхождения, содержащих более 10% жира, внутренние стандарты могут быть добавлены либо перед экстракцией, либо после извлечения жира. Осуществляется соответствующий утвержденный метод проверки эффективности экстракции, в зависимости от стадии внедрения внутренних стандартов и способа указания результатов (в зависимости от продукта или жира).

4) Перед GC/MS анализом должны быть добавлены один или два восстановительных стандарта (суррогат).

5) Необходим восстановительный контроль. Для подтверждающих методов восстановление отдельных внутренних стандартов должно быть в пределах 60-120%. Утверждены и наименьшие или наибольшие восстановления для отдельных соединений, особенно для дибензодиоксинов и дибензофуранов гепта- и октахлорированных, до тех пор, пока их вклад в значение TEQ не превышает 10% от общего значения TEQ (основанное на сумме ПХДД/Ф и диоксиноподобных ПХБ). Для методов скрининга восстановление должно быть в пределах 30-140%.

6) Разделение диоксинов из хлорированных интерферентных соединений, таких как ПХБ, не схожих с диоксином и хлорированным дифенилэтером, достигается с помощью адекватных соответствующих хроматографических методов (желательно на колонке флорисила, алюминия и/или угольной).

7) Разделение изомеров методом газовой хроматографии удовлетворительно (< 25% от пика до пика между 1,2,3,4,7,8-НхCDF и 1,2,3,6,7,8-НхCDF).

8) Определение тетра-октахлорированных диоксинов и фуранов достигается за счет изотопного разбавления HRGC/HRMS.

9) Разница между верхним и нижним пределом не должна превышать 20% для кормов, характеризующихся заражением диоксином в пределах, или превышающих максимальный уровень заражения. Для кормов со значительно более низкими уровнями заражения разница может быть в диапазоне 25-40%.

2.7. Аналитические методы для обнаружения

2.7.1. Введение

Могут применяться различные аналитические подходы с использованием метода скрининга: чистый скрининг-подход и количественный подход.

Скрининг-подход

Реакция образцов сравнивается с ориентировочным образцом до уровня интересов. Образцы с реакцией ниже ориентировочного признаются отрицательными, а образцы с наибольшим реагированием предполагаются как положительные.

Требования:

1) В каждую исследуемую серию необходимо включать один контрольный образец и один ориентировочный, подлежащие экстрагированию и тестированию в то же время и в одинаковых условиях. Ориентировочный образец должен давать намного большие результаты по сравнению с контрольной группой.

2) Включаются дополнительные ориентировочные образцы 0,5x и 2x уровень интереса, чтобы продемонстрировать эффективность теста в промежутке интересов, для контроля уровня интереса.

3) При тестировании других матриц необходимо продемонстрировать, что ориентировочный образец (образцы) является соответствующим, желательно с включением и образцов, которые доказали посредством HRGC/HRMS, что имеют приблизительно такой TEQ уровень, как и ориентировочный образец или иначе зараженной партии на данном уровне.

4) Поскольку внутренние стандарты не могут быть использованы в биопробах, тесты на повторяемость очень важны, чтобы получить информацию о стандартном отклонении серии тестов. Коэффициент вариации должен быть не менее 30%.

5) Для биотестирования определяются целевые соединения, возможные интерференции и максимально допустимые уровни партии.

Количественный подход

Этот подход требует стандартных серий разбавления, процедуры очистки и двойного или тройного измерения, а также проверки восстановления и партии. Результат может быть выражен как TEQ, предполагая тем самым, что соединения, которые находятся в начале сигнала, соответствуют TEQ. Это достигается с помощью ГХДД (или стандартной смесью диоксинов/фуранов/диоксиноподобных ПХБ) для получения калибровочной кривой для расчета уровня TEQ в экстракте и, следовательно, в образце. Полученная сумма впоследствии исправляется значением TEQ, рассчитанным для контрольного образца (с учетом примесей из растворителей и используемых химических веществ) и для восстановления (рассчитанное на основании значения TEQ из контрольного образца приблизительного качества интересующего уровня). Важно учитывать, что часть возникающих потерь восстановления может быть установлена воздействием матрицы и/или различиями между значениями TEF в биопробах и официальными значениями TEF, установленными OMS.

