

Този текст служи само за информационни цели и няма правно действие. Институциите на Съюза не носят отговорност за неговото съдържание. Автентичните версии на съответните актове, включително техните преамбюли, са версиите, публикувани в Официален вестник на Европейския съюз и налични в EUR-Lex. Тези официални текстове са пряко достъпни чрез връзките, публикувани в настоящия документ

► **V**

РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 152/2009 НА КОМИСИЯТА
от 27 януари 2009 година
за определяне на методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол
на фуражите
(текст от значение за ЕИП)
(ОВ L 54, 26.2.2009 г., стр. 1)

Изменен със:

		Официален вестник		
		№	страница	дата
► <u>M1</u>	Регламент (ЕС) № 278/2012 на Комисията от 28 март 2012 година	L 91	8	29.3.2012 г.
► <u>M2</u>	Регламент (ЕС) № 51/2013 на Комисията от 16 януари 2013 година	L 20	33	23.1.2013 г.
► <u>M3</u>	Регламент (ЕС) № 691/2013 на Комисията от 19 юли 2013 година	L 197	1	20.7.2013 г.
► <u>M4</u>	Регламент (ЕС) № 709/2014 на Комисията от 20 юни 2014 година	L 188	1	27.6.2014 г.
► <u>M5</u>	Регламент (ЕС) 2017/645 на Комисията от 5 април 2017 година	L 92	35	6.4.2017 г.
► <u>M6</u>	Регламент (ЕС) 2017/771 на Комисията от 3 май 2017 година	L 115	22	4.5.2017 г.
► <u>M7</u>	Регламент за изпълнение (ЕС) 2020/1560 на Комисията от 26 октомври 2020 година	L 357	17	27.10.2020 г.
► <u>M8</u>	Регламент за изпълнение (ЕС) 2022/893 на Комисията от 7 юни 2022 година	L 155	24	8.6.2022 г.
► <u>M9</u>	Регламент за изпълнение (ЕС) 2024/771 на Комисията от 29 февруари 2024 година	L 771	1	15.3.2024 г.

▼B**РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 152/2009 НА КОМИСИЯТА****от 27 януари 2009 година****за определяне на методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на фуражите****(текст от значение за ЕИП)****▼M3***Член 1***▼M9**

Вземането на проби за целите на официалния контрол на фуражите, и по-специално с оглед определянето на съставките им, включително материали, които съдържат, състоят се или са произведени от генетично модифицирани организми (ГМО), фуражни добавки, определени в Регламент (ЕО) № 1831/2003 на Европейския парламент и на Съвета ⁽¹⁾, и нежелани вещества, определени в Директива 2002/32/ЕО на Европейския парламент и на Съвета ⁽²⁾, се извършва в съответствие с методите, определени в приложение I, с изключение на вземането на проби за целите на контрола на микробиологичното замърсяване.

▼M3

Методът за вземане на проби, установен в приложение I, е приложим за контрола на фуражите по отношение на определянето на остатъчни вещества от пестициди, определени в Регламент (ЕО) № 396/2005 на Европейския парламент и на Съвета ⁽³⁾, и контрола на спазването на Регламент (ЕС) № 619/2011.

▼B*Член 2*

Подготовката на проби за анализ и представянето на резултатите се извършва в съответствие с методите, посочени в приложение II.

Член 3

Анализът на фуражите за целите на официалния контрол се провежда, като се използват методите, посочени в приложение III (Методи за анализ с цел контролиране на състава на фуражните съставки и на комбинирания фураж), приложение IV (Методи за анализ с цел контролиране на равнището на позволени добавки във фуражите), приложение V (Методи за анализ с цел контролиране на нежеланите вещества във фуражите) и приложение VI (Методи за анализ за определяне на съставките от животински произход за целите на официалния контрол на фуражите).

Член 4

Енергийната стойност на комбинираните фуражи за домашни птици се изчислява в съответствие с приложение VII.

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 1831/2003 на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2003 г. относно добавки за използване при храненето на животните (ОВ L 268, 18.10.2003 г., стр. 29).

⁽²⁾ Директива 2002/32/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 7 май 2002 г. относно нежеланите вещества в храните за животни (ОВ L 140, 30.5.2002 г., стр. 10).

⁽³⁾ ОВ L 70, 16.3.2005 г., стр. 1.



Член 5

Посочените в приложение VIII методи за анализ с цел контролиране на непозволено наличие на добавки, чието ползване във фуражи вече не е разрешено, се използват за потвърждение.

Член 6

Директиви 71/250/ЕИО, 71/393/ЕИО, 72/199/ЕИО, 73/46/ЕИО, 76/371/ЕИО, 76/372/ЕИО, 78/633/ЕИО, 81/715/ЕИО, 84/425/ЕИО, 86/174/ЕИО, 93/70/ЕИО, 93/117/ЕО, 98/64/ЕО, 1999/27/ЕО, 1999/76/ЕО, 2000/45/ЕО, 2002/70/ЕО и 2003/126/ЕО се отменят.

Позоваванията на отменените директиви се считат за позовавания на настоящия регламент и се четат съгласно таблиците на съответствието в приложение IX.

Член 7

Настоящият регламент влиза в сила на двадесетия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Той се прилага от 26 август 2009 г.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

▼ **M9***ПРИЛОЖЕНИЕ I***МЕТОДИ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ****1. ЦЕЛ И ОБХВАТ**

Пробите, предназначени за официалния контрол на фуражите, се вземат по описаните по-долу методи. Така получените проби се смятат за представителни за опробваните части от партида.

Целта на вземането на представителни проби е да се получи малка част от една партида по такъв начин, че определянето на която и да е конкретна характеристика на тази част да представлява средната стойност на характеристиката за цялата партида. Проба от партидата се взема, като многократно се вземат точкови проби на различни места в партидата. Тези точкови проби се смесват, така че да образуват съставна проба, от която чрез представително разделяне се подготвят представителни крайни проби.

Ако при визуална проверка или въз основа на друга относима информация части от фуража, подлежащ на вземане на проби, показват разлика в качеството в сравнение с останалата част от фуража от същата партида, тези части трябва да бъдат отделени от останалата част на фуража и третираны като отделна подпартида. Ако не е възможно фуражът да се раздели на подпартиди, от него се вземат проби като от една единична партида. В такива случаи това се посочва в протокола за вземане на проби.

Когато за даден фураж, от който са взети проби в съответствие с разпоредбите на настоящия регламент, се установи, че не отговаря на изискванията на ЕС, и той съставлява част от партида фуражи от една и съща категория или с едно и също описание, се приема, че констатациите се отнасят до всички фураж от тази партида, освен ако след щателна оценка не се окаже неоснователно да се счита, че останалата част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС.

Вземането на проби може да обхваща също така и фуражи, които операторите в сектора на фуражите предлагат за продажба чрез средства за комуникация от разстояние в съответствие с член 11, параграф 3 от Регламент (ЕО) № 767/2009 на Европейския парламент и на Съвета ⁽¹⁾. Вземането на проби от фуражи, предлагани за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, по принцип се извършва при условията, изложени в настоящото приложение. Специфичните аспекти на вземането на проби от фуражи, предлагани за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, са описани в т. 11.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- Партида: определено количество фураж, за което е установено, че има общи характеристики, като произход, разновидност, вид на опаковката, опаковчик, изпращач или етикетирание, и — в случай на производствен процес — представлява единица продукция от един завод, който използва еднакви производствени параметри, или няколко такива единици, когато са произведени в последователен ред и са складирани заедно.
- Опробвана част от партида: партида или определена част от партидата или подпартидата.
- Запечатана проба: проба, запечатана по такъв начин, че да е невъзможно да се осъществи достъп до нея, без да бъде счупен или премахнат печатът или пломбата.

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 767/2009 на Европейския парламент и на Съвета от 13 юли 2009 г. относно пускането на пазара и употребата на фуражи, за изменение на Регламент (ЕО) № 1831/2003 на Европейския парламент и на Съвета, за отмяна на Директива 79/373/ЕИО на Съвета, Директива 80/511/ЕИО на Комисията, директиви 82/471/ЕИО, 83/228/ЕИО, 93/74/ЕИО, 93/113/ЕО и 96/25/ЕО на Съвета, както и на Решение 2004/217/ЕО на Комисията (ОВ L 229, 1.9.2009 г., стр. 1).

▼ M9

- Точкова проба: количество, взето от едно и също място в опробваната част от партида.
- Съставна проба: съвкупността от всички точкови проби, взети от една и съща опробвана партида.
- Редуцирана проба: част от съставната проба, получена от нея чрез представително редуциране.
- Крайна проба: Част от съставната проба (смесена), от редуцираната проба или от хомогенизираната съставна проба, в зависимост от вида на контрола (вж. т. 9.4.).
- Лабораторна проба: проба, предназначена за лабораторията (както е получена в лабораторията), която може да бъде крайна, редуцирана или съставна проба.
- Проба от фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние: Проба от партида фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние.

3. ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ

- Вземането на проби се извършва от лица, оправомощени да извършват това от компетентния орган.
- В случай на вземане на проба от фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, компетентният орган изисква от оператора в сектора на фуражите известно количество от фуража посредством средство за комуникация от разстояние.
- Пробата трябва да се запечата по такъв начин, че да се предотврати всякакъв достъп до нея, без да се счупи или премахне пломбата или печатът.

Маркировката на пломбата/печата трябва да бъде ясно разпознаваема и ясно видима.

- Идентификация на пробата: пробата трябва да бъде незаличимо маркирана и да се идентифицира по такъв начин, че да има недвусмислена връзка с протокола за вземане на проби.
- От всяка съставна или редуцирана проба се вземат следните крайни проби: една за контрол (правоприлагане) и една за оператора в сектора на фуражите (защитна проба). Еwentуално може да бъде взета още една, арбитражна крайна проба. В случай че съставната проба е напълно хомогенизирана, крайните проби се вземат от хомогенизираната съставна проба, освен ако такава процедура не противоречи на правилата на държавата членка по отношение на правата на оператора в сектора на фуражите.
- Съгласно член 15, параграфи 1 и 2 от Регламент (ЕС) 2017/625, доколкото е необходимо за извършването на официално вземане на проби и когато компетентните органи го изискват, операторите в сектора на фуражите:
 - Предоставят на служителите на компетентните органи достъп до оборудването под техен контрол, включително, при необходимост, подходящо оборудване за вземане на проби и лични предпазни средства;
 - Съдействат и сътрудничат на служителите на компетентните органи с оглед на успешното вземане на проби, включително като осигуряват на служителите на компетентните органи достъп до фуражите.

▼ **M9**

4. АПАРАТУРА

4.1. Апаратурата за вземане на проби трябва да е изработена от материали, които не могат да замърсят взетите за проба продукти. Апаратурата, предназначена да бъде използвана многократно, трябва да се почиства лесно, за да се избегне кръстосаното замърсяване на пробите.

4.2. **Препоръчвана апаратура за вземане на проби от твърди фуражи**4.2.1. *Ръчно вземане на проби*

4.2.1.1. Плоска лопатка за вземане на проби с вертикални страни.

4.2.1.2. Сонда за вземане на проби с дълъг прорез или камери. Размерите на сондата за вземане на проби трябва да съответстват на характеристиките на опробваната част от партида (дълбочина на контейнера, размери на чувалите и т.н.) и на големината на частиците на фуража.

Ако сондата за вземане на проби има няколко отвора, те трябва да водят до разделени камери или да са с последователно изместване по обиколката на напречното сечение на сондата, за да се гарантира, че пробата е взета от различни места по дължината на сондата.

4.2.2. *Механично вземане на проби*

Може да се използва подходяща механична апаратура за вземане на проби от фураж от конвейерна лента. Механичната апаратура се счита за подходяща, когато се вземат, като минимум, проби от цялото сечение на потока.

Проби от фураж на конвейерна лента (при високи скорости на потока) може да се вземат с автоматичен пробовземач.

4.2.3. *Делителни устройства*

Ако е възможно и уместно, за подготовката на представителни редуцирани проби следва да се използват устройства, предназначени да разделят пробата на приблизително равни части.

5. КОЛИЧЕСТВЕНИ ИЗИСКВАНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ НА БРОЯ НА ТОЧКОВИТЕ ПРОБИ

— Количествените изисквания в точки 5.1. и 5.2. по отношение на броя на точковите проби са приложими за опробвани части от партида с размер до не повече от 500 тона, от които могат да се вземат представителни проби. Описаната процедура за вземане на проби важи в еднаква степен и за по-големи количества от определения максимален размер на опробваната част от партида, при условие че максималният брой на точковите проби, посочен в таблиците в точки 5.1.1., 5.1.3. и 5.1.5. по-долу, бъде пренебрегнат и вместо това броят на точковите проби бъде определен с помощта на формулата с квадратен корен, представена в съответната част на процедурата (вж. точка 5.3.), а минималният размер на съставната проба се увеличи пропорционално. Това не пречи голяма партида да бъде разделена на по-малки подпартиди и от всяка подпартида да се вземат проби в съответствие с процедурата, описана в точки 5.1 и 5.2.

— Опробваната част от партида трябва да бъде с такъв размер, че да има възможност за вземане на проба от всяка от съставните ѝ части.

— За много големи партии или подпартиди (> 500 тона) и за партии, които са транспортирани или складирани по такъв начин, че не може да се вземат проби в съответствие с процедурата за вземане на проби, предвидена в т. 5.1. и т. 5.2. от настоящата глава, се прилага процедурата за вземане на проби, предвидена в т. 5.3.

▼ M9

- За пробите от фуражи, предлагани за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, размерът на партидата, от която се изисква количеството, обикновено не е известен на компетентния орган. Следователно посочената в точки 5.1. и 5.2. процедура не може да се използва. В този случай се прилага процедурата, описана в т. 11.
- В случай че операторът в сектора на фуражите е задължен от закона да се съобрази с настоящия регламент в рамките на задължителна система за мониторинг, той може да се отклонява от количествените изисквания в настоящата точка, за да вземе предвид експлоатационните характеристики, при условие че е представил на компетентния орган достатъчно доказателства за това, че тази процедура за вземане на проби е в същата степен представителна, и е получил разрешение от компетентния орган.
- В изключителни случаи, ако описаният метод за вземане на проби не може да се приложи по отношение на количествените изисквания поради неприемливата търговска щета, която би нанесло евентуално увреждане на партидата (поради начините на опаковане, средствата за транспорт, начина на складиране и т.н.), може да се прилага алтернативен метод за вземане на проби, при условие че е максимално представителен и е напълно описан и документиран.

5.1. Количествени изисквания по отношение на точковите проби във връзка с контрола на вещества или продукти, разпределени равномерно във фуража

5.1.1. Насипни твърди фуражи

Размер на опробваната част от партида	Минимален брой точкови проби
$\leq 2,5$ тона	7
$> 2,5$ тона	$\sqrt{}$ от 20 пъти броят на тоновете на опробваната част от партида (*), но не повече от 40 точкови проби

(*) Ако полученото число е дробно, то се закръглява до най-близкото по-голямо цяло число.

5.1.2. Течни фуражи в насипно състояние

Размер на опробваната част от партида	Минимален брой точкови проби
$\leq 2,5$ тона или $\leq 2\,500$ литра	4 (*)
$> 2,5$ тона или $> 2\,500$ литра	7 (*)

(*) Ако течността не може да се хомогенизира, броят на точковите проби трябва да бъде увеличен.

5.1.3. Пакетирани фуражи

Фуражите (твърди и течни) могат да бъдат пакетирани в торби, чували, кутии, бидони и други, които в таблицата се обозначават като единици. Проби от големи единици (≥ 500 кг или литра) трябва да се вземат в съответствие с разпоредбите за насипни фуражи (вж. 5.1.1 и 5.1.2.)

Размер на опробваната част от партида	Минимален брой единици, от които трябва да се вземе (най-малко) една точкова проба (*)
От 1 до 20 единици	1 единица (**)
От 21 до 150 единици	3 единици (**)

▼ M9

Размер на опробваната част от партида	Минимален брой единици, от които трябва да се вземе (най-малко) една точкова проба (*)
От 151 до 400 единици	5 единици (**)
> 400 единици	$\frac{1}{4}$ от $\sqrt{\text{от броя на единиците}}$, от които се състои опробваната част от партида (***), но не повече от 40 единици

(*) Ако отварянето на единицата би могло да повлияе на анализа (напр. при нетрайни влажни фуражи), точковата проба трябва да бъде неотворената единица.

(**) За единици, чистото съдържание не надвишава 1 kg или един литър, за точкова проба се приема съдържанието на една оригинална единица.

(***) Ако полученото число е дробно, то се закръглява до най-близкото по-голямо цяло число.

5.1.4. *Фуражни блокчета и минерални буци за близане*

На една опробвана част от партида от 25 единици се взема за проба най-малко едно блокче или една буца, но не повече от четири блокчета или буци за близане.

За блокчета или буци за близане, които са с тегло до 1 kg, за точкова проба се приема съдържанието на едно блокче или една буца.

5.1.5. *Тревни и груби фуражи*

Размер на опробваната част от партида	Минимален брой точкови проби (*)
≤ 5 тона	5
> 5 тона	$\sqrt{\text{от 5 пъти броят на тоновете на опробваната част от партида (**)}} ,$ но не повече от 40 точкови проби

(*) Известно е, че в някои ситуации (например при силажите) не е възможно да се вземат необходимите точкови проби, без да се нанесат неприемливи щети на партидата. В такива ситуации може да се прилага алтернативен метод за вземане на проби, като насоките за вземане на проби от такива партии са достъпни на следния адрес https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

(**) Ако полученото число е дробно, то се закръглява до най-близкото по-голямо цяло число.

5.2. **Количествени изисквания по отношение на точковите проби във връзка с контрола на съставки или вещества, които могат да са разпределени неравномерно във фуража**

Тези количествени изисквания по отношение на точковите проби се използват в следните ситуации:

— контрол на афлатоксини, мораво рогче, други микотоксини и вредни ботанически примеси във фуражните суровини;

— контрол на кръстосано замърсяване от съставка, включително генетично модифициран материал, или вещество, за което се очаква неравномерно разпределение във фуражите.

Ако надзорният орган има сериозни основания да подозира, че такова неравномерно разпределение съществува и в случай на кръстосано замърсяване от съставка или вещество в комбиниран фураж, може да се прилагат количествените изисквания, предвидени в таблицата по-долу.

▼ M9

Размер на опробваната част от партида	Минимален брой точкови проби
< 80 тона	Вж. количествените изисквания в т. 5.1. Броят на точковите проби, които трябва да се вземат, трябва да бъде умножен по 2,5.
≥ 80 тона	100

5.3. **Количествени изисквания по отношение на точковите проби при много големи партии**

В случай на големи опробвани части от партида (опробвани части от партида > 500 тона) броят на точковите проби, които трябва да се вземат, е равен на 40 точкови проби + $\sqrt{\text{от тоновете}}$ по отношение на контрола на вещества или продукти, разпределени равномерно във фуража, или 100 точкови проби + $\sqrt{\text{от тоновете}}$ по отношение на контрола на съставки или вещества, които могат да са разпределени неравномерно във фуражите.

6. **КОЛИЧЕСТВЕНИ ИЗИСКВАНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ НА СЪСТАВНИТЕ ПРОБИ**

Изисква се една съставна проба за всяка опробвана част от партида.

	Естество на фуражите	Минимален размер на съставната проба (*) (**)
6.1.	Насипни фуражи	4 kg
6.2.	Пакетирани фуражи:	4 kg (***)
6.3.	Течни или полутечни фуражи	4 литра
6.4.	Фуражни блокчета или минерални буци за близане:	
6.4.1.	всяко(а) с тегло над 1 kg	4 kg
6.4.2.	всяко(а) с тегло не повече от 1 kg	теглото на четири оригинални блокчета или буци
6.5.	Тревни и груби фуражи	4 kg (****)

(*) Ако фуражите, от които се вземат проби, са с висока стойност, може да се вземе по-малко количество за съставната проба, при условие че това се описва и документира в протокола за вземане на проби.

(**) В съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕС) № 619/2011 на Комисията от 24 юни 2011 г. за определяне на методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на фуражите по отношение на наличието на генетично модифициран материал, за който е в ход процедура за даване на разрешение или за който разрешението е изтекло (ОВ L 166, 25.6.2011 г., стр. 9) съставната проба за контрол за наличие на генетично модифициран материал трябва да съдържа най-малко 35 000 семена/зърна. Това означава, че за царевица размерът на съставната проба трябва да бъде най-малко 10,5 kg, а за соя — 7 kg. За други семена и зърна като ечемик, просо, овес, ориз, ръж, пшеница и рапично семе размерът на съставната проба от 4 kg съответства на повече от 35 000 семена/зърна.

(***) В случай на пакетирани фуражи може и да не бъде възможно да се постигне съставна проба от 4 kg в зависимост от размера на отделните единици.

(****) В случай на тревни или груби фуражи с ниска относителна плътност (напр. сено, слама) съставната проба трябва да е като минимум с тегло 1 kg.

▼ M9

7. КОЛИЧЕСТВЕНИ ИЗИСКВАНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ НА КРАЙНИТЕ ПРОБИ

Крайни проби

Изисква се анализ на поне една крайна проба. Масата на крайната проба за анализ не трябва да бъде по-малка от следното:

Твърди фуражи	500 g (*) (**) (***) (****)
Течни или полутечни фуражи	500 ml (*)

(*) В съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕС) № 619/2011 крайната проба за контрол за наличие на генетично модифициран материал трябва да съдържа най-малко 10 000 семена/зърна. Това означава, че за паревица размерът на крайната проба трябва да бъде най-малко 3000 g, а за соя — 2000 g. За други семена и зърна като ечемик, просо, овес, ориз, ръж, пшеница и рапично семе размерът на крайната проба от 500 g съответства на повече от 10 000 семена/зърна.

(**) Ако размерът на съставната проба е значително по-малко от 4 kg или литра (вж. бележките под линия към точка 6), може да се вземе и по-малко количество от крайната проба, при условие че това се описва и документира в протокола за вземане на проби.

(***) В случай на вземане на проби от бобови растения, зърна от зърнени култури и черупкови плодове за определяне на остатъчни вещества от пестициди минималният размер на крайната проба е 1 kg в съответствие с разпоредбите на Директива 2002/63/ЕО на Комисията от 11 юли 2002 г. за определяне на методи на Общността за вземане на проби за официалния контрол на остатъци от пестициди във и върху продукти от растителен и животински произход и за отмяна на Директива 79/700/ЕИО (ОВ L 187, 16.7.2002 г., стр. 30).

(****) В случай на изследване чрез визуална проверка или микроскопско изследване количеството на крайната проба за изследване е 1 kg.

8. МЕТОД ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ ОТ МНОГО ГОЛЕМИ ПАРТИДИ ИЛИ ПАРТИДИ, СЪХРАНЯВАНИ И ТРАНСПОРТИРАНИ ПО НАЧИН, ПРИ КОЙТО ВЗЕМАНЕТО НА ПРОБИ ОТ ЦЯЛАТА ПАРТИДА НЕ Е ОСЪЩЕСТВИМО

8.1. Общи принципи

В случай че начинът на транспортиране или съхранение на дадена партида не позволява да се вземат точкови проби от цялата партида, за предпочитане е вземането на проби от такива партиди да се извърши, докато партидата е в движение.

При големи складови помещения, предназначени за съхраняване на фуражи, операторите следва да бъдат насърчавани да инсталират съответно оборудване в склада, което позволява (автоматично) вземане на проби от цялата складирана партида.

Когато се прилагат процедурите за вземане на проби, предвидени в настоящата точка, операторът в сектора на фуражите или неговият представител биват осведомени за процедурата. Ако операторът в сектора на фуражите или неговият представител оспорят тази процедура за вземане на проби, те трябва да дадат възможност на компетентния орган да вземе проби от цялата партида за сметка на оператора.

8.2. Големи партии, транспортирани с кораб

8.2.1. Динамично вземане на проби от големи партии, транспортирани с кораб

За предпочитане е вземането на проби от големи партии на кораби да се извършва, докато продуктът е в движение (динамично вземане на проби).

Вземането на проби трябва да се извършва по трюмове (единици, които могат физически да бъдат отделени). Трюмовете обаче се изпразват частично един след друг, така че след прехвърлянето в съоръженията за съхранение първоначалното физическо разделяне вече не съществува. Поради това вземането на проби може да се извършва в зависимост от първоначалното физическо разделяне или в зависимост от разделянето след прехвърляне в съоръженията за съхранение.

▼ M9

Разтоварването на кораба може да продължи няколко дни. Обикновено вземането на проби се извършва на равномерни интервали по време на цялото разтоварване. Официалният инспектор обаче не винаги може или е целесъобразно да присъства на вземането на проби по време на цялото разтоварване. Поради това се разрешава да се вземат проби от част от цялата партида (опробвана част от партида). Броят на точковите проби се определя, като се вземе предвид размерът на опробваната част от партида.

Когато се вземат проби от част от партида фураж от една и съща категория или с едно и също описание и се установи, че тази част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС, се приема, че констатациите се отнасят до всички фураж от тази партида, освен ако след щателна оценка не се окаже неоснователно да се счита, че останалата част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС.

Дори когато официалната проба се взема автоматично, присъствието на инспектор е необходимо. Когато обаче автоматичното вземане на проби се извършва по предварително зададени параметри, които не могат да бъдат променени по време на вземането на пробите, и точковите проби се събират в запечатан с пломба съд, което предотвратява всякакви потенциални измами, то присъствието на инспектор се изисква само в началото на вземането на проби, всеки път, когато съдът с пробите се сменя, и в края на вземането на пробите.

8.2.2. *Статично вземане на проби от партиди, транспортирани с кораб*

Ако вземането на проби се извършва статично, трябва да се прилага същата процедура като предвидената по отношение на съоръжения за съхранение (силози), достъпни отгоре (вж. точка 8.4.1).

Пробите се вземат от достъпната част (отгоре) на партидата/трюма. Броят на точковите проби се определя, като се вземе предвид размерът на опробваната част от партида. Когато се вземат проби от част от партида фураж от една и съща категория или с едно и също описание и се установи, че тази част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС, се приема, че констатациите се отнасят до всички фураж от тази партида, освен ако след щателна оценка не се окаже неоснователно да се счита, че останалата част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС.

8.3. **Вземане на проби от големи партиди, съхранявани в складове**

Пробите се вземат от достъпната част на партидата. Броят на точковите проби се определя, като се вземе предвид размерът на опробваната част от партида. Когато се вземат проби от част от партида фураж от една и съща категория или с едно и също описание и се установи, че тази част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС, се приема, че констатациите се отнасят до всички фураж от тази партида, освен ако след щателна оценка не се окаже неоснователно да се счита, че останалата част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС.

8.4. **Вземане на проби от съоръжения за складиране (силози)**

8.4.1. *Вземане на проби от силози, които са (лесно) достъпни отгоре*

Пробите се вземат от достъпната част на партидата. Броят на точковите проби се определя, като се вземе предвид размерът на опробваната част от партида. Когато се вземат проби от част от партида фураж от една и съща категория или с едно и също описание и се установи, че тази част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС, се приема, че констатациите се отнасят до всички фураж от тази партида, освен ако след щателна оценка не се окаже неоснователно да се счита, че останалата част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС.

▼ **M9**

8.4.2. *Вземане на проби от силози, които не са достъпни отгоре (затворени силози)*

8.4.2.1. Силози, които не са достъпни отгоре (затворени силози), с размер > 100 тона

Пробите от фуражи, съхранявани в такива силози, не могат да се вземат статично. Поради това, ако от фуража в силоза трябва да бъдат взети проби, а пратката не може да бъде преместена, с оператора трябва да се постигне договореност той да информира инспектора кога силовът ще бъде разтоварен, с цел да се направи възможно вземането на проби докато фуражът е в движение.

8.4.2.2. Силози, които не са достъпни отгоре (затворени силози), с размер < 100 тона

Процедурата за вземане на проби включва пускането на количество от 50—100 kg в съд и вземането на пробите от него. Размерът на съставната проба съответства на цялата партида, а броят на точковите проби се определя от количеството, пуснато от силоза в съда за вземане на проби. Когато се вземат проби от част от партида фураж от една и съща категория или с едно и също описание и се установи, че тази част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС, се приема, че констатациите се отнасят до всички фураж от тази партида, освен ако след щателна оценка не се окаже неоснователно да се счита, че останалата част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС.

8.5. **Вземане на проби от насипни фуражи в големи затворени контейнери**

Често от такива партии могат да се вземат проби само в момента на разтоварване. В някои случаи разтоварването е невъзможно на пункта за внос или контрол и поради това пробите следва да се вземат, когато контейнерите се разтоварват.

9. **ИНСТРУКЦИИ ОТНОСНО ВЗЕМАНЕТО, ПОДГОТОВКАТА И ОПАКОВАНЕТО НА ПРОБИТЕ**

9.1. **Общи положения**

Пробите се вземат и се подготвят без излишно забавяне, като се спазват изискваните предпазни мерки, за да се избегне подмяна или замърсяване на продукта. Инструментите, повърхностите и съдовете за поставяне на пробите трябва да са чисти и сухи.

9.2. **Точкови проби**

Точковите проби трябва да се вземат произволно от цялата опробвана част от партида, а размерите им трябва да са приблизително еднакви.

Размерът на точковите проби е най-малко 100 грама или 25 грама при тревни или груби фуражи с ниска относителна плътност.

Ако в съответствие с правилата за процедурата за вземане на проби, установени в точка 8, трябва да бъдат взети по-малко от 40 точкови проби, размерът на точковите проби се определя в зависимост от изисквания размер на съставната проба, който трябва да бъде постигнат (вж. точка 6).

В случай на вземане на проби от малки партии пакетирани фуражи, когато в съответствие с количествените изисквания трябва да се вземе ограничен брой точкови проби, за точкова проба се приема съдържанието на една оригинална единица, която не надвишава 1 kg или един литър.

В случай на вземане на проби от пакетирани фуражи, съставени от малки единици (напр. < 250 g), размерът на точковата проба зависи от размера на единицата.

▼ **M9**

В случай на проби от фуражи, предлагани за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, размерът на точковата проба зависи от размера на единицата и може в отделни случаи да съдържа по-малко от 100 g или 100 ml.

9.2.1. *Насипни фуражи*

Когато е уместно, пробите могат да се вземат при преместване на опробваната част от партида (товарене или разтоварване).

9.2.2. *Пакетирани фуражи*

След като се избере необходимият брой единици за вземане на проби, както е указано в т. 5, част от съдържанието на всяка единица се отделя с помощта на сонда или лопатка. Ако е необходимо, пробите се вземат, след като единиците се изсипят отделно една от друга.

9.2.3. *Хомогенни или поддаващи се на хомогенизация течни или полутечни фуражи*

След като се избере необходимият брой единици за вземане на проби, както е указано в т. 5, съдържанието им се хомогенизира, ако е необходимо, и от всяка единица се взема определено количество.

Точковите проби могат да се вземат при източване на съдържанието.

9.2.4. *Неподдаващи се на хомогенизация течни или полутечни фуражи*

След като се избере необходимият брой единици за вземане на проби, както е указано в т. 5, се вземат проби от различни нива.

Пробите могат да се вземат също така при източване на съдържанието, след отстраняване на първите количества.

И в двата случая общият обем на взетите проби не трябва да бъде под 10 литра.

9.2.5. *Фуражни блокчета и минерални буци за близане*

След като бъде избран необходимият брой блокчета или буци за вземане на проби, както е указано в т. 5, може да се вземе част от всяко блокче или буца. В случай на съмнение, че блокчето или буцата е нехомогенно(а), като проба може да се вземе цялото блокче или цялата буца.

За блокчета или буци за близане, които са с тегло до 1 kg, за точкова проба се приема съдържанието на едно блокче или една буца.

9.3. **Подготовка на съставните проби**

Точковите проби се смесват, за да се образува една-единствена съставна проба.

9.4. **Подготовка на крайните проби**

Материалът в съставната проба се смесва грижливо ⁽¹⁾.

Всяка проба се поставя в подходящ контейнер/съд. Вземат се всички необходими предпазни мерки, за да се не се допуснат промени в състава на пробата или замърсяването и увреждането ѝ по време на транспортиране или съхранение.

9.4.1. *Равномерно разпределени вещества*

В случай на контрол на съставки или вещества, разпределени равномерно във фуража, съставната проба може да бъде представително редуцирана до не по-малко от 2,0 kg или 2,0 литра (редуцирана проба) ⁽²⁾, за предпочитане с помощта на механично или автоматично делително устройство. За целите на контрола за наличие на остатъчни вещества от пестициди в бобови растения,

⁽¹⁾ Ако има бучки, те се смачкват (ако е необходимо, те се отделят от общата маса, а след това се връщат в пробата).

⁽²⁾ Освен в случай на груби и тревни фуражи с ниска относителна плътност.

▼ M9

зърна от зърнени култури и черупкови плодове минималният размер на редуцираната проба е 3 kg. Ако естеството на фуража не позволява използването на делително устройство или делително устройство не е на разположение, пробата може да бъде редуцирана чрез метода на четвъртинките.

От съставната проба или от редуцираните проби след това се вземат крайни проби (контролна, защитна и, евентуално, арбитражна) с приблизително еднакво количество, отговарящи на количествените изисквания в т. 7.

9.4.2. *Неравномерно разпределени вещества*

В случай на контрол на съставки, включващи генетично модифициран материал, или вещества, които могат да са разпределени неравномерно във фуражите, съставната проба е както следва:

- i) напълно хомогенизирана. След това от хомогенизираната съставна проба се вземат крайни проби (контролна, защитна и, евентуално, арбитражна) с приблизително еднакво количество, отговарящи на количествените изисквания в т. 7; или
- ii) редуцирана до не по-малко от 2 kg или 2 литра ⁽¹⁾ с механично или автоматично делително устройство. Само в случай, че естеството на фуража не позволява използването на делително устройство, пробата може да бъде редуцирана, ако е необходимо, чрез метода на четвъртинките. За целите на контрола за наличие на генетично модифициран материал в рамките на Регламент (ЕС) № 619/2011 редуцираната проба трябва да съдържа най-малко 35 000 семена/зърна, за да може да се получат крайни проби за правоприлагане, защита и, евентуално, арбитражна, с най-малко 10 000 семена/зърна (вж. бележка под линия (**)) в т. 6 и бележка под линия (*) в т. 7).

От редуцираната проба след това се вземат крайни проби с приблизително еднакво количество, отговарящи на количествените изисквания от т. 7.

9.5. **Опаковане на пробите**

Контейнерите или опаковките се запечатват с пломба/печат и се етикетират по такъв начин, че да не могат да бъдат отваряни, без да се увреди пломбата/печата. Целият етикет трябва да е захванат от пломбата/печата. Алтернативно пробата може да се постави в съд или контейнер, който може да бъде затворен по такъв начин, че да не може да бъде отворен, без съдът или контейнерът да се увредят необратимо, което осуетява повторното използване на съда или контейнера.

9.6. **Изпращане на пробите до лабораторията**

Пробата се изпраща без излишно забавяне на определената лаборатория за анализи, заедно с необходимите за анализа данни.

10. **ПРОТОКОЛ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИТЕ**

За всяко вземане на проба се изготвя протокол, по който недвусмислено се идентифицират опробваната част от партида и нейният размер.

В протокола се посочват и евентуални отклонения от процедурата за вземане на проби, предвидена в настоящия регламент.

Протоколът се предоставя на разположение на официалната контролна лаборатория, както и на оператора в сектора на фуражите и/или лабораторията, определена от него.

⁽¹⁾ Освен в случай на груби и тревни фуражи с ниска относителна плътност.

▼ M9

11. ПРОБА ОТ ФУРАЖ, ПРЕДЛАГАН ЗА ПРОДАЖБА ЧРЕЗ СРЕДСТВА ЗА КОМУНИКАЦИЯ ОТ РАЗСТОЯНИЕ

- В случай на вземане на проба от фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, фуражът се изисква от оператора в сектора на фуражите посредством техники за комуникация от разстояние. В този случай, когато изисква фураж, компетентният орган не е задължен да се идентифицира пред оператора в сектора на фуражите с официална самоличност, а може да използва прикрита такава.
- Съставната проба и крайните проби от пробата от фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, трябва да бъдат взети незабавно след получаване на пратката от упълномощени за целта лица. За да се получи съставната проба, трябва да бъдат взети подходящ брой точкови проби, взети на случаен принцип от цялото получено количество и старателно смесени/хомогенизирани, в съответствие, доколкото е възможно, с принципите, определени в точка 5 и в точки 9.2. и 9.3. Ако фуражите са пакетирани в отделни единици, следва да бъдат получени най-малко 4 единици, от които трябва да бъде взета най-малко една точкова проба. Ако се докаже за всеки отделен случай, че получените единици произхождат от различни партии, броят на единиците, от които ще бъдат взети проби, трябва да бъде намален и ограничен до единиците, произхождащи от една и съща партия. В случай на анализ на проба от фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, за определяне на съставки или вещества, които са неравномерно разпределени във фуражите, броят на точковите проби трябва да бъде най-малко 2,5 пъти по-голям от броя на пробите, които се анализират за определяне на равномерно разпределени във фуражите вещества.

От съставната проба се вземат съответните крайни проби (контролна, защитна и, евентуално, арбитражна), в съответствие, доколкото е възможно, с принципите, определени в точка 9.4, а в протокола за вземане на пробите се посочва, че пробата е от фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние. След това компетентният орган незабавно информира оператора в сектора на фуражите за вземането на пробите. Операторът в сектора на фуражите бива също така уведомен че, когато е възможно, компетентният орган пази на негово разположение, на точно определено място, една проба (защитна) или я изпраща на оператора в сектора на фуражите, или на лабораторията, посочена от оператора в сектора на фуражите в съответствие с действащите норми на национално равнище.

Ако пробата се изпраща директно в официалната лаборатория, крайната проба трябва да бъде подготвена и запечатана в лабораторията, от упълномощени за целта лица или в тяхно присъствие. Веднага след образуването на крайните проби протоколът за вземане на проби от фуражи, предлагани за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, се изпраща на компетентния орган, който информира оператора в сектора на фуражите за вземането на пробите.

Счита се, че количеството, предоставено на компетентния орган от оператора в сектора на фуражите, представлява част от партия фураж от една и съща категория или с едно и също описание. В съответствие с член 15 от Регламент (ЕО) № 178/2002 на Европейски парламент и на Съвета ⁽¹⁾, ако се установи, че тази част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС, се приема, също и в случай на проба от фураж, предлаган за продажба чрез средства за комуникация от разстояние, че констатациите се отнасят до всички фураж от тази партия, освен ако след щателна оценка (когато е целесъобразно – при проверка на място) не се окаже неоснователно да се счита, че останалата част от партидата не отговаря на изискванията на ЕС.

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 178/2002 на Европейския парламент и на Съвета от 28 януари 2002 г. за установяване на общите принципи и изисквания на законодателството в областта на храните, за създаване на Европейски орган за безопасност на храните и за определяне на процедури относно безопасността на храните (ОВ L 31, 1.2.2002 г., стр. 1).

▼ M9

ПРИЛОЖЕНИЕ II

ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ ОТНОСНО МЕТОДИТЕ ЗА АНАЛИЗ НА
ФУРАЖИТЕ

А. ПОДГОТОВКА НА ПРОБИТЕ ЗА АНАЛИЗ

1. Цел

Описаните в настоящото приложение процедури се отнасят до подготовката за анализ на пробите, изпратени на лабораториите за контрол след вземане на проби, проведено в съответствие с разпоредбите в приложение I.

Лабораторните проби трябва да бъдат подготвени по такъв начин, че претеглените количества, предвидени в методите за анализ, да са хомогенни и представителни за крайните проби.

В допълнение към процедурите, описани в настоящото приложение, се следват и указанията за подготовка на проби, предвидени в стандарт EN ISO 6498.

2. Необходими предпазни мерки

Процедурата, която трябва да се следва за подготовка на пробите, зависи от използваните методи за анализ и от контролираните съставки или вещества. Поради това е от изключително значение следваната процедура за подготовка на пробите да е подходяща за използвания метод за анализ и за контролираните съставки или вещества.

Всички необходими действия трябва да се извършват по такъв начин, че да се избегне, доколкото е възможно, замърсяване на пробата или промени в нейния състав.

Стриването, разбъркването и пресяването се извършват без забавяне с минимално излагане на пробата на въздух и светлина. Не се използва оборудване за смилане и стриване, което може да предизвика значително загряване на пробата.

За фуражите, които са особено чувствителни към загряване, се препоръчва ръчно стриване. Следи се също самият апарат да не бъде източник на замърсяване.

В някои случаи хомогенизацията на пробата чрез смесване с вода до получаване на каша с помощта на високоскоростен смесител осигурява по-хомогенни подпроби, отколкото сухата хомогенизация или сухото стриване, по-специално в случай на хетерогенно разпределени химични вещества. Хомогенни подпроби обаче могат да се получат и посредством хомогенизиране чрез достатъчно сухо стриване.

В някои случаи, като например при определянето на мораво рогче от ръж, вредни ботанически примеси и т.н., хомогенизирането на пробата не може да се извърши чрез стриване, а само чрез достатъчно смесване на пробата.

Ако подготовката не може да се проведе без значими промени в съдържанието на влага на пробата, се определя съдържанието на влага преди и след подготовката в съответствие с метода, описан в част А от приложение III.

3. Процедура

3.1. Обща процедура

Аликвотната част за изследване се взема от крайната хомогенизирана проба. Методите на конуса и на четвъртинките не се препоръчват, защото при тях може да се получат аликутни части с голяма грешка при разделяне.

▼ **M9****3.1.1. Фуражи, които могат да бъдат смлени във вида, в който са**

- Крайната проба се разбърква и се прибира в подходящ чист и сух контейнер, снабден с херметична запушалка. Разбърква се отново, за да се гарантира пълна хомогенизация, непосредствено преди да се вземе претегленото количество за анализ (аликвотната част за изследване).

3.1.2. Фуражи, които могат да бъдат смлени след изсушаване

- Освен ако не е посочено друго в методите за анализ, крайната проба се изсушава по такъв начин, че съдържанието на влага в нея да се сведе до 8—12 %, като се прилага процедурата за предварително изсушаване, описана в точка 4.3 от метода за определяне на влагата, посочен в част А от приложение III. След това се процедира, както е посочено в точка 3.1.1.

3.1.3. Течни или полутечни фуражи

- Крайната проба се взема в подходящ чист и сух контейнер, снабден с херметична запушалка. Разбърква се старателно, за да се гарантира пълна хомогенизация, непосредствено преди да се вземе претегленото количество за анализ (аликвотната част за изследване).

3.1.4. Други фуражи

- Към крайни проби, които не могат да бъдат подготвени по някоя от посочените по-горе процедури, се прилага всяка друга процедура, с която може да се гарантира, че претеглените количества за анализ (аликвотните части за изследване) са хомогенни и представителни за крайните проби.

3.2. Специална процедура в случай на изследване чрез визуална проверка или микроскопско изследване или когато цялата съставна проба се хомогенизира

- В случай на изследване чрез визуална проверка (без микроскоп) за изследването се използва цялата съставна или крайна проба.
- В случай на микроскопско изследване лабораторията може да редуцира съставната проба или допълнително да редуцира редуцираната проба. Крайната защитна и, евентуално, крайната арбитражна проба се вземат след процедура, еквивалентна на процедурата, която се следва при крайната проба за правоприслагане.
- Когато цялата съставна проба е хомогенизирана, крайните проби се вземат от хомогенизираната съставна проба.
- За определянето на мораво рогче от ръж и вредни ботанически примеси крайната проба трябва да бъде разделена на 2 подпроби с равно тегло приблизително 500 g. Изследва се една подпроба. Когато резултатът от подпробите е равен или по-малък от 50 % (аналитичен праг) от максимално допустимото количество, пробата е в съответствие с максимално допустимото количество. Ако резултатът е над 50 % от максимално допустимото количество, трябва да се изследва друга подпроба и средната стойност от резултатите на 2 подпроби се използва за проверка на съответствието с максимално допустимото количество.

4. Съхранение на пробите

Пробите се съхраняват при температура, при която не се променя техният състав. Пробите, предназначени за анализ на витамини или вещества, които са особено чувствителни към светлина, се съхраняват при такива условия, че светлината да не оказва неблагоприятно въздействие върху тях.

▼ M9

Б. РАЗПОРЕДБИ ОТНОСНО РЕАКТИВИТЕ И АПАРАТУРАТА, ИЗПОЛЗВАНИ ПРИ МЕТОДИТЕ ЗА АНАЛИЗ

1. Освен ако не е посочено друго в методите за анализ, всички аналитични реактиви трябва да са чисти за анализ (ч.з.а.). Когато се прави анализ за определяне на микроелементи, чистотата на реактивите трябва да се проверява чрез празна проба. В зависимост от получените резултати може да се наложи по-нататъшно пречистване на реактивите.
2. Всяка дейност, която включва приготвянето на разтвори, разреждане, изплакване или измиване, посочена в методите за анализ без указание за естеството на употребявания разтворител или разредител, предполага, че трябва да се използва вода. По принцип се използва деминерализирана или дестилирана вода. В особени случаи, които са посочени в методите за анализ, тя трябва да бъде подложена на специално пречистване.
3. Като се има предвид обичайната апаратура в контролните лаборатории, в методите за анализ се посочват само онези инструменти и апарати, които са специални или изискват специфичен начин на използване. Те трябва да са чисти, особено когато трябва да се определят много малки количества от веществата.

В. ПРИЛАГАНЕ НА МЕТОДИТЕ ЗА АНАЛИЗ И ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Процедура за екстракция

При няколко метода е необходима конкретна процедура за екстракция. По принцип могат да бъдат приложени други процедури за екстракция, освен посочената в метода процедура, при условие че е доказано, че използваната процедура за екстракция има еквивалентна екстракционна ефективност за анализираната матрица, каквато има и упоменатата в метода процедура.

2. Процедура за почистване

При няколко метода е необходима конкретна процедура за почистване. По принцип могат да бъдат приложени други процедури за почистване, освен посочената в метода процедура, при условие че е доказано, че използваната процедура за почистване има еквивалентна почиствателна ефективност за анализираната матрица, каквато има и упоменатата в метода процедура.

3. Брой на определянията

В случай на анализ на нежелани вещества, ако резултатът от първото определяне е значително ($> 50\%$) по-нисък от стойността, която подлежи на контрол, не са необходими допълнителни определяния, при условие че се прилагат подходящите процедури за осигуряване на качеството. В други случаи е необходим повторен анализ (второ определяне), за да се изключи възможността за вътрешно кръстосано замърсяване на пробите или случайно обръкване на пробите. За извършването на допълнителна оценка се използва средната стойност от двете определяния.

В случай на контрол на минималното или максималното количество фуражни добавки, ако резултатът от първото определяне е по-висок от минимално допустимото или по-нисък от максимално допустимото количество, не са необходими допълнителни определяния, при условие че се прилагат подходящите процедури за осигуряване на качеството. В други случаи е необходим повторен анализ (второ определяне), за да се изключи възможността за вътрешно кръстосано замърсяване на пробите или случайно обръкване на пробите. За извършването на допълнителна оценка се използва средната стойност от двете определяния.

В случай на контрол на декларирано съдържание на вещество или съставка, ако резултатът от първото определяне потвърди декларираното съдържание, т.е. ако аналитичният резултат попада в интервала на допустимото отклонение за декларираното съдържание, не са необходими допълнителни определяния, при условие че се прилагат подходящи процедури за осигуряване на качеството. В други случаи е необходим повторен анализ (второ определяне), за

▼ M9

да се изключи възможността за вътрешно кръстосано замърсяване на пробите или случайно объркване на пробите. При контрол на декларирано съдържание на вещество или съставка, ако резултатът от първото определяне потвърди декларираното съдържание, т.е. ако аналитичният резултат попада в интервала на допустимото отклонение за декларираното съдържание, не са необходими допълнителни определяния, при условие че се прилагат подходящи процедури за осигуряване на качеството.

В някои случаи въпросният интервал на допустимото отклонение е определен от законодателството, като Регламент (ЕО) № 767/2009 и Регламент (ЕС) 2019/4 на Европейския парламент и на Съвета ⁽¹⁾.

4. Протокол за използвания метод за анализ

В протоколът за анализ се посочва използваният метод за анализ.

5. Протокол за аналитичния резултат

Аналитичният резултат се изразява по начина, посочен в метода за анализ, със съответен брой значещи цифри, и, ако е необходимо, се коригира в зависимост от съдържанието на влага в крайната проба преди подготовката.

Повечето регулаторни стойности (напр. максимално или минимално допустимо количество) в законодателството на ЕС в областта на фуражите са определени по отношение на фураж със съдържание на влага 12 %. Поради това, за да се оцени в тези случаи измереният върху пробата аналитичен резултат спрямо регулаторната стойност, той трябва първо да бъде разделен на съдържанието на сухо вещество в пробата (в %), умножено по 88, както е посочено в следната формула:

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

където:

M_c : съдържание на влага в пробата (в %). Следователно $100 - M_c$ представлява съдържанието на сухо вещество в пробата (в %).

R_{ana} : аналитичен резултат, измерен върху пробата

$R_{12\%}$: резултат за фураж със съдържание на влага 12 %; да се оцени спрямо регулаторната стойност.

В допълнение към това, ако са изпълнени следните условия:

- аналитичният резултат е значително ($> 50\%$) по-нисък или по-висок от информацията върху етикета/специфичната стойност, която подлежи на контрол, (в зависимост от това дали информацията върху етикета/специфичната стойност е максимално или минимално допустимо количество);
- съдържанието на влага на опробвания фураж в известно и може да се заключи че корекцията в съдържанието на влага няма да повлияе на резултата от оценката,

тогава, при условие че се прилагат подходящите процедури за осигуряване на качеството и анализът се прави само за да се провери съответствието със законовите разпоредби, корекцията в зависимост от съдържанието на влага може да бъде пропусната (напр. в случаите когато не е определена специфична или регулаторна стойност), освен когато това се изисква за целите на тълкуването.

Ако аналитичният резултат се коригира в зависимост от съдържанието на влага, съответната неопределеност на измерването също трябва да бъде коригирана съгласно същата процедура.

⁽¹⁾ Регламент (ЕС) 2019/4 на Европейския парламент и на Съвета от 11 декември 2018 г. относно производството, пускането на пазара и употребата на медикаментозни фуражи, за изменение на Регламент (ЕО) № 183/2005 на Европейския парламент и на Съвета и за отмяна на Директива 90/167/ЕИО на Съвета (ОВ L 4, 7.1.2019 г., стр. 1).

▼ M9

В случай на определяне на мораво рогче или вредни ботанически примеси чрез визуална проверка/микроскопско изследване, корекция в зависимост от съдържанието на влага не е необходима.

6. **Неопределеност на аналитично измерване и стойност на аналитичен добив при анализ на нежелани вещества**

По отношение на нежеланите вещества по смисъла на Директива 2002/32/ЕО, продукти, предназначени за хранене на животни, се считат за неотговарящи на изискването за максимално съдържание, ако се прецени, че стойността на аналитичния резултат като средна стойност от две независими определяния, отнасящи се до фураж със съдържание на влага 12 %, надвишава максималното съдържание, като се отчита разширената неопределеност на аналитичното измерване при използване на множител на покритие 2, който дава доверителна вероятност приблизително 95 %, и корекция за аналитичен добив. Това означава, че за да се оцени спазването на максималното съдържание, се използва анализираната концентрация, след като се коригира със стойността на аналитичен добив и след изваждане на разширената неопределеност на аналитичното измерване. Тази процедура е приложима единствено в случаи, когато методът за анализ позволява оценка на разширената неопределеност на измерването и корекция за аналитичен добив. (напр. тя не се изисква в случай на визуална проверка/микроскопско изследване)

В отсъствието на специфична нормативна уредба на национално равнище, ако аналитичният резултат от взетата защитна проба надвишава максималното съдържание (без да се отчита разширената неопределеност на аналитичното измерване), това потвърждава установеното посредством контролната проба несъответствие.

Аналитичният резултат се отчита, както следва (доколкото използваният метод за анализ позволява да се оцени разширената неопределеност на аналитичното измерване):

- a) коригиран за аналитичен добив, когато е целесъобразно и уместно, като се посочва корекцията. Следва да се посочи стойността на аналитичен добив, освен когато в процедурата поначало е включена корекция за изместване, където „изместване“ е разликата между измерената стойност и еталонната концентрация. Корекцията за аналитичен добив не е необходима, ако стойността на аналитичен добив е между 90 и 110 %.
- b) като „ $x \pm U$ “, където x е аналитичният резултат, а U е разширената неопределеност на аналитичното измерване при използване на множител на покритие 2 ⁽¹⁾, който дава доверителна вероятност от около 95 %.

Ако обаче аналитичният резултат е значително (> 50 %) по-нисък от стойността, която подлежи на контрол, и при условие че се прилагат подходящите процедури за осигуряване на качеството и анализът се прави само за да се провери съответствието със законовите разпоредби, отчитането на стойността на аналитичен добив и на разширената неопределеност на аналитичното измерване може да бъде пропуснато (напр. в случаите когато не е определена специфична или регулаторна стойност), освен когато информацията за неопределеността на измерването е необходима за целите на тълкуването.

7. **Неопределеност на аналитичното измерване и степен на аналитичен добив при анализ на съдържанието на фуражни добавки**

За целите на проверката на съответствието с разрешеното минимално и максимално съдържание на фуражни добавки наличието на фуражни добавки се счита за несъответстващо на изискването за минимално и максимално допустимо съдържание, ако се прецени, че стойността на аналитичния резултат, като средна стойност от две независими определяния, по отношение на фураж със съдържание на влага 12 %:

- надвишава максимално допустимото съдържание, като се отчитат разширената неопределеност на аналитичното измерване и корекцията за аналитичен добив. Това означава, че за да се

⁽¹⁾ Доверителният интервал от 95 % може да бъде постигнат чрез използване на друг коефициент, като например коефициента t (коефициент на Стюдент).

▼ M9

оцени спазването на максималното съдържание, се използва анализираната концентрация (т.е. средната стойност от две определяния), след като се коригира със стойността на аналитичния добив и след изваждане на разширената неопределеност на аналитичното измерване.

- е под минимално допустимото съдържание, като се отчитат разширената неопределеност на аналитичното измерване и корекцията за аналитичен добив. Това означава, че за да се оцени спазването на максималното съдържание, се използва анализираната концентрация (т.е. средната стойност от двете определяния), след като се коригира със стойността на аналитичния добив и след добавяне на разширената неопределеност на аналитичното измерване.

В отсъствието на специфична нормативна уредба на национално равнище, ако аналитичният резултат от взетата защитна проба надвишава максималното съдържание (без да се отчита разширената неопределеност на аналитичното измерване), това потвърждава установеното посредством контролната проба несъответствие.

Аналитичният резултат се отчита, както следва (доколкото използваният метод за анализ позволява да се оцени разширената неопределеност на аналитичното измерване):

- а) коригиран за аналитичен добив, когато е целесъобразно и уместно, като се посочва корекцията. Следва да се посочи стойността на аналитичен добив, освен когато в процедурата поначало е включена корекция за изместване, където „изместване“ е разликата между измерената стойност и еталонната концентрация. Корекцията за аналитичен добив не е необходима, ако стойността на аналитичен добив е между 90 и 110 %.
- б) като „ $x \pm U$ “, където x е аналитичният резултат (средната стойност от две определяния), а U е разширената неопределеност на аналитичното измерване при използване на множител на покритие 2 ⁽¹⁾, който дава доверителна вероятност приблизително 95 %.

⁽¹⁾ Доверителният интервал от 95 % може да бъде постигнат чрез използване на друг коефициент, като например коефициента t (коефициент на Стьюдент).

▼ M9

ПРИЛОЖЕНИЕ III

МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ С ЦЕЛ КОНТРОЛ НА СЪСТАВА НА
ФУРАЖНИТЕ СУРОВИНИ И НА КОМБИНИРАНИТЕ ФУРАЖИ

А. ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВЛАГА

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на влага във фуражите. В случай, че фуражът съдържа летливи вещества, като например органични киселини, трябва да се отбележи, че заедно със съдържанието на влага се откриват и редица летливи вещества.

Методът не обхваща анализа на млечните продукти в качеството им на фуражни суровини, нито на комбинираните фуражи, съставени предимно от млечни продукти, или анализа на животинските и растителните мазнини и масла или на маслодайните семена и плодове.

Определянето на съдържанието на влага в маслодайни семена се прави по метода, предвиден в стандарт EN ISO 665 „Определяне съдържанието на влага и летливи вещества“, като соевите зърна трябва да бъдат смлени преди определянето на съдържанието на влага.

2. Принцип

Пробата се изсушава при точно определени условия, които варират в зависимост от вида фураж. Загубата на тегло се определя посредством претегляне. При работа с твърди фуражи, които имат високо съдържание на влага, е необходимо да се извърши предварително сушене.

3. Апаратура

- 3.1. Мелница от неабсорбиращ влага материал, която е лесна за почистване, позволява бързо, равномерно раздробяване без забележимо загряване, предотвратява контакта с външния въздух, доколкото това е възможно, и отговаря на изискванията, определени в т. 4.1.1 и т. 4.1.2 (напр. чукови микромелници или микромелници с водно охлаждане, сглобяеми конусни мелници, нискооборотни мелници или мелници със зъбни колела).
- 3.2. Аналитични весни за измерване с точност до 1 mg.
- 3.3. Сухи съдове от некородиращ метал или от стъкло, с капаци, осигуряващи херметично затваряне; работна повърхност, позволяваща разстилане на изследваната проба с плътност около 0,3 g/cm².
- 3.4. Електрическа изотермична пещ (± 2 °C) с подходяща вентилация, която осигурява бързо регулиране на температурата ⁽¹⁾.
- 3.5. Регулируема електрическа вакуумна пещ, оборудвана с маслена помпа и с механизъм за вкарване на горещ сух въздух или с изсушаващ агент (напр. калциев оксид).
- 3.6. Ексикатор с дебела перфорирана метална или порцеланова плоча, съдържащ ефикасен изсушаващ агент.

⁽¹⁾ За изсушаването на зърнени култури, брашно, булгур и едросляно брашно, фурната трябва да има такъв топлинен капацитет, че при предварително загряване до 131 °C, да достигне отново тази температура за по-малко от 45 минути след като в нея е било сложено максималното количество проби за едновременно сушене. Вентилацията трябва да е такава, че когато толкова проби от обикновено жито, колкото може да събере, се сушат в продължение на два часа, резултатите се различават от онези, които се получават след четиричасово сушене, с по-малко от 0,15 %.

▼ M9**4. Процедура**

N.B.: Описаните в този раздел операции следва да се извършват незабавно след отварянето на опаковките с проби. Провежда се най-малко двукратен анализ.

4.1. Подготовка**4.1.1. Фуражи, различни от изброените в т. 4.1.2 и т. 4.1.3.**

Вземат се най-малко 50 g от пробата. При необходимост това количество се раздробява или разделя така, че да се избегне промяна в съдържанието на влага (вж. т. 6).

4.1.2. Зърнени култури и булгур

Вземат се най-малко 50 g от пробата. Смилат се на ситни частици, от които поне 50 % да могат да преминат през сито с големина на отворите 0,5 mm и от които най-много 10 % да не могат да преминат през сито с кръгли отвори с размер 1 mm.

4.1.3. Фуражи в течно или пастообразно състояние и фуражи, състоящи се предимно от масла и мазнини.

Вземат се около 25 g от пробата, претеглят се с точност до 10 mg, добавя се съответното количество безводен пясък, претеглено с точност до 10 mg, и се разбърква до получаването на хомогенен продукт.

4.2. Сушене

Изушава се съд (т. 3.3.), заедно с капака, в пещ, настроена на 103 °C за 30 min +/- 1 min. Пробата се изважда от пещта и се оставя в ексикатора да се охлади до температурата на околната среда (т. 3.6.).

4.2.1. Фуражи, различни от изброените в т. 4.2.2 и т. 4.2.3.

Съдът се претегля заедно с капака си с точност до 1 mg. В претегления съд се измерват с точност до 1 mg около 5 g от пробата и се разстилат равномерно. Съдът, без капака, се поставя в предварително загрята до 103 °C пещ. За да се предотврати нежелателното спадане на температурата, съдът се поставя в пещта възможно най-бързо. Пробата се оставя да съхне четири часа, считано от времето на възстановяване на температурата от 103 °C. Пещта се отваря, капакът незабавно се поставя обратно върху съда, който се изважда от пещта, оставя се да се охлади за 30—45 min в ексикатора (т. 3.6) и се претегля с точност до 1 mg.

За фуражи, състоящи се предимно (> 50 %) от масла и мазнини с животински и растителен произход, пробите се сушат 30 min по-дълго при температура 103 °C. Разликата между стойностите за съдържанието на влага, получени от двете претегления, не трябва да надвишава 0,1 %.

4.2.2. Зърнени култури, брашно, булгур и грис

Съдът се претегля заедно с капака си с точност до 0,5 mg. В претегления съд се измерват с точност до 1 mg около 5 g от раздробената проба и се разстилат равномерно. Съдът, без капака, се поставя в предварително загрята до 130 °C пещ. За да се предотврати нежелателното спадане на температурата, съдът се поставя в пещта възможно най-бързо. Пробата се оставя да съхне четири часа, считано от времето на възстановяване на температурата от 130 °C. Пещта се отваря, капакът незабавно се поставя обратно върху съда, който се изважда от пещта, оставя се да се охлади за 30—45 min в ексикатора (т. 3.6) и се претегля с точност до 1 mg.

▼ M9

- 4.2.3. Комбинирани фуражи, съдържащи повече от 4 % захароза или лактоза: фуражни суровини, като например плодове на рожков, хидролизирани зърнени продукти, малцови семена, парченца изсушено цвекло, рибни и захарни разтворими компоненти;

Съдът се претегля заедно с капака си с точност до 0,5 mg. В претегления съд се измерват с точност до 1 mg около 5 g от пробата и се разстилат равномерно. Съдът, без капака, се поставя в предварително загрята от 80 °C до 85 °C вакуумна пещ (т. 3.5). За да се предотврати нежелателното спадане на температурата, съдът се поставя в пещта възможно най-бързо.

Налигането се увеличава до 100 Torr и пробата се оставя да се суши четири часа при това налягане на поток горещ сух въздух или посредством изсушаващ агент (около 300 g за 20 проби). Във втория случай вакуумната помпа се изключва, когато се достигне предписаното налягане. Времето на сушене се отчита от момента на възстановяване на температурата от 80 °C—85 °C в пещта. Налигането в пещта внимателно се понижава и изравнява с атмосферното. Пещта се отваря, капакът веднага се поставя обратно върху съда, съдът се изважда от пещта, оставя се да се охлади за 30—45 min в ексикатора (т. 3.6) и се претегля с точност до 1 mg. Суши се още 30 min във вакуумна пещ на 80 °C—85 °C и се претегля отново. Разликата между стойностите за съдържанието на влага, получени от двете претегляния, не трябва да надвишава 0,1 %.

- 4.3. *Предварително (частично) сушене*

„Влажните“ фуражи с масова част на сухата материя под 85 % (напр. груби фуражи, единен смесен порцион, (не)течни храни) трябва да бъдат частично изсушени преди да бъдат подложени на фино стриване за целите на анализа на техните стабилни вещества; за нестабилните вещества частично изсушаване не е възможно.

Частичното сушене може да се извърши чрез използване на лабораторна пещ с принудителна вентилация, на микровълнова фурна или чрез лиофилизация. Освен в случаите на частично сушене чрез лиофилизация, целта е фуражът да се изсуши, като същевременно температура на пробата се поддържа под 60 °C, така че химическият състав да бъде засегнат в минимална степен. Сушенето при температури над 60 °C причинява химични изменения във фуражите (напр. разграждане на белтъците). Преди измерването на частта на сухото вещество изсушеният фураж се оставя да се уравни при стайна температура за около 15 минути, за да бъдат сведени до минимум потенциалните изменения във влажността, които могат да възникнат по време на стриване и съхранение. Сушенето при температури под 60 °C не отстранява цялата вода от фуража; следователно полученият от (първоначалното) частично сушене продукт не съставлява общото сухо вещество във фуража. Когато се определят други химични съставки, след изсушаване подпробата се стрива и анализира за съдържание на (крайно) сухо вещество от частично изсушената проба (остатъчна влажност от 3 % до 15 %).

Поради това се препоръчва двуетапна процедура за определяне на сухото вещество. Първо се определя частичното съдържание на сухо вещество (ако е по-малко от 85 % сухо вещество), а след това се определя остатъчното съдържание на сухо вещество върху стрита проба за изследване и частичното сухо вещество се умножава по останалото сухо вещество, за да се определи общото съдържание на сухо вещество.

5. **Изчисляване на резултатите**

Съдържанието на влага (X) като процент от пробата се изчислява по следните формули:

▼ **M9**5.1. *Изсушаване без предварително сушене*

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

където:

 m = първоначално тегло в грамове на пробата за анализ, m_0 = тегло в грамове на сухата проба за анализ.5.2. *Изсушаване с предварително сушене* ⁽¹⁾

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

където:

 m = първоначално тегло в грамове на пробата за анализ, m_1 = тегло в грамове на пробата за анализ след предварителното сушене, m_2 = тегло в грамове на пробата за анализ след раздробяване или стриване, m_0 = тегло в грамове на сухата проба за анализ.5.3. *Повторяемост*

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени с една и съща проба, не трябва да надвишава 0,2 % от абсолютната стойност на влагата, освен за мокри храни за домашни любимци и дъвчащи предмети за кучета, където разликата не трябва да надвишава 0,5 % от абсолютната стойност на влагата.

6. **Забележки**

В случай, че се наложи раздробяване, и ако това промени съдържанието на влага в продукта, резултатите от анализа на съставките на фуража трябва да бъдат коригирани въз основа на съдържанието на влага на пробата в първоначалното ѝ състояние.

Б. ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВЛАГА В ЖИВОТИНСКИ И РАСТИТЕЛНИ МАЗНИНИ И МАСЛА

1. **Цел и обхват**

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на вода и летливи вещества, съдържащи се в животински и растителни мазнини и масла.

2. **Принцип**

Пробата се суши, докато теглото ѝ стане постоянно (намаляването на теглото при две последователни претегляния трябва да е по-малко или равно на 1 mg), при 103 °C. Загубата на тегло се определя посредством претегляне.

3. **Апаратура**

- 3.1. Плоскородно блюдо от корозионно устойчив материал с диаметър от 8 до 9 cm и с приблизителна височина 3 cm.
- 3.2. Термометър с усилен резервоар и разширение в горната част на капилара, градуиран от около 80 °C до най-малко 110 °C и дълъг приблизително 10 cm.
- 3.3. Пясъчна баня или електрически котлон.

⁽¹⁾ За повече подробности относно изчислението се прави позоваване на стандарт EN ISO 6498– Фуражи. Указания за подготовка на проби.

▼ **M9**

3.4. Ексикатор, съдържащ ефикасен изсушаващ агент.

3.5. Аналитични везни.

4. **Процедура**

В сухото претеглено блюдо (т. 3.1), в което е поставен термометърът (т. 3.2) се претеглят с точност до 1 mg около 20 g от хомогенизираната проба. Пробата се нагрява върху пясъчната баня или котлона (т. 3.3), като се разбърква непрекъснато с термометъра така, че да се достигне температура 90 °C за около 7 min.

Нагряването се намалява, като се наблюдава честотата, с която се появяват мехурчета от дъното на блюдото. Температурата не трябва да надвишава 105 °C. Разбъркването продължава, като се стърже дъното на блюдото, докато престанат да се образуват мехури.

За да се осигури напълно отстраняване на влагата, нагряването се повтаря няколко пъти до 103 °C ± 2 °C с охлаждане до 93 °C между нагряванията. След това се оставя да се охлади до стайна температура в ексикатора (т. 3.4) и се претегля. Тази операция се повтаря, докато загубата на тегло между две последователни претегляния спре да надвишава 2 mg.

N.B. Увеличаване на теглото на пробата след повторно нагряване е индикация за окисляване на мазнината. В този случай резултатът се пресмята, като за основа се взема претеглянето, проведено непосредствено преди теглото да започне да нараства.

5. **Изчисляване на резултатите**

Съдържанието на влага (X) като процент от пробата се пресмята по следната формула:

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

където:

m = теглото в грамове на пробата за анализ;

m_1 = теглото в грамове на блюдото със съдържанието му преди нагряване;

m_2 = теглото в грамове на блюдото със съдържанието му след нагряване.

Резултати по-ниски от 0,05 % трябва да бъдат записани като „по-ниски от 0,05 %“.

Повторяемост

Разликата във влажността между резултатите в две паралелни определения, проведени върху една и съща проба, не трябва да надвишава 0,1 % като абсолютна стойност.

В. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА АЗОТ И ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА СУРОВ ПРОТЕИН

1. **Цел и обхват**

Настоящият метод дава възможност да се определи общото количество суров протеин в храните за животни на базата на съдържанието на азот, определяно по метода на Келдал ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Съдържанието на азот може да бъде определено във всички фуражи, но е възможно коефициентът на преобразуване 6,25 да не е приложим за изчисляване на съдържанието на суров протеин за фуражни суровини от насекоми (по-нисък коефициент на преобразуване), както и за определени храни за домашни любимци и за белтъци, извлечени от кръвна плазма (по-висок коефициент на преобразуване)

▼ **M9****2. Принцип**

Пробата се изварява със сярна киселина в присъствие на катализатор. Киселинният разтвор се алкализирa с разтвор на натриев хидроксид. Амонякът се дестилира и събира в определено количество сярна киселина, излишъкът от която се титрува със стандартен разтвор на натриев хидроксид.

Като алтернатива, отделеният амоняк се дестилира в излишък от разтвор на борна киселина, след което се титрува с разтвор на солна или сярна киселина.

3. Реагенти

- 3.1. Калиев сулфат.
- 3.2. Катализатор: меден (II) оксид CuO или меден (II) сулфат пентахидрат, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Цинк на гранули.
- 3.4. Сярна киселина $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Сярна киселина, стандартен обемен разтвор, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Сярна киселина, стандартен обемен разтвор, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Сярна киселина, стандартен обемен разтвор, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Индикатор метилово червено; разтварят се 300 mg метилово червено в 100 ml етанол, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v).(v/v)}$.
- 3.9. Разтвор на натриев хидроксид (може да се използва технически чист разтвор) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.
- 3.10. Натриев хидрооксид, стандартен обемен разтвор, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Натриев хидрооксид, стандартен обемен разтвор, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Пемза на гранули, измита в солна киселина и запалена
- 3.13. Ацетанилид (точка на топене = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, съдържание на N = 10,36 %).
- 3.14. Захароза (без азот).
- 3.15. Борна киселина (H_3BO_3).
- 3.16. Индикаторен разтвор на метилово червено: разтварят се 100 mg метилово червено в 100 ml етанол или метанол.
- 3.17. Разтвор на бромокрезолово зелено: разтварят се 100 mg бромокрезолово зелено в 100 ml етанол или метанол.
- 3.18. Разтвор на борна киселина (10 g/l—40 g/l в зависимост от използваната апаратура).

Когато еквивалентният пункт се определя по колориметричен метод, индикаторните разтвори с метилово червено и бромокрезолно зелено се добавят към разтворите на борна киселина. Ако е приготвен 1 литър разтвор на борна киселина, преди коригирането на обема се добавят 7 ml индикаторен разтвор на метилово червено (т. 3.16) и 10 ml разтвор на бромокрезолно зелено (т. 3.17).

В зависимост от използваната вода, рН на разтвора на борна киселина може да се различава в различните партии. рН на разтвора на борна киселина трябва да бъде между 4,3 и 4,7. Често е необходимо да направи корекция с малък обем алкално вещество, за да се получи надеждна празна проба

▼ **M9**

Забележка: Добавянето на около 3 ml до 4 ml NaOH (т. 3.11) в 1 литър борна киселина с концентрация 10 g/l обикновено осигурява добра корекция. Разтворът се съхранява при стайна температура и се пази от светлина и източници на амонячни пари по време на съхранението.

- 3.19. Солна киселина, стандартен обемен разтвор, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Забележка: Могат да се използват други концентрации с друго обемно съотношение (т. 3.5, т. 3.6, т. 3.7, т. 3.10, т. 3.11 и т. 3.19), ако се направи съответна корекция при изчисляването. Концентрациите се изписват винаги с четири знака след десетичната запетая.

4. Апаратура

Апаратурата следва да бъде подходяща за изваряване, дестилация и титруване по процедурата на Келдал.

5. Процедура

5.1. Изваряване

Отмерва се 1 g от пробата с точност до 0,001 g и пробата се прехвърля в колбата на апарата за изваряване. Прибавят се 15 g калиев сулфат (т. 3.1), подходящо количество катализатор (т. 3.2) (от 0,3 до 0,4 меден (II) оксид или от 0,9 до 1,2 g меден (II) сулфат пентахидрат), 25 ml сярна киселина (т. 3.4) и ако е необходимо, няколко гранули пемза (т. 3.12) и се разбърква.