2.7.2. Аналитические требования для выявления

1) Обнаружение основано на аналитических методах GC/MS или биопробах. Для GC/MS методов должны использоваться требования, предусмотренные в пункте 2.6. Для клеточных биопроб установлены специальные требования, изложенные в подпункте 2.7.3, а для биопроб, осуществленных с помощью диагностических тестов, установлены специальные требования, указанные в подпункте 2.7.4.

2) Необходима информация о количестве ложных положительных и отрицательных результатов, полученных для большого набора образцов, превышающих или находящихся ниже максимального уровня или уровня вмешательства, в сравнении с установленным содержанием TEQ, как это определено аналитическим методом подтверждения. Фактическая доля ложного отрицательного количества должна быть ниже 1%. Доля ложного положительного количества достаточно ниже, чтобы сделать более эффективным использование инструмента по выявлению.

3) Положительные результаты должны подтверждаться каждый раз методом анализа (HRGC/HRMS).

Дополнительно образцы из широкого спектра TEQ подтверждаются HRGC/HRMS (примерно 2-10% отрицательных образцов). Поставляется информация о соответствии результатов биотестирования и HRGC/HRMS.

2.7.3. Особые требования для клеточных биопроб

1) При осуществлении биопробы каждый тест требует ряд ориентировочных концентраций ТХДД или смеси диоксинов/фуранов (для кривой доза-эффект в комплекте составляет $R^2 > 0,95$). Тем не менее для целей выявления может быть использована кривая с низким уровнем расширения для анализа образцов с низким содержанием.

2) Для результатов анализа биологической активности в постоянном интервале времени используют на контрольном листе качества ориентировочную ТХДД концентрацию (примерно в три раза превышающую предел квантификации).

3) Графики контроля за качеством для каждого типа ориентировочного материала регистрируются и проверяются, с тем, чтобы убедиться, что результат соответствует установленным правилам.

4) Для количественных расчетов выполнение разбавления образца должно быть в пределах линейного участка ответной кривой. Образцы, расположенные выше линейной части ответной кривой, должны быть разбавлены и повторно проверены. Тестирование проводится не менее чем один раз в три разведения.

5) Процент стандартного отклонения не превышает 15% в трехразовом определении для каждого разбавленного образца и 30% в трех независимых испытаниях.

6) Предел обнаружения может быть установлен в 3-х стандартном отклонении контрольного растворителя или фонового ответа. Другой подход заключается в применении ответа, который превышает фоновый ответ (фактор индукции в 5х раз выше, чем контрольный растворитель), рассчитанный из калибровочной кривой на день. Предел квантификации может быть определен как значение от 5х до 6х стандартного отклонения контрольного растворителя или фонового ответа или применяются ответные меры, которые явно превосходят фоновый ответ (фактор индукции в 10х раз выше, чем контрольный растворитель), рассчитанный из калибровочной кривой на день.

2.7.4. Особые требования для биопроб, выполненных на основании диагностических тестов

1) Гарантировать, что наборы на основе биопроб имеют достаточную чувствительность и надежность для применения их к кормам.

- 2) Чтобы соблюдались инструкции производителя при подготовке и анализе проб.
- 3) Диагностические тесты не используют после истечения срока годности.
- 4) Не используют материалы или компоненты, предназначенные для применения с другими комплектами.
- 5) Диагностические тесты хранятся при температуре, расположенной в пределах указанного диапазона, и используются при указанной рабочей температуре.
- 6) Предел обнаружения для иммунодозировки определяется как средняя сумма и значения в 3х стандартном отклонении, основанная на серии 10 повторных контрольных анализов, которая делится на пятиступенчатое значение линейного уравнения регрессии.
- 7) Для лабораторных испытаний используются стандартные наборы, чтобы гарантировать, что результат измерения находится в пределах допустимого диапазона.

2.8. Отчетность о результатах

Если использованный метод исследования позволяет, то аналитические результаты содержат индивидуальные уровни аналогов ПХДД/Ф и диоксиноподобных ПХБ; аналитические результаты соотносятся к нижнему, верхнему и среднему уровню для максимального включения информации в отчетность о результатах, позволяющему интерпретацию результатов в соответствии с конкретными требованиями.