Колбата се нагрива първоначално бавно, като от време на време се завърта, докато съдържанието се овъгли и пяната изчезне; след това се нагрива по-интензивно, докато течността започне непрекъснато да кипи. Нагриването е подходящо, ако врящата киселина се кондензира по стените на колбата. Следи се стените да не прегреят и към тях да не прилепват органични частици.

Когато разтворът се избистри и стане бледозелен, продължава да се вари още два часа, след което се оставя да се охлади.

5.2. Дестилация

Внимателно се добавя достатъчно вода, за да се осигури пълно разтваряне на сулфатите. Оставя се да се охлади и след това се прибавят няколко гранули цинк (т. 3.3), ако е необходимо. Действа се според т. 5.2.1 или т. 5.2.2.

5.2.1. Дестилация в сярна киселина

В събирателната колба на апарата за дестилация се поставя точно измерено количество от 25 ml сярна киселина (т. 3.5) или (т. 3.7) в зависимост от предполагаемото съдържание на азот. Добавят се няколко капки индикатор метилово червено (т. 3.8).

Колбата, в която е проведено изваряването, се свързва към хладника на дестилационния апарат и изходът на хладника се потапя в течността в събирателната колба на дълбочина поне 1 cm (вж. забележка в т. 8.3). Бавно се изсипват 100 ml разтвор на натриев хидроксид (т. 3.9) в колбата за изваряване, без загуба на амоняк (вж. забележка в т. 8.1). Колбата се нагрива, докато амонякът се дестилира.

5.2.2. Дестилация в борна киселина

Когато титруването на съдържанието на амоняк в дестилата се осъществява ръчно, се прилага описаната по-долу процедура. Когато дестилационният модул е напълно автоматизиран и включва титруването на съдържанието на амоняк в дестилата, се следват инструкциите на производителя за работата на дестилационния модул.

▼ **M9**

Поставя се събирателна колба, в която има 25 ml—30 ml разтвор на борна киселина (т. 3.18), под изхода на хладника по такъв начин, че изходната тръба да е под равнището на излишното количество разтвор на борна киселина. Настройва се дестилационният модул да подава 50 ml разтвор на натриев хидрооксид (т. 3.9). Дестилационният модул се пуска в действие в съответствие с инструкциите на производителя и се дестилира амонякът, отделен при добавянето на разтвора на натриев хидрооксид. Дестилатът се събира в приемащия разтвор на борна киселина. Количеството на дестилата (времето на дестилация на парите) зависи от количеството азот в пробата. Следват се инструкциите на производителя.

Забележка: В полуавтоматичните дестилационни модули добавянето на излишъка от натриев хидрооксид и дестилацията на парите се извършват автоматично.

5.3. *Титруване*

Действа се според т. 5.3.1 или т. 5.3.2.

5.3.1. *Сярна киселина*

Излишното количество сярна киселина в събирателната колба се титрува с разтвор от натриев хидроксид (т. 3.10 или т. 3.11) в зависимост от концентрацията на използваната сярна киселина, докато се достигне еквивалентния пункт.

5.3.2. *Борна киселина.*

Съдържанието на събирателната колба се титрува със стандартен обем разтвор на солна киселина (т. 3.19) или със стандартен обем разтвор на сярна киселина (т. 3.6), като се използва бюрета и се отчита количеството на използвания титрационен агент.

Когато се използва колориметричен метод за определяне на еквивалентния пункт, крайната точка е достигната, когато в съдържанието се появи първата розова следа. Показанията от бюретата се отчитат с точност до 0,05 ml. Може да се подпомогне визуализацията на еквивалентния пункт чрез използването на осветена магнитна бъркалка или фотометричен детектор.

Този процес може да се проведе автоматично, като се използва дестилатор на парите с автоматично титруване.

При работа с конкретен дестилатор или дестилатор/титратор се следват указанията на производителя.

Забележка: Когато се използва автоматизирана система за титруване, титруването започва веднага след началото на дестилацията и се използва разтвор на борна киселина (т. 3.18) с концентрация 1 %.

Когато се използва изцяло автоматизирана дестилация, автоматичното титруване на амоняка може да се осъществи също така чрез определяне на еквивалентния пункт като се използва система за потенциометрично определяне на pH.

В този случай се използва автоматичен титратор с pH-метър. pH-метърът се калибрира правилно в обхвата от pH 4 до pH 7, като се следват обичайните лабораторни процедури за калибриране на pH.

Еквивалентният пункт на титруването на pH е достигнат, когато pH достигне стойност 4,6, като това е най-високата точка на кривата на титруване (инфлексна точка).

5.4. *Тест с празна проба*

За да се потвърди, че реагентите не съдържат азот, се извършва контролен тест с празна проба (изваряване, дестилация и титруване) с 1 g захароза (т. 3.14) вместо с пробата.

▼ **M9****6. Изчисляване на резултатите**

Изчисляването се извършва в съответствие с т. 6.1 или т. 6.2.

6.1. Изчисляване на титруването в съответствие с т. 5.3.1.

Съдържанието на суров протеин като процент от теглото на пробата се пресмята по следната формула:

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

където:

V_0 = е обемът (в ml) на NaOH (т. 3.10 или т. 3.11), използван в теста с празната проба.

V_1 = е обемът (в ml) на NaOH (т. 3.10 или т. 3.11), използван при титруването на пробата.

c = е концентрацията (в mol/l) на натриев хидроксид (т. 3.10 или т. 3.11).

m = е теглото (в g) на пробата.

6.2. Изчисляване на титруването в съответствие с т. 5.3.2.**6.2.1. Титруване със солна киселина**

Съдържанието на суров протеин като процент от теглото на пробата се пресмята по следната формула:

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

където:

m = е теглото (в g) на частта от пробата за анализ;

c = е концентрацията (в mol/l) на стандартния обем разтвор на сярна киселина (т. 3.19);

V_0 = е обемът (в ml) на солната киселина, използвана при анализа на празната проба;

V_1 = е обемът (в ml) на солната киселина, използвана при анализа на частта от пробата за анализ.

6.2.2. Титруване със сярна киселина

Съдържанието на суров протеин като процент от теглото на пробата се пресмята по следната формула:

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

където:

m = е теглото (в g) на частта от пробата за анализ;

c = е концентрацията (в mol/l) на стандартния обем разтвор на сярна киселина (т. 3.6)

V_0 = е обемът (в ml) на сярната киселина (т. 3.6), използвана при анализа на контролната проба

V_1 = е обемът (в ml) на сярната киселина (т. 3.6), използвана при анализа на частта от пробата за анализ

▼ M9**7. Проверка на метода****7.1. Повторяемост**

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени с една и съща проба, не трябва да превишава:

- 0,4 % като абсолютна стойност при съдържание на суров протеин под 20 %;
- 2,0 % от по-високата стойност, за съдържание на суров протеин от 20 % до 40 %;
- 0,8 % като абсолютна стойност при съдържание на суров протеин над 40 %.

7.2. Възпроизводимост

Разликата между резултатите от две определяния, извършени с една и съща проба в различни лаборатории, не трябва да надвишава:

- 1,8 % като абсолютна стойност при съдържание на суров протеин под 20 %;
- 9,0 % от по-високата стойност, за съдържание на суров протеин от 20 % до 40 %;
- 3,6 % като абсолютна стойност при съдържание на суров протеин над 40 %.

7.3. Точност

Анализът (изваряване, дестилация и титруване) се извършва с подходящо количество ацетанилид (т. 3.13) (напр. от 0,2 до 0,3 g) в присъствието на 1 g захароза (т. 3.14); 1 g ацеталинид консумира 14,80 ml сярна киселина (т. 3.5). Аналитичният добив трябва да бъде поне 99 %.

8. Забележки

- 8.1. Апаратурата трябва да бъде от ръчен, полуавтоматичен или автоматичен тип. Ако апаратурата изисква прехвърляне между етапите на изваряване и дестилация, прехвърлянето трябва да се извърши без загуба. Ако колбата на дестилационния апарат не е снабдена с делителна фуния, натриевият хидроксид се добавя веднага преди свързването на колбата с хладника, като течността се изсипва бавно по стената.
- 8.2. Ако изваряваното вещество се втвърди, определянето се повтаря с по-големи от указаните в т. 5.1. количества сярна киселина (т. 3.4).
- 8.3. За продукти с ниско съдържание на азот обемът на сярната киселина (т. 3.7), който трябва да се постави в събирателната колба, може да се намали, ако е необходимо, до 10 или 15 ml и да се допълни до 25 ml с вода.
- 8.4. За рутинни анализи могат да се използват алтернативни методи за определяне на съдържанието на суров протеин, но референтен е описаният в настоящата част В метод на Келдал. Еквивалентността между резултатите, получени с алтернативния метод (напр. DUMAS), и резултатите, получени с референтния метод, трябва да бъде доказвана поотделно за всяка матрица. Тъй като резултатите, получени с алтернативния метод, дори и след проверка на еквивалентността, могат леко да се различават от резултатите, получени с референтния метод, необходимо е да се посочи в протокола от анализа кой метод за определяне на суров протеин е използван.

▼ M9**Г. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КАРБАМИД****1. Цел и обхват**

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на карбамид във фуражите за преживни животни.

2. Принцип

Пробата се суспендира във вода с избистрящ агент. Суспензията се филтрира. Съдържанието на карбамид във филтрата се определя след добавяне на 4-диметиламинобензалдеhid (4-DMAB) чрез измерване на оптичната плътност при дължина на вълната 420 nm.

3. Реагенти

3.1. Разтвор на 4-диметиламинобензалдеhid: разтваря се 1,6 g 4-DMAB в 100 ml 96 % етанол и се добавят 10 ml солна киселина (ρ_{20} 1,19 g/ml). Този реактив се съхранява най-много две седмици.

3.2. Разтвор на Карез I: 21,9 g цинков ацетат $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 3 g безводна оцетна киселина се разтварят във вода. Допълва се до 100 ml с вода.

3.3. Разтвор на Карез II: разтварят се във вода 10,6 g калиев фероцианид $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Допълва се до 100 ml с вода.

3.4. Активен въглен, който не абсорбира карбамид (да се провери).

3.5. Разтвор на карбамид с концентрация 0,1 % (w/v).

4. Апаратура

4.1. Смесител (барабанен): приблизително 35—40 грm.

4.2. Епруветки: 160 × 16 mm, снабдени с шлифовани стъклени запушалки.

4.3. Спектрофотометър.

5. Процедура**5.1. Анализ на пробата**

Претеглят се с точност до 1 mg 2 g от пробата и заедно с 1 g активен въглен (т. 3.4) се поставят в мерителна колба с вместимост 500 ml. Добавят се 400 ml вода и 5 ml разтвор на Карез I (т. 3.2), разбъркват се в продължение на около 30 секунди и след което се добавят 5 ml разтвор на Карез II (т. 3.3). Размесват се в продължение на тридесет минути в барабанныя смесител. Допълва се до марката с вода, разклаща се и се филтрира.

Взимат се 5 ml от прозрачните безцветни филтрата, поставят се в епруветки с шлифовани стъклени запушалки, добавя се 5 ml разтвор на 4-DMAB (т. 3.1) и се размесва. Поставят се епруветките във водна баня при 20 °C (+/- 4 °C). След петнадесет минути със спектрофотометър при 420 nm се измерва оптичната плътност на пробния разтвор. Сравнява се с контролния разтвор на реагентите.

5.2. Калибрационна крива

Взимат се обеми от 1, 2, 4, 5 и 10 ml от карбамидния разтвор (т. 3.5), поставят се в мерителни колби с вместимост 100 ml и се допълват до марката с вода. Взимат се по 5 ml от всеки разтвор, добавят се 5 ml разтвор на 4-DMAB (т. 3.1) към всеки от тях, хомогенизират се и се измерва оптичната плътност, както е указано по-горе, като се сравняват с контролен разтвор, съдържащ 5 ml 4-DMAB и 5 ml вода, която не съдържа карбамид. Построява се калибрационната крива.

▼ **M9****6. Изчисляване на резултатите**

Определя се количеството карбамид в пробата, като се използва калибрационната крива.

Резултатът се изразява в милиграми карбамид на килограм проба.

7. Оценка на метода**7.1. Повторяемост**

Разликата между резултатите от две определяния, извършени с една и съща проба, в една и съща лаборатория и от един и същ оператор, не трябва да надвишава:

— При 420 nm

— 50 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид от 3 000 mg/kg до по-малко от 5 000 mg/kg.

— 25 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид от 5 000 mg/kg до по-малко от 7 000 mg/kg;

— 20 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид над 7 000 mg/kg или повече;

— При 435 nm

— 40 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид от 3 000 mg/kg до по-малко от 5 000 mg/kg.

— 25 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид от 5 000 mg/kg до по-малко от 9 000 mg/kg.

— 5 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид над 9 000 mg/kg или повече;

7.2. Възпроизводимост

Разликата между резултатите от две определяния, извършени с една и съща проба в различни лаборатории и/или от различни оператори, не трябва да надвишава:

— При 420 nm

— 3 000 mg/kg, като абсолютна стойност при съдържание на карбамид от 3 000 mg/kg до по-малко от 12 000 mg/kg;

— 4 500 mg/kg, като абсолютна стойност при съдържание на карбамид от 12 000 mg/kg или повече.

— При 435 nm

— 50 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид от 3 000 mg/kg до по-малко от 8 000 mg/kg.

— 25 % от по-високата стойност, за съдържание на карбамид от 8 000 mg/kg или повече;

8. Резултати от съвместно изследване

Беше организирано междулабораторно съпоставяне в рамките на ЕС, в което взеха участие 18 лаборатории. Пет положителни проби от комбинирани фуражи за преживни животни (в таблици 1 и 2, наричани MAT) бяха анализирани (в рамките на 1 анализ) посредством неизвестни за оператора паралелни проби, а един комбиниран фураж без добавки, за преживни животни, беше подложен на еднократен анализ.

Изчисленията за границите на повторяемост (r) и възпроизводимост (R), както са определени в международните насоки, бяха извършени след премахване на отклоняващите се стойности с помощта на анализ на вариациите на валидните стойности.

▼ M9

Резултатите от изчисленията на показателите за оценка на метода (повторяемост, възпроизводимост) са представени в следната таблица: В никоя от изследваните проби, включително във фуража без добавки, не бяха открити фалшиви положителни или фалшиви отрицателни резултати.

Таблица 1

Характеристики за оценка на ефективността на метода за карбамид, измерени при $\lambda = 420$ nm във всички материали

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Овце	Говеда	Овце	Овце	Говеда
Целева масова част (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Средна масова част. (mg kg^{-1})	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Стандартно отклонение на възпроизводимостта s_R (mg kg^{-1})	1 141	1 303	985	994	1 711
Стандартно отклонение на повторяемостта s_r (mg kg^{-1})	723	601	549	712	737
Относително стандартно отклонение на възпроизводимостта RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Относително стандартно отклонение на повторяемостта RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Граница на възпроизводимост, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Граница на повторяемост, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Таблица 2

Характеристики за оценка на ефективността на метода за карбамид, измерени при $\lambda = 435$ nm във всички материали

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Овце	Говеда	Овце	Овце	Говеда
Целева масова част (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Средна масова част. (mg kg^{-1})	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Стандартно отклонение на възпроизводимостта s_R (mg kg^{-1})	706	1 194	675	745	1 378
Стандартно отклонение на повторяемостта s_r (mg kg^{-1})	570	628	613	196	167
Относително стандартно отклонение на възпроизводимостта RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Относително стандартно отклонение на повторяемостта RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Граница на възпроизводимост, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Граница на повторяемост, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ M9

9. **Забележки**

- 9.1. В случай на съдържание карбамид над 3 %, пробата се намалява до 1 g или първоначалният разтвор се разрежда така, че да не съдържа повече от 50 mg карбамид в 500 ml.
- 9.2. В случай на ниско съдържание на карбамид, пробата се увеличава дотогава, докато се получи прозрачен и безцветен филтрат.
- 9.3. Горните резултати от съвместните изпитвания не показват значителна разлика в точността между измерванията на карбамид при 420 nm и при 435 nm.

Д. ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА АМИНОКИСЕЛИНИ (БЕЗ ТРИПТОФАН)

Методите за анализ, които следва да се използват за определяне на аминокиселини (без триптофан), са:

- EN ISO 13903 Фуражи – Определяне на съдържанието на аминокиселини,
- EN ISO 17180 Фуражи – Определяне на лизин, метионин и треонин в търговски аминокиселинни продукти и предварителни смеси (премикси) ⁽¹⁾,
- методът за анализ, описан в т. 1 и 10 по-надолу.

1. **Цел и обхват**

Настоящият метод служи за определяне с помощта на анализатор за аминокиселини на съдържанието на свободни (синтетични и естествени) аминокиселини и на общото съдържание на аминокиселини (участващи в пептидна връзка и свободни) във фуражните суровини, в комбинираните фуражи и в премиксите, които съдържат под 10 % ⁽²⁾ от всяка аминокиселина. Методът е приложим за следните аминокиселини: цист(е)ин, метионин, лизин, треонин, аланин, аргинин, аспарагинова киселина, глутаминова киселина, глицин, хистидин, изолевцин, левцин, фенилаланин, пролин, серин, тирозин и валин.

Методът не позволява да се направи разграничение между солите на аминокиселините и не може да различи D- и L-форми на аминокиселините. Той не важи за определяне на съдържанието на триптофан или на хидрокси аналози на аминокиселините.

2. **Принцип**2.1. *Свободни аминокиселини*

Свободните аминокиселини се извличат с разредена солна киселина. Извлечените паралелно с тях азотисти макромолекули се утаяват със сяро-салицилова киселина и отстраняват посредством филтриране. Филтрираният разтвор се коригира до pH 2,20. Аминокиселините се отделят посредством йонообменна хроматография и съдържанието им се определя посредством нинхидринова реакция с фотометрично отчитане при 570 nm.

2.2. *Общо съдържание на аминокиселини*

Процедурата, която ще бъде избрана, зависи от вида на аминокиселините, които се изследват. Цист(е)инът и метионинът трябва да бъдат окислени съответно до цистеинова киселина и метионин сулфон преди хидролизата. Тирозинът трябва да се определя в продукти от хидролизата в неокислени проби. Всички останали аминокиселини, изброени в т. 1 (Цел и обхват), могат да бъдат определени както в окислените, така и в неокислените проби.

⁽¹⁾ Методът за анализ, предвиден в EN 17180, е приет за алтернативен метод за целите на официалния контрол за определяне на аминокиселини във фуражи, съдържащи над 10 % аминокиселини.

⁽²⁾ Методът не е валидиран посредством съвместно изпитване за премикси, съдържащи над 10 % фуражни добавки. Независимо от това, той е приложим и за тези матрици, с подходящите минимални изменения, при условие че впоследствие бъде валидиран в съответната лаборатория. За допълнителна информация вж. <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

Окислението се извършва при 0 °C със смес от пероксимравчена киселина и фенол. Излишъкът от окислителния реагент се разгражда с натриев дисулфит. Пробата, независимо дали е окислена или неокислена, се подлага на хидролиза със солна киселина (т. 3.20) в продължение на 23 часа. Продуктът на хидролизата се коригира до pH 2,20. Аминокиселините се отделят посредством йонообменна хроматография и се определят посредством нинхидринова реакция с фотометрично отчитане при 570 nm (440 nm за пролина).

3. Реагенти

Трябва да се използва двойно дестилирана вода или вода с равносвойно качество (проводимост < 10 µS/cm).

- 3.1. Водороден прекис, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Мравчена киселина, w (w/w) = 98-100 %.
- 3.3. Фенол.
- 3.4. Натриев дисулфит.
- 3.5. Натриев хидроксид.
- 3.6. Дихидрат на 5-сулфосалициловата киселина.
- 3.7. Солна киселина, плътност приблизително 1,18 g/ml.
- 3.8. Тринариев цитрат дихидрат.
- 3.9. 2,2'-тиодиетанол (тиодигликол).
- 3.10. Натриев хлорид
- 3.11. Нинхидрин.
- 3.12. Петролен етер, диапазон на кипене: 40—60 °C
- 3.13. Норлевцин или друго съединение, подходящо за използване като вътрешен стандарт.
- 3.14. Газообразен азот (< 10 ppm кислород).
- 3.15. 1-октанол
- 3.16. Аминокиселини.
 - 3.16.1. Стандартни вещества на аминокиселините, посочени в точка 1 (Цел и обхват). Химически чисти съединения, които не съдържат кристализационна вода. Преди употреба се изсушават във вакуум над P₂O₅ или H₂SO₄ в продължение на 1 седмица.
 - 3.16.2. Цистеинова киселина.
 - 3.16.3. Метионин сулфон.
- 3.17. Разтвор на натриев хидроксид, c = 7,5 mol/l:

Разтварят се 300 g NaOH (т. 3.5) във вода и се допълва с вода до 1 литър.
- 3.18. Разтвор на натриев хидроксид, c = 1 mol/l:

Разтварят се 40 g NaOH (т. 3.5) във вода и се допълва с вода до 1 литър.
- 3.19. Разтвор на мравчена киселина и фенол:

Смесват се 889 g мравчена киселина (т. 3.2) със 111 g вода и се добавят 4,73 g фенол (т. 3.3).

▼ **M9**

- 3.20. Смес за хидролиза, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, съдържаща 1 g фенол на литър:

Добавя се 1 g фенол (т. 3.3) към 492 ml HCl (т. 3.7) и се допълва с вода до 1 литър.

- 3.21. Смес за екстракция, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, съдържаща 2 % тиодигликол: вземат се 8,2 ml HCl (т. 3.7), разреждат се с около 900 ml вода, добавят се 20 ml тиодигликол (т. 3.9) и се допълва с вода до 1 литър (да не се смесват директно веществата в т. 3.7 и т. 3.9).

- 3.22. 5-сулфосалицилова киселина $\beta = 6 \text{ \%}$:

Разтварят се 60 g 5-сулфосалицилова киселина (т. 3.6) във вода и се допълва с вода до 1 литър

- 3.23. Смес за окисляване (пероксимравчена киселина и фенол):

Смесват се 0,5 ml водороден прекис (т. 3.1) с 4,5 ml разтвор от мравчена киселина и фенол (т. 3.19) в малка бехерова чаша. Инкубира се при температура $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ — $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 1 час, за да се образува пероксимравчена киселина, след което се охлажда в ледена водна баня (15 min) преди да се добави към пробата.

Внимание: Да се избягва контакт с кожата и да се носи защитно облекло.

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

Разтварят се 19,61 g натриев цитрат (т. 3.8), 5 ml тиодигликол (т. 3.9), 1 g фенол (т. 3.3) и 16,50 ml HCl (т. 3.7) в приблизително 800 ml вода. Стойността на pH се регулира на 2,20. Допълва се до 1 l с вода.

- 3.25. Буферни разтвори за отмиване, приготвени в съответствие с указанията за използвания уред за анализ (т. 4.9).

- 3.26. Нинхидринов реагент, приготвен в съответствие с указанията за използвания уред за анализ (т. 4.9).

- 3.27. Стандартни разтвори на аминокиселини. Тези разтвори се съхраняват при температура под $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 3.27.1. Изходен стандартен разтвор на аминокиселини (т. 3.16.1).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ от всяка в солна киселина.

Могат да бъдат купени в търговската мрежа.

- 3.27.2. Изходен стандартен разтвор на цистеинова киселина и на метионин сулфон, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Разтварят се 0,2115 g цистеинова киселина (т. 3.16.2) и 0,2265 g метионин сулфон (т. 3.16.3) в цитратния буферен разтвор (т. 3.24) в градуирана колба от 1 литър и се допълва до този обем с цитратен буферен разтвор. Да се съхранява под $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ не повече от 12 месеца. Този разтвор не се използва, ако изходният стандартен разтвор (т. 3.27.1) съдържа цистеинова киселина и метионин сулфон.

- 3.27.3. Изходен стандартен разтвор на вътрешния стандарт, напр. норлевцин, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Разтварят се 0,6560 g норлевцин (т. 3.13) в цитратния буферен разтвор (3.24) в градуирана колба и се допълва до 250 ml с цитратен буферен разтвор. Да се съхранява под $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ не повече от 6 месеца.

▼ **M9**

3.27.4. Калибрационен разтвор на стандартни аминокиселини за употреба с хидролизатите, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ цистеинова киселина и метионин сулфон и $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ за другите аминикиселини. Разтварят се 2,2 g натриев хлорид в бехерова чаша (т. 3.10) от 100 ml в 30 ml цитратен буферен разтвор (т. 3.24). Добавят се 4,00 ml изходен стандартен разтвор на аминокиселини (т. 3.27.1), 4,00 ml изходен стандартен разтвор на цистеинова киселина и метионин сулфон (т. 3.27.2) и 0,50 ml изходен стандартен разтвор на вътрешния стандарт (т. 3.27.3), ако се използва такъв. Коригира се до pH 2,20 с натриев хидроксид (т. 3.18).

Прехвърля се в градуирана колба от 50 ml, допълва се до марката с цитратен буферен разтвор (т. 3.24) и се разбърква.

Да се съхранява под 5 °C не повече от 3 месеца.

Вж. също забележка 9.1.

3.27.5. Калибрационен разтвор на стандартни аминокиселини за употреба с приготвени в съответствие с точка 5.3.3.1 хидролизати и за употреба с екстракти (т. 5.2). Калибрационният разтвор се приготвя в съответствие с т. 3.27.4, но не се добавя натриев хлорид.

Да се съхранява под 5 °C не повече от 3 месеца.

4. Апаратура

- 4.1. Облодънна колба с обем 100 или 250 ml, снабдена с обратен хладник.
- 4.2. Шише от боросиликатно стъкло от 100 ml с винтова капачка с гумена/тефлонова гарнитура (напр. Duran, Schott), което може да се използва в пещ.
- 4.3. Пещ с принудителна вентилация и температурен регулатор с точност по-висока от $\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4.4. pH-метър (три знака след десетичната запетая).
- 4.5. Мембранен филтър, 0,22 μm .
- 4.6. Центрофуга
- 4.7. Ротационен вакуумен изпарител.
- 4.8. Механична клатачна машина или магнитна бъркалка.
- 4.9. Уред за анализ на аминокиселини или уред за HPLC с йонообменна колона, устройство за нинхидрин, следколонна дериватизация и фотометричен детектор.

Колоната се запълва със сулфонирани полистиренови смоли, които могат да отделят аминокиселините една от друга и от други вещества, реагиращи положително на нинхидрин. Циркулацията на буферния разтвор и на нинхидриновия реагент се осигурява от помпи с устойчивост на потока от $\pm 0,5 \%$ за целия период, включващ както стандартното времетраене на калибрирането, така и извършване на анализа на пробата.

При някои уреди за анализ на аминокиселини може да се използва хидролизна процедура, при която хидролизатът е с концентрация на натрий $c = 0,8 \text{ mol/l}$ и съдържа цялата остатъчна мравчена киселина от етапа на окисляването. Други уреди не осигуряват задоволително отделяне на някои определени аминокиселини, ако хидролизатът съдържа излишък от мравчена киселина и/или високи концентрации на натриеви йони. В този случай количеството на киселината се намалява чрез изпарение до приблизително 5 ml след хидролизата и преди коригиране на киселинността. Изпарението се извършва във вакуумна среда при максимум 40 °C.

▼ **M9****5. Процедура****5.1. Подготовка на пробата**

Пробата се смилва, така че да може да премине през сито с отвори 0,5 mm. Пробите с голяма влажност трябва да се изсушат на въздух при температура най-много 50 °C или чрез лиофилизация преди смилането. Пробите с високо съдържание на мастни вещества се екстрахират с петролен етер (т. 3.12) преди смилането.

5.2. Определяне на свободни аминокиселини

Претегля се с точност до 0,2 mg подходящо количество (1—5 g) от подготвената проба (т. 5.1) в конусовидна колба и се добавят 100,0 ml от сместа за екстракция (т. 3.21). Разбърква се или се размесва в продължение на 60 min с механична клатачна машина или с магнитна бъркалка (точка 4.8). Остава се седиментът да се утаи и 10,0 ml от супернатанта се слага с пипета в бехерова чаша 100 ml.

Като се разбърква, се добавят 5,0 ml разтвор на сулфосалицилова киселина (т. 3.22), и с помощта на магнитната бъркалка разбъркването продължава още 5 min. Супернатантът се филтрира или центрофугира, така че да не остане никаква утайка. Поставят се 10,0 ml от получения разтвор в бехерова чаша 100 ml и с натриев хидроксид (т. 3.18) се коригира pH до 2,20, прехвърля се в мерителна колба с подходящ обем, като се използва цитратен буферен разтвор (т. 3.24) и се допълва до пълния обем с буферния разтвор (т. 3.24).

Ако се използва вътрешен стандарт, се добавя 1,00 ml от вътрешния стандарт (т. 3.27.3) за всеки 100 ml от крайния разтвор и се допълва до пълния обем с буферния разтвор (т. 3.24).

Пристъпва се към етапа на хроматографията в съответствие с точка 5.4.

Ако екстрактите няма да се използват през същия ден, те трябва да се съхраняват при температура под 5 °C.

5.3. Определяне на общото количество аминокиселини**5.3.1. Окисляване**

Претеглят се с точност до 0,2 mg между 0,1 и 1 g от подготвената проба (т. 5.1) във:

- облодънна колба с обем от 100 ml (т. 4.1) за октрита хидролиза (т. 5.3.2.3), или
- облодънна колба с обем 250 ml (т. 4.1), ако се изисква ниска концентрация на натрий (т. 5.3.3.1), или
- шише от 100 ml, снабдено с винтова капачка (точка 4.2) (за закрыта хидролиза, т. 5.3.2.4).

Претеглената част от пробата трябва да съдържа около 10 mg азот и не повече от 100 mg влага.

Колбата/шишето се слага в ледена водна баня и се охлажда до 0 °C, добавят се 5 ml от сместа за окисляване (т. 3.23) и се разбърква с помощта на стъклена шпатула със закривен връх. Колбата/шишето, в която/което се намира шпатулата, се запечатва херметично с филм, водната баня със запечатания съд се слага в хладилник при 0 °C и се оставя за 16 часа. След 16 часа се изважда от хладилника и излишният окислителен реагент се разлага чрез добавяне на 0,84 g натриев дисулфит (т. 3.4).

Пристъпва се към процедурата в т. 5.3.2.1

▼ M9**5.3.2. Хидролиза****5.3.2.1. Хидролиза на окислените проби**

Към окислената проба, подготвена в съответствие с т. 5.3.1 се добавят 25 ml от сместа за хидролизиране (т. 3.20), като се измиват всякакви остатъци от пробата, полепнали по стените на съда и шпатулата.

Според използваната процедура за хидролиза се процедира в съответствие с процедурата в т. 5.3.2.3 или в т. 5.3.2.4.

5.3.2.2. Хидролиза на неокислените проби

В облодънна колба с обем 100 ml или от 250 ml (т. 4.1) или в шише от 100 ml с винтова капачка (т. 4.2) се претеглят с точност до 0,2 mg между 0,1 и 1 g от подготвената проба (т. 5.1). Претеглената част от пробата трябва да съдържа около 10 mg азот. Внимателно се добавят 25 ml от сместа за хидролиза (т. 3.20) и се смесват с пробата. Процедира се в съответствие с процедурата в т. 5.3.2.3 или в т. 5.3.2.4.

5.3.2.3. Открита хидролиза

Добавят се 3 стъклени топчета към сместа в колбата (приготвена в съответствие с процедурата в т. 5.3.2.1 или в т. 5.3.2.2) и се вари с обратен хладник и при постоянно отделяне на мехурчета в продължение на 23 часа. След приключване на хидролизата, хладникът се изплаква с 5 ml цитратен буферен разтвор (т. 3.24). Колбата се откача и се охлажда в ледена баня.

Процедира се в съответствие с т. 5.3.3.

5.3.2.4. Затворена хидролиза

Шишето с приготвената съгласно т. 5.3.2.1 или т. 5.3.2.2 смес се поставя в сушилня (т. 4.3) при 110 °C. За да се избегне покачване на налягането (поради отделянето на газообразни вещества) и за да се предотврати избухване, през първия час винтовата капачка се поставя върху гърлото на съда без да се затваря. Да не се затваря съдът с капачката. След един час съдът се затваря с капачката и се оставя в сушилнята (т. 4.3) за 23 часа. След приключване на хидролизата, шишето се изважда от сушилнята, внимателно се отваря капачката на шишето и то се слага в ледена водна баня. Оставя се да се охлади.

В зависимост от процедурата за коригиране на pH (т. 5.3.3), съдържанието на шишето количествено се прехвърля в бехерова чаша от 250 ml или в облодънна колба от 250 ml, като се използва цитратен буферен разтвор (т. 3.24).

Процедира се в съответствие с т. 5.3.3.

5.3.3. Коригиране на pH

В зависимост от толерантността на уреда за анализ на аминокиселини към натрий (т. 4.9), коригирането на pH се извършва в съответствие с т. 5.3.3.1 или с т. 5.3.3.2.

5.3.3.1. За хроматографски системи (т. 4.9), които изискват ниска концентрация на натрий.

Препоръчва се да се използва вътрешен изходен стандартен разтвор (т. 3.27.3), когато се използват уреди за анализ на аминокиселини, изискващи ниски концентрации на натрий (когато трябва да се намали обемът на киселината).

В този случай преди изпарението към хидролизата се добавят 2,00 ml от вътрешния изходен стандартен разтвор (т. 3.27.3).

Добавят се 2 капки 1-октанол (т. 3.15) към получения в съответствие с т. 5.3.2.3 или т. 5.3.2.4 хидролизат.

▼ M9

Като се използва ротационен изпарител (т. 4.7), обемът се намалява до 5–10 ml във вакуум при 40 °C. Ако случайно обемът е намален на по-малко от 5 ml, хидролизатът трябва да се изхвърли и анализът да се повтори.

Коригира се рН до 2,20 с разтвор на натриев хидроксид (т. 3.18) и се пристъпва към изпълнението на процедурата в т. 5.3.4.

5.3.3.2. За всички други уреди за анализ на аминокиселини (т. 4.9)

Вземат се получените в съответствие с т. 5.3.2.3 или т. 5.3.2.4 хидролизати и частично се неутрализират, като внимателно се добавят при непрекъснато бъркане 17 ml разтвор на натриев хидроксид (т. 3.17), като се гарантира, че температурата не се покачва над 40 °C.

Коригира се рН до 2,20 при стайна температура, като се използва разтвор на натриев хидроксид (т. 3.17) и накрая разтвор на натриев хидроксид (т. 3.18). Пристъпва се към процедурата в т. 5.3.4

5.3.4. Пробен разтвор за хроматография

Хидролизатът с коригирано рН (т. 5.3.3.1 или т. 5.3.3.2) се прехвърля количествено с помощта на цитратен буферен разтвор (т. 3.24) в градуирана колба от 200 ml и се допълва до маркировката с буферен разтвор (т. 3.24).

Ако не е бил използван вътрешен стандарт, се добавят 2,00 ml от вътрешния стандарт (т. 3.27.3) и се допълва до пълния обем с цитратен буферен разтвор (т. 3.24). Старателно се размесва.

Пристъпва се към етапа на хроматографията в съответствие с точка 5.4.

Ако пробните разтвори няма да се изследват в същия ден, те трябва да се съхраняват при температура под 5 °C.

5.4. *Хроматографско изследване*

Преди започване на хроматографското изследване екстрактът (т. 5.2) или хидролизатът (т. 5.3.4) се затопля до стайна температура. Сместа се разклаща и подходящо количество от нея се филтрира през мембранен филтър с размер на отворите 0,22 µm (т. 4.5). Полученият бистър разтвор се подлага след това на йонообменна хроматография, като се използва уред за анализ на аминокиселини (т. 4.9).

Впръскването може да се извърши ръчно или автоматично. Важно е в колоната за анализ да се поставя еднакво — с точност до $\pm 0,5$ % — количество стандартен и пробен разтвор, освен когато се използва вътрешен стандарт, и съотношението между натрия и аминокиселини в стандартния и в пробния разтвор да е толкова близко, колкото е възможно.

По принцип, честотата на калибровъчните операции зависи от стабилността на нинхидриновия реагент и от аналитичната система. Стандартът или изследваната проба се разреждат с цитратен буферен разтвор (т. 3.24), така че пиковата площ на стандарта да бъде от 30 до 200 % от пиковата площ на аминокиселината на пробата.

Хроматографията на аминокиселините варира леко според типа на уреда за анализ и според използваната смола. Използваната система трябва да е в състояние да отдели аминокиселините една от друга и от вещества, реагиращи положително на нинхидрин. В работния диапазон на хроматографската система трябва да се наблюдава линейна зависимост спрямо промяната на количествата аминокиселини, които се въвеждат в колоната.