Отчетность также включает содержание липидов образца и метод, используемый для экстракции липидов.

Должна быть доступной информация о восстановлении отдельных внутренних стандартов, если восстановление выходит за пределы, указанные в пункте 2.6, когда превышает максимальный уровень.

Так, когда устанавливается соответствие образца и необходимо учитывать погрешность измерения, этот параметр должен быть доступен. Таким образом, анализ результатов сопоставим как, $x \pm U$, где “x” является аналитическим результатом и “U” является расширенной неопределенностью измерения с использованием покрытия в 2 раза, и уровнем достоверности примерно 95%. В случае отдельных определений диоксинов и диоксиноподобных ПХБ сумма предполагаемой расширенной неопределенности отдельных результатов анализа диоксинов и диоксиноподобных ПХБ используется для суммы диоксинов и диоксиноподобных ПХБ.

Если погрешность измерения учитывается путем применения $SS\alpha$, этот параметр сообщается.

[anexa nr.6](#)

Приложение № 6
к Постановлению Правительства
№ 686 от 13 сентября 2012 г.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА по определению компонентов животного происхождения для официального контроля кормов

1. УСЛОВИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОЦЕНКИ ПУТЕМ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ

ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КОРМАХ

1.1. Цель и область применения

Настоящие условия используются для обнаружения компонентов животного происхождения (определяемых как продукты переработки туш или частей тела млекопитающих, домашних птиц и рыб) в корме на основании микроскопического исследования в рамках скоординированной программы инспекции в области кормления животных.

1.2. Чувствительность

В зависимости от компонентов животного происхождения возможно обнаружение очень малых количеств ($< 0,1\%$) в кормах.

1.3. Принцип применения

Для обнаружения используется репрезентативный образец, отобранный в соответствии с указаниями приложения № 1, который прошел соответствующую подготовку. Протокол, описанный в пункте 1.9, подходит для обработки корма с низким содержанием влаги. Корма с влажностью, превышающей 14%, высушиваются (сгущаются) до начала обработки. Корма и специальное сырье (например, жиры, масла) подвергаются специальной обработке (см. положения пункта 1.9). Компоненты животного происхождения определяются на основании типичных характеристик, идентифицируемые микроскопическим исследованием (например, мышечных волокон и других частиц мяса, хряща, костей, рогов, волос, щетины, крови, перьев, яичной скорлупы, костей и рыбной чешуи). Определение должно осуществляться как для отсеянных фракций, в соответствии с положениями, описанными в подпункте 1.6.1, а также концентрированных осадков (см. положения из подпункта 1.6.2) из образца.

1.4. Применяемые реагенты

1.4.1. Используемые агенты

1.4.1.1. Хлоридрат (водный раствор, 60% вес/объем).

1.4.1.2. Раствор золы (NaOH 2,5% в/о или KOH 2,5% вес/объем) для отсеивающих фракций.

1.4.1.3. Парафиновое масло или глицерин (вязкость: 68-81) для микроскопического исследования осадка.

1.4.2. Раствор для промывания

1.4.2.1. Алкоголь, 96%.

1.4.2.2. Ацетон.

1.4.3. Концентрированный агент

1.4.3.1. Тетрахлорэтилен (плотность 1,62).

1.4.4. Реагенты для окрашивания

1.4.4.1. Раствор йода/йодистый калий (растворяют 2 г йодистого калия в 100 мл воды и добавляют 1 г йода, часто помешивая).

1.4.4.2. Ализарин красный (разбавляют 2,5 мл 1М соляной кислоты в 100 мл воды и добавляют 200 мг раствора ализарина красного).

1.4.4.3. Раствор цистина (2 г ацетатного свинца, 10 г NaOH/100 мл H₂O).

1.4.4.4. Раствор йода/йодистый калий (растворенный в этаноле 70%).

1.4.5. Отбеливающий реагент

1.4.5.1 Коммерческий раствор гипохлорида натрия (9,6% активного хлора).

1.5. Оборудование и аксессуары

1.5.1. Аналитические весы (точность 0,01 г, за исключением концентрированного осадка: 0,001 г).

1.5.2. Устройство для измельчения (мельница или ступка, особенно для корма, содержащего > 15% жира, обнаруженного при анализе).