При хроматографския етап на анализа се прилагат съотношенията между най-ниските и най-високите стойности, споменати по-долу, при условие че се анализира еквимоларен разтвор (на определените аминокиселини). Еквимоларният разтвор трябва да съдържа най-малко 30 % от максималното количество от всяка аминокиселина, която може да бъде прецизно измерена със системата за анализ на аминокиселини (т. 4.9).

▼ **M9**

За разграничаването на треонин от серин съотношението между най-ниската и най-високата стойност върху хроматограмата за по-слабо представената от двете застъпващи се аминокиселини не трябва да надвишава 2:10. (ако се определят само цист(е)ин, метионин, треонин и лизин, недостатъчното разграничаване на придружаващите пикови стойности ще повлияе отрицателно върху определянето). За всички останали аминокиселини разграничаването трябва да бъде по-добро от 1:10.

Системата трябва да гарантира, че лизинът се разграничава от „лизиновите артефакти“ и от орнитин.

6. Изчисляване на резултатите

Пиковата площ на пробата и на стандарта се измерва за всяка отделна аминокиселина и се пресмята количеството X в грамове аминокиселина на килограм проба.

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

Ако се използва вътрешен стандарт, се умножава по: $\frac{D}{C}$

A = пикова площ на хидролизат или екстракт

B = пикова площ, калибрационен стандартен разтвор

C = пикова повърхност на вътрешния стандарт в хидролизат или екстракт

D = пикова площ, вътрешен стандарт, калибрационен стандартен разтвор

M = моларно тегло на определяната аминокиселина

c = концентрация на стандарта в $\mu\text{mol/ml}$

m = тегло на пробата (g) (коригирано, за да се получи началното тегло, ако продуктът е изсушен или обезмаслен)

V = ml общ хидролизат (т. 5.3.4) или ml изчислен общ разтворен обем на екстракта (т. 6.1)

Цистинът и цистеинът се определят като цистеинова киселина в продукти на хидролизата на окислена проба, но се изчисляват като цистин ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol) като се използва M 120,15 g/mol ($= 0,5 \times 240,30$ g/mol).

Метионинът се определя като метионин сулфон в продуктите на хидролизата на окислената проба, но се изчислява като метионин, като се използва M на метионина: 149,21 g/mol.

Добавеният свободен метионин се определя след екстракция като метионин, като за изчисленията се използва същото M .

6.1. Общият разтворен обем на екстрактите (F) за определянето на аминокиселините (т. 5.2) се изчислява както следва:

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

V = обем на крайния екстракт

7. Оценка на метода

Методът беше изпитан по време на международно сравнително изследване през 1990 г., с използване на четири различни вида фураж (фуражна смеска за свине, смеска за бройлери, протеинов концентрат, премикс).

▼ **M9**

Забележка: Методът беше изпитан по време на второ международно сравнително изследване през 2003 г. посредством неизвестни за оператора паралелни проби от фуражи за угодяване на бройлери, стартерен фураж за бройлери, царевица, рибно брашно и птиче брашно. За примери вж. стандарт EN ISO 13903.

Резултатите от сравнителното изследване от 1990 г. за средните стойности и за стандартното отклонение след отстраняване на отклоняващите се стойности са дадени в таблицата в настоящата точка:

Средни стойности в g/kg

Еталонен материал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистин/ цистеин	Метионин	Лизин
Фуражна смеска за свине	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Фуражна смеска за бройлери	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Протеинов концентрат	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Премикс	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = брой на лабораториите, взели участие в изследването.

7.1. *Повторяемост*

Повторяемостта на сравнителното изследване от предходната таблица, изразена като „стандартно лабораторно отклонение“, е дадена в таблицата по-долу:

Коефициент на вариация (%) за повторяемостта (CV_r)

Еталонен материал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистин/ цистеин	Метионин	Лизин
Фуражна смеска за свине	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Фуражна смеска за бройлери	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Протеинов концентрат	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Премикс	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = брой на лабораториите, взели участие в изследването.

7.2. *Възпроизводимост*

В таблицата по-долу са дадени резултатите за стандартното отклонение между отделните лаборатории при гореспоменатото сравнително изследване:

▼ **M9****Коефициент на вариация (%) за възпроизводимостта (CV_r)**

Еталонен материал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистин/ цистеин	Метионин	Лизин
Фуражна смеска за свине	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Фуражна смеска за бройлери	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Протеинов концентрат	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Премикс	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = брой на лабораториите, взели участие в изследването.

8. Използване на еталонни материали

Точното прилагане на метода се проверява с повтаряне на измерванията върху сертифицирани еталонни материали при наличие на такива. Препоръчва се калибриране със сертифициран калибрационен разтвор на аминокиселини.

9. Забележки

- 9.1. Поради различията между уредите за анализ на аминокиселини, за ръководни се считат крайните концентрации на калибрационните разтвори на стандартни аминокиселини (вж. т. 3.27.4 и т. 3.27.5) и на продукта на хидролизата (вж. т. 5.3.4).

Диапазонът на линейна чувствителност на апарата трябва да се провери за всички аминокиселини.

Стандартният разтвор се разрежда с цитратен буфер, за да може пиковите площи да съвпадат със средата на диапазона.

- 9.2. Когато за анализиране на хидролизатите се използва оборудване за високоефективна течна хроматография, експерименталните условия трябва да бъдат оптимизирани според препоръките на производителя.
- 9.3. При прилагането на метода за комбинирани фуражи или премикси, съдържащи повече от 1 % хлорид (концентрати, минерални фуражи, допълващи фуражи) е възможно да се получат твърде ниски стойности за метионина и затова се налага специална обработка.

10. Критерии за ефективност

Въз основа на обобщените резултати (с изключение на тирозин) от двете съвместни изследвания (от 1990 г., дадени в точка 7 по-горе и от 2005 г., изложени в стандарт EN/ISO 13903) бяха изведени следните критерии за повторяемост и възпроизводимост. Възможно е изведените от тези две лабораторни изпитвания стойности да не са приложими за диапазони на концентрация и матрици, различни от посочените.

10.1. Повторяемост

Разликата между резултатите от две определяния, извършени с една и съща проба, в една и съща лаборатория и от един и същ оператор, не трябва да надвишава:

- 6 % от по-високата стойност, за общото количество аминокиселини в случай на глицин, аланин, лизин, пролин, глутаминова киселина, изолевцин и хистидин,
- 8 % от по-високата стойност, за общото количество аминокиселини в случай на треонин, фенилаланин, метионин, аспаргинова киселина и левцин,

▼ M9

- 10 % от по-високата стойност, за общото количество аминокиселини в случай на аргинин и валин,
- 12 % от по-високата стойност, за общо количество аминокиселина серин,
- 15 % от по-високата стойност, за общо количество аминокиселина цистеин.

10.2. Възпроизводимост

Разликата между резултатите от две определяния, извършени с една и съща проба в различни лаборатории и/или от различни оператори, не трябва да надвишава:

- 15 % от по-високата стойност, за общото количество аминокиселини в случай на глицин, аланин и треонин,
- 20 % от по-високата стойност, за общото количество аминокиселини в случай на лизин, пролин, фенилаланин, метионин и аспарагинова киселина,
- 22 % от по-високата стойност, за общото количество аминокиселини в случай на glutamiнова киселина и левцин,
- 27 % от по-високата стойност, за общото количество аргининова аминокиселина,
- 32 % от по-високата стойност, за общото количество изолевцинова аминокиселина,
- 35 % от по-високата стойност, за общото количество аминокиселини в случай на валин и серин,
- 40 % от по-високата стойност, за общото количество хистидинова аминокиселина,
- 50 % от по-високата стойност, за общото количество цист(е)инова аминокиселина.

Е. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТРИПТОФАН

Методите за анализ, които следва да се използват за определяне на триптофан, са:

- EN ISO 13904 Фуражи – Определяне съдържанието на триптофан,
- методът за анализ, описан в т. 1 и 9 по-надолу.

1. Цел и обхват

Методът дава възможност да се определят общият и свободният триптофан във фуражите. Методът не прави разлика между D- и L-формите.

2. Принцип

За да се определи общият триптофан, пробата се хидролизира в алкална среда с наситен разтвор на бариев хидроксид и се загрява до 110 °C в продължение на 20 часа. След хидролизата се прибавя вътрешен стандарт.

За да се определи свободният триптофан, пробата се подлага на екстракция в умерено кисела среда при наличие на вътрешен стандарт.

Триптофанът и вътрешният стандарт в хидролизата или в екстракта се определят чрез HPLC с флуоресцентен детектор.

3. Реагенти

- 3.1. Трябва да се използва двойно дестилирана вода или вода с равностойно качество (проводимост < 10 µS/cm).

▼ M9

- 3.2. Стандартно вещество: триптофан (чистота/съдържание $\geq 99\%$), изсушен във вакуум над фосфорен пентоксид.
- 3.3. Вещество, използвано като вътрешен стандарт: α -метил-триптофан (чистота/съдържание $\geq 99\%$), изсушен във вакуум над фосфорен пентоксид.
- 3.4. Бариев хидроксид октахидрат (внимава се $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ да не се излага прекалено дълго на въздух, за да се избегне образуването на BaCO_3 , който може да попречи на определянето) (вж. забележка в т. 9.3).
- 3.5. Натриев хидроксид.
- 3.6. Ортофосфорна киселина, $w(w/w) = 85\%$
- 3.7. Солна киселина, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.
- 3.8. Метанол, с чистота за HPLC
- 3.9. Петролен етер, диапазон на кипене: $40\text{—}60^\circ\text{C}$
- 3.10. Разтвор на натриев хидроксид, $c = 1 \text{ mol/l}$
Разтварят се $40,0 \text{ g NaOH}$ (т. 3.5) във вода и се долива вода (т. 3.1) до 1 литър.
- 3.11. Солна киселина, $c = 6 \text{ mol/l}$:
Взимат се 492 ml HCl (т. 3.7) и се долива вода до 1 литър.
- 3.12. Солна киселина, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Взимат се 82 ml HCl (т. 3.7) и се долива вода до 1 литър.
- 3.13. Солна киселина, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
Взимат се $8,2 \text{ ml HCl}$ (т. 3.7) и се долива вода до 1 литър.
- 3.14. Ортофосфорна киселина, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
Взимат се 34 ml ортофосфорна киселина (т. 3.6) и се долива вода (т. 3.1) до 1 литър.
- 3.15. Концентриран разтвор на триптофан (т. 3.2), $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
В мерителна колба от 500 ml се разтварят $0,2553 \text{ g}$ триптофан (т. 3.2) в солна киселина (т. 3.13) и се допълва до пълния обем със солна киселина (т. 3.13). Разтворът се съхранява при -18°C в продължение най-много на 4 седмици.
- 3.16. Концентриран разтвор на вътрешния стандарт, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
В мерителна колба от 500 ml се разтварят $0,2728 \text{ g}$ α -метил-триптофан (т. 3.3) в солна киселина (т. 3.13) и се допълва до пълния обем със солна киселина (т. 3.13). Разтворът се съхранява при -18°C в продължение най-много на 4 седмици.
- 3.17. Калибрационен стандартен разтвор от триптофан и вътрешен стандарт:
Взимат се $2,00 \text{ ml}$ концентриран разтвор на триптофан (т. 3.15) и $2,00 \text{ ml}$ концентриран разтвор на вътрешния стандарт (α -метил-триптофан) (т. 3.16). Разреждат се с вода (т. 3.1) и метанол (т. 3.8) приблизително до същия обем и приблизително до същата концентрация на метанол ($10\text{—}30\%$) като тези на готовия хидролизат.
Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.
Да се осигури защита срещу пряка слънчева светлина по време на приготвянето на разтвора.

▼ **M9**

- 3.18. Оцетна киселина
- 3.19. 1,1,1-трихлоро-2-метил-2-пропанол.
- 3.20. Етаноламин w (w/w) > 98 %
- 3.21. Разтвор от 1 g 1,1,1-трихлоро-2-метил-2-пропанол (т. 3.19) в 100 ml метанол (т. 3.8).
- 3.22. Подвижна фаза за HPLC: 3,00 g оцетна киселина (т. 3.18) + 900 ml вода (т. 3.1) 50,0 ml разтвор (т. 3.21) на 1,1,1-трихлоро-2-метил-2-пропанол (т. 3.19) в метанол (точка 3.8) (1 g/100 ml). Стойността на рН се коригира на 5,00 етаноламин (т. 3.20). Допълва се до 1 000 ml с вода (т. 3.1).

4. Апаратура

- 4.1. Оборудване за HPLC със спектрофлуорометричен детектор
- 4.2. Колона за течна хроматография 125 mm × 4 mm, C₁₈, пълнеж от 3 µm, или еквивалентна.
- 4.3. рН-метър.
- 4.4. Полипропиленова колба с обем 125 ml, с широко гърло и винтова капачка.
- 4.5. Мембранен филтър, 0,45 µm.
- 4.6. Автоклав, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) бара
- 4.7. Механична клатачна машина или магнитна бъркалка.
- 4.8. Миксер Vortex

5. Процедура**5.1. Подготовка на пробите**

Пробата се смилва, така че да може да премине през сито с отвори 0,5 mm. Пробите с голяма влажност трябва да се изсушат на въздух при температура най-много 50 °C или чрез лиофилизация преди смилането. Пробите с високо съдържание на мастни вещества се подлагат на екстракция с петролен етер (т. 3.9) преди смилането.

5.2. Определяне на свободния триптофан (екстракт)

Претегля се с точност до 1 mg подходящо количество (1—5 g) от подготвената проба (т. 5.1) в конусовидна колба. Прибавят се 100,0 ml солна киселина (т. 3.13) и 5,00 ml концентриран разтвор на вътрешния стандарт (т. 3.16). Разбърква се или се размесва в продължение на 60 min с механична клатачна машина или с магнитна бъркалка (т. 4.7). Остава се седиментът да се утаи и с пипета се прехвърлят 10,0 ml от супернатанта в бехерова чаша. Прибавят се 5 ml ортофосфорна киселина (т. 3.14). Коригира се рН до 3, като се използва натриев хидроксид (т. 3.10). Прибавя се достатъчно количество метанол (т. 3.8), за да се постигне концентрация между 10 и 30 % метанол в крайния обем. Сместа се прехвърля в мерителна колба с подходящ обем и се разрежда с вода до достигане на необходимия за хроматографията обем (приблизително еднакъв с този на калибрационния стандартен разтвор (т. 3.17)).

Няколко милилитра от разтвора се фитрират през мембранен филтър от 0,45 µm (т. 4.5) преди да бъдат впръскани в колоната за HPLC. Пристъпва се към етапа на хроматографията в съответствие с точка 5.4.

Стандартният разтвор и екстрактите следва да се пазят от пряка слънчева светлина. Ако не е възможно да се анализират в същия ден, екстрактите могат да се съхраняват при температура 5 °C за най-много 3 дни.

▼ M9

5.3. *Определяне на общото количество триптофан (хидролизат).*

Претеглят се с точност до 0,2 mg между 0,1 и 1 g от подготвената проба (т. 5.1) в полипропиленова колба (т. 4.4). Претеглената част от пробата трябва да съдържа около 10 mg азот. Добавят се 8,4 g бариев хидроксид октахидрат (т. 3.4) и 10 ml вода. Съставките се размесват с миксер Vortex (т. 4.8) или с магнитна бъркалка (т. 4.7). Покритият с тефлон магнит се оставя в сместа. Стените на съда се изплакват с 4 ml вода. Поставя се винтовата капачка и колбата се затваря, без да се затяга капачката. Прехвърля се в автоклав (т. 4.6) с вряща вода и се оставя на пара за 30—60 min. Автоклава се затваря и се включва на температура 110 ($\pm$ 2) °C в продължение на 20 часа.

Преди отварянето на автоклава температурата се намалява до малко под 100 °C. За да се избегне кристализация на Ba(OH)₂·8 H₂O, към загрялата смес се прибавят 30 ml вода със стайна температура. Леко се разклаща или разбърква. Прибавят се 2,00 ml от концентрирания разтвор на вътрешния стандарт (α -метил-триптофан) (т. 3.16). Съдовете се охлаждат във вода/ледена вана в продължение на 15 min.

След това се прибавят 5 ml ортофосфорна киселина (т. 3.14). Съдът се държи в охлаждащата вана и съдържанието се неутрализира със HCl (т. 3.11), като се бърка непрекъснато и pH се коригира до 3,0 с помощта на HCl (т. 3.12). Прибавя се достатъчно количество метанол, за да се достигне концентрация между 10 и 30 % метанол в крайния обем. Прехвърля се в мерителна колба с подходящ обем и се разрежда с вода до достигане на обема, необходим за хроматографията (например 100 ml). Добавянето на метанол не трябва да предизвика утаяване.

Няколко милилитра от разтвора се фитрират през мембранен филтър от 0,45 μ m (т. 4.5) преди да бъдат впръскани в колоната за HPLC. Пристъпва се към етапа на хроматографията в съответствие с точка 5.4.

Стандартният разтвор и хидролизатите трябва да се пазят от пряка слънчева светлина. Ако не е възможно да се анализират в същия ден, хидролизатите могат да се съхраняват при температура 5 °C в продължение най-много на 3 дни.

5.4. *Определяне с помощта на HPLC*

Дават се следните указания за условията на провеждане на изократно елуиране. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати (вж. също забележки 9.1 и 9.2):

Колона за течна хроматография 125 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, пълнеж от 3 μ m, или еквивалент (т. 4.2):

Температура на колоната: стайна температура

Подвижна фаза (т. 3.22): 3,00 g оцетна киселина (т. 3.18) + 900 ml вода (т. 3.1) + 50,0 ml разтвор (т. 3.21) на 1,1,1-трихлоро-2-метил-2-пропанол (т. 3.19) в метанол (т. 3.8) (1 g/100 ml). Стойността на pH се коригира на 5,00 етанолламин (т. 3.20). Допълва се до 1 000 ml свода (т. 3.1)

Скорост на изтичане: 1 ml/min

Общо време: приблизително 34 min

Дължина на вълната за откриване: 280 nm, излъчване: 356 nm.

Обем на впръскване 20 μ l

▼ M9

6. Изчисляване на резултатите

Количеството триптофан (X) се изчислява в g на 100 g проба.

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

A = пикова площ на вътрешния стандарт, калибрационен стандартен разтвор (т. 3.17)

B = пикова площ на триптофана, екстракт (т. 5.2) или хидролизат (т. 5.3)

V₁ = обем в ml (2 ml) на концентрирания разтвор на триптофан (т. 3.15), прибавен към калибрационния разтвор (т. 3.17)

c = концентрация в µmol/ml (= 2,50) на концентрирания разтвор на триптофан (т. 3.15), прибавен към калибрационния разтвор (т. 3.17)

V₂ = обем в ml на развора на вътрешния стандарт (т. 3.16), прибавен към екстракта (т. 5.2) (= 5,00 ml) или към хидролизата (т. 5.3) (= 2,00 ml)

C = пикова площ на вътрешен стандарт, екстракт (т. 5.2) или хидролизат (т. 5.3)

D = пикова площ на триптофан, разтвор на калибрационен стандарт (т. 3.17)

V₃ = обем в ml (= 2,00 ml) от концентрирания разтвор на вътрешния стандарт (т. 3.16), прибавен към калибрационния стандартен разтвор (т. 3.17)

m = тегло на пробата в g (коригирано, за да се получи началното тегло, ако продуктът е изсушен и/или обезмаслен)

M = молекулно тегло на триптофана (= 204,23 g/mol)

7. Повторяемост

Разликата в резултатите от две паралелни определяния на една и съща проба не трябва да надхвърля 10 % от най-високия резултат.

8. Резултати от съвместно изследване

Беше организирано съвместно изследване (4-то сравнение) на равнище ЕС, при което три проби бяха подложени на анализ в 12 лаборатории с цел сертифициране на метода за изследване чрез хидролиза. Бяха направени 5 еднакви анализа на всяка проба. Резултатите са представени в следната таблица:

	Проба 1 Фураж за свине	Проба 2 Фураж за свине с добавен L-триптофан	Проба 3 Концентриран фураж за свине
L	12	12	12
n	50	55	50
Средна стойност в g/kg	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09

▼ M9

	Проба 1 Фураж за свине	Проба 2 Фураж за свине с добавен L- триптофан	Проба 3 Концентриран фураж за свине
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = брой на лабораториите, предали резултати
 n = брой на запазените индивидуални резултати след елиминиране на отклоняващите се стойности (определени чрез тестовите на Cochran и Dixon)
 s_r = стандартно отклонение на повторяемостта
 S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта
 r = повторяемост
 R = възпроизводимост
 CV_r = коефициент на вариация на повторяемостта, %
 CV_R = коефициент на вариация на възпроизводимостта, %

Беше организирано друго съвместно изследване (3-то сравнение) на равнище ЕС, при което две проби бяха подложени на анализ в 13 лаборатории с цел сертифициране на метода за екстракция на свободен триптофан. Бяха направени 5 еднакви анализа на всяка проба. Резултатите са представени в следната таблица:

	Проба 4 Смес от пшеница и соя	Проба 5 Смес от пшеница и соя (= проба 4) с добавен триптофан (0,457g/kg)
L	12	12
n	55	60
Средна стойност в g/kg	0,391	0,931
s _r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34
S _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11

L = брой на лабораториите, предали резултати
 n = брой на запазените индивидуални резултати след елиминиране на отклоняващите се стойности (определени чрез тестовите на Cochran и Dixon)
 s_r = стандартно отклонение на повторяемостта
 S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта
 r = повторяемост
 R = възпроизводимост
 CV_r = коефициент на вариация на повторяемостта, %
 CV_R = коефициент на вариация на възпроизводимостта, %

Беше организирано друго сравнително изследване на равнище ЕС, при което четири проби бяха подложени на анализ в 7 лаборатории с цел сертифициране на триптофан за хидролиза. Резултатите са представени по-долу. Бяха направени 5 еднакви анализа на всяка проба.

▼ **M9**

	Проба 1 Фуражна смеска за свине (CRM 117)	Проба 2 Рибно брашно с ниско съдържание на мазнини (CRM 118)	Проба 3 Соево брашно (CRM 119)	Проба 4 Обезмаслено мляко на прах (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Средна стойност в g/kg	2,064	8,801	6,882	5,236
s _r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV _r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S _R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = брой на лабораториите, предали резултати
n = брой на запазените индивидуални резултати след елиминирание на отклоняващите се стойности (определени чрез тестове на Cochran и Dixon)
s_r = стандартно отклонение на повторяемостта
S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта
r = повторяемост
R = възпроизводимост
CV_r = коефициент на вариация на повторяемостта, %
CV_R = коефициент на вариация на възпроизводимостта, %

9. **Забележки**

9.1. Следните специални условия за хроматография могат да доведат до по-добро разграничаване на триптофан и α-метил-триптофан.

Изократно елуиране с последващо градиентно почистване на колоната:

Колона за течна хроматография: 125 mm × 4 mm, C₁₈, пълнеж от 5 μm или еквивалентна

Температура на колоната: 32 °C

Подвижна фаза: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/метанол, 95 + 5 (V+V).

B: Метанол

Програма за градиента: 0 min 100 % A 0 % B

15 min 100 % A 0 % B

17 min 60 % A 40 % B

19 min 60 % A 40 % B

21 min 100 % A 0 % B

33 min 100 % A 0 % B

Скорост на изтичане: 1,2 ml/min

Общо време: приблизително 33 min

9.2. Хроматографията варира според типа HPLC и според материала, използван за запълването на колоната. Избраната система трябва да може да разграничи триптофана от вътешния стандарт на равнището на базовата линия. Освен това е важно продуктите на

▼ **M9**

разлагането да се разделят добре от триптофана и вътрешния стандарт. Изследват се хидролизати без вътрешен стандарт, за да се провери базовата линия за примеси при наличие на вътрешен стандарт. Важно е също така времето за елуиране да е достатъчно продължително, за да има възможност за елуиране на всички продукти на разлагането, в противен случай късните пикове, породени от елуирането, могат да интерферира със следващите хроматографски операции.

В работния диапазон хроматографската система трябва да покаже линейна реакция. Линейната реакция се измерва при постоянна концентрация (т.е. нормална концентрация) на вътрешния стандарт и при различни концентрации на триптофана. Важно е височината на пикове на триптофана и на вътрешния стандарт да се намира в линейния диапазон на системата HPLC/флуоресцентната система. Ако пикът или пикове на триптофана и/или на вътрешния стандарт са прекалено ниски или прекалено високи, анализът се повтаря с проба с различна големина и/или изменен краен обем.

9.3. *Бариев хидроксид*

С течение на времето разтварянето на бариевият хидроксид става все по-трудно. Това води до мътен разтвор при определяне с HPLC, което може да доведе до слаби резултати за триптофана.

Ж. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУРОВИ МАСЛА И МАЗНИНИ**1. Цел и обхват**

Настоящият методът служи за определяне на съдържанието на сурови масла и мазнини във фуражите.

Използването на двете разгледани по-долу процедури зависи от характера и състава на фуража и причината за извършване на анализа.

За определяне съдържанието на сурови масла и мазнини в маслодайни семена и плодове, както и във фуражи, които съдържат над 15 % сурови масла или мазнини, екстракцията следва да се извършва посредством процедура А, а повторната екстракция – посредством процедура Б (т. 5.3).

1.1. Процедура А — Директно екстрахиреми сурови масла и мазнини

Настоящият метод е приложим за фуражни суровини от растителен произход, с изключение на включените в обхвата на процедура Б.

1.2. Процедура Б — Общо съдържание на сурови масла и мазнини

Настоящият метод е приложим за фуражни суровини от животински произход и за всички комбинирани фуражи. Той трябва да се използва за всички суровини, от които маслата и мазнините не могат да бъдат екстрахирани напълно, без преди това да се осъществи хидролиза (напр. глютен, мая, картофени протеини и продукти, подлежащи на преработка като екструдирани, сплескване и нагряване).

1.3. *Тълкуване на резултатите*

Във всички случаи, когато резултатът, получен при използване на процедура Б, е по-висок от получения по процедура А, за действителен се приема резултатът от процедура Б.

2. Принцип2.1. *Процедура А*

Пробата се подлага на екстракция с петролен етер. Разтворителят се дестилира, след което остатъкът се изсушава и претегля.

2.2. *Процедура Б*

Пробата се обработва със солна киселина под действието на топлина. Сместа се охлажда и филтрира. Остатъкът се измива, изсушава и се подлага на определяне на съдържанието в съответствие с процедура А.

▼ **M9****3. Реагенти**

- 3.1. Петролен етер, диапазон на кипене: 40—60 °C. Бромното число трябва да бъде под 1, а остатъкът при изпарение — под 2 mg/100 ml.
- 3.2. Натриев сулфат, безводен.
- 3.3. Солна киселина, $c = 3 \text{ mol/l}$.
- 3.4. Спомагателно средство за филтриране, напр. инфузорна пръст, Nyflo-supercel.

4. Апаратура

- 4.1. Екстракционен апарат. Когато екстракционният апарат е снабден със сифон (апарат на Сокслет), скоростта на обратния поток трябва да бъде такава, че да се получават около 10 цикъла на час; когато апаратът не е от сифонен тип, скоростта на обратния поток трябва да бъде около 10 ml в минута.
- 4.2. Екстракционни гилзи, незамърсени с вещества, разтворими в петролен етер и с пропускливост, която отговаря на изискванията в т. 4.1.
- 4.3. Сушилня или вакуумна сушилня, настроена на $75 \pm 3 \text{ °C}$ или въздушна пещ, настроена на $100 \pm 3 \text{ °C}$.

5. Процедура**5.1. Процедура А (вж. т. 8.1)**

Претеглят се 5 g от пробата с точност до 1 mg, прехвърлят се в екстракционна гилза (т. 4.2), която се закрива с памучен тампон, по който не трябва да има мазнини.

Гилзата се поставя в екстрактора (т. 4.1) и се провежда екстракция в продължение на шест часа с петролен етер (т. 3.1). Екстрактът от петролния етер се събира в суха претеглена колба, в която са поставени парченца пемза⁽¹⁾.

Разтворителят се отстранява чрез дестилация. Остатъкът се изсушава, като се остави колбата за час и половина в сушилнята (т. 4.3). Оставя се да се охлади в ексикатор и се претегля. Изсушава се отново в продължение на 30 min, за да се гарантира, че теглото на маслата и мазнините ще остане постоянно (загубата на тегло между две последователни претегляния трябва да бъде по-малка или равна на 1 mg).

5.2. Процедура Б

Претеглят се 2,5 g от пробата с точност до 1 mg (вж. т. 8.2), поставят се в бехерова чаша от 400 ml или конусообразна колба от 300 ml и се добавят 100 ml солна киселина (т. 3.3) и парченца пемза. Бехеровата чаша се покрива със стъкло за наблюдение или на конусообразната колба се поставя обратен хладник. Сместа се оставя да заври леко над слаб пламък или котлон и се задържа така един час. Не трябва да се позволява на продукта да полепва по стените на съда.

Съдържанието се охлажда, добавя се толкова филтратор (т. 3.4), колкото е достатъчно, за да се предотврати загубата на масло или мазнина по време на филтрирането. Сместа се филтрира през навлажнена, чиста от мазнини двойна филтърна хартия. Остатъкът се измива в студена вода до получаване на неутрален филтрат. Проверява се дали филтратът не съдържа масла или мазнини. Наличието им показва, че преди хидролизата пробата трябва да бъде екстрахирана с петролен етер, като се използва процедура А.

Двойната филтърна хартия с остатъка се поставя върху стъкло за наблюдение и се суши в продължение на час и половина в сушилня (т. 4.3) при $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

⁽¹⁾ Когато маслото или мазнината трябва след това да бъдат подложени на изпитания за качество, вместо парченца пемза се използват стъклени топчета.

▼ **M9**

Двойната филтърна хартия със сухия остатък се поставя в екстракционна гилза (т. 4.2) и се покрива с чист от мазнини памучен тампон. Гилзата се поставя в екстрактора (т. 4.1) и се процедира, както е посочено във втори и трети параграф от точка 5.1.

5.3. *Процедура А и повторната екстракция чрез процедура Б.*

За определяне съдържанието на сурови масла и мазнини в маслодайни семена и плодове, както и във фуражи, които съдържат над 15 % сурови масла или мазнини, екстракцията следва да се извършва посредством процедура А, а повторната екстракция – посредством процедура Б.

Това означава че след екстракцията с петролен етер (процедура А) остатъкът или част от остатъка се екстрахира повторно със солна киселина (процедура Б). Съдържанието на сурови масла и мазнини е равно на сбора от резултатите от процедури А и Б:

6. **Изразяване на резултата**

Теглото на остатъка се изразява като процент от теглото на пробата.

7. **Повторяемост**

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени с една и съща проба, от един и същ лаборант, не трябва да надвишава:

- 0,2 % като абсолютна стойност, при съдържание на сурови масла и мазнини под от 5 %,
- 4,0 % от най-високия резултат за съдържание от 5 до 10 %,
- 0,4 % като абсолютна стойност, при съдържание над 10 %.

8. **Забележки**

8.1. При продукти с високо съдържание на масла и мазнини, които трудно се трошат или не са подходящи за получаване на хомогенна редуцирана проба за анализ, се процедира както следва.

Претеглят се 20 g от пробата с точност до 1 mg и се смесват с 10 g или повече безводен натриев сулфат (т. 3.2). Провежда се екстрахиране с петролен етер (т. 3.1), както е указано в точка 5.1. Към получения екстракт се добавя петролен етер (т. 3.1) до 500 ml и се размесва. Вземат се 50 ml от разтвора и се поставят в малка суха претеглена колба, която съдържа парченцата пемза. Разтворителят се отстранява чрез дестилация, съдържанието на колбата се изсушава и се процедира, както е указано в последния параграф на точка 5.1.

От останалия в гилзата остатък от екстракцията се отстранява разтворителят, остатъкът се натрошава до размер на чстиците от 1 mm, връща се в екстракционната гилза (да не се добавя натриев сулфат) и се процедира, както е указано във втория и третия параграф на точка 5.1.

Съдържанието на масла и мазнини се изчислява като процент от пробата, като се използва следната формула:

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

където:

m_1 = тегло в грамове на остатъка след първата екстракция (аликвотна част на екстракта),

m_2 = тегло в грамове на остатъка след втората екстракция.

▼ M9

- 8.2. За някои продукти (напр. такива с ниско съдържание на масла и мазнини) масата на пробата за анализ може да се увеличи.
- 8.3. Може да е необходимо храните за домашни любимци с високо водно съдържание да се смесят с безводен натриев сулфат преди хидролизата и екстракцията по процедура Б.
- 8.4. При описаната в т. 5.2. процедура за измиването на остатъка след филтрирането може да е по-ефикасно да се използва топла вода вместо студена.
- 8.5. Може да се наложи времето за сушене от 1,5 часа да бъде увеличено за някои видове фуражи. Избягва се прекаленото изсушаване, тъй като то може да доведе до занижени резултати. Може да се използва също и микровълнова фурна.

И. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУРОВИ ВЛАКНА

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието във фуражите на неразтворими в кисели и в алкални среди органични вещества, които не съдържат мазнини, обикновено означавани като сурови влакна.

Методът не е приложим в случай на лигноцелулоза и растителен въглен (твърде фини частици).

2. Принцип

Пробата, обезмаслена, когато е необходимо, се обработва последователно с кипящи разтвори на сярна киселина и калиев хидроксид с определени концентрации. Остатъкът се отделя чрез филтриране с филтър от синтеровано стъкло, измива се, изсушава се, претегля се и се опепелява при температура от 475 до 500 °C. Загубата на тегло в резултат на опепеляването отговаря на суровите влакна, присъстващи в пробата за анализ.

3. Реагенти

- 3.1. Сярна киселина, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Средство срещу образуване на пяна (напр. n-октанол).
- 3.3. Помощно средство за филтриране (Celite 545 или еквивалентно), нагрявано при температура 500 °C в продължение на 4 часа (т. 8.6).
- 3.4. Ацетон.
- 3.5. Петролен етер, диапазон на кипене от 40 до 60 °C.
- 3.6. Солна киселина, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Разтвор на натриев хидроксид, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Апаратура

- 4.1. Нагревателен модул за изваряване с разтвор на сярна киселина и калиев хидроксид, снабден с основа за филтрувален тигел (т. 4.2) и с отвеждаща тръба с кранче, свързана с резервоар за изходна течност и с вакуумна помпа, евентуално снабден с източник на стъстен въздух. Преди употреба всеки ден модулът се нагрява в продължение на пет минути с вряла вода.
- 4.2. Стъклен филтрувален тигел със запоен синтерован плосък стъклен филтър с размер на порите 40—90 μm . Преди първото използване филтърът се загрева до 500 °C в продължение на няколко минути и се охлажда (т. 8.6).
- 4.3. Цилиндър с вместимост най-малко 270 ml с обратен хладник, подходящ за кипване на вода.
- 4.4. Сушилня с термостат.
- 4.5. Муфелна пещ с термостат.
- 4.6. Модул за екстракция, състоящ се от основа за филтрувалния тигел (т. 4.2) и тръба с кранче към вакуумната помпа и резервоара за течност.

▼ **M9**

- 4.7. Съединителни пръстени за сглобяване на нагревателния модул (т. 4.1), тигела (т. 4.2) и цилиндъра (т. 4.3) и за свързване на модула за студена екстракция (т. 4.6) и тигела.

5. **Процедура**

Претегля се 1 g от пробата с точност до 1 mg и се слага в тигела (т. 4.2) (вж. забележки в т. 9.1, т. 9.2 и т. 9.3) и се добавя 1 g помощно средство за филтриране (т. 3.3).

Сглобяват се модулът за нагряване (т. 4.1) и филтрувалният тигел (т. 4.2), след което цилиндърът (т. 4.3) се свързва към тигела. Наливат се 150 ml вряща сярна киселина (т. 3.1) в сглобените цилиндър и тигел и ако е необходимо, се добавят няколко капки средство срещу образуване на пяна (т. 3.2).

Течността се нагрява до кипене за 5 ± 2 min и се оставя да ври при силно кипене точно 30 min.

Отваря се кранчето към отвеждащата тръба (т. 4.1) и под вакуум се филтрира сярната киселина през филтрувалния тигел, като остатъкът се измива три пъти с по 30 ml вряща вода, като се следи след всяко измиване остатъкът да е филтриран до сухо.

Затваря се изходното кранче и се наливат 150 ml врящ разтвор на калиев хидроксид (т. 3.7) в сглобените цилиндър и тигел и се добавят няколко капки средство срещу образуване на пяна (т. 3.2). Течността се нагрява до точката на кипене за 5 ± 2 min и се оставя да ври при силно кипене точно 30 min. Филтрира се и се повтаря процедурата на измиване, която е използвана при етапа на обработка със сярна киселина.