1.5.3. Решето с квадратными отверстиями с максимальной шириной 0,5 мм.

1.5.4. Воронка для разделения или лабораторный стакан для сцеживания с коническим дном.

1.5.5. Стереоскопический микроскоп (увеличение не менее чем в 40 раз).

1.5.6. Современный микроскоп (увеличение не менее чем в 400 раз), проходящий свет или поляризованный свет.

1.5.7. Стандартная лабораторная посуда

Все оборудование тщательно очищено. Воронка для разделения и стеклянная посуда промываются в посудомоечной машине. Решето необходимо очищать жесткой зубной щеткой.

1.6. Процедура подготовки

Если обе фракции анализировались как отдельные образцы, кормовые гранулы предварительно просеиваются.

Не менее 50 г образца рассматриваются [в случае необходимости, осторожно перемалываются с помощью устройства для измельчения в целях достижения соответствующей структуры]. Из измельченного материала отбираются две представительные части, одна – для просеянной фракции (не менее 5 г) (см. подпункт 1.6.1) и одна – для концентрированного осадка (не менее 5 г) (см. подпункт 1.6.2). Для идентификации применяют дополнительно окрашивание реагентом для окрашивания в соответствии с положениями подпункта 1.6.3.

Чтобы указать характер животного белка и происхождение частиц может быть использована система поддержки для принятия решения типа ARIES и могут быть документированы ориентировочные образцы.

1.6.1. Идентификация компонентов животного происхождения из просеянных фракций

Образец не менее 5 г просеивают через решето на две фракции.

Доля (доли) просеянной (просеянных) с большими частицами (или представительная часть фракции) наносится тонким слоем на подходящую поддержку и исследуется систематически под стереомикроскопом с различными увеличениями для выявления компонентов животного происхождения.

Подготовленные стекла с фракцией (фракциями) с мелкими частицами проверяются систематически под современным микроскопом с различными увеличениями для выявления компонентов животного происхождения.

1.6.2. Идентификация компонентов животного происхождения из концентрированного осадка

Не менее 5 г (с точностью до 0,01 г) образца переносят в делительную воронку или лабораторный стакан для сцеживания с коническим дном и обрабатывают не менее чем 50 мл тетрахлорэтилена. Смесь взбалтывается или перемешивается несколько раз.

1) При использовании закрытой воронки отделения, осадок оставляют на достаточный период времени (не менее трех минут) перед отделением. Повторно взбалтывают и осадок отстаивают в течение не менее трех минут.

Отделяют осадок снова.

2) При использовании открытого лабораторного стакана осадок оставляют по крайней мере на пять минут перед отделением.

Общий осадок сушат и взвешивают (с точностью до 0,001 г). Взвешивание требуется только при необходимости определения. Если осадок содержит много крупных частиц, его просеивают через решето на две фракции.

Сушенный осадок исследуют под стереомикроскопом и с помощью современного микроскопа для обнаружения костных компонентов.

1.6.3. Использование включенных агентов и реагентов для окрашивания

Для облегчения идентификации микроскопом микроскопических компонентов животного происхождения могут быть использованы включенные агенты и специальные реагенты для окрашивания.

Гидрохлорид: путем осторожного нагревания клеточные структуры видны более четко в результате того, что гранулы крахмала застывают, а нежелательное клеточное содержимое удаляется.

Щелок: как гидроксид натрия, так и гидроксид калия проясняют содержимое корма, что облегчает обнаружение мышечных волокон, волос или других кератиновых структур.

Парафиновое масло и глицерин: костные соединения могут быть четко идентифицированы в составе включенных агентов, потому что большинство пробелов остаются заполненными воздухом и выглядят, как черные дыры примерно от 5 до 15 мкм.

Раствор йода/йодированного калия: используется для определения крахмала (цвет сине-фиолетовый) и белка (цвет желто-оранжевый). При необходимости раствор может быть отделен.

Раствор красного ализарина: окрас костей, в том числе костей и чешуи рыбы, красный, розовый. Перед высушиванием осадка (см. подпункт 1.6.2) весь осадок перемещают в стеклянный сосуд и дважды промывают 5 мл спирта (каждый раз используя шейкер, растворитель оставляют в течение одной минуты и устраняют). Прежде чем использовать этот реагент для окраски, осадок обесцвечивают, добавляя не менее 1 мл раствора гипохлорита натрия. Допускают, чтобы реакция продолжалась в течение 10 минут. Сосуд заполняют водой, ожидают 2-3 минуты, чтобы осадок отстоялся, а воду и частицы суспензии устраняют. Осадок промывают еще два раза примерно с 10 мл воды (каждый раз используется шейкер, а затем оставляют и далее исключают воду). Добавляют от двух до десяти или больше капель (в зависимости от суммы остатка) раствора ализарина красного. Смесь встряхивают и ожидают реакции в течение нескольких секунд. Цветной осадок дважды промывают 5 мл спирта, затем один раз с ацетоном (каждый раз используя шейкер, растворитель оставляют в течение одной минуты и устраняют). После этого осадок готов для высушивания.

Реактивный цистин: путем тщательного нагревания компоненты, содержащие цистин (волосы, перья и т.д.), становятся черно-коричневого цвета.

1.6.4. Исследование восприимчивых кормов, содержащих рыбную муку

Исследуют с помощью современного микроскопа (см. положения подпунктов 1.6.1 и 1.6.2) не менее одной пластины измельченной мелкой фракции и мелкой фракции осадка.

Если этикетка указывает на наличие рыбной муки в ингредиентах или подозревается или обнаружено присутствие рыбной муки в первоначальном исследовании, рассматривается не менее двух пластин мелкой измельченной фракции исходного образца, а также общая доля осадка.

1.7. Расчет и оценка

Компетентный санитарно-ветеринарный орган должен обеспечить, чтобы процедуры, описанные в настоящем пункте, использовались для всех официальных тестов в целях оценки количества (а не только наличия) компонентов животного происхождения.

Расчет может быть сделан только в том случае, если компоненты животного происхождения содержат фрагменты костей.

Костные фрагменты наземных видов с теплой кровью (например, млекопитающие и птицы) могут отличаться от различных типов рыбных костей на микроскопической пластине, с помощью типичного недостатка. Доля состава животных компонентов в образце оценивается с учетом:

- a) расчетной доли (% по весу) костных фрагментов в концентрированном осадке; и
- b) соотношения (% по весу) кости в компонентах животного происхождения.

Для оценки исследуются (если возможно) не менее трех пластин и не менее пяти полей для каждой пластины. В комбикорме концентрированный осадок обычно содержит не только фрагменты костей наземных животных и рыбных костей, но и других частиц с высоким удельным весом, таких, как минералы, песок, одревесневшие фрагменты растений и другие.

1.7.1. Предполагаемый процент костных фрагментов

% костных фрагментов наземных животных = $(S \times c)/g$

% костных фрагментов и рыбьей чешуи = $(S \times d)/g$,

где:

[S = вес осадка (мг), c = коэффициент поправки (%) для оцениваемой части костей наземных животных в осадке, d = коэффициент поправки (%) для оцениваемой части рыбных костей и чешуи из осадка, g = вес образца для оседания (мг)].

1.7.2. Ориентировочное значение составляющих животного происхождения

Соотношение костей в продуктах животного происхождения может сильно отличаться. (Процент костей составляет порядка 50-60% для костной муки и 20-30% для мясной муки; в случае костной муки содержимое костей и чешуи варьирует в зависимости от категории и происхождения костной муки, и, как правило, составляет порядка 10-20%).

Если тип муки животного происхождения, присутствующей в образце, известен, можно оценить содержание:

Расчетное содержание компонентов наземных животных продуктов (%) = $(S \times c)/(g \times f) \times 100$

Расчетное содержание компонентов рыбной продукции (%) = $(S \times d)/(g \times f) \times 100$,

где:

[S = вес осадка (мг), c = коэффициент поправки (%) для оцениваемой части сформированных костей наземных животных в осадке, d = коэффициент поправки (%) для оцениваемой части рыбных костей и чешуи из осадка, f = коэффициент поправки на долю сформированных костей животного происхождения в исследуемом образце, g = вес образца для оседания (мг)].

1.8. Выражение результатов исследования

Отчет содержит, как минимум, информацию о наличии компонентов, происходящих от наземных животных и из рыбной муки. Различные случаи взаимоотносятся в порядке, описанном в подпунктах 1.8.1 и 1.8.2.