След последното измиване и изсушаване тигелът с неговото съдържание се отделя и се свързва с модула за студена екстракция (т. 4.6). Прилага се вакуумът и остатъкът във филтрувалния тигел се измива три пъти с по 25 ml ацетон (т. 3.4), като се следи след всяко измиване остатъкът да е филтруван до сухо.

Тигелът се изсушава, докато теглото му остане постоянно, в сушилния при температура 130 °C. След всяко сушене той се охлажда в ексикатор и бързо се претегля. Тигелът се поставя в муфелна пещ и се подлага на опепеляване, докато теглото му остане постоянно (загубата на тегло между две последователни претегляния трябва да бъде по-малка или равна на 2 mg) при 475 °C—500 °C в продължение най-малко на 30 min.

След всяко нагряване тигелът се охлажда първо в пещта, а после в ексикатора, преди да бъде претеглен.

Прави се тест без пробата. Загубата на тегло в резултат от опепеляването не трябва да надвишава 4 mg.

6. **Изчисляване на резултатите**

Съдържанието на сурови влакна като процент от пробата се дава от израза:

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

където:

m = тегло в g на пробата;

m₀ = загуба на тегло в g след опепеляване по време на определянето;

m₁ = загуба на тегло в g след опепеляване при празната проба.

▼ M9**7. Повторяемост**

Разликата между резултатите от две определяния, проведени върху една и съща проба, не трябва да надвишава:

- 0,6 % като абсолютна стойност при съдържание на сурови влакна под 10 %;
- 6 % от по-високата стойност при съдържание на сурови влакна, равно или по-голямо от 10 %.

8. Възпроизводимост

Разликата между резултатите от две определяния, извършени с една и съща проба в различни лаборатории, не трябва да надвишава:

- 1,0 % като абсолютна стойност при съдържание на сурови влакна под 10 %;
- 10 % от по-високата стойност при съдържание на сурови влакна, равно или по-голямо от 10 %.

9. Забележки

- 9.1. Фуражите, съдържащи повече от 10 % сурови мазнини, трябва да бъдат обезмаслени с петролен етер (т. 3.5) преди анализа. Филтрувалният тигел (т. 4.2) със съдържанието си се свързва с модула за студена екстракция (т. 4.6), прилага се вакуумът и остатъкът се измива три пъти с по 30 ml петролен етер, като се следи остатъкът да е филтриран до сухо. Тигелът със съдържанието си се свързва модула за нагряване (т. 4.1) и след това се процедира, както е описано в т. 5.
- 9.2. Фуражите, които не могат да бъдат подложени пряко на екстракция с петролен етер (т. 3.5), следва да бъдат обезмаслени, както е указано в т. 8.1, и след изваряване в киселина да бъдат обезмаслени още веднъж. След изваряването в киселина и последващото измиване тигелът със съдържанието си се свързва към модула за студена екстракция (т. 4.6) и се измива три пъти с по 30 ml ацетон, след което се измива още три пъти с по 30 ml петролен етер. Филтрира се до сухо под вакуум и анализът се продължава, както е описано в т. 5, като се започне с третирането с калиев хидроксид.
- 9.3. Ако фуражът съдържа повече от 5 % карбонати, изразени като калциев карбонат, тигелът (т. 4.2) с претеглената проба се свързва към модула за нагряване (т. 4.1). Пробата се измива три пъти с по 30 ml солна киселина (т. 3.6). След всяко добавяне на киселина се изчаква около минута преди да се започне филтрирането. Пробата се измива един път с 30 ml вода, след което се процедира, както е описано в т. 5.
- 9.4. Ако се използва уред във формата на статив (няколко тигела, свързани към един модул за нагряване), не може в рамките на една и съща серия да се провеждат две отделни определяния върху една и съща проба за анализ.
- 9.5. Ако след варенето филтрирането на киселинния или основния разтвор е затруднено, се използва съгъстен въздух, подаван през отвеждащата тръба на модула за нагряване, след което филтрирането продължава.
- 9.6. Температурата на опепеляване не трябва да надвишава 500 °C, за да се удължи срокът на ползване на стъклениите филтрувални тигели. Трябва да се избягват твърде големи температурни разлики при циклите на нагряване и охлаждане.

▼ **M9****И. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЗАХАР****1. Цел и обхват**

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на редуциращи захари и общи захари след инверсия, изразени като глюкоза или, когато е целесъобразно, като захароза, при преобразуване с коефициент 0,95. Той е приложим за комбинирани фуражи. За другите фуражи са предвидени специални методи. Когато е необходимо, лактозата се измерва отделно и се отчита при изчисляването на резултатите.

Настоящият метод следва да се използва за определяне на съдържанието на захар за целите на изчисляването на енергийната стойност на фуражите.

В случай че съдържанието на захар трябва да бъде определено за други цели, могат да се използват други методи за анализ.

2. Принцип

Захарите се екстрахират в разреден етанол; разтворът се избистря с разтвори на Карез I и II. След отстраняване на етанола количествата преди и след инверсията се определят по метода на Луф-Шорл.

3. Реагенти

3.1. Етанол 40 % (v/v) с плътност: 0,948 g/ml at 20 °C, неутрализиран спрямо фенолфталеин.

3.2. Разтвор на Карез I: 21,9 g цинков ацетат $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 3 g безводна оцетна киселина се разтварят във вода. Допълва се до 100 ml с вода.

3.3. Разтвор на Карез II: разтварят се във вода 10,6 g калиев фероцианид $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Допълва се до 100 ml с вода.

3.4. Разтвор на метилово оранжево с концентрация 0,1 % (w/v).

3.5. Солна киселина, 4 mol/l.

3.6. Солна киселина, 0,1 mol/l.

3.7. Разтвор на натриев хидроксид, 0,1 mol/l.

3.8. Реагент на Луф-Шорл:

При внимателно разбъркване, разтворът на лимонена киселина (т. 3.8.2) се добавя към разтвора на натриев карбонат (т. 3.8.3). Добавя се разтворът на меден сулфат (т. 3.8.1) и се допълва до 1 литър с вода. Остава се да престои една нощ и се филтрира.

Проверява се концентрацията на така получения реагент (Cu 0,05 mol/litre; Na_2CO_3 1 mol/litre), вж. т. 5.4, последния параграф. Стойността на pH на разтвора е приблизително 9,4.

3.8.1. Разтвор на меден сулфат: 25 g меден сулфат, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, несъдържащо желязо, се разтварят в 100 ml вода.

3.8.2. Разтвор на лимонена киселина: 50 g лимонена киселина $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ се разтварят в 50 ml вода.

3.8.3. Разтвор на натриев карбонат: 143,8 g безводен натриев карбонат се разтварят в приблизително 300 ml топла вода. Остава се да се охлади.

3.9. Разтвор на натриев тиосулфат 0,1 mol/l.

3.10. Разтвор на нишесте: смес от 5 g разтворимо нишесте в 30 ml вода се прибавя към 1 литър кипяща вода. Остава се да кипи три минути, остава се да се охлади и, ако е необходимо, се добавят 10 mg живачен йодид като консервант.

▼ M9

- 3.11. Сярна киселина, 3 mol/l.
- 3.12. Разтвор на калиев йодид, 30 % (w/v).
- 3.13. Гранулирана пемза, кипната в солна киселина, промита с вода и изсушена.
- 3.14. 3-метилбутан-1-ол.

4. Апаратура

Смесител (барабанен): приблизително 35—40 грm.

5. Процедура

5.1. *Екстрахиране на пробата*

Претеглят се 2,5 g от пробата с точност до 1 mg и се изсипват в мерителна колба от 250 ml. Добавят се 200 ml етанол (т. 3.1) и пробата се размесва един час в барабания смесител. Добавят се 5 ml разтвор на Карез I (т. 3.2) и се бърка около 30 секунди. Добавят се 5 ml разтвор на Карез II (т. 3.3) и се бърка още една минута. Допълва се до пълния обем с етанол (т. 3.1), хомогенизира се и се филтрира. Отделят се 200 ml от филтрата, който се съгъства чрез изпаряване, докато обемът му намалее приблизително наполовина, за да се отстрани по-голямата част от етанола. Остатъкът след изпаряването се прибавя количествено в 200 ml мерителна колба с помощта на гореща вода, охлажда се, допълва се с вода до пълния обем, хомогенизира се и, ако е необходимо, се филтрира. Този разтвор се използва за определянето на количеството редуциращи захари и, след инверсия, на общите захари.

5.2. *Определяне на редуциращи захари*

С помощта на пипета се вземат не повече от 25 ml от разтвора, съдържащ най-малко 60 mg редуциращи захари, изразени като глюкоза. Ако е необходимо, обемът се коригира до 25 ml с дестилирана вода и се определя съдържанието на редуциращи захари по метода на Луф-Шорл. Резултатът се изразява като процентно съдържание на глюкоза в пробата.

5.3. *Определяне на общи захари след инверсия*

С помощта на пипета се взимат 50 ml от разтвора и се прехвърлят в мерителна колба от 100 ml. Добавят се няколко капки разтвор на метилово оранжево (т. 3.4), след това внимателно и при непрекъснато разбъркване се добавя солна киселина (т. 3.5), докато течността придобие определено червен цвят. Добавят се 15 ml солна киселина (т. 3.6), колбата се потапя в силно кипяща вода и се оставя там в продължение на тридесет минути. Охлажда се бързо до около 20 °C и се добавят 15 ml разтвор на натриев хидроксид (т. 3.7). Допълва се до 100 ml с вода и се хомогенизира. Взимат се не повече от 25 ml, които съдържат не повече от 60 mg редуциращи захари, изразени като глюкоза. Ако е необходимо, обемът се коригира до 25 ml с дестилирана вода и се определя съдържанието на редуциращи захари по метода на Луф-Шорл. Резултатът се изразява като проценти глюкоза или, когато е целесъобразно, като захароза, чрез умножаване по коефициент 0,95.

5.4. *Титруване по метода на Луф-Шорл*

С помощта на пипета се вземат 25 ml от реагента на Луф-Шорл (т. 3.8) и се прехвърлят в ерленмайерова колба от 300 ml; добавят се точно 25 ml от избистрения захарен разтвор. Добавят се 2 гранули пемза (т. 3.13), нагряват се с бъркане на ръка на открит пламък със средна височина и течността се довежда до кипене за около две минути. Ерленмайеровата колба се поставя веднага върху покрита с азбест телена мрежа с отвор с диаметър около 6 cm, под която е запален пламък. Пламъкът следва да се регулира така, че само основата на ерленмайеровата колба да се нагрява. Ерленмайеровата колба се свързва към обратен хладник. Оставя се да кипи точно десет минути. Охлажда се веднага в студена вода и след около пет минути се титрува, както следва:

▼ **M9**

Добавя се 10 ml разтвор на калиев йодид (т. 3.12) и веднага след това (внимателно, тъй като има опасност от обилно образуване на пяна) се добавят 25 ml сярна киселина (т. 3.11). Титрува се с разтвор на натриев тиосулфат (т. 3.9) до появяване на матовожълт цвят, добавя се нишестеният индикатор (т. 3.10) и се завършва титруването.

Същото титруване се провежда с точно измерена смес от 25 ml реагент на Луф-Шорл (т. 3.8) и 25 ml вода след добавяне на 10 ml разтвор на калиев йодид (т. 3.12) и 25 ml сярна киселина (т. 3.11) без кипене.

6. Изчисляване на резултатите

С помощта на таблицата се определя количеството глюкоза в mg, което съответства на разликата между стойностите на двете титрувания, изразена в ml натриев тиосулфат 0,1 mol/l. Резултатът се изразява като процент от пробата.

7. Специални процедури

- 7.1. Ако се изследват богати на меласа фуражи и други слабо хомогенни фуражи, 20 g от пробата се претеглят и се поставят в 500 ml вода в 1-литрова мерителна колба. Размесват се един час в барабанен смесител. Избистря се с разтвори на Карез I (т. 3.2) и II (т. 3.3), както е описано в т. 5.1, като обаче се използват четирикратни количества от всеки реагент. Допълва се до пълния обем с 80 % етанол (v/v).

Хомогенизира се и се филтрира. Етанолът се отстранява, както е описано в т. 5.1. Ако няма декстринизирано нишесте, съдържанието на колбата се допълва до пълния обем с дестилирана вода.

- 7.2. Ако се изследва меласа и суровини за фуражи без примеси, които са богати на захар и почти не съдържат нишесте (рожкови, сушено цвекло и др.), се претеглят 5 g, поставят се в мерителна колба от 250 ml, добавят се 200 ml дестилирана вода и се размесват в барабанный смесител един час или повече, ако е необходимо. Избистря се с разтвор на Карез I (т. 3.2) и разтвор на Карез II (т. 3.3), както е описано в т. 5.1. Допълва се до пълния обем със студена вода, хомогенизира се и се филтрира. За да се определи количеството общи захари, се продължава, както е описано в т. 5.3.

8. Забележки

- 8.1. За да се избегне образуването на пяна, препоръчва се да се добави (независимо от обема) приблизително 1 ml 3-метилбутан-1-ол (т. 3.14) преди кипването с реагента на Луф-Шорл.
- 8.2. Разликата между съдържанието на общи захари след инверсия, изразени като глюкоза, и съдържанието на редуциращи захари, изразени като глюкоза, умножена по 0,95, дава процентното съдържание на захароза.
- 8.3. Могат да се използват два метода за определяне на количеството на редуциращи захари с изключение на лактоза:
- 8.3.1. За приблизително изчисляване, установеното с друг аналитичен метод съдържание на лактоза се умножава по 0,675 и полученият резултат се изважда от съдържанието на редуциращите захари.
- 8.3.2. За точно изчисляване на количеството редуциращи захари, с изключение на лактоза, трябва да се използва една и съща проба за двете крайни определяния: Единият анализ се прави с част от разтвора, получен по процедурата в т. 5.1, а другият — с част от разтвора, получен при определянето на лактозата по метода, посочен за тази цел (след ферментиране на другите видове захар и избистряне).

▼ **M9**

И в двата случая количеството налична захар се определя по метода на Луф-Шорл и се изчислява в mg глюкоза. Едната от стойностите се изважда от другата и разликата се изразява като процент от теглото на пробата.

Пример

Двата обема, взети за всяко определение, отговарят на проба от 250 mg.

В първия случай се изразходват 17 ml разтвор на натриев тиосульфат от 0,1 mol/l, съответстващи на 44,2 mg глюкоза; във втория — 11 ml, съответстващи на 27,6 mg глюкоза.

Разликата е 16,6 mg глюкоза.

Съдържанието на редуциращи захари (с изключение на лактоза), изчислено като глюкоза, е съответно:

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

Таблица на стойностите за 25 ml реагент на Луф-Шорл

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litre, загряване – две минути, кипене – десет минути

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

Й. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛАКТОЗА

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на лактоза във фуражи, съдържащи повече от 0,5 % лактоза.

2. Принцип

Захарите се разтварят във вода. Разтворът се подлага на ферментация под въздействие на дрождите *Saccharomyces cerevisiae*, които не засягат лактозата. След избистряне и филтриране съдържанието на лактоза във филтратата се определя по метода на Луф-Шорл.

▼ M9

3. Реагенти

- 3.1. Суспензия на *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g пресни дрожди се смесват със 100 ml вода до получаването на суспензия. Суспензията може да се запази най-много една седмица в хладилник.
- 3.2. Разтвор на Карез I: 21,9 g цинков ацетат $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 3 g безводна оцетна киселина се разтварят във вода. Допълва се до 100 ml с вода.
- 3.3. Разтвор на Карез II: разтварят се във вода 10,6 g калиев фероцианид $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Допълва се до 100 ml с вода.
- 3.4. Реагент на Луф-Шорл:
- При внимателно разбъркване, разтворът на лимонена киселина (т. 3.4.2) се добавя към разтвора на натриев карбонат (т. 3.4.3). Добавя се разтворът на меден сулфат (т. 3.4.1) и се допълва до 1 литър с вода. Остава се да престои една нощ и се филтрира. Проверява се концентрацията на така получения реактив (Cu 0,05 mol/litre; Na_2CO_3 1 mol/l). Стойността на pH на разтвора е приблизително 9,4.
- 3.4.1. Разтвор на меден сулфат: 25 g меден сулфат и $\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, несъдържащ желязо, се разтварят в 100 ml вода.
- 3.4.2. Разтвор на лимонена киселина: 50 g лимонена киселина $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ се разтварят в 50 ml вода.
- 3.4.3. Разтвор на натриев карбонат: 143,8 g безводен натриев карбонат се разтварят в приблизително 300 ml топла вода. Остава се да се охлади.
- 3.5. Гранулирана пемза, кипната в солна киселина, промита с вода и изсушена.
- 3.6. Разтвор на калиев йодид, 30 % (w/v).
- 3.7. Сярна киселина, 3 mol/l.
- 3.8. Разтвор на натриев тиосулфат 0,1 mol/l.
- 3.9. Разтвор на нишесте: смес от 5 g разтворимо нишесте в 30 ml вода се прибавя към 1 литър кипяща вода. Остава се да кипи три минути, остава се да се охлади и, ако е необходимо, се добавят 10 mg живачен йодид като консервант.

4. Апаратура

Водна баня с термостат, настроен на 38—40 °C.

5. Процедура

Претегля се 1 g от пробата с точност до 1 mg и тази част от пробата се поставя в мерителна колба от 100 ml. Добавят се 25—30 ml вода. Колбата се поставя в кипяща водна баня за тридесет минути и след това се охлажда до приблизително 35 °C. Добавят се 5 ml от дрождената суспензия (т. 3.1) и сместа се хомогенизира. Колбата се оставя да престои два часа на водна баня при температура 38—40 °C. Охлажда се до приблизително 20 °C.

Добавят се 2,5 ml разтвор на Карез I (т. 3.2), бърка се тридесет секунди, след това се добавят 2,5 ml разтвор на Карез II (т. 3.3) и отново се бърка тридесет секунди. Допълва се до 100 ml с вода, разбърква се и се филтрира. С помощта на пипета се взима част от филтрат — не повече от 25 ml, по възможност със съдържание на лактоза от 40 до 80 mg — и се прехвърля в ерленмайерова колба от 300 ml. Ако е необходимо, се допълва до 25 ml с вода.

▼ **M9**

Прави се празна проба по същия начин с 5 ml дрождена суспензия (3.1). Съдържанието на лактозата се определя по метода на Луф-Шорл, както следва: прибавят се точно 25 ml реагент на Луф-Шорл (3.4) и две гранули пемза (т. 3.5). Бърка се на ръка, като едновременно се нагрява на открит пламък със средна височина, и течността се довежда до кипене за около две минути. Ерленмайеровата колба се поставя веднага върху покрита с азбест телена мрежа с отвор с диаметър около 6 cm, под която е запален пламък. Пламъкът следва да се регулира така, че само основата на ерленмайеровата колба да се нагрява. Ерленмайеровата колба се свързва към обратен хладник. Остава се да кипи точно десет минути. Охлажда се веднага в студена вода и след около пет минути се титрува, както следва:

Добавят се 10 ml разтвор на калиев йодид (т. 3.6) и веднага след това (внимателно, защото има опасност от обилно образуване на пяна) се добавят 25 ml сярна киселина (т. 3.7). Титрува се с разтвор на натриев тиосулфат (т. 3.8) до появяване на матовожълт цвят, добавя се нишестеният индикатор (т. 3.9) и се завършва титруването.

Същото титруване се провежда с точно измерена смес от 25 ml реагент на Луф-Шорл (т. 3.4) и 25 ml вода след добавяне на 10 ml разтвор на калиев йодид (т. 3.6) и 25 ml сярна киселина (т. 3.7) без кипене.

6. Изчисляване на резултатите

Като се използва приложената таблица, се установява количеството лактоза в mg, което отговаря на разликата между резултатите от двете титрувания, изразено в ml натриев тиосулфат 0,1 mol/l.

Резултатът се изразява като процент безводна лактоза от пробата.

7. Забележки

1. За продукти, съдържащи повече от 40 % ферментируема захар, се използват повече от 5 ml дрождена суспензия (т. 3.1).
2. В храните с „намалено съдържание на лактоза“ (напр. мляко за котки) лактозата се преобразува във фруктоза, която не достига пълна ферментация в рамките на 2 часа, което води до по-високи или до фалшиви положителни резултати (тъй като в екстракта остават остатъци от фруктоза).

Таблица на стойностите за 25 ml реагент на Луф-Шорл

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litre, загаряване – две минути, кипене – десет минути

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Глюкоза, фруктоза, инвертни захари C ₆ H ₁₂ O ₆		Лактоза C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	разлика	mg	разлика	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14

▼ M9

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

К. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИШЕСТЕ

ПОЛЯРИМЕТРИЧЕН МЕТОД

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на нишесте и на продукти от разграждането на нишесте с високо молекулно тегло във фуражите, с цел проверка на съответствието с обявената енергийна стойност (разпоредби в приложение VII) и с Регламент (ЕО) № 767/2009.

Настоящият метод следва да се използва за определяне на съдържанието на нишесте за целите на изчисляването на енергийната стойност на фуражите.

В случай че съдържанието на нишесте трябва да бъде определено за други цели, могат да се използват други методи за анализ.

2. Принцип

Методът включва две определяния. При първото пробата се третира с разредена солна киселина. След избистряне и филтриране се измерва въртенето на плоскостта на поляризацията на разтвора чрез поляриметрия.

При второто пробата се подлага на екстракция с 40 % етанол. След подкисляване на филтратата със солна киселина, избистряне и филтриране се измерва въртенето на плоскостта на поляризацията, както при първото определяне.

Като се умножи разликата между двете измервания с коефициент, който е известен, се получава съдържанието на нишесте в пробата.

3. Реагенти

3.1. Разтвор на солна киселина, 25 % (w/w), плътност: 1,126 g/ml.

3.2. Разтвор на солна киселина с концентрация 1,13 % (w/v).

Концентрацията трябва да се провери чрез титруване, като се използва разтвор на натриев хидроксид 0,1 mol/l, в присъствие на 0,1 % (w/v) метилово червено в 94 % (v/v) етанол. За неутрализацията на 10 ml са необходими 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Разтвор на Карез I: 21,9 g цинков ацетат Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O и 3 g безводна оцетна киселина се разтварят във вода. Допълва се до 100 ml с вода.

▼ **M9**

3.4. Разтвор на Карез II: разтварят се във вода 10,6 g калиев фероцианид $K_4 Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Допълва се до 100 ml с вода.

3.5. Етанол 40 % (v/v), с плътност: 0,948 g/ml при 20 °C.

4. Апаратура

4.1. Ерленмайерова колба от 250 ml, със стандартен стъклен шлиф и с обратен хладник.

4.2. Поляриметър или захарометър.

5. Процедура

5.1. Подготовка на пробата

Пробата се разтрошава до получаване на достатъчно дребни частици, за да може цялата проба да премине през сито с кръгли отвори с големина 0,5 mm.

5.2. Определяне на общото въртене на плоскостта на поляризацията (P или S) (вж. Забележка в т. 7.1)

Претеглят се точно до един mg 2,5 g от натрошената проба и се поставят в градуирана колба от 100 ml. Прибавят се 25 ml солна киселина (т. 3.2), разклаща се до получаване на равномерно разпределение на пробата, и се добавят още 25 ml солна киселина (т. 3.2). Колбата се потапя във водна баня с вряща вода, като енергично се разклаща през първите три минути, за да се предотврати образуването на агломерати. Количеството вода във водната баня трябва да е достатъчно, за да може при поставяне на колбата в нея кипенето на продължи. Колбата не трябва да се изважда от банята докато трае разклащането. Точно след 15 min колбата се изважда от водната баня, добавят се 30 ml студена вода и незабавно се охлажда до 20 °C.

Добавят се 5 ml разтвор на Карез I (т. 3.3) и се разбърква около 30 секунди. Добавят се 5 ml разтвор на Карез II (т. 3.4) и се разбърква още около 30 секунди. Допълва се с вода до запълване на обема, разбърква се и се филтрира. Ако филтратът не е идеално бистър (което рядко се случва), определянето се повтаря, като се използва по-голямо количество разтвор на Карез I и II, например 10 ml.

С поляриметър или захарометър се измерва въртенето на плоскостта на поляризацията на разтвора в епруветка от 200 mm.

5.3. Определяне на въртенето на плоскостта на поляризацията (P' или S') на вещества, разтворими в 40 % етанол

Претеглят се 5 g от пробата с точност до един mg, поставят се в градуирана колба от 100 ml и се прибавят 80 ml етанол (т. 3.5) (вж. забележка 7.2). Колбата се оставя в продължение на 1 час при стайна температура; през това време тя шесткратно се разклаща енергично, така че пробата за анализ напълно да се смеси с етанола. Допълва се с етанол (т. 3.5) до запълване на обема, разбърква се и се филтрира.

Отмерват се с пипета 50 ml от филтрата (отговаря на 2,5 g от пробата) и се поставят в ерленмайерова колба от 250 ml, прибавят се 2,1 ml солна киселина (т. 3.1) и се разклаща енергично. Обратният хладник се монтира към ерленмайеровата колба и тя се потапя в баня с вряща вода. Точно след 15 минути ерленмайеровата колба се изважда от водната баня, съдържанието ѝ се прехвърля в градуирана колба от 100 ml, като колбата се изплаква с малко студена вода и се охлажда до 20 °C.

▼ **M9**

Съдържанието се избистря с разтвор на Карез I (т. 3.3) и II (т. 3.4), допълва се с вода до пълния обем, разбърква се, филтрира се и се измерва въртенето на плоскостта на поляризацията, както е посочено във втория и третия параграф на точка 5.2.

6. Изчисляване на резултатите

Съдържанието на нишесте (в %) се изчислява, както следва:

6.1. Измерване с поляриметър

$$\text{Съдържание на нишесте (в \%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = общо въртене на плоскостта на поляризацията в градуси

P' = въртене на плоскостта на поляризацията в градуси на веществата, разтворими в 40 % (v/v) етанол

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = Специфично въртене на плоскостта на поляризацията за чисто нишесте. Числовите стойности, които обикновено се приемат за този параметър, са следните:

+ 185,9°: оризово нишесте

+ 185,7°: картофено нишесте

+ 184,6°: царевично нишесте

+ 182,7°: пшенично нишесте

+ 181,5°: ечемичено нишесте

+ 181,3°: овесено нишесте

+ 184,0°: други видове нишесте и смеси от нишесте в комбинирани фуражи

6.2. Измерване със захарометър

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

S = Общо въртене на плоскостта на поляризацията в градуси на захарометъра

S' = Въртене на плоскостта на поляризацията в градуси на захарометъра на веществата, разтворими в 40 % (v/v) етанол

N = тегло (в g) на разтворена в 100 ml вода захароза, която предизвиква въртене на плоскостта на поляризацията от 100 градуса по скалата на захарометъра, измерени при използване на епруветка от 200 mm

16,29 g при френските захарометри

26,00 g при немските захарометри

20,00 g при смесени захарометри.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = Специфично въртене плоскостта на поляризацията на чистото нишесте (вж. т. 6.1)

▼ **M9**6.3. *Повторяемост*

Разликата в резултатите от две паралелни определяния, извършени с една и съща проба, не трябва да превишава 0,4 като абсолютна стойност при съдържание на нишесте по-ниско от 40 %, и 1 % като относителна стойност при съдържание на нишесте от 40 % или повече.

7. **Забележки**

7.1. Ако пробата съдържа повече от 6 % карбонати, изчислени като калциев карбонат, те трябва да се неутрализират, като се обработят с точно определено количество разредена сярна киселина преди определянето на общото въртене на плоскостта на поляризацията.

7.2. В случай на продукти с високо съдържание на лактоза, като серум от сухо мляко или сухо обезмаслено мляко, след като се добавят 80 ml етанол (т. 3.5), се процедира, както е указано по-долу. Свързва се обратният хладник към колбата и тя се потапя за 30 минути във водна баня при 50 °C. Остава се да изстине и анализът продължава, както е указано в т. 5.3.

7.3. Известно е, че следните фуражни суровини, когато присъстват във фуражите в значителни количества, предизвикват смущения при определяне на съдържанието на нишесте по поляриметричния метод, което би могло да доведе до неточни резултати:

— продукти от (захарно) цвекло, като пулп от (захарно) цвекло, меласа от (захарно) цвекло, меласен пулп от (захарно) цвекло, винаса от (захарно) цвекло, (цвеклова) захар;

— цитрусов пулп;

— ленено семе; експелер от ленено семе; екстрахирано ленено семе;

— рапично семе; експелер от рапично семе; екстрахирано рапично семе; обвивки от рапично семе;

— слънчогледово семе; екстрахирано слънчогледово семе; слънчогледово семе, частично обелено, екстрахирано;

— експелер от копра; екстрахирана копра;

— картофен пулп;

— дехидрирани дрожди;

— продукти, богати на инулин (напр. резенки и брашно от земни ябълки);

— пръжки;

— соеви продукти.

В тези случаи може да бъде приложен методът за анализ, предвиден в Регламент (ЕО) № 121/2008 на Комисията ⁽¹⁾. Този метод може да се използва и за фураж със съдържание на нишесте под 1 %.

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 121/2008 на Комисията от 11 февруари 2008 г. за установяване на метода за анализ за определяне на съдържанието на нишесте в препарати от видовете, използвани за храна на животни (код по КН 2309) (ОВ L 37, 12.2.2008 г., стр. 3).

▼ M9

Л. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУРОВА ПЕПЕЛ

1. **Цел и обхват**

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на сурова пепел във фуражите.

2. **Принцип**

Пробата се опепелява при 550 °C; остатъкът се претегля.

3. **Реагенти**

Разтвор на амониев нитрат, 20 % (w/v).

4. **Апаратура**

4.1. Нагревателна плоча

4.2. Електрическа муфелна пещ с термостат.

4.3. Кварцови, порцеланови или платинени тигли за опепеляване, правоъгълни (прибл. 60 × 40 × 25 mm) или кръгли (диаметър 60—75 mm, височина 20—40 mm)

5. **Процедура**

Претеглят се с точност до един mg около 5 g от пробата (2,5 g при продукти, които имат свойството да набъбват) и се поставя в тигел за опепеляване, който е бил предварително нагрят до 550 °C, охладен и тариран. Тигелът се поставя върху нагревателната плоча и се нагрява постепенно, докато веществото се овъгли. Опепеляването се извършва в съответствие с процедурата в т. 5.1 или т. 5.2.

5.1. Тигелът се поставя в калибрирана муфелна пещ, настроена на 550 °C. Държи се при тази температура, докато се получи бяла, светло сива или червеникава пепел, която видимо не съдържа въгленови частици. Тигелът се поставя в ексикатор, оставя се да се охлади и се претегля незабавно.

5.2. Тигелът се поставя в калибрирана муфелна пещ, настроена на 550 °C. Оставя се да се опепелява 3 часа. Тигелът се поставя в ексикатор, оставя се да се охлади и се претегля незабавно. Опепелява се отново в продължение на 30 минути, за да се гарантира, че теглото на пепелта ще остане постоянно (загубата на тегло между две последователни претегляния трябва да бъде по-малка или равна на 1 mg).

6. **Изчисляване на резултатите**

Теглото на остатъка се изчислява, като се изважда теглото на тарата.

Резултатът се изразява като процент от пробата.

7. **Забележки**7.1. Пепелта на *субстанции, които се опепеляват трудно*, трябва да бъде подложена на първоначално опепеляване в продължение на най-малко три часа, да бъде охладена и след това да се добавят няколко капки 20 % разтвор на амониев нитрат или вода (внимателно, за да се избегне разпрашаването на пепелта или образуването на бучици). След изсушаване в пещта калцинирането се продължава. Повтаря се операцията колкото пъти се налага до постигане на пълно опепеляване.7.2. При *субстанции, устойчиви към обработката*, описана в т. 7.1, се процедира, както следва: след опепеляване в продължение на три часа, пепелта се поставя в гореща вода и се филтрира през малък, несъдържащ пепели филтър. Филтърът и съдържанието му се опепеляват в първоначалния тигел. Филтратът се поставя в охладен тигел, изпарява се до сухо, опепелява се и се претегля.7.3. Когато се изследват *масла и мазнини*, се претегля точно проба от 25 g в подходящ по размери тигел. Субстанцията се овъглява, като се запали чрез поднасяне на горяща лента от филтерна хартия, която не съдържа пепели. След овъгляването се навлажнява с колкото е възможно по-малко вода. След изгарянето се навлажнява с колкото е възможно по-малко вода, изсушава се и се опепелява, както е описано в точка 5.

▼ **M9****М. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НЕРАЗТВОРИМА В СОЛНА КИСЕЛИНА ПЕПЕЛ****1. Цел и обхват**

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на неразтворими в солна киселина минерални вещества във фуражите. В зависимост от естеството на пробата могат да се приложат два метода.

- 1.1. *Метод А:* приложим към органични суровини за фуражи и към повечето комбинирани фуражи;
- 1.2. *Метод Б:* приложим към минерални вещества и смеси и към комбинирани фуражи, чието съдържание на неразтворими в солна киселина вещества, определено по метод А, е по-голямо от 1 %.

2. Принцип

- 2.1. *Метод А:* пробата се опепелява, пепелта се кипва в солна киселина и неразтворимият остатък се филтрира и претегля.
- 2.2. *Метод Б:* пробата се обработва със солна киселина. Разтворът се филтрира, остатъкът се опепелява и така получената пепел се обработва по метод А.

3. Реагенти

- 3.1. Солна киселина, 3 mol/l.
- 3.2. Разтвор на трихлороцетна киселина с концентрация 20 % (w/v).
- 3.3. Разтвор на трихлороцетна киселина с концентрация 1 % (w/v).

4. Апаратура

- 4.1. Нагревателна плоча.
- 4.2. Електрическа муфелна пещ с термостат.
- 4.3. Кварцови, порцеланови или платинени тигли за опепеляване, правоъгълни (прибл. 60 × 40 × 25 mm) или кръгли (диаметър 60—75 mm, височина 20—40 mm)
- 4.4. Несъдържащи пепели филтри

5. Процедура**5.1. Метод А:**

Пробата се опепелява по метода, описан за определянето на сурова пепел. Може да се използва и пепелта, получена при посочения анализ.

Пепелта се поставя в бехерова чаша с вместимост от 250—400 ml, като се използват 75 ml солна киселина (точка 3.1). Довежда се бавно до кипене и се оставя да кипи умерено в продължение на петнадесет минути. Горещият разтвор се филтрира през филтерна хартия, несъдържаща пепели, и остатъкът се промива с гореща вода до изчезване на киселинната реакция. Филтърът с остатъка се изсушава и се опепелява в тариран тигел при температура, не по-ниска от 550 °C и не по-висока от 700 °C. Оставя се да се охлади в ексикатор и се претегля.

5.2. Метод Б:

Претеглят се 5 g от пробата с точност до един mg и се поставят в бехерова чаша с вместимост 250—400 ml. Добавят се последователно 25 ml вода и 25 ml солна киселина (т. 3.1), разбърква се и се изчаква да спре кипенето. Добавят се още 50 ml солна киселина (т. 3.1). Изчаква се да спре отделянето на газ, след което бехеровата чаша се поставя във вана с вряща вода и се държи там тридесет минути или повече, ако е необходимо, за да се хидролизира изцяло нишестето, което евентуално се съдържа в

▼ **M9**

пробата. Докато е горещо, съдържанието се филтрира през филтър, несъдържащ пепел, и филтърът се промива с 50 ml топла вода (вж. забележка в т. 7). Филтърът се поставя с остатъка в тигел за опепеляване, изсушава се и се опепелява при температура, не по-ниска от 550 °C и не по-висока от 700 °C. Пепелта се поставя в бехерова чаша с вместимост 250—400 ml, като се добавят 75 ml солна киселина (точка 3.1); продължава се, както е описано във втория абзац на точка 5.1.

6. Изчисляване на резултатите

Теглото на остатъка се изчислява, като се изважда теглото на тарата. Резултатът се изразява като процент от пробата.

7. Забележки

Ако филтрирането се окаже трудно, анализът се повтаря, като се заместват 50-те ml солна киселина (точка 3.1) с 50 ml 20 % (w/v) разтвор на трихлороцетна киселина (точка 3.2) и се промива филтърът с топъл 1 % разтвор на трихлороцетна киселина (точка 3.3).