1.8.1. Что касается присутствия компонентов, происходящих от наземных животных:

a) насколько было заметно под микроскопом, в исследуемом образце не было выявлено компонентов, происходящих от наземных животных, или

б) насколько было видно под микроскопом, в исследуемом образце были обнаружены компоненты, происходящие от наземных животных.

1.8.2. Что касается присутствия в рыбной муке:

а) насколько было видно под микроскопом, ни один компонент, происходящий от рыбы, не был обнаружен в образце, или

б) насколько было видно под микроскопом, в исследуемом образце были обнаружены компоненты, происходящие от рыбы.

При обнаружении компонентов, происходящих от рыбы и наземных животных, отчет о результатах обследования, при необходимости, может указывать на оценку количества обнаруженных компонентов ($x\%$, $< 0,1\%$, от 0,1 до 0,5%, от 0,5 до 5% или $> 5\%$), дополнительные характеристики о видах наземных животных, если это возможно, а также выявленные компоненты животного происхождения (мышцы, хрящ, кости, рога, волосы, щетина, перья, кровь, яичная скорлупа, рыбные кости, чешуя).

В случае, когда оценивается предполагаемое количество компонентов животного происхождения, указывается используемый коэффициент поправки “f”.

В случае, когда определены компоненты, полученные от наземных животных, отчет содержит дополнительное примечание:

“Не исключена возможность происхождения вышеуказанных компонентов от млекопитающих”.

Эта дополнительная информация не является необходимой, если костные частицы, происходящие от наземных животных, определяются, как костные частицы, происходящие от домашних птиц или от млекопитающих.

1.9. Факультативный протокол для анализа жиров или масел

Для анализа жиров или масел можно использовать следующий протокол:

1) Если жир твердый, он нагревается, например, в микроволновой печи, пока не станет жидким.

2) С помощью пипетки перемещают 40 мл жира из нижней части образца в центрифугированную трубку.

3) Подвергается центрифугированию в течение 10 минут при 4000 оборотах в минуту.

4) Если жир становится твердым после центрифугирования, он нагревается снова в духовке, пока не станет жидким. Центрифугирование повторяется в течение пяти минут при 4000 оборотов в минуту.

5) С помощью маленькой ложки или шпателя переводят половину сцеживаемых примесей в чашку Петри или на микроскопическую пластинку для микроскопического определения возможного содержания компонентов животного происхождения (волокна мяса, перья, костные частицы и т.д.). Как включенное средство для микроскопии рекомендуются парафиновые масла или глицерин.

6) Оставшиеся примеси используются для осаждения согласно описанию в подпункте 1.6.2.

МЕТОДЫ

по определению энергетической ценности комбикормов для домашних птиц

1. Методика расчета и выражение энергетической ценности для домашних птиц

1.1 Энергетическая ценность комбикормов для домашних птиц рассчитывается по формуле, указанной в пункте 1.2.

1.2. Это значение выражается в МДж (МДж) обменной энергии (МЕ), скорректированной с помощью азота, на килограмм комбикорма:

$$\text{МДж/кг} = 0,1551 \text{ МЕ} \times \% \text{ сырого белка} + 0,3431 \times \% \text{ сырого жира} + 0,1669 \times \% \text{ крахмала} + 0,1301 \times \% \text{ общего сахара (выраженного в сахарозе)}.$$

1.3. Отбор проб комбикормов и аналитического определения соединений, указанных в методе расчета, должен быть сделан в соответствии со следующими методами:

а) для определения содержания необработанного жира: процедура В метода определения необработанных масел и жиров согласно главе VIII из приложения № 3;

б) для определения содержания крахмала: поляриметрический метод согласно главе XII приложения № 3.

2. Допустимые отклонения объявленных значений и выражение результата

2.1. Если при официальной проверке установлено отклонение (наибольшая или наименьшая энергетическая ценность пищи для птиц) между результатами проверки и указанной энергетической ценностью, допустимое отклонение составляет минимум 0,4 МДж/кг МЕ.

2.2. Полученный результат для применения формулы, указанной в пункте 1.2, выражается с точностью до одной десятой.