Н. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОБЩОТО КОЛИЧЕСТВО ФОСФОР

Общото съдържание на фосфор се определя посредством

- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 15510 Фуражи: методи за вземане на проби и за анализ – Определяне на калций, натрий, фосфор, магнезий, калий, желязо, цинк, мед, манган, кобалт, молибден и олово чрез ICP-AES или
- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 15621 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на калций, натрий, фосфор, магнезий, калий, сяра, желязо, цинк, мед, манган и кобалт след разлагане под налягане чрез ICP-AES, или
- фотометричния метод, описан по-долу.

ФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност да се определи общото съдържание на фосфор във фуражите. Той е особено подходящ за анализ на продукти с ниско съдържание на фосфор. В някои случаи (при богати на фосфор продукти) може да се използва гравиметричен метод.

2. Принцип

Пробата се минерализира чрез сухо изгаряне (за органични фуражи) или чрез киселинно изваряване (за минерални смеси и течни фуражи), след което се поставя в разтвор на киселина. Разтворът се обработва с молибдованадатен реагент. Оптичната плътност на така образувания жълт разтвор се измерва със спектрофотометър при 430 nm.

3. Реагенти

- 3.1. Калциев карбонат.
- 3.2. Солна киселина $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (приблизително 6 mol/l).
- 3.3. Азотна киселина, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4. Азотна киселина, ρ_{20} = от 1,38 до 1,42 g/ml.
- 3.5. Сярна киселина, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6. Молибдованадатен реагент: в градуирана колба от 1 l се смесват 200 ml разтвор на амониев хептамолибдат (точка 3.6.1), 200 ml разтвор на амониев монованадат (точка 3.6.2) и 134 ml азотна киселина (точка 3.4). Допълва се до пълния обем с вода.

▼ **M9**

- 3.6.1. Разтвор на амониев хептамолибдат: в гореща вода се разтварят 100 g амониев хептамолибдат ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Добавят се 10 ml амоняк (с плътност 0,91 g/ml) и обемът се допълва до 1 l с вода.
- 3.6.2. Разтвор на амониев монованадат: 2,35 g амониев монованадат NH_4VO_3 се разтварят в 400 ml гореща вода. При постоянно бъркане бавно се добавят 20 ml разредена азотна киселина (7 ml HNO_3 (т. 3.4) + 13 ml H_2O) и обемът се допълва до 1 l с вода.
- 3.7. Стандартен разтвор от 1 mg фосфор на ml: разтварят се 4,387 g калиев дихидроген фосфат KH_2PO_4 във вода. Допълва се до 1 l с вода.

4. Апаратура

- 4.1. Кварцови, порцеланови или платинени тигли за опепеляване.
- 4.2. Електрическа муфелна пещ с термостат, настроен на 550 °C.
- 4.3. Колба тип Келдал с обем 250 ml.
- 4.4. Градуирани колби и прецизни пипети.
- 4.5. Спектрофотометър.
- 4.6. Епруветки с приблизителен диаметър 16 mm и запушалки, калибровани за диаметър 14,5 mm; вместимост: 25—30 ml.

5. Процедура**5.1. Приготвяне на разтвора**

Според вида на пробата разтворът се приготвя по начина, указан в точка 5.1.1 или в точка 5.1.2.

5.1.1. Обичайна процедура

Претегля се 1 g или повече от пробата с точност до 1 mg. Пробата за анализ се поставя в колба тип Келдал, добавят се 20 ml сярна киселина (т. 3.5), колбата се разклаща с цел веществото напълно да се импрегнира с киселина и да се предотврати полепването му по стените ѝ, след което се нагрява и се поддържа в точката на кипене в продължение на 10 минути. Остава се да изстине леко, добавят се 2 ml азотна киселина (3.4), леко се нагрява, остава се да изстине леко, добавя се още малко азотна киселина (3.4) и отново се довежда до точката на кипене. Тази процедура се повтаря до получаване на безцветен разтвор. Последният се охлажда, добавя се малко вода, течността се прелива в градуирана колба с обем 500 ml, като колбата Келдал се изплаква с гореща вода. Остава се да изстине, след което обемът се допълва с вода и течността се хомогенизира и филтрира.

5.1.2. Проби, съдържащи органични вещества и несъдържащи калциеви и магнезиеви дихидроген фосфати.

Около 2,5 g от пробата се претеглят с точност до 1 mg в тигел за опепеляване. Пробата за анализ се разбърква до пълно смесване с 1 g калциев карбонат (т. 3.1). Сместа се опепелява в пещта при температура 550 °C до получаване на бяла или сива пепел (малко количество въглен не е от значение). Пепелта се пресипва в бехерова чаша с обем 250 ml. Добавят се 20 ml вода и солна киселина (т. 3.2), докато престане отделянето на газ. Добавят се още 10 ml солна киселина (т. 3.2). Бехеровата чаша се поставя на пясъчна баня и се оставя съдържанието ѝ да се сгъстява чрез изпарение, докато изсъхне, така че силициевият диоксид да стане неразтворим. Остатъкът се разтваря отново в 10 ml азотна киселина (т. 3.3) и се оставя да кипи на пясъчната баня или на нагревателна плоча 5 минути, без да се изпарява до изсъхване. Течността се прелива в градуирана колба с обем 500 ml, като бехеровата чаша се изплаква няколко пъти с гореща вода. Остава се да изстине, след което обемът се допълва с вода и течността се хомогенизира и филтрира.

▼ **M9****5.2. Получаване на оцветяването и измерване на оптичната плътност**

Аликвотна част от получения в съответствие с процедурата в т. 5.1.1 или т. 5.1.2 филтрат се разрежда до получаване на концентрация на фосфор не по-висока от 40 µg/ml. Поставят се 10 ml от този разтвор в епруветка (т. 4.6) и се добавят 10 ml от молибдованадатния реагент (т. 3.6). Сместа се хомогенизира и се оставя да престои най-малко 10 минути при температура 20 °C. Оптичната плътност се измерва в спектрофотометър при 430 nm спрямо разтвор, получен чрез добавяне на 10 ml от молибдованадатния реагент (т. 3.6) към 10 ml вода.

5.3. Калибрационна крива

От стандартния разтвор (т. 3.7) се приготвят разтвори със съдържание на фосфор съответно 5, 10, 20, 30 и 40 µg/ml. Вземат се по 10 ml от всеки от разтворите и към тях се прибавят по 10 ml от молибдованадатния реагент (т. 3.6). Смесите се хомогенизират и се оставят да престоят най-малко 10 минути при температура 20 °C. Измерва се оптичната плътност, както е указано в точка 5.2. Калибрационната крива се очертава, като различните стойности на оптичната плътност се нанасят спрямо съответните количества фосфор. За концентрации между 0 и 40 µg/ml графиката е линейна.

6. Изчисляване на резултатите

Определя се количеството фосфор в пробата, като се използва калибрационната крива.

Резултатът се изразява като процент от пробата.

Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени с една и съща проба, не трябва да надвишава:

- 3 %, от по-високата стойност, при съдържание на фосфор под 5 %;
- 0,15 % като абсолютна стойност при съдържание на фосфор от 5 % или повече.

О. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ХЛОР ОТ ХЛОРИДИ**1. Цел и обхват**

Настоящият метод дава възможност да се определи съдържанието на хлор в разтворими във вода хлориди, обикновено изразявани като натриев хлорид. Той е приложим за всички фуражи.

2. Принципи

Хлоридите се разтварят във вода. Ако продуктът съдържа органични вещества, той се подлага на избистряне. Разтворът се подкислява леко с азотна киселина и хлоридите се утаяват под формата на сребърен хлорид с помощта на разтвор от сребърен нитрат. Излишният сребърен нитрат се титрува с разтвор на амониев тиоцианат по метода на Фолхард.

3. Реагенти

- 3.1. Разтвор на амониев тиоцианат 0,1 mol/l.
- 3.2. Разтвор на сребърен нитрат 0,1 mol/l.
- 3.3. Наситен разтвор на амониев ферисулфат (NH₄)Fe(SO₄)₂.
- 3.4. Азотна киселина, плътност: 1,38 g/ml.

▼ M9

- 3.5. Диетилов етер.
- 3.6. Ацетон.
- 3.7. Разтвор на Карез I: 21,9 g цинков ацетат $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 3 g безводна оцетна киселина се разтварят във вода. Допълва се до 100 ml с вода.
- 3.8. Разтвор на Карез II: разтварят се във вода 10,6 g калиев фероцианид $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Допълва се до 100 ml с вода.
- 3.9. Активен въглен, който не съдържа хлориди и не абсорбира хлориди.

4. Апаратура

Смесител (барабанен): приблизително 35—40 грм.

5. Процедура

5.1. Приготвяне на разтвора

Според естеството на пробата, се приготвя разтвор, както е посочено в т. 5.1.1, т. 5.1.2 или т. 5.1.3.

Същевременно се прави *празна проба* без подлежащото на анализ вещество.

5.1.1. Проби, които не съдържат органични вещества

Претегля се с точност до един mg проба от не повече от 10 g, която съдържа не повече от 3 g хлор под формата на хлориди. Претегленото количество се слага заедно с 400 ml вода в мерителна колба от 500 ml при температура от около 20 °C. Сместа се размесва тридесет минути в барабания смесител, допълва се до пълния обем, хомогенизира се и се филтрира.

5.1.2. Проби, съдържащи органични вещества, без продуктите, описани в точка 5.1.3.

Претеглят се около 5 g от пробата с точност до един mg и това количество се поставя с 1 g активен въглен в мерителна колба от 500 ml. Добавят се 400 ml вода с температура около 20 °C и 5 ml разтвор на Карез I (т. 3.7), разбърква се 30 секунди и после се добавят 5 ml разтвор на Карез II (т. 3.8). Сместа се размесва тридесет минути в барабания смесител, допълва се до пълния обем, хомогенизира се и се филтрира.

5.1.3. Топлинно обработени фуражи, ленено кюспе и ленено брашно, продукти, богати на ленено брашно, и други продукти, богати на растителен клей или на колоидални субстанции (например декстринирано нишесте)

Разтворът се приготвя, както е описано в т. 5.1.2, но не се филтрира. Декантира се (ако се налага — се центрофугира), отливат се 100 ml от супернатанта, които се прехвърлят в мерителна колба от 200ml. Смесва се с ацетон (т. 3.6) и се допълва до пълния обем с този разтворител, хомогенизира се и се филтрира.

5.2. Титруване

С помощта на пипета в ерленмайерова колба се прехвърлят 25 ml —100 ml от филтрата (в зависимост от предполагаемото хлорно съдържание), получен както е описано в т. 5.1.1, т. 5.1.2 или т. 5.1.3. Аликвотната част не трябва да съдържа повече от 150 mg хлор (Cl). Разрежда се, ако е необходимо, до не по-малко от 50 ml с вода, добавят се 5 ml азотна киселина (т. 3.4), 2 ml наситен разтвор на амониев ферисулфат (т. 3.3) и две капки разтвор на амониев тиоцианат (т. 3.1), прехвърлен с помощта на бюрета, допълнена до нулевото деление. Като се използва бюрета, разтворът на сребърен нитрат (т. 3.2) се прехвърля по такъв начин, че да се получи излишък от 5 ml. Добавят се 5 ml диетилов етер (т. 3.5) и се разклаща енергично, за да коагулира утайката. Излишният сребърен нитрат се титрува с разтвора на амониев тиоцианат (т. 3.1) дотогава, докато червено-кафеникавото оцветяване се задържи една минута.

▼ M9**6. Изчисляване на резултатите**

Съдържанието на хлор (X), изразено като процентно съдържание на натриев хлорид, се изчислява по следната формула:

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

където:

V_1 = ml обем (в ml) на добавения разтвор на сребърен нитрат 0,1 mol/l

V_2 = обем (в ml) на разтвора на амониев тиоцианат 0,1 mol/l, използван за титруване

m = тегло в g на пробата в алиkvота.

В случай че празната проба покаже изразходване на разтвора на сребърен нитрат с концентрация 0,1 mol/l, тази стойност се изважда от обема ($V_1 - V_2$).

7. Забележки

- 7.1. Титруването може да се извърши и чрез потенциометрия или амперометрия;
- 7.2. При продукти, които са много богати на масла и мазнини, първо се извършва обезмасляване с диетилов етер или петролен етер;
- 7.3. При рибено брашно титруването може да се извърши по метода на Мор.

▼ **M9***ПРИЛОЖЕНИЕ IV***МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ С ЦЕЛ КОНТРОЛ НА КОЛИЧЕСТВАТА
РАЗРЕШЕНИ ДОБАВКИ ВЪВ ФУРАЖИТЕ****A. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИТАМИН А**

Витамин А се определя посредством:

- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17547 – Фуражи – методи за вземане на проби и анализ – Определяне на съдържанието на витамини А, Е и D ⁽¹⁾. Метод, използващ пречистване чрез твърдофазна екстракция (SPE) и високоефективна течна хроматография (HPLC) или
- чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза (RP-HPLC), с използване на UV или флуоресцентен детектор, съгласно описаното в точки 1—9 по-долу.

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност за определяне на количеството на витамин А (ретинол) във фуражи. Витамин А включва изцяло-*транс* ретинилов алкохол и неговите *цис*-изомери, които се определят по този метод. Съдържанието на витамин А се изразява в международни единици (IU) на kg. Една IU отговаря на активността на 0,300 µg изцяло-*транс*-витамин А алкохол или на 0,344 µg изцяло-*транс*-витамин А ацетат, или на 0,550 µg изцяло-*транс*-витамин А палмитат.

Границата на количествено определяне е 2 000 IU витамин А/kg.

2. Принцип

Пробата се хидролизира с етанолов разтвор на калиев хидроксид и витамин А се извлича в петролен етер. Разтворителят се елиминира чрез изпаряване, остатъкът се разтваря в метанол и, ако е необходимо, се разрежда до изискваната концентрация. Съдържанието на витамин А се определя чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза (RP-HPLC) с помощта на UV-детектор или флуоресцентен детектор. Параметрите на хроматографията се подбират така, че да не се разделя изцяло-*транс*-витамин А алкохол от неговите *цис*-изомери.

3. Реагенти

- 3.1. Етанол, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Петролен етер, диапазон на кипене: 40-60 °C
- 3.3. Метанол
- 3.4. Разтвор на калиев хидроксид, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Разтвор на натриев аскорбат, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (вж. забележката в т. 7.7)
- 3.6. Натриев сулфид, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Разтвор на натриев сулфид, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ в глицерин $\beta = 120 \text{ g/l}$ (за $x = 9$) (вж. забележките в точка 7.8)
- 3.7. Разтвор на фенолфталеин, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ в етанол (т. 3.1)

⁽¹⁾ Методът за анализ, предвиден в EN 17547, е приет за метод, който следва да се използва за целите на официалния контрол при определянето на витамини А и Е като алтернативен на метода за определяне на витамин А, описан в част А от настоящото приложение и на метода за определяне на витамин Е, описан в част Б от настоящото приложение.

▼ **M9**

- 3.8. 2-пропанол
- 3.9. Подвижна фаза за HPLC: смес от метанол (т. 3.3) и вода, например: 980 + 20 (v + v). Точното съотношение се определя от характеристиките на използваната колона.
- 3.10. Азот, незамърсен с кислород.
- 3.11. Изцяло-*транс*-витамин А ацетат, с изключителна чистота, с гарантирана активност, например $2,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.11.1. Изходен разтвор на изцяло-*транс*-витамин А ацетат: Претеглят се 50 mg стандартно вещество витамин А ацетат (т. 3.11) с точност до 0,1 mg в градуирана колба от 100 ml. Разтварят се в 2-пропанол (т. 3.8) и се допълва до марката със същия разтворител. Номиналната концентрация на този разтвор е 1 400 IU витамин А на ml. Точната концентрация се определя в съответствие с т. 5.6.3.1.
- 3.12. Изцяло-*транс*-витамин А палмитат, с изключителна чистота, с гарантирана активност, например $1,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.12.1. Изходен разтвор на изцяло транс витамин А палмитат: Претеглят се 80 mg стандартно вещество витамин А палмитат (т. 3.12) с точност до 0,1 mg в градуирана колба от 100 ml. Разтварят се в 2-пропанол (т. 3.8) и се допълва до марката със същия разтворител. Номиналната концентрация на този разтвор е 1 400 IU витамин А на ml. Точната концентрация се определя в съответствие с т. 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (ВНТ, бутилхидрокситолуол) (вж. забележката в т. 7.5)
4. **Апаратура**
 - 4.1. Вакуумен ротационен изпарител.
 - 4.2. Лабораторни съдове от тъмно стъкло.
 - 4.2.1. Плоскодънни или конусовидни колби от 500 ml, с шлиф.
 - 4.2.2. Градуирани колби с шлифована стъклена запушалка, тясно гърло, 10, 25, 100 и 500 ml.
 - 4.2.3. Конусовидни делителни фунии, 1 000 ml, с шлифована стъклена запушалка.
 - 4.2.4. Крушообразни колби, 250 ml, с шлиф.
 - 4.3. Хладник на Алин, дължина на кожуха 300 mm, с шлифован стъклен шлиф, с адаптер за тръба за хранване с газ.
 - 4.4. Нагъната филтърна хартия за сепарация на фазите, диаметър 185 mm (например Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
 - 4.5. Оборудване за HPLC със система за впръскване.
 - 4.5.1. Колона за течна хроматография, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, пълнеж от 5 или 10 μ m, или еквивалентна (експлоатационен критерий: при провеждане на HPLC трябва да се получи само един пик за всички изомери на ретинола).
 - 4.5.2. UV-детектор или флуоресцентен детектор с настройка на дължината на вълната.
 - 4.6. Спектрофотометър с 10-милиметрови кварцови елементи.
 - 4.7. Вана за водна баня с магнитна бъркалка.
 - 4.8. Екстрактор (вж. фиг.1), състоящ се от:

▼ M9

- 4.8.1. Стъклен цилиндър с обем 1 l, с шлифовани стъклени гърло и запушалка
- 4.8.2. Шлифована стъклена вложка, снабдена със странична тръбичка и регулируема тръба, която минава през центъра ѝ. Долната част на регулиращата се тръба следва да бъде с U-образна форма и с дюза в противоположния край, така че горният течен слой в цилиндъра да може да се прехвърли в делителна фуния

5. Процедура

Забележка: Витамин А е чувствителен към (УВ) светлина и податлив на окисляване. Всички манипулации трябва да се извършват на тъмно (в съдове от тъмно или покрито с алуминиево фолио стъкло) и в отсъствие на кислород (елиминира се с азот). По време на екстракцията въздухът над течността се заменя с азот (за да се избягва прекалено голямото налягане, по време на време трябва да се отваря запушалката).

5.1. Подготовка на пробата

Пробата се смиля, така че да може да премине през сито с отвори 1 mm, като се избягва нагряване. Стриването трябва да се извърши непосредствено преди претеглянето и осажуването, в противен случай съществува риск от загуби на витамин А. Пробата(-ите) не се стриват ако разпределението на частиците по размер е подходящо (напр. премикси и фуражни добавки).

5.2. Осапуняване

Според тегловното съдържание на витамин А, в плоскодънна или конусовидна колба от 500 ml (т. 4.2.1.) се претеглят с точност до 1mg 2—25 g от пробата. В случаите на ниски концентрации теглото на пробата може да бъде увеличено с цел да се осигури достатъчен брой частици в частта от пробата за анализ. Последователно се прибавят при постоянно разбъркване 130 ml етанол (т. 3.1), около 100 mg ВНТ (т. 3.13), 2 ml разтвор на натриев аскорбат (т. 3.5) и 2 ml разтвор на натриев сулфид (т. 3.6). Монтира се хладникът (т. 4.3) на колбата и последната се потапя във вана за водна баня с магнитна бъркалка (т. 4.7). Нагрява се до кипене и в продължение на 5 min се оставят парите да преминават през хладника. Прибавяте след това 25 ml разтвор на калиев хидроксид (3.4) през охладителя (4.3) и оставяте отново да се отвърне за 25 min., като бъркате при слаб приток на азот. Изплаква се хладникът с около 20 ml вода и се оставя съдържанието на колбата да изстине до достигането на стайна температура.

5.3. Екстракция

Чрез декантация осажуващият разтвор се прехвърля количествено, като колбата се изплаква с общо 250 ml вода, в делителна фуния от 1 000 ml (т. 4.2.3) или в екстрактора (т. 4.8). Колбата за осажуване се изплаква последователно с 25 ml етанол (т. 3.1) и 100 ml петролен етер (т. 3.2) и течността от изплакването се прехвърля в делителната фуния или в екстрактора. Съотношението между водата и етанола в комбинираните разтвори трябва да е около 2:1. Разклаща се енергично в продължение на 2 min и се оставя в покой за 2 min.

5.3.1. Екстракция с делителна фуния (т. 4.2.3)

Когато слоевете се отделят (вж. забележката в т. 7.3), слой от петролен етер се прехвърля в друга делителна фуния (т. 4.2.3). Екстракцията се повтаря два пъти със 100 ml петролен етер (т. 3.2), а след това два пъти с 50 ml петролен етер (т. 3.2).

Събраните екстракти се промиват два пъти в делителната фуния при леко разклащане (за да се избегне образуването на емулсия) с порции от по 100 ml вода и след това с повторно разклащане с нови порции от по 100 ml вода, докато последната остане безцветна след добавянето на разтвор на фенолфталеин (т. 3.7) (обикновено са достатъчни

▼ M9

четири промивания). Промитият екстракт се филтрира със сух нагънат филтър за отделяне на фазите (т. 4.4), за да се отстрани всякаква суспендирана вода, и се прехвърля в градуирана колба от 500 ml (т. 4.2.2). Делителната фуния и филтърът се изплакват с 50 ml петролен етер (т. 3.2), долива се до пълния обем с петролен етер (т. 3.2) и се разбърква добре.

5.3.2. Екстракция с помощта на екстрактор (т. 4.8)

Когато слоевете се отделят (вж. забележката в т. 7.3), запушалката на стъкления цилиндър (т. 4.8.1) се заменя с шлифованата стъклена вложка (т. 4.8.2), като долният U-образен край на регулиращата се трябва се поставя така, че да се окаже точно над нивото на разделителната повърхност. Чрез подаване на азот през страничната тръбичка се прилага налягане и се прехвърля горният слой петролен етер в делителна фуния от 1 000 ml (т. 4.2.3). Прибавят се 100 ml петролен етер (т. 3.2) в стъкления цилиндър, затваря се с запушалката и силно се разклаща. Оставят се слоевете да се отделят и горният слой се прехвърля в делителната фуния, както е посочено по-горе. Процедурата на екстракция се повтаря с нови 100 ml петролен етер (т. 3.2), след това още два пъти с по 50 ml петролен етер (т. 3.2) и слоевете петролен етер се добавят в делителната фуния.

Събраните екстракти от петролен етер се промиват съгласно процедурата, описана в т. 5.3.1, и се изпълняват процедурата, описана в посочената точка.

5.4. Подготовка на пробния разтвор за HPLC

Аликвотна част от разтвора на петролен етер (т. 5.3.1 или т. 5.3.2) се прехвърля с пипета в крушообразна колба от 250 ml (т. 4.2.4). Оставя се разтворителят да се изпари почти изцяло в ротационния изпарител (т. 4.1) при понижено налягане, при температура на ваната не по-висока от 40 °C. Възстановява се атмосферното налягане, като се вкара азот (точка 3.10), и колбата се изважда от ротационния изпарител. Останалото количество разтворител се отстранява в поток азот (т. 3.10) и остатъкът незабавно се разтваря в известен обем (10—100 ml) метанол (т. 3.3) (концентрацията на витамин А трябва да е в интервала от 5 IU/ml до 30 IU/ml).

5.5. Определяне чрез HPLC

Витамин А се отделя в колона C_{18} с обратна фаза (т. 4.5.1) и концентрацията му се измерва с помощта на UV-детектор (325 nm) или флуоресцентен детектор (възбуждане: 325 nm, излъчване: 475 nm) (т. 4.5.2).

Впръсква се аликвотна част (например 20 μ l) от получения метанолов разтвор (вж. т. 5.4) и се елуира с подвижната фаза (т. 3.9). Изчислява се средната височина на пика (площ) на няколко впръсквания от същия пробен разтвор и средните височини на пиковите (площи) на няколко впръсквания от калибрационните разтвори (т. 5.6.2).

Условия на HPLC

Дават се следните указания за условията на провеждане на анализа. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати:

Колона за течна хроматография (т. 4.5.1): 250 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , пълнеж от 5 μ m или от 10 μ m или еквивалентна

Подвижна фаза (т. 3.9): Смес от метанол (т. 3.3) и вода, например: 980 + 20 (v + v).

Скорост на изтичане: 1—2 ml/min

Детектор (т. 4.5.2): UV-детектор (325 nm) или флуоресцентен детектор (възбуждане: 325 nm, излъчване: 475 nm)

▼ M9

5.6. Калибриране

5.6.1. Приготвяне на работните стандартни разтвори

Отмерват се с пипета 20 ml от изходния разтвор на витамин А ацетат (т. 3.11.1) или 20 ml от изходния разтвор на витамин А палмитат (т. 3.12.1) в колба с плоско дъно или конусообразна колба с обем 500 ml (т. 4.2.1) и се хидролизират, както е описано в т. 5.2, но без да се прибавя ВНТ. След това се пристъпва към екстракция с петролен етер (т. 3.2) съгласно процедурата в т. 5.3 и се допълва до 500 ml с петролен етер (т. 3.2). В ротативния изпарител (вж. т. 5.4) 100 ml от този екстракт се подлагат на почти пълно изпаряване, отстранява се останалото количество разтворител в поток от азот (т. 3.10) и остатъкът отново се разтваря в 10,0 ml метанол (т. 3.3). Номиналната концентрация на този разтвор е 560 IU витамин А на ml. Точната концентрация следва да се определи в съответствие с т. 5.6.3.3. Работният стандартен разтвор трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

Отмерват се с пипета 2,0 ml от работния стандартен разтвор в градуирана колба от 20 ml, допълва се до пълния обем с метанол (т. 3.3) и се размесва. Номиналната концентрация на този разреден работен стандартен разтвор е 56 IU витамин А на ml.

5.6.2. Приготвяне на калибрационните разтвори и построяване на калибрационната крива

Прехвърлят се 1,0, 2,0, 5,0 и 10,0 ml от разредения работен стандартен разтвор в градуирани колби от 20 ml, допълва се до пълния обем с метанол (т. 3.3) и се размесва. Номиналните концентрации на тези разтвори са 2,8, 5,6, 14,0 и 28,0 IU витамин А на ml.

Неколкократно се впръскват 20 µl от всеки калибрационен разтвор и се определят средните височини на пиковете (площите). Според средните височини на пиковете (площите) се построява калибрационна крива, като се вземат предвид резултатите от UV-контрола (т. 5.6.3.3).

5.6.3. Ултравиолетово калибриране на стандартните разтвори

5.6.3.1. Изходен разтвор на витамин А ацетат

Отмерват се с пипета 2,0 ml от изходния разтвор на витамин А ацетат (т. 3.11.1) в градуирана колба от 50 ml (т. 4.2.2) и се допълва до пълния обем с 2-пропанол (т. 3.8). Номиналната концентрация на този разтвор е 56 IU витамин А на ml. Отмерват се с пипета 3,0 ml от този разтвор в градуирана колба от 25 ml и се допълва до пълния обем с 2-пропанол (т. 3.8). Номиналната концентрация на този разтвор е 6,72 IU витамин А на ml. Ултравиолетовият (UV) спектър на разтвора се сравнява с този на 2-пропанол (т. 3.8) в спектрофотометъра (т. 4.6) между 300 nm и 400 nm. Максимумът на екстинция трябва да бъде между 325 nm и 327 nm.

Изчисляване на съдържанието на витамин А:

$$\text{IU витамин А/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ за витамин А ацетат} = 1\,530 \text{ при } 326 \text{ nm в } 2 - \text{пропанол})$$

5.6.3.2. Изходен разтвор на витамин А палмитат

Отмерват се с пипета 2,0 ml от изходния разтвор на витамин А палмитат (т. 3.12.1) в градуирана колба от 50 ml (т. 4.2.2) и се допълва до пълния обем с пропанол-2 (т. 3.8). Номиналната концентрация на този разтвор е 56 IU витамин А на ml. Отмерват се с пипета 3,0 ml от този разреден разтвор на витамин

▼ **M9**

А в градуирана колба от 25 ml и се допълва до пълния обем с 2-пропанол (т. 3.8). Номиналната концентрация на този разтвор е 6,72 IU витамин А на ml. Ултравиолетовият (UV) спектър на разтвора се сравнява с този на 2-пропанол (т. 3.8) в спектрофотометъра (т. 4.6) между 300 nm и 400 nm. Максимумът на екстинция трябва да бъде между 325 nm и 327 nm.

Изчисляване на съдържанието на витамин А:

$$\text{IU витамин А/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ за витамин А палмитат} = 957 \text{ при } 326 \text{ nm в } 2 - \text{пропанол})$$

5.6.3.3. Работен стандартен разтвор на витамин А

Отмерват се с пипета 3,0 ml неразреден работен стандартен разтвор на витамин А, приготвен по процедурата в т. 5.6.1, в градуирана колба от 50 ml (т. 4.2.2) и се допълва до пълния обем с 2-пропанол (т. 3.8). Отмерват се пипета 5,0 ml от този разтвор в градуирана колба от 25 ml и се допълва до пълния обем с 2-пропанол (т. 3.8). Номиналната концентрация на този разтвор е 6,72 IU витамин А на ml. Ултравиолетовият (UV) спектър на разтвора се сравнява с този на 2-пропанол (т. 3.8) в спектрофотометъра (т. 4.6) между 300 nm и 400 nm. Максимумът на екстинция трябва да бъде между 325 nm и 327 nm.

Изчисляване на съдържанието на витамин А:

$$\text{IU витамин А/ml} = E_{325} \times 18,30$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ за витамин А алкохол} = 1\,821 \text{ при } 325 \text{ nm в } 2 - \text{пропанол})$$

6. Изчисляване на резултатите

Като се изхожда от средната височина (площ) на пиковите на витамин А на пробния разтвор, се определя концентрацията на този разтвор в IU/ml чрез сравняване с калибрационната крива (т. 5.6.2).

Съдържанието w на витамин А в пробата, изразено в IU/kg, се получава по следната формула:

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

където:

c = концентрация на витамин А в пробния разтвор (т. 5.4) в IU/ml

V_1 = обем на пробния разтвор (т. 5.4) в ml

V_2 = обем на взетата алиquotна част по т. 5.4 в ml

m = тегло на частта от пробата за анализ в грамове

7. Забележки

- 7.1. При проби с ниско съдържание на витамин А, може да се окаже полезно да се обединят получените от две осажуваания екстракти в петролен етер (претеглено количество: 25 g) в един пробен разтвор за определяне чрез HPLC.

▼ **M9**

- 7.2. Вземаната за анализ проба не трябва да съдържа повече от 2 g мазнини.
- 7.3. Ако не се получи разделяне на фазите, се прибавят около 10 ml етанол (т. 3.1), за да се пресече емулсията.
- 7.4. При рибено масло и други чисти мазнини времето на осаждаване се удължава до 45—60 min.
- 7.5. ВНТ може да се замени с хидрохинон.
- 7.6. Разделянето на ретиноловите изомери е възможно при използване на нормалнофазова колона. В този случай обаче при изчисленията височината (площта) на пикетите на транс- и цисизомерите се сумира.
- 7.7. Разтворът на натриев аскорбат може да се замени с приблизително 150 ml аскорбинова киселина.
- 7.8. Разтворът на натриев сулфид може да се замени с около 50 ml EDTA.
- 7.9. При анализ на витамин А в заместители на млякото трябва да се обърне специално внимание на:
- осаждаването (т. 5.2): поради наличието на мазнини в пробата, може да е необходимо увеличаване на количеството на разтвора на калиев хидроксид (т. 3.4);
 - екстракцията (т. 5.3): поради наличието на емулсии, може да се наложи коригиране на съотношението 2:1 между етанол и вода.

За да се провери дали прилаганият метод за анализ дава надеждни резултати за конкретната матрица (заместител на мляко), се провежда тест за аналитичен добив върху още една част от пробата. Ако стойността на аналитичен добив е по-ниска от 80 %, аналитичният резултат следва да се коригира с оглед на аналитичния добив.

8. **Повторяемост**

Разликата в резултатите от две паралелни определяния, проведени върху една и съща проба, не трябва да надхвърля 15 % по отношение на по-високия резултат.

9. **Резултати от съвместно изследване ⁽¹⁾**

	Премикс	Премикс фураж	Минерален концентрат	Протеинов фураж	Прасенца
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Средна стойност в IU/kg	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614

⁽¹⁾ Проведено от Работната група по фуража на Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ **M9**

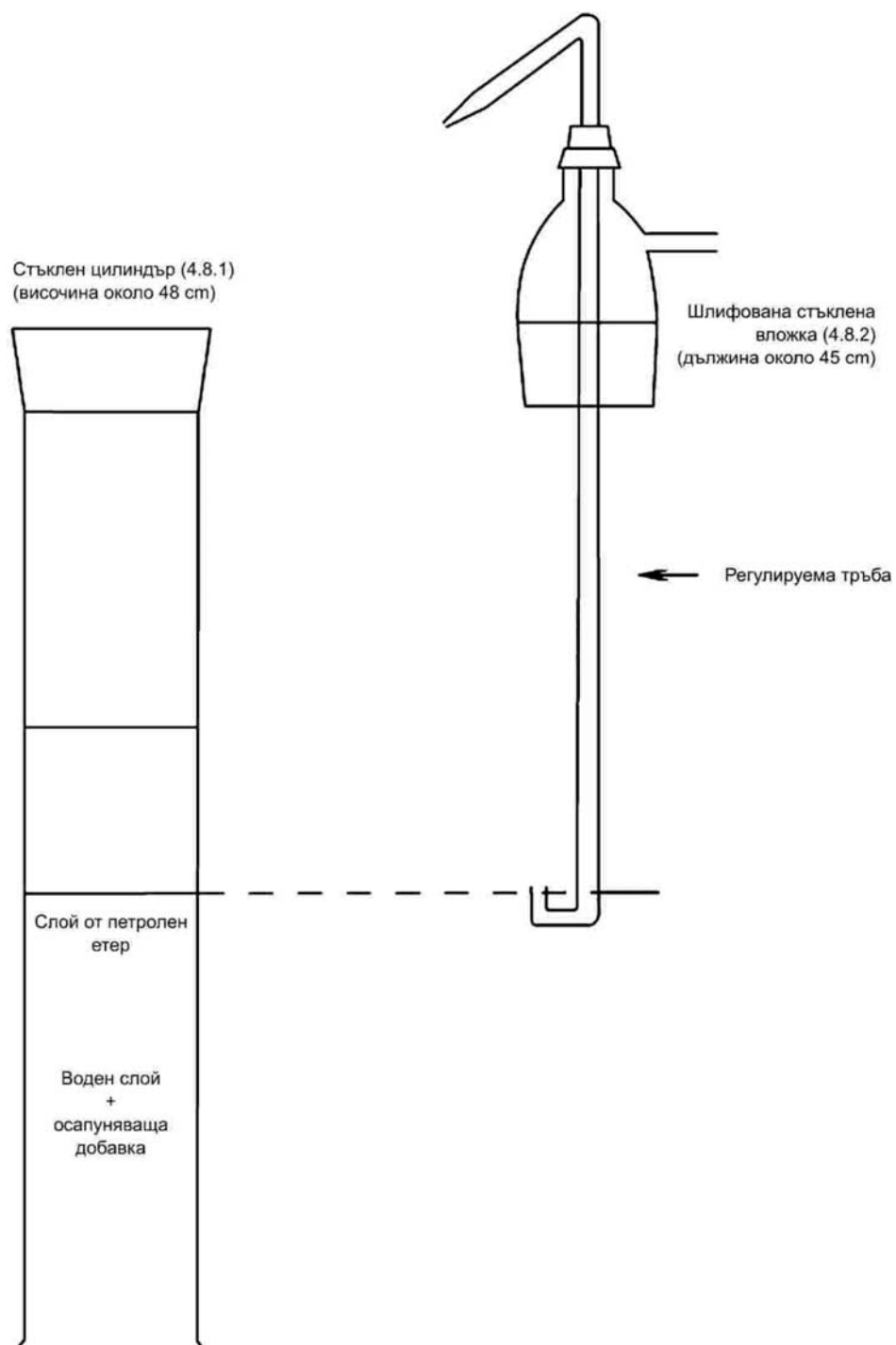
	Премикс	Премикс фураж	Минерален концентрат	Протеинов фураж	Прасенца
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L:	брой на лабораториите
n:	брой отделни стойности
sr:	стандартно отклонение на повторяемостта
sR:	стандартно отклонение на възпроизводимостта
г:	повторяемост
R;	възпроизводимост
CVr:	коефициент на вариация на повторяемостта
CVR:	коефициент на вариация на възпроизводимостта

▼ M9

Фигура 1

Екстрактор (точка 4.8)



▼ **M9****Б. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИТАМИН Е**

Витамин Е се определя посредством:

- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17547 – Фуражи – методи за вземане на проби и анализ – Определяне на съдържанието на витамини А, Е и D ⁽¹⁾ – Метод, използващ пречистване чрез твърдофазна екстракция (SPE) и високоефективна течна хроматография (HPLC) или
- чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза (RP-HPLC), с използване на UV или флуоресцентен детектор, съгласно описаното в точки 1—9 по-долу.

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност за определяне на количеството на витамин Е във фуражи. Съдържанието на витамин Е се изразява в mg DL- α -токоферол ацетат на kg. 1 mg DL- α -токоферол ацетат отговаря на 0,91 mg DL- α -токоферол (витамин Е).

Границата на количествено определяне е 2 mg витамин Е/kg. Достигането на тази граница е възможно само с флуоресцентен детектор. При използване на UV-детектор границата на количествено определяне е 10 mg/kg.

2. Принцип

Пробата се хидролизира с етанолов разтвор на калиев хидроксид и витамин Е се извлича в петролен етер. Разтворителят се елиминира чрез изпаряване, остатъкът се разтваря в метанол и, ако е необходимо, се разрежда до изискваната концентрация. Съдържанието на витамин Е се определя чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза с помощта на флуоресцентен детектор или UV-детектор.

3. Реагенти

- 3.1. Етанол, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Петролен етер, диапазон на кипене: 40—60 °C
- 3.3. Метанол
- 3.4. Разтвор на калиев хидроксид, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Разтвор на натриев аскорбат, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (вж. забележката в т. 7.7)
- 3.6. Натриев сулфид, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
 - 3.6.1. Разтвор на натриев сулфид, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ в глицерин $\beta = 120 \text{ g/l}$ (за $x = 9$) (вж. забележките в точка 7.8)
- 3.7. Разтвор на фенолфталеин, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ в етанол (т. 3.1)
- 3.8. Подвижна фаза за HPLC: смес от метанол (т. 3.3) и вода, например: 980 + 20 ($v + v$). Точното съотношение се определя от характеристиките на използваната колона.
- 3.9. Азот, незамърсен с кислород.
- 3.10. DL- α -токоферол ацетат, с изключителна чистота, с гарантирана активност

⁽¹⁾ Методът за анализ, предвиден в EN 17547, е приет за метод, който следва да се използва за целите на официалния контрол при определянето на витамини А и Е като алтернативен на метода за определяне на витамин А, описан в част А от настоящото приложение и на метода за определяне на витамин Е, описан в част Б от настоящото приложение.

▼ **M9**

3.10.1. Изходен разтвор на DL- α -токоферол ацетат: Претеглят се 100 mg стандартно вещество DL- α -токоферол ацетат (т. 3.10) с точност до 0,1 mg в градуирана колба от 100 ml. Разтварят се в етанол (т. 3.1) и се допълва до пълния обем със същия разтворител. 1 ml от този разтвор съдържа 1 mg DL- α -токоферол ацетат. (за контрола с ултравиолетови лъчи вж. т. 5.6.1.3; за стабилизирането вж. забележките в т. 7.4).

3.11. DL- α -токоферол, с изключителна чистота, с гарантирана активност

3.11.1. Изходен разтвор на DL- α -токоферол: Претеглят се 100 mg стандартно вещество DL- α -токоферол (т. 3.11) с точност до 0,1 mg в градуирана колба от 100 ml. Разтварят се в етанол (т. 3.1) и се допълва до пълния обем със същия разтворител. 1 ml от този разтвор съдържа 1 mg DL- α -токоферол. (за контрола с ултравиолетови лъчи вж. т. 5.6.2.3; за стабилизирането вж. забележките в т. 7.4).

3.12. 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (ВНТ, бутилхидрокситолуол) (вж. забележката в т. 7.5)

4. Апаратура

4.1. Ротационен тънкослоен изпарител

4.2. Лабораторни съдове от тъмно стъкло

4.2.1. Плоскодънни или конусовидни колби от 500 ml, с шлиф

4.2.2. Градуирани колби с шлифована стъклена запушалка, тясно гърло, 10, 25, 100 и 500 ml.

4.2.3. Конусовидни делителни фунии, 1 000 ml, с шлифована стъклена запушалка

4.2.4. Крушообразни колби, 250 ml, с шлиф

4.3. Хладник на Алин, дължина на кожуха 300 mm, с шлифован стъклен шлиф, с адаптер за тръба за захранване с газ

4.4. Нагъната филтърна хартия за сепарация на фазите, диаметър 185 mm (например Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Оборудване за HPLC със система за впръскване

4.5.1. Колона за течна хроматография, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, пълнеж от 5 или 10 μ m, или еквивалентна

4.5.2. УВ- или флуорометричен датчик с променлива дължина на вълната

4.6. Спектрофотометър с 10-милиметрови кварцови елементи

4.7. Вана за водна баня с магнитна бъркалка

4.8. Екстрактор (вж. фиг.1), състоящ се от:

4.8.1. Стъклен цилиндър с обем 1 l, с шлифовани стъклени гърло и запушалка

4.8.2. Шлифована стъклена вложка, снабдена със странична тръбичка и регулируема тръба, която минава през центъра ѝ. Долната част на регулиращата се тръба следва да бъде с U-образна форма и с дюза в противоположния край, така че горният течен слой в цилиндъра да може да се прехвърли в делителна фуния

▼ M9

5. Процедура

Забележка: Витамин Е е чувствителен към (UV-) светлина и податлив на окисляване. Всички манипулации трябва да се извършват на тъмно (в съдове от тъмно или покрито с алуминиево фолио стъкло) и в отсъствие на кислород (елиминира се с азот). По време на екстракцията въздухът над течността се заменя с азот (за да се избягва прекалено голямото налягане, от време на време трябва да се отваря запушалката).

5.1. Подготовка на пробата

Пробата се смила, така че да може да премине през сито с отвори 1 mm, като се избягва нагряване. Смилането трябва да стане непосредствено преди претеглянето и осапуняването, в противен случай съществува риск от загуби на витамин Е.

5.2. Осапуняване

Според тегловното съдържание на витамин Е, от 2 до 25 g от пробата се претеглят с точност до 0,01 g в плоскодънна или конусовидна колба от 500 ml (т. 4.2.1.). Последователно се прибавят при постоянно разбъркване 130 ml етанол (т. 3.1), около 100 mg ВНТ (т. 3.12), 2 ml разтвор на натриев аскорбат (т. 3.5) и 2 ml разтвор на натриев сулфид (т. 3.6). Монтира се хладникът (т. 4.3) на колбата и последната се потапя във вана за водна баня с магнитна бъркалка (т. 4.7). Нагрява се до кипене и в продължение на 5 min се оставят парите да преминават през хладника. Прибавяте след това 25 ml разтвор на калиев хидроксид (3.4) през охладителя (4.3) и оставяте отново да се отвърне за 25 min., като бъркате при слаб приток на азот. Изплаква се хладникът с около 20 ml вода и се оставя съдържанието на колбата да изстине до достигането на стайна температура.

5.3. Екстракция

Чрез декантация осапуняващият разтвор се прехвърля количествено, като колбата се изплаква с общо 250 ml вода, в делителна фуния от 1 000 ml (т. 4.2.3) или в екстрактора (т. 4.8). Колбата за осапуняване се изплаква последователно с 25 ml етанол (т. 3.1) и 100 ml петролен етер (т. 3.2) и течността от изплакването се прехвърля в делителната фуния или в екстрактора. Съотношението между водата и етанола в комбинирания разтвор трябва да е около 2:1. Разклаща се енергично в продължение на 2 min и се оставя в покой за 2 min.

5.3.1. Екстракция с делителна фуния (т. 4.2.3)

Когато слоевете се отделят (вж. забележката в т. 7.3), слой от петролен етер се прехвърля в друга делителна фуния (т. 4.2.3). Екстракцията се повтаря два пъти със 100 ml петролен етер (т. 3.2), а след това два пъти с 50 ml петролен етер (т. 3.2).

Събраните екстракти се промиват два пъти в делителната фуния при леко разклащане (за да се избегне образуването на емулсия) с порции от по 100 ml вода и след това с повторно разклащане с нови порции от по 100 ml вода, докато последната остане безцветна след добавянето на разтвор на фенолфталеин (т. 3.7) (обикновено са достатъчни четири промивания). Промитият екстракт се филтрира със сух нагънат филтър за отделяне на фазите (т. 4.4), за да се отстрани всякаква суспендирана вода, и се прехвърля в градуирана колба от 500 ml (т. 4.2.2). Делителната фуния и филтърът се изплакват с 50 ml петролен етер (т. 3.2), долива се до пълния обем с петролен етер (т. 3.2) и се разбърква добре.

5.3.2. Екстракция с помощта на екстрактор (т. 4.8)

Когато слоевете се отделят (вж. забележката в т. 7.3), запушалката на стъкления цилиндър (т. 4.8.1) се заменя с шлифованата стъклена вложка (т. 4.8.2), като долният U-образен край на регулиращата се тръба се поставя така, че да се окаже точно над нивото на разделителната повърхност. Чрез подаване на азот през страничната тръбичка се прилага налягане и се прехвърля

▼ M9

горният слой петролен етер в делителна фуния от 1 000 ml (т. 4.2.3). Прибавят се 100 ml петролен етер (т. 3.2) в стъкления цилиндър, затваря се с запушалката и силно се разклаща. Оставят се слоевете да се отделят и горният слой се прехвърля в делителната фуния, както е посочено по-горе. Процедурата на екстракция се повтаря с нови 100 ml петролен етер (т. 3.2), след това още два пъти с по 50 ml петролен етер (т. 3.2) и слоевете петролен етер се добавят в делителната фуния.

Събраните екстракти от петролен етер се промиват съгласно процедурата, описана в т. 5.3.1, и се изпълняват процедурата, описана в посочената точка.

5.4. Подготовка на пробния разтвор за HPLC

Аликвотна част от разтвора на петролен етер (т. 5.3.1 или т. 5.3.2) се прехвърля с пипета в крушообразна колба от 250 ml (т. 4.2.4). Остава се разтворителят да се изпари почти изцяло в ротационния изпарител (т. 4.1) при понижено налягане, при температура на ваната не по-висока от 40 °C. Възстановява се атмосферното налягане, като се вкара азот (точка 3.9), и колбата се изважда от ротационния изпарител. Останалото количество разтворител се отстранява в поток азот (т. 3.9) и остатъкът незабавно се разтваря в известен обем (10—100 ml) метанол (т. 3.3) (концентрацията на DL- α -токоферол трябва да е в интервала от 5 $\mu\text{g/ml}$ до 30 $\mu\text{g/ml}$).

5.5. Определяне чрез HPLC

Витамин Е се отделя в обратнофазова колона C₁₈ (т. 4.5.1) и концентрацията му се измерва с помощта на флуоресцентен детектор (възбуждане: 295 nm, излъчване: 330 nm) или UV-детектор (292 nm) (т. 4.5.2).

Впръсква се аликвотна част (например 20 μl) от получения метанолов разтвор (вж. т. 5.4) и се елуира с подвижната фаза (т. 3.8). Изчисляват се средните височини на пиковите (площите) на няколко впръсквания от същия пробен разтвор и средните височини на пиковите (площи) на няколко впръсквания от калибрационните разтвори (т. 5.6.2).

Условия на HPLC

Дават се следните указания за условията на провеждане на анализа. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати:

Колона за течна хроматография (т. 4.5.1):	250 mm $\times$ 4 mm, C ₁₈ , 5 или пълнеж от 10 μm , или еквивалентна
Подвижна фаза (т. 3.8):	Смес от метанол (т. 3.3) и вода, напр. 980 + 20 (v + v).
Скорост на изтичане:	1—2 ml/min
Детектор (т. 4.5.2)	Флуоресцентен детектор (възбуждане: 295 nm / излъчване: 330 nm) или UV детектор (292 nm)

5.6. Калибриране (DL- α -токоферол ацетат или DL- α -токоферол)

5.6.1. Стандартен разтвор на DL- α -токоферол ацетат

5.6.1.1. Приготвяне на работния стандартен разтвор

Прехвърлят се с пипета 25 ml от изходния разтвор на DL- α -токоферол ацетат (т. 3.10.1) в плоскодънна или конусообразна колба с обем 500 ml (т. 4.2.1) и се хидролизират, както е описано в точка 5.2. След това се пристъпва към екстракция с петролен етер (т. 3.2) съгласно процедурата в т. 5.3 и се допълва до 500 ml с петролен етер. В ротативния изпарител (вж. т. 5.4) 25 ml от този екстракт се подлагат на почти пълно изпаряване, отстранява се останалото количество разтворител в поток от азот

▼ M9

(т. 3.9) и остатъкът отново се разтваря в 25,0 ml метанол (т. 3.3). Номиналната концентрация на този разтвор е 45,5 µg DL-α-токоферол на ml, еквивалентен на 50 µg DL-α-токоферол ацетат на ml. Работният стандартен разтвор се приготвя непосредствено преди употреба.

5.6.1.2. Приготвяне на калибрационните разтвори и построяване на калибрационната крива

Прехвърлят се 1,0, 2,0, 4,0 и 10,0 ml от работния стандартен разтвор в няколко градуирани колби от 20 ml, допълват се до пълния обем с метанол (т. 3.3) и съдържанието се разбърква. Номиналните концентрации на тези разтвори са 2,5; 5,0; 10,0 и 25,0 µg/ml DL-α-токоферол ацетат, или 2,28; 4,55; 9,10 µg/ml и 22,8 µg/ml DL-α-токоферол.

Неколкократно се впръскват 20 µl от всеки калибрационен разтвор и се определят средните височини на пиковите (площите). Като се използват средните височини на пиковите (площите), се построява калибрационната крива.

5.6.1.3. UV-калибриране на изходния разтвор на DL-α-токоферол ацетат (т. 3.10.1)

Разреждат се 5,0 ml от основния разтвор на DL-α-токоферол ацетат (т. 3.10.1) с етанол до 25,0 ml и ултравиолетовият спектър на този разтвор се сравнява със спектъра на етанол (т. 3.1) в спектрален фотометър (т. 4.6) при дължина на вълната между 250 nm и 320 nm.

Максималното поглъщане се наблюдава при 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ при } 284 \text{ nm в етанол}$$

При това разреждане трябва да се получи стойност на екстинция от 0,84 до 0,88.

5.6.2. Стандартен разтвор на DL-α-токоферол ацетат

5.6.2.1. Приготвяне на работния стандартен разтвор

Прехвърлят се с пипета 2 ml от изходния разтвор на DL-α-токоферол (т. 3.11.1) в градуирана колба от 50 ml, разтваря се в метанол (т. 3.3) и се допълва до пълния обем с метанол. Номиналната концентрация на този разтвор е 40 µg DL-α-токоферол на ml, еквивалентен на 44,0 µg DL-α-токоферол ацетат на ml. Работният стандартен разтвор се приготвя непосредствено преди употреба.

5.6.2.2. Приготвяне на калибрационните разтвори и построяване на калибрационната крива

Прехвърлят се 1,0, 2,0, 4,0 и 10,0 ml от работния стандартен разтвор в няколко градуирани колби от 20 ml, допълват се до пълния обем с метанол (т. 3.3) и съдържанието се разбърква. Номиналните концентрации на тези разтвори са 2,0; 4,0; 8,0 и 20,0 µg/ml DL-α-токоферол или 2,20; 4,40; 8,79 и 22,0 µg/ml DL-α-токоферол ацетат.

Неколкократно се впръскват 20 µl от всеки калибрационен разтвор и се определят средните височини на пиковите (площите). Като се използват средните височини на пиковите (площите), се построява калибрационната крива.

5.6.2.3. UV-калибриране на изходния разтвор на DL-α-токоферол (т. 3.11.1)

Разреждат се 2,0 ml от изходния разтвор на DL-α-токоферол (т. 3.11.1) с етанол до 25,0 ml и ултравиолетовият спектър на този разтвор се сравнява със спектъра на етанол (т. 3.1) в спектрофотометър (т. 4.6) при дължина на вълната между 250 nm и 320 nm. Максималното поглъщане се наблюдава при 292 nm:

▼ **M9**

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ при } 292 \text{ nm в етанол}$$

При това разреждане трябва да се получи стойност на екстинция равна на 0,6.

6. Изчисляване на резултатите

Като се изхожда от средната височина (повърхността) на пиковите на витамин Е на пробния разтвор, концентрацията на този разтвор в $\mu\text{g/ml}$ (изчислена като DL- α -токоферол ацетат) се определя чрез сравнение с калибрационната крива (т. 5.6.1.2 или т. 5.6.2.2.).

Съдържанието w на витамин Е в пробата, изразено в mg/kg , се пресмята по следната формула:

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

където:

c = концентрация на витамин Е (като DL- α -токоферол ацетат) в пробния разтвор (т. 5.4) в $\mu\text{g/ml}$

V_1 = обем на пробния разтвор (т. 5.4) в ml

V_2 = обем на взетата аликвотна част (т. 5.4) в ml

m = тегло на частта от пробата за анализ в грамове

7. Забележки

- 7.1. При проби с ниско съдържание на витамин Е, може да се окаже полезно да се обединят получените от две осажуваания екстракти в петролен етер (претеглено количество: 25 g) в един пробен разтвор за определяне чрез HPLC.
- 7.2. Взетата за анализ проба не трябва да съдържа повече от 2 g мазнини.
- 7.3. Ако не се получи разделяне на фазите, се прибавят около 10 ml етанол (т. 3.1), за да се пресече емулсията.
- 7.4. След спектрофотометричното измерване на разтвора на DL- α -токоферол ацетат или на DL- α -токоферол съгласно т. 5.6.1.3 или т. 5.6.2.3 съответно, към разтвора (т. 3.10.1 или т. 3.10.2) се прибавят около 10 mg ВНТ (т. 3.12) и разтворът се съхранява хладилник (максимален срок на съхранение: 4 седмици).
- 7.5. ВНТ може да се замени с хидрохинон.
- 7.6. Разделянето на α -, β -, γ - и δ -токоферол е възможно при използване на нормалнофазова колона.
- 7.7. Разтворът на натриев аскорбат може да се замени с приблизително 150 ml аскорбинова киселина.
- 7.8. Разтворът на натриев сулфид може да се замени с около 50 ml EDTA.
- 7.9. Витамин Е много лесно се хидролиза в алкална среда и поради това е много чувствителен към окисляване, особено в присъствието на микроелементи като желязо или мед. При определяне на витамин Е в премикси при равнища по-високи от 5 000 mg/kg , може да се стигне до разграждане на витамин Е. Поради това за потвърждаване се препоръчва метод с използване на високоефективна течна хроматография, който включва ензимно разграждане на препаратата, съдържащ витамин Е, но без етапа на осажуване в алкална среда.

▼ **M9**8. **Повторяемост**

Разликата в резултатите от две паралелни определяния, проведени върху една и съща проба, не трябва да надхвърля 15 % по отношение на по-високия резултат.

9. **Резултати от съвместно изследване ⁽¹⁾**

	Премикс	Премикс фураж	Минерален концентрат	Протеинов фураж	Прасенца
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Средна стойност в [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: брой на лабораториите

n: брой отделни стойности

s_r: стандартно отклонение на повторяемостта

s_R: стандартно отклонение на възпроизводимостта

r:= повторяемост

R: възпроизводимост

CV_r: коефициент на вариация на повторяемостта

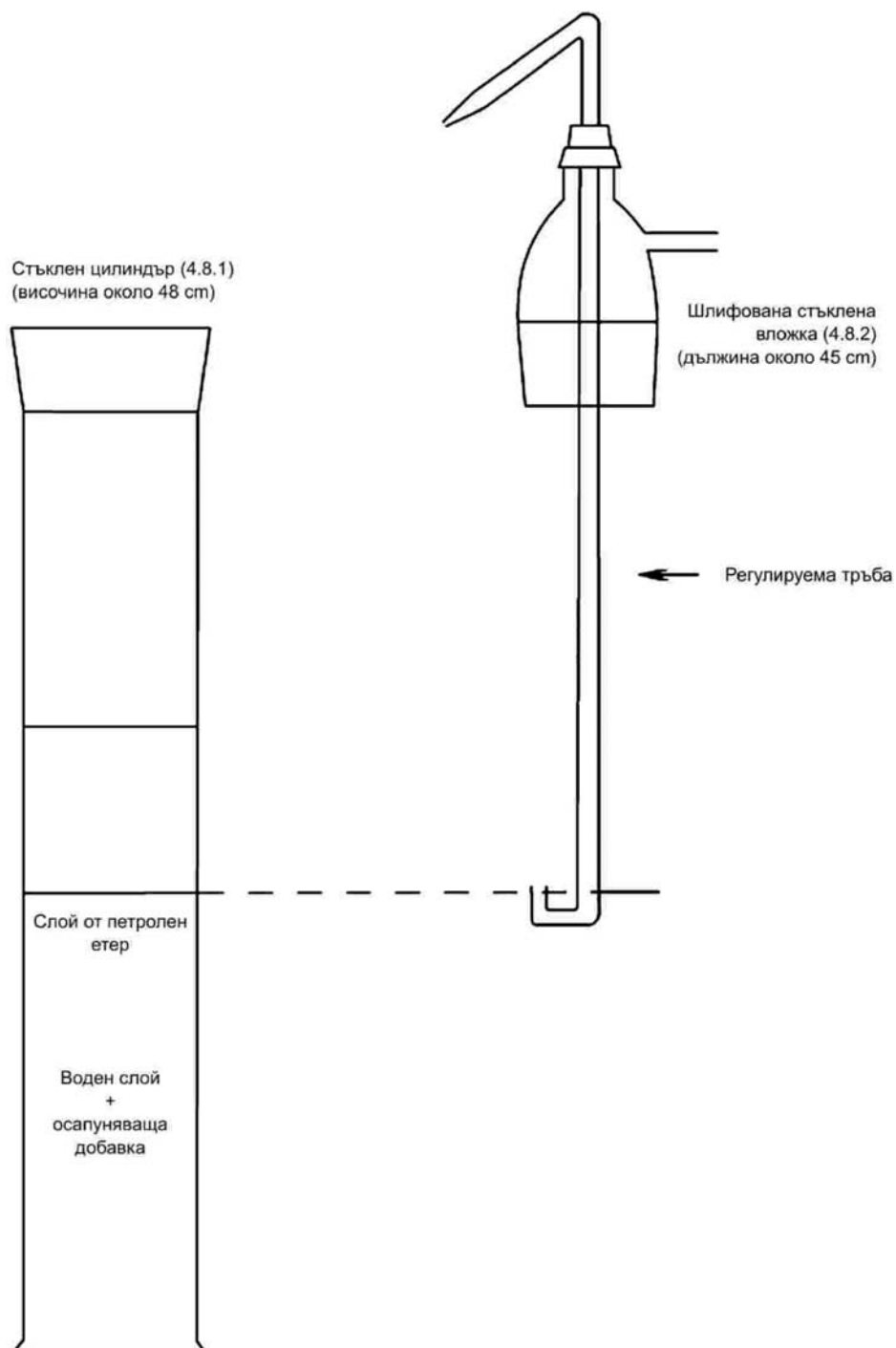
CV_R: коефициент на вариация на възпроизводимостта

⁽¹⁾ Проведено от Работната група по фуража на Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)

▼ M9

Фигура 2

Екстрактор (точка 4.8)



▼ **M9****В. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЛЕДИ ОТ МИКРОЕЛЕМЕНТИ — ЖЕЛЯЗО, МЕД, МАНГАН И ЦИНК**

Съдържанието на желязо, мед, манган и цинк се определя посредством:

- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 15510 – Фуражи: Методи за вземане на проби и за анализ – Определяне на калций, натрий, фосфор, магнезий, калий, желязо, цинк, мед, манган, кобалт, молибден и олово чрез ICP-AES, или
- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 15621 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на калций, натрий, фосфор, магнезий, калий, сяра, желязо, цинк, мед, манган и кобалт след разлагане под налягане чрез ICP-AES, или
- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17053 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на микроелементи, тежки метали и други елементи във фуражи чрез масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) (мултиметод), или
- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN ISO 6869 – Фуражи. Определяне съдържанието на калций, мед, желязо, магнезий, манган, калий, натрий и цинк. Метод, използващ атомноабсорбционна спектрометрия, или
- метода на пламъковата атомноабсорбционна спектрометрия (FAAS), описан в точки 1—8 по-долу.

1 Цел и обхват

Методът дава възможност да се определи съдържанието на микроелементите желязо, мед, манган и цинк в храните ⁽¹⁾. Границите на количествено определяне са следните:

- желязо (Fe): 20 mg/kg
- мед (Cu): 10 mg/kg
- манган (Mn): 20 mg/kg
- цинк (Zn): 20 mg/kg

2. Принцип

Пробата се поставя в разтвор на солна киселина след разрушаване на органичните вещества, ако има такива. Елементите желязо, мед, манган и цинк се определят с атомноабсорбционна спектрометрия след подходящо разтваряне.

3. Реагенти*Уводни бележки*

За приготвянето на реагентите и аналитичните разтвори се използва вода, която не съдържа подлежащите на определяне катиони, получена чрез двойно дестилиране в боросиликатно или кварцово стъкло или чрез двойно третиране с йонообменна смола.

Реагентите трябва да бъдат поне с чистота за анализ. Отсъствието на елемента за определяне трябва да се проверява чрез експеримент с празна проба. Ако е необходимо, реагентите трябва допълнително да се пречистват.

⁽¹⁾ Методът не е валидиран посредством съвместно изпитване за различни фуражни матрици. За допълнителна информация вж. <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

Вместо описаните по-долу стандартни разтвори, могат да се използват търговски стандартни разтвори, при условие че те са с гарантирано качество и са проверени преди употреба.

- 3.1. Солна киселина. (d:1.19 g/ml).
- 3.2. Солна киселина. (6 mol/l).
- 3.3. Солна киселина. (0,5 mol/l).
- 3.4. Флуороводородна киселина 38—40 % (v/v) със съдържание на желязо (Fe) под 1 mg/l и остатък след изпаряване под 10 mg (като сулфат) на литър.
- 3.5. Сярна киселина. (d:1,84 g/ml).
- 3.6. Водороден прекис. (приблизително 100 обема кислород (30 % на тегло)).
- 3.7. Стандартен разтвор, съдържащ желязо (1 000 µg Fe/ml), приготвен, както следва, или еквивалентен търговски достъпен разтвор: разтваря се 1 g желязна тел в 200 ml солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2), добавят се 16 ml водороден прекис (т. 3.6) и се допълва до един литър с вода.
- 3.7.1. Работен стандартен разтвор, съдържащ желязо (100 µg Fe/ml), приготвен чрез разреждане на една част от стандартния разтвор (т. 3.7) с 9 части вода.
- 3.8. Стандартен разтвор, съдържащ мед (1 000 µg Cu/ml), приготвен, както следва, или еквивалентен търговски достъпен разтвор:
 - разтваря се 1 g мед на прах в 25 ml солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2), добавят се 5 ml водороден прекис (т. 3.6) и се допълва до един литър с вода.
- 3.8.1. Работен стандартен разтвор, съдържащ мед (10 µg Cu/ml), приготвен чрез разреждане на една част от стандартния разтвор (т. 3.8) с 9 части вода и след това разреждане на една част от получения разтвор с 9 части вода.
- 3.9. Стандартен разтвор, съдържащ манган (1 000 µg Mn/ml), приготвен, както следва, или еквивалентен търговски достъпен разтвор:
 - разтваря се 1 g манган на прах в 25 ml солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2) и се допълва до един литър с вода.
- 3.9.1. Работен стандартен разтвор, съдържащ манган (10 µg Mn/ml), приготвен чрез разреждане на една част от стандартния разтвор (т. 3.9) с 9 части вода и след това разреждане на една част от получения разтвор с 9 части вода.
- 3.10. Стандартен разтвор, съдържащ цинк (1 000 µg Zn/ml), приготвен, както следва, или еквивалентен търговски достъпен разтвор:
 - разтваря се 1 g цинк на ленти или листове в 25 ml солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2) и се допълва до 1 литър с вода.
- 3.10.1. Работен стандартен разтвор, съдържащ цинк (10 µg Zn/ml), приготвен чрез разреждане на една част от стандартния разтвор (т. 3.10) с 9 части вода и след това разреждане на една част от получения разтвор с 9 части вода.
- 3.11. Разтвор на лантанов трихлорид: разтварят се 12 g лантанов оксид в 150 ml вода, добавят се 100 ml солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2) и се допълва до един литър с вода.

▼ M9

4. Апаратура

- 4.1. Муфелна пещ с регулиране на температурата и по възможност със записващо устройство.
- 4.2. Съдовете трябва да бъдат от устойчиво боросиликатно стъкло и се препоръчва да се използва апарат, който е предназначен само за определяне на микроелементи.
- 4.3. Атомноабсорбиционен спектрометър, съответстващ на изискванията на метода, с оглед на чувствителността и прецизността в необходимия обхват.

5. Процедура ⁽¹⁾

5.1. Проби, съдържащи органични вещества

5.1.1. *Опепеляване и приготвяне на разтвора за анализ* ⁽²⁾

- 5.1.1.1. Поставете се 5—10 g от пробата, премерена с точност до 0,2 mg, в кварцов или платинен тигел (вж. забележка б)), изсушават се в пещ при 105 °C и тигелът се поставя в студената муфелна пещ (т. 4.1). Пещта се затваря (виж забележка в) и температурата постепенно се повишава до 450—475 °C за около 90 минути. Тази температура се поддържа 4—16 часа (напр. през нощта) за отделяне на сажите, след това пещта се отваря, за да се охладят (вж. забележка г)).

Пепелта се навлажнява с вода и се прехвърля в бехерова чаша от 250 ml. Тигелът се измива с около 5 ml солна киселина (т. 3.1), след което последната бавно и внимателно се добавя към бехерова чаша (може да има бурна реакция поради образуването на CO₂). Капка по капка се добавя солна киселина (т. 3.1) като се разбърква докато престане образуването на газови мехурчета. Изпарява се до сухо, като от време на време се разбърква със стъклена пръчка.

Добавят се 15 ml солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2) към остатъка, след което се добавят и 120 ml вода. Разбърква се със стъклена пръчка, която се оставя в бехеровата чаша, и последната се покрива с часовниково стъкло. Бавно се нагрява до кипене и се поддържа тази температура докато спре разтварянето на пепелта. Филтрира се през чиста от пепел филтърна хартия и филтратът се събира в мерителна колба от 250 ml. Бехеровата чаша и филтърът се измиват с 5 ml гореща солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2) и два пъти с вряла вода. Напълва се мерителната колба до марката с вода (концентрация на солната киселина около 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Ако остатъкът във филтъра изглежда черен (въглерод), той се връща в пещта и се опепелява отново при 450—475 °C. Това опепеляване, което изисква само няколко часа (около 3—5 часа), е завършено, когато пепелта изглежда бяла или почти бяла.

⁽¹⁾ Могат да се използват и други методи за изваряване, при условие че е доказано, че те дават сходни резултати (напр. изваряване под налягане с микровълни).

⁽²⁾ Зелените фуражи (пресни или изсушени) е възможно да съдържат значително количество силициев диоксид от растителен произход, който може да задържи микроелементите, и който трябва да бъде отстранен. Поради това, за проби от тези фуражи трябва да се следват следните изменени процедури. Операция 5.1.1.1. се провежда едновременно с филтрирането. Филтърната хартия с неразтворимия остатък се измива два пъти с вряла вода и се поставя в кварцов или платинен тигел.

В муфелната пещ (т. 4.1) филтърната хартия се изгаря при температура под 550 °C, докато всички сажени частици изчезнат напълно. Оставя се да изстине, добавят се няколко капки вода и 10—15 ml флуороводородна киселина (т. 3.4) и се подлага на изпаряване до сухо при около 150 °C. Ако има остатъци от силициев диоксид в остатъка, те се разтварят повторно в няколко милилитра флуороводородна киселина (т. 3.4) и се подлагат на изпаряване до сухо. Добавят се няколко капки сярна киселина (т. 3.5) и се нагрява, докато престане да се образува бял дим. След като се добавят около 5 ml солна киселина с концентрация 6 mol/l (т. 3.2) и около 30 ml вода, разтворът се нагрява, филтрира се в мерителна колба от 250 ml и се допълва до пълния обем с вода (концентрация на HCl около 0,5 mol/l). След това се пристъпва към определянето в съответствие с точка 5.1.2.

▼ **M9**

Остатъкът се разтваря с около 2 ml солна киселина (т. 3.1), изпарява се до сухо и се добавят 5 ml солна киселина (т. 3.2) с концентрация 6 mol/l. Нагрива се, разтворът в мерителната колба се филтрира и се допълва до пълния обем с вода (концентрация на HCl около 0,5 mol/l).

Забележки:

- а) При определянето на микроелементите е важно да се вземат предвид рисковете от замърсяване, особено с цинк, мед и желязо. Затова оборудването, което се използва за подготвяне на пробите, не трябва да съдържа тези метали.

За намаляване на общия риск от замърсяване трябва да се работи в обезпашена атмосфера с безупречно чисти прибори и внимателно измити стъклени съдове. Определянето на цинка е особено чувствително към много видове замърсяване, например от стъклените съдове, реагентите, прахта и др.

- б) Теглото на пробата, която трябва да се опепели, се изчислява, като се вземе предвид приблизителното съдържание на микроелементи във фуража по отношение на чувствителността на използвания спектрофотометър. За определени фуражи, които съдържат малко микроелементи, може да е необходимо да се започне с проба от 10—20 g и да се ограничи крайният разтвор само до 100 ml.

- в) Опепеляването трябва да се извършва в затворена пещ без подаване на въздух или кислород.

- г) Температурата, която показва пирометърът, не трябва да надвишава 475 °C.

5.1.2. Определяне чрез спектрофотометрия

5.1.2.1. Приготвяне на калибрационни разтвори

За всеки от елементите, които ще се определят, от работните стандартни разтвори, посочени в точки 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 и 3.10.1, се приготвя серия от калибрационни разтвори, като всеки има концентрация на HCl около 0,5 mol/l (и (за желязото, мангана и цинка) концентрация на лантанов трихлорид, еквивалентна на 0,1 % La (w/v).

Подбраните концентрации на микроелементи трябва да бъдат в рамките на чувствителността на използвания спектрометър. Таблиците по-долу дават примери за състава на типични серии от калибрационни разтвори; в зависимост обаче от вида и чувствителността на използвания спектрофотометър, може да се наложи да се изберат други концентрации.

Желязо

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml работен стандартен разтвор (т. 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (т. 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml разтвор на лантанов трихлорид (т. 3.11) и се долива с вода до 100 ml

▼ **M9****Мед**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml работен стандартен разтвор (т. 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (т. 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Манган

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml работен стандартен разтвор (т. 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (т. 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml разтвор на лантанов трихлорид (т. 3.11) и се долива с вода до 100 ml

Цинк

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml работен стандартен разтвор (т. 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (т. 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml разтвор на лантанов трихлорид (т. 3.11) и се долива с вода до 100 ml

5.1.2.2. Приготвяне на разтвора за анализ

За определянето на медта разтворът, приготвен както е указано в т. 5.1.1, може да се използва директно. Ако е необходимо концентрацията му да се сведе до рамките на калибрационните разтвори, може да се прехвърли аликвотна част от разтвора с пипета в мерителна колба от 100 ml и да се допълни до марката със солна киселина с концентрация 0,5 mol/l (т. 3.3).

За определянето на желязото, мангана и цинка се прехвърля с пипета аликвотна част от разтвора, приготвен, както е указано в т. 5.1.1, в мерителна колба от 100 ml, добавят се 10 ml разтвор от лантанов трихлорид (т. 3.11) и се допълва до марката със солна киселина с концентрация 0,5 mol/l (т. 3.3) (вж. също т. 8 – „Забележки“).

5.1.2.3. Контролен експеримент

Контролният експеримент трябва да включва всички указани стъпки на процедурата, с изключение на това, че се пропуска добавянето на пробния материал. Калибрационен разтвор „0“ не трябва да се използва като контролен разтвор.

5.1.2.4. Измерване на атомната абсорбция

Измерва се атомната абсорбция на калибрационните разтвори и на разтвора, който ще се анализира, чрез използване на окисляващ въздушноацетиленов пламък при следните дължини на вълната:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Всички измервания се извършат четири пъти.

▼ **M9**5.2. *Минерални фуражи*

Ако пробата не съдържа органични вещества, не е необходимо да се извършва предварително опепеляване. Процедира се, както е указано в точка 5.1.1.1, като се започне от втория параграф. Може да се пропусне изпаряването с флуороводородна киселина.

6. **Изчисляване на резултатите**

С помощта на калибрационна крива се изчисляват концентрациите на микроелементите в разтвора за анализ и резултатът се изразява в милиграми микроелемент на килограм проба (ppm, части на милион).

7. **Повторяемост**

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени с една и съща проба, от един и същ лаборант, не трябва да надвишава:

- 5 mg/kg като абсолютна стойност при съдържание на въпросния микроелемент до 50 mg/kg;
- 10 % от по-високия резултат при съдържание на въпросния микроелемент от 50 до 100 mg/kg;
- 10 mg/kg като абсолютна стойност при съдържание на въпросния микроелемент от 100 до 200 mg/kg;
- 5 % от по-високия резултат при съдържание на въпросния микроелемент над 200 mg/kg.

8. **Забележки**

Наличието на големи количества фосфати може да окаже неблагоприятно влияние върху определянето на желязо, манган и цинк. Подобно влияние трябва да бъде коригирано с добавянето на разтвор на лантанов трихлорид (т. 3.11). Ако обаче тегловното съотношение $\text{Ca} + \text{Mg/P} > 2$, добавянето на разтвор на лантанов трихлорид (т. 3.11) към анализирания разтвор и към калибрационните разтвори може да се пропусне.

Г. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ХАЛОФУГИНОН

DL-транс-7-бромо-6-хлоро-3-[3-(3-хидрокси-2-пиперидил)ацетонил]-квиназолин-4-(3H)-на хидробромид.

Съдържанието на халофугинон се определя посредством:

- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и tandemна масспектрометрия (LC-MS/MS), или
- чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза (HPLC), с използване на UV детектор, съгласно описаното в точки 1—8 по-долу.

1. **Цел и обхват**

Методът дава възможност за определяне на количеството на халофугинон във фуражи. Границата на количествено определяне е 1 mg/kg.

2. **Принцип**

След третиране с гореща вода, халофугинонът се екстрахира като свободна основа в етилов ацетат и след това се разделя като хидрохлорид във воден киселинен разтвор. Екстрактът се очисти посредством йоннообменна хроматография. Съдържанието на халофугинон се определя с помощта на високоефективна течна хроматография с обратна фаза (HPLC), като се използва UV-детектор.

▼ **M9****3. Реагенти**

- 3.1. Ацетонитрил, с чистота за HPLC
- 3.2. Амберлит XAD-2 смола
- 3.3. Амониев ацетат
- 3.4. Етилов ацетат
- 3.5. Оцетна киселина на кристали
- 3.6. Халофугинон — стандартно вещество (DL-транс-7-бромо-6-хлоро-3-[3-(3-хидрокси-2-пиперидил)ацетонил]-хиназолин-4-(3H)-он хидробромид, E 764)

3.6.1. Изходен стандартен разтвор на халофугинон, 100 µg/ml

Претеглят се с точност до 0,1 mg 50 mg халофугинон (т. 3.6) в градуирана колба с вместимост 500 ml, разтварят се в буферен разтвор на амониев ацетат (т. 3.18), допълва се до пълния обем с буферен разтвор и се разбърква. Този разтвор остава стабилен в продължение на три седмици при температура 5 °C, ако се съхранява на тъмно.

3.6.2. Калибрационни разтвори

В поредица от градуирани колби с вместимост 100 ml се прехвърлят 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 6,0 ml от изходния стандартен разтвор на халофугинон (т. 3.6.1). Допълват се до пълния обем с подвижната фаза (т. 3.21) и се разбъркват. Разтворите ще имат съответно концентрации на халофугинон 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 6,0 µl. Разтворите трябва да се приготвят непосредствено преди употреба.

- 3.7. Солна киселина (ρ_{20} е приблизително 1,16 g/ml)
- 3.8. Метанол
- 3.9. Сребърен нитрат
- 3.10. Натриев аскорбат
- 3.11. Натриев карбонат
- 3.12. Натриев хлорид
- 3.13. EDTA (етилен-диамин-тетра-оцетна киселина, двунатриева сол)
- 3.14. Вода, с чистота за HPLC
- 3.15. Разтвор на натриев карбонат, $c = 10$ g/100 ml
- 3.16. Натриев хлорид — наситен разтвор на натриев карбонат, $c = 5$ g/100 ml

Разтварят се 50 g натриев карбонат (т. 3.11) във вода, разрежда се до 1 литър и се добавя натриев хлорид (т. 3.12), докато се получи наситен разтвор.
- 3.17. Солна киселина, приблизително 0,1 mol/l.

Разтварят се 10 ml HCl (т. 3.7) във вода, докато се получи 1 l.
- 3.18. Буферен разтвор на амониев ацетат, приблизително 0,25 mol/l

Разтварят се 19,3 g амониев ацетат (т. 3.3) и 30 ml оцетна киселина (т. 3.5) във вода (т. 3.14) и разтворът се разрежда до 1 l.

▼ **M9**

3.19. Подготовка на амберлит XAD-2 смола

Подходящо количество амберлит (т. 3.2) се промива с вода, докато бъдат отстранени всички хлорни йони, като това се установява чрез тест със сребърен нитрат (т. 3.20), който се извършва върху промивната вода. След това смолата се промива с 50 ml метанол (3.8), отстранява се метанолът и се смолата се съхранява под чист метанол.

3.20. Разтвор на сребърен нитрат, приблизително 0,1 mol/l.

Разтварят се 0,17 g сребърен нитрат (т. 3.9) в 10 ml вода.

3.21. Подвижна фаза HPLC

Смесват се 500 ml ацетонитрил (т. 3.1) с 300 ml буферен разтвор на амониев ацетат (т. 3.18) и 1 200 ml вода (т. 3.14). Киселинността се коригира до $\text{pH} = 4,3$, като се използва оцетна киселина (т. 3.5). Разтворът се филтрира през филтър с размер на порите 0,22 μm (т. 4.8) и се обезгазява (напр.чрез подлагане на въздействието на ултразвук в продължение на 10 минути). Този разтвор остава стабилен в продължение на един месец, при условие че се съхранява на тъмно място в затворен съд.

4. Апаратура

4.1. Ултразвукова вана

4.2. Ротационен тънкослоен изпарител

4.3. Центрофуга

4.4. Апарат за HPLC с UV-детектор с настройка на дължината на вълната или с детектор с диодна матрица

4.4.1. Колона за течна хроматография, 300 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , пълнеж от 10 μm , или еквивалентна колона4.5. Стъклена колона (300 mm $\times$ 10 mm), снабдена с филтър от синтеровано стъкло и спирачно кранче.

4.6. Филтри от стъкловлакно, с диаметър 150 mm

4.7. Мембранен филтър, 0,45 μm .4.8. Мембранен филтър, 0,22 μm .

5. Процедура

Забележка:

Халофугинонът като свободна основа е нестабилен в алкални разтвори и в разтвор на етилов ацетат. Халофугинонът не трябва да остава в етилов ацетат повече от 30 min.

5.1. Общи положения

5.1.1. Анализира се фураж без добавки, за да се провери дали не присъстват халофугинон или други замърсяващи вещества.

5.1.2. Провежда се тест за аналитичен добив, като се анализира фураж без добавки, обогатен чрез добавяне на известно количество халофугинон, подобно на това, което присъства в пробата. За да се обогати фуражът до равнище 3 mg/kg, се добавят 300 μl от изходния стандартен разтвор (т. 3.6.1) към 10 g от фуража без добавки, смесва се и се изчаква 10 min, преди да се премине към етапа на екстрахиране (т. 5.2).

Забележка: за целите на този метод фуражът без добавки трябва да е подобен по вид на този от пробата и при анализ да не се открива халофугинон.

▼ M9

5.2. *Екстракция*

Претеглят се с точност до 0,1 g 10 g от подготвената проба в епруветка за центрофугиране с вместимост 200 ml, добавят се 0,5 g натриев аскорбат (т. 3.10), 0,5 g EDTA (т. 3.13) и 20 ml вода и се разбърква. Тръбичката се поставя за 5 min във водна баня (80 °C). След охлаждане до стайна температура се добавят 20 ml разтвор на натриев карбонат (т. 3.15) и се разбърква. Незабавно се добавят 100 ml етилов ацетат (т. 3.4) и се разклаща силно с ръка в продължение на 15 секунди. След това епруветката се поставя за три минути в ултразвукова вана (т. 4.1) и се разклаща запушалката. Центрофугира се в продължение на и се прелива фазата на етилов ацетат през филтър от стъкловолакно (т. 4.6) в делителна фуния с вместимост 500 ml. Екстрахирането на пробата се повтаря с втора порция от 100 ml етилов ацетат. Събраните на едно място екстракти се промиват в продължение на с 50 ml наситен разтвор на натриев хлорид в разтвор на натриев карбонат (т. 3.16) и се отстранява водният слой.

Екстрахира се органичният слой в продължение на 1 min с 50 ml солна киселина (т. 3.17). Прехвърля се долният киселинен слой в делителна фуния с вместимост 250 ml. Повторно се екстрахира органичният слой в продължение на минута и половина с нови 50 ml разтвор на солна киселина и се прибавя към първия екстракт. Събраните заедно киселинни екстракти се промиват чрез въртене в продължение на приблизително 10 s с 10 ml етилов ацетат (т. 3.4).

Водният слой се прехвърля количествено в облодънна колба от 250 ml, като се отстранява органичната фаза. Изпарява се целият останал етилов ацетат от киселинния разтвор, като се използва ротационен тънкослоен изпарител (т. 4.2). Температурата на водната баня не трябва да надвишава 40 °C. Под вакуум от приблизително 25 mbar целият остатъчен етилов ацетат се отстранява в рамките на 5 min при температура 38 °C.

5.3. *Почистване*5.3.1. *Подготвяне на колоната с амберлит*

За всеки екстракт на пробата се подготвя по една колона XAD-2. 10 g от подготвения амберлит (т. 3.19) се прехвърлят в стъклена колона (т. 4.5) с метанол (т. 3.8). Добавя се малка запушалка от стъклен памук в горната част на коритото от смола. Метанолът се източва от колоната и смолата се промива със 100 ml вода, като потокът се спира веднага, щом течността достигне горната част на коритото от смола. Остава се колоната да се уравни за 10 min преди употреба. Не се допуска колоната да изсъхва.

5.3.2. *Почистване на пробата*

Екстрактът (т. 5.2) се прехвърля количествено в горната част на подготвената колона от амберлит (т. 5.3.1) и се елуира, като се изхвърля елуатът. Скоростта на потока за елуиране не трябва да надвишава 20 ml/min. Облодънна колба се изплаква с 20 ml солна киселина (т. 3.17), която се използва и за да се измие колоната със смола. Евентуално останалият киселинен разтвор се отстранява с въздушен поток. Промивните течности се отстраняват. Добавят се 100 ml метанол (т. 3.8) към колоната и се оставя процесът на елуиране да продължи от 5 до 10 min, като елуатът се събира в облодънна колба с вместимост 250 ml. Остава се останалият метанол за 10 min, за да влезе в равновесие със смолата, и се продължава отмиването със скорост 20 ml/min, като отмитият разтвор се събира в същата колба с кръгло дъно. Изпарява се метанолът върху ротационния тънкослоен изпарител (т. 4.2), като температурата на водната баня не трябва да надвишава 40 °C. Остатъкът се прехвърля количествено в мерителна колба от 10 ml, като се използва подвижната фаза (т. 3.21). Долива се до номиналния обем с подвижната фаза и се разбърква. Една аликвотна част се филтрира през мембранен филтър (т. 4.7). Този разтвор се запазва за определяне с помощта на HPLC (т. 5.4).

▼ **M9**5.4. *Определяне с помощта на HPLC*5.4.1. *Параметри*

Дават се следните указания за условията на провеждане на анализа. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати:

Колона за течна хроматография (т. 4.4.1);

Подвижна фаза за HPLC (т. 3.21);

Скорост на изтичане: 1,5—2 ml/min

Дължина на вълната за откриване: 243 nm

Обем на впръскване: 40—100 µl.

Проверява се стабилността на хроматографската система, като се впръсква неколнократно калибрационният разтвор (т. 3.6.2), съдържащ 3,0 µg/ml, докато височината на пиковите (или площите) и времето на задържане останат постоянни.

5.4.2. *Калибрационна крива*

Всеки калибрационен разтвор (т. 3.6.2) се впръсква няколко пъти и се измерват височините на пиковите (площите) за всяка концентрация. Построява се калибрационна крива, като за ординати се използват средните височини на пиковите (площите) на калибрационните разтвори, а за абсциси — съответните концентрации в µg/ml.

5.4.3. *Пробен разтвор*

Екстрактът на пробата (т. 5.3.2) се впръсква неколнократно, като се използва същият обем, който е взет за калибрационните разтвори, и се определя средната височина на пиковите (площи) за пиковите за халофугинона.

6. **Изчисляване на резултатите**

Концентрацията на пробния разтвор в µg/ml се определя от средната височина (площ) на пиковите за халофугинона от пробния разтвор, като се сравнява с калибрационната крива (т. 5.4.2).

Съдържанието w (mg/kg) на халофугинон в пробата се получава със следната формула:

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

където:

c : концентрация на халофугинон в пробния разтвор в µg/ml,

m : тегло на частта от пробата за анализ в грамове.

7. **Потвърждаване на резултатите**7.1. *Идентичност*

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез кохроматография или чрез използване на детектор с диодна матрица, с помощта на който се сравняват спектрите на екстракта на пробата и на калибрационния разтвор (т. 3.6.2), съдържащ 6,0 µg/ml.

7.1.1. *Кохроматография*

Екстрактът на пробата се обогатява, като към него се прибави подходящо количество от калибрационния разтвор (т. 3.6.2.). Количеството добавен халофугинон трябва да е сходно с предполагаемото количество халофугинон, намерен в екстракта на пробата.

▼ M9

Увеличава се само височината на пика на халофугинона, след като се вземе под внимание както добавеното количество, така и разреждането на екстракта. Широчината на пика, на половината от неговата максимална височина, трябва да бъде в рамките на $\pm 10\%$ от първоначалната широчина.

7.1.2. Детектиране с диодна матрица

Резултатите се оценяват според следните критерии:

- а) дължината на вълната на максимална абсорбция на пробата трябва да бъде същата като тази на спектрите на стандарта, регистрирана в най-високата точка на хроматограмата и при отклонение, определено от разделителната способност на детектиращата система. За детектирането с диодна матрица, отклонението обикновено е в рамките на $\pm 2\text{ nm}$.
- б) в границите от 225 до 300 nm регистрираните при максимума на пика на хроматограмата спектри на пробата и на стандартите не трябва да се различават за тези части на спектъра, попадащи в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между двата спектъра не надвишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ;
- в) в границите от 225 до 300 nm спектрите на възходящата линия, максимума и низходящата линия на пика, получен от екстракта на пробата, не трябва да се различават един от друг за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между спектрите не надвишава 15 % от абсорбцията на спектъра на най-високата точка.

Ако някой от критериите не е изпълнен, наличието на анализа не се потвърждава.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определения, проведени върху една и съща проба, не трябва да надвишава 0,5 mg/kg при съдържание на халофугинон до 3 mg/kg.

7.3. Аналитичен добив

За обогатената празна проба аналитичният добив трябва да е най-малко 80 %.

8. Резултати от съвместно изследване

Беше проведено съвместно изследване ⁽¹⁾, при което три проби бяха подложени на анализ от осем лаборатории.

Резултати

	Проба А (празна) При получаване	Проба Б (брашно)		Проба В (пелети)	
		При получаване	След два месеца	При получаване	След два месеца
Средна стойност [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17

⁽¹⁾ The Analyst 108 от 1983 г., стр. 1252—1256

▼ M9

	Проба А (празна) При получаване	Проба Б (брашно)		Проба В (пелети)	
		При получаване	След два месеца	При получаване	След два месеца
Рес. [%]		86	74	88	75

ND = не е открито

S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта

CV_R = коефициент на вариация на възпроизводимостта, %

Рес. = аналитичен добив %

Д. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РОБЕНИДИН

1,3-bis[(4-хлоробензилиден)амино] гуанидин хидрохлорид.

Съдържанието на робенидин се определя посредством

- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ. Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и тандемна маспектрометрия (LC-MS/MS), или
- чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза (HPLC), с използване на UV детектор, съгласно описаното в точки 1—8 по-долу.

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност за определяне на количеството на робенидин във фуражи. Границата на количествено определяне е 5 mg/kg.

2. Принцип

Пробата се екстрахира с помощта на подкиселен метанол. Екстрактът се изсушава, след което аликуотна част от него се подлага на пречистване в колона с алуминиев оксид. Робенидинът се елуира от колоната с метанол, концентрира се и се разрежда до желания обем с подвижна фаза. Съдържанието на робенидин се определя с помощта на високоефективна течна хроматография с обратна фаза (HPLC), като се използва UV-детектор.

3. Реагенти

3.1. Метанол

3.2. Подкиселен метанол

Поставят се 4,0 ml солна киселина ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$) в градуирана колба от 500 ml, допълва се с метанол до пълния обем (т. 3.1), и се разбърква. Разтворът се приготвя непосредствено преди употреба.

3.3. Ацетонитрил, с чистота за HPLC

3.4. Молекулярно сито

Тип 3A, частици с меш от 8 до 12 (частици от 1,6—2,5 mm, кристален алуминосиликат, диаметър на порите 0,3 mm).

3.5. Алуминиев оксид със степен на киселинна активност I за колонна хроматография

▼ **M9**

В подходящ съд се поставят 100 g алуминиев оксид и се прибавят 2,0 ml вода. Запушва се и се разклаща за приблизително 20 min. Така полученият разтвор се съхранява в добре запушен съд.

3.6. Разтвор на калиев дихидроген фосфат, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

В градуирана колба от 1 000 ml се разтварят 3,40 g калиев дихидроген фосфат във вода (чиста за HPLC), допълва се до пълния обем и се разбърква.

3.7. Разтвор на натриев хидроген фосфат, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

В градуирана колба от 1 литър се разтварят 3,55 g безводен натриев хидроген фосфат (или 4,45 g дихидрат или 8,95 g дедекахидрат) във вода (с чистота за HPLC), допълва се до пълния обем и се разбърква.

3.8. Подвижна фаза HPLC

Смесват се следните реагенти:

650 ml ацетонитрил (т. 3.3),

250 ml вода (с чистота за HPLC),

50 ml разтвор на калиев дихидроген фосфат (т. 3.6),

50 ml разтвор на натриев хидроген фосфат (т. 3.7).

Разтворът се филтрира през филтър с размер на порите 0,22 μm (т. 4.6) и се обезгазява (напр. чрез подлагане на въздействието на ултразвук в продължение на 10 минути).

3.9. Стандартна субстанция

Чист робенидин: 1,3-bis[(4-хлоробензилиден)амино] гуанидин хидрохлорид.

3.9.1. Изходен стандартен разтвор на робенидин: 300 $\mu\text{g/ml}$

С точност до 0,1 mg се отмерват 30 mg от стандартното вещество робенидин (т. 3.9). Това количество се разтваря в подкиселен метанол (т. 3.2) в градуирана колба от 100 ml, допълва се до пълния обем със същия разтворител и се разбърква. Колбата се увива с алуминиево фолио и се съхранява на тъмно място.

3.9.2. Междинен стандартен разтвор на робенидин: 12 $\mu\text{g/ml}$

Прехвърлят се 10,0 ml от изходния стандартен разтвор (т. 3.9.1) в градуирана колба от 250 ml, долива се с подвижната фаза (т. 3.8) до пълния обем и се разбърква. Колбата се увива с алуминиево фолио и се съхранява на тъмно място.

3.9.3. Калибрационни разтвори

В мерителни колби от 50 ml се поставят съответно 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 и 25,0 ml от междинния стандартен разтвор (т. 3.9.2). Колбите се допълват до пълния обем с подвижната фаза (т. 3.8) и съдържанието им се разбърква. Разтворите отговарят съответно на 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 и 6,0 $\mu\text{g/ml}$ робенидин. Разтворите трябва да се приготвят непосредствено преди употреба.

3.10. Вода, с чистота за HPLC

4. Апаратура

4.1. Стъклена колона Направена е от тъмно кехлибарено стъкло, снабдено със запорен кран.

Направена от непрозрачно стъкло и снабдена със спирателно кранче, с резервоар с обем приблизително 150 ml, вътрешен диаметър от 10 до 15 mm и дължина 250 mm.

▼ **M9**

- 4.2. Механичен или магнитен миксер
- 4.3. Ротационен тънкослоен изпарител
- 4.4. Апарат за HPLC с UV-детектор с настройка на дължината на вълната или с диодна матрица, която работи в обхвата 250—400 nm.
- 4.4.1. Колона за течна хроматография: 300 mm × 4 mm, C₁₈, пълнеж от 10 µm или еквивалентна
- 4.5. Филтрова хартия със стъклени нишки (Whatman GF/A или еквивалент)
- 4.6. Мембранен филтър, 0,22 µm.
- 4.7. Мембранен филтър, 0,45 µm.

5. **Процедура***Забележка:*

Робендинът е чувствителен към светлина. Трябва да се използват непрозрачни лабораторни съдове при всички операции.

5.1. *Общи положения*

- 5.1.1. Необходимо е да се анализира фураж без добавки с цел да се провери наличието на робенидин или вещества, които пречат на анализа.
- 5.1.2. Необходимо е да се проведе тест за аналитичен добив, като се анализира проба от фураж без робенидин (т. 5.1.1.), обогатена чрез добавяне на известно количество робенидин, сходно с това в пробата. За да се постигне обогатяване до равнище 60 mg/kg, в конична колба от 250 ml се прехвърлят 3,0 ml от изходния стандартен разтвор (т. 3.9.1). Разтворът се изпарява до прил. 0,5 ml под приток на азот. Прибавят се 15 g от фуража без добавки, разбърква се добре и се изчакава 10 min, преди да се продължи с етапа на екстракция (т. 5.2).

Забележка:

За целите на този метод фуражът без добавки трябва да е подобен по вид на този от пробата и при анализ да не се открива робенидин.

5.2. *Екстракция*

Отмерват се с точност до 0,01 g приблизително 15 g от приготвената проба. Прехвърлят се в конична колба от 250 ml и се добавят 100,0 ml подкиселен метанол (т. 3.2), съдът се запушва добре и се разклаща в продължение на 1 h в клатачна машина (т. 4.2). Разтворът се филтрира през филтрова хартия от стъклени нишки (т. 4.5) и целият филтрат се събира в конична колба от 150 ml. Прибавят се 7,5 g от молекулярно сито (т. 3.4), съдът се запушва добре и се разбива в продължение на 5 min. Незабавно се прецежда през филтрова хартия със стъклени нишки. Разтворът се запазва за етапа на пречистване (т. 5.3).

5.3. *Пречистване*5.3.1. *Подготовка на колоната с алуминиев оксид*

Долният край на стъклената колона (т. 4.1) се запушва с тапа от стъклен памук, която се вкарва с помощта на стъклена пръчка. Отмерват се 11 g от приготвения алуминиев оксид (т. 3.5) и се прехвърлят в колоната. По време на тази манипулация излагането на въздействието на обкръжаващия въздух се свежда до минимум. Напълнената колона се почуква леко в долния край, за да улегне алуминиевият оксид.

▼ **M9****5.3.2. Пречистване на пробата**

С пипета се прехвърлят в колоната 5 ml от екстракта на пробата, приготвен съгласно точка 5.2. Краят на пипетата се поставя близо до стената на колоната и се оставя разтворът да се абсорбира от алуминиевия оксид. Робенидинът от колоната се елуира, като се използват 100 ml метанол (т. 3.1) при скорост на изтичане 2—3 ml/min, а елуатът се събира в облодънна колба с вместимост 250 ml. Метаноловият разтвор се подлага на изпаряване до изсъхване при намалено налягане при температура 40 °C с помощта на ротационен тънкослоен изпарител (т. 4.3). Остатъкът се разтваря отново в 3—4 ml от подвижната фаза (т. 3.8) и се прехвърля количествено в градуирана колба от 10 ml. Колбата се изплаква на няколко пъти с порции от 1—2 ml от подвижната фаза и изплакнатите количества се прехвърлят в градуираната колба. Допълва се до пълния обем със същия разтворител и се разбърква. Една аликвотна част се филтрира през мембранен филтър от 0,45 µm (т. 4.7). Този разтвор се запазва за определяне с помощта на HPLC (т. 5.4).

5.4. *Определяне с помощта на HPLC***5.4.1. Параметри**

Дават се следните указания за условията на провеждане на анализа. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати:

Колона за течна хроматография (т. 4.4.1),

подвижна фаза за HPLC (т. 3.8),

Скорост на изтичане: 1,5 до 2 ml/min,

Дължина на вълната, на която е настроен детекторът: 317 nm,

Обем на впръскване: 20—50 µl.

Проверява се стабилността на хроматографската система, като се впръсква неколккратно калибрационният разтвор (т. 3.9.3), съдържащ 3,6 µg/ml, докато височината на пиковите (или площите) и времето на задържане останат постоянни.

5.4.2. Калибрационна крива

Всеки от калибрационните разтвори (т. 3.9.3), се впръсква няколко пъти и се измерват височините (площите) за всяка концентрация. Построява се калибрационна крива, като за ординати се използват средните височини на пиковите или площите на калибрационните разтвори, а за абсциси — съответните концентрации в µg/ml.

5.4.3. Пробен разтвор

Разтворът на пробата (т. 5.3.2) се впръсква няколко пъти, като се използва същият обем, който е взет за калибрационните разтвори, и се определя средната височина на пиковите (площ) за пиковите на робенидина.

6. Изчисляване на резултатите

Концентрацията на пробния разтвор в µg/ml се определя от средната височина (площ) на пиковите за робенидина, като се сравнява с калибрационната крива (т. 5.4.2).

Съдържанието w (mg/kg) на робенидин в пробата се пресмята по следната формула:

▼ **M9**

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

където:

c = концентрация на робенидин в пробния разтвор в $\mu\text{g/ml}$,

m = тегло на частта от пробата за анализ в грамове.

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез кохроматография или чрез използване на детектор с диодна матрица, с помощта на който се сравняват спектрите на екстракта на пробата и на калибрационния разтвор (т. 3.9.3), съдържащ 6 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Кохроматография

Екстрактът на пробата се обогатява, като към него се прибави подходящо количество от калибрационния разтвор (т. 3.9.3). Количеството добавен робенидин трябва да е сходно с предполагаемото количество робенидин, намерен в екстракта на пробата.

Увеличава се само височината на пика на робенидина, след като се вземе под внимание както добавеното количество, така и степента на разреждане на екстракта. Широчината на пика на половината от неговата максимална височина трябва да бъде в рамките на около 10 % от първоначалната широчина.

7.1.2. Детектиране с диодна матрица

Резултатите се оценяват според следните критерии:

- а) дължината на вълната на максимална абсорбция на пробата трябва да бъде същата като тази на спектрите на стандарта, регистрирана в най-високата точка на хроматограмата и при отклонение, определено от разделителната способност на детектиращата система. При детектиране с диодна матрица, отклонението обикновено е в рамките на 2 nm;
- б) в границите от 250 до 400 nm регистрираните при максимума на пика на хроматограмата спектри на пробата и на стандартите не трябва да се различават за тези части на спектъра, попадащи в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между двата спектъра не надвишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ;
- в) в границите от 250 до 400 nm спектрите на възходящата линия, максимума и низходящата линия на пика, получен от екстракта на пробата, не трябва да се различават един от друг за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между спектрите не надвишава 15 % от абсорбцията на спектъра на най-високата точка.

Ако някой от критериите не е изпълнен, наличието на анализа не се потвърждава.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определения, проведени върху една и съща проба, не трябва да надвишава 10 % от по-високия резултат при съдържание на робенидин по-високо от 15 mg/kg.

▼ M9

7.3. Аналитичен добив

аналитичният добив за обогатена проба от фураж без добавки трябва да е най-малко 85 %.

8. Резултати от съвместно изследване

Беше организирано съвместно изследване на равнище ЕС, при което четири проби от фураж за домашни птици и зайци под формата на брашно или пелети бяха анализирани в 12 лаборатории. За всяка проба са проведени по два анализа. Резултатите са представени в следната таблица:

	Домашни птици		Зайци	
	Брашно	Пелети	Брашно	Пелети
Средна стойност [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Аналитичен добив [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = стандартно отклонение на повторяемостта

CV_r = коефициент на вариация на повторяемостта, %

S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта

CV_R = коефициент на вариация на възпроизводимостта, %

Е. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ДИКЛАЗУРИЛ

(+)-4-хлорфенил [2,6-дихлоро-4-(2,3,4,5-тетрахидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2-ил)фенил]-ацетонитрил.

Съдържанието на диклазурил се определя посредством:

- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ. Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и tandemна маспектрометрия (LC-MS/MS) или
- Чрез триградиентна високоефективна течна хроматография с обратна фаза (HPLC), с използване на UV детектор, съгласно описаното в точки 1—9 по-долу.

1. Цел и обхват

Методът дава възможност за определяне на количеството диклазурил в комбинирани фуражи и в премикси⁽¹⁾. Границата на откриване е 0,1 mg/kg, а границата на количествено определяне е 0,5 mg/kg. Възможно е да бъдат постигнати по-ниски граници на количествено определяне, но те трябва да бъдат валидирани от потребителя.

2. Принцип

След прибавяне на вътрешен стандарт, пробата се екстрахира с подкислен метанол. При фуражите, една аликвотна част от екстракта се пречиства в патрон за екстракция на твърда фаза C18. Диклазурият се елуира от патрона със смес от подкислен

⁽¹⁾ Методът е приложим и за определяне на диклазурил във фуражни суровини.

▼ **M9**

метанол и вода. След изпарение, остатъкът се разтваря в DMF/вода. При премиксите екстрактът се изпарява и остатъкът се разтваря в DMF/вода. Съдържанието на диклазурил се определя чрез високоефективна триградиентна течна хроматография (HPLC) с обратна фаза, с помощта на UV детектор.

3. **Реагенти**

3.1. Вода с чистота за HPLC

3.2. Амониов ацетат

3.3. Тетрабутиламониев хидроген сулфат (TBHS)

3.4. Ацетонитрил, с чистота за HPLC

3.5. Метанол, с чистота за HPLC

3.6. N,N-диметилформамид (DMF)

3.7. Солна киселина, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$

3.8. Еталонно вещество: диклазурил: (+)-4-хлорфенил [2,6-дихлоро-4-(2,3,4,5-тетрахидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2-ил)фенил]-ацетонитрил с гарантирана чистота

3.8.1. Изходен стандартен разтвор на диклазурил, 500 $\mu\text{g/ml}$

Претеглят се 25 mg стандартно вещество диклазурил (т. 3.8) с точност до 0,1 mg в градуирана колба от 50 ml. Това количество се разтваря в DMF (т. 3.6), разтворът се допълва до пълния обем с DMF (3.6) и се разбърква. Колбата се обвива с алуминиево фолио или се използва колба от тъмно стъкло и се поставя за съхранение в хладилник. При температура $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на 1 месец⁽¹⁾.

3.8.2. Стандартен разтвор на диклазурил, 50 $\mu\text{g/ml}$

Прехвърлят се 5,00 ml от изходния стандартен разтвор (т. 3.8.1) в градуирана колба от 50 ml, допълва се до пълния обем с DMF (т. 3.6) и се разбърква. Колбата се обвива с алуминиево фолио или се използва колба от тъмно стъкло и се поставя за съхранение в хладилник. При температура $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ разтворът е стабилен в продължение на 1 месец.

3.9. Вещество, използвано като вътрешен стандарт: 2,6 дихлоро- α -(4-хлорофенил)-4-(4,5 дихидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2 (3H) —ил) α -метилбензен-ацетонитрил (метил диклазурил)

3.9.1. Вътрешен изходен стандартен разтвор на диклазурил, 500 $\mu\text{g/ml}$

Претеглят се 25 mg от веществото, използвано като вътрешен стандарт (т. 3.9), с точност до 0,1 mg в градуирана колба от 50 ml. Това количество се разтваря в DMF (т. 3.6), разтворът се допълва до пълния обем с DMF (3.6) и се разбърква. Колбата се обвива с алуминиево фолио или се използва колба от тъмно стъкло и се поставя за съхранение в хладилник. При температура $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ разтворът е стабилен в продължение на 1 месец.

3.9.2. Разтвор на вътрешен стандарт, 50 $\mu\text{g/ml}$

Прехвърлят се 5,00 ml от вътрешния изходен стандартен разтвор (т. 3.9.1) в градуирана колба от 50 ml, допълва се до пълния обем с DMF (т. 3.6) и се разбърква. Колбата се обвива с алуминиево фолио или се използва колба от тъмно стъкло и се поставя за съхранение в хладилник. При температура $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ разтворът е стабилен в продължение на 1 месец.

3.9.3. Разтвор на вътрешния стандарт за премикси, p/1 000 mg/ml (p = номинално съдържание на диклазурил в mg/kg в премикса)

Отмерват се с точност до 0,1 mg p/10 mg от веществото, използвано като вътрешен стандарт, в градуирана колба от 100 ml, разтварят се в DMF (т. 3.6) в ултразвукова вана (т. 4.7), допълва се до пълния обем с DMF и се разбърква. Колбата се обвива с алуминиево фолио или се използва колба от тъмно стъкло и се поставя за съхранение в хладилник. При температура $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ разтворът е стабилен в продължение на 1 месец.

⁽¹⁾ Възможен е и по-продължителен период на стабилност (до 1 година), но това трябва да бъде потвърдено от конкретната лаборатория.

▼ **M9**

3.10. Калибрационни разтвори

3.10.1. Калибрационен разтвор 1 µg/ml.

Отмерват се с пипета 1,00 ml от стандартния разтвор на диклазурил (т. 3.8.2) и 2 ml от вътрешния стандартен разтвор (т. 3.9.2) в градуирана колба от 50 ml. Прибавят се 17 ml DMF (т. 3.6), допълва се до пълния обем с вода (т. 3.1) и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

3.10.2. Калибрационен разтвор 2 µg/ml.

Отмерват се с пипета 2,00 ml от стандартния разтвор на диклазурил (т. 3.8.2) и 2 ml от вътрешния стандартен разтвор (т. 3.9.2) в градуирана колба от 50 ml. Прибавят се 16 ml DMF (т. 3.6), допълва се до пълния обем с вода (т. 3.1) и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

3.10.3. Калибрационен разтвор 3 µg/ml.

Отмерват се с пипета 3,00 ml от стандартния разтвор на диклазурил (т. 3.8.2) и 2 ml от вътрешния стандартен разтвор (т. 3.9.2) в градуирана колба от 50 ml. Прибавят се 15 ml DMF (т. 3.6), допълва се до пълния обем с вода (т. 3.1) и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

3.10.4. Калибрационен разтвор 4 µg/ml.

Отмерват се с пипета 4,00 ml от стандартния разтвор на диклазурил (т. 3.8.2) и 2 ml от вътрешния стандартен разтвор (т. 3.9.2) в градуирана колба от 50 ml. Прибавят се 14 ml DMF (т. 3.6), допълва се до пълния обем с вода (т. 3.1) и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

3.10.5. Калибрационен разтвор 5 µg/ml.

Отмерват се с пипета 5,00 ml от стандартния разтвор на диклазурил (т. 3.8.2) и 2 ml от вътрешния стандартен разтвор (т. 3.9.2) в градуирана колба от 50 ml. Прибавят се 13 ml DMF (т. 3.6), допълва се до пълния обем с вода (т. 3.1) и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

Забележка: калибрационните разтвори (т. 3.10.1, т. 3.10.2, т. 3.10.3, т. 3.10.4 и т. 3.10.5) обхващат концентрации на диклазурил във фуража в диапазона от 0,5 до 2,5 mg/kg при използване на настоящия протокол.

3.11. Патрон за екстракция на твърда фаза C₁₈, напр. Mega Bond Elut, размер: 20 cc, тегло на сорбента: 5 000 mg (предварителна подготовка в съответствие с насоките на доставчика).

3.12. Екстракционен разтворител: подкислен метанол.

Отмерват се с пипета 5,0 ml солна киселина (т. 3.7) и се смесват с 1 000 ml метанол (т. 3.5) и се смесват.

3.13. Подвижна фаза за HPLC

3.13.1. Елуиращ агент А: разтвор на амониев ацетат — тетрабутиламониев хидроген сулфат.

Разтварят се 5 g амониев ацетат (т. 3.2) и 3,4 g TBHS (т. 3.3) в 1 000 ml вода (т. 3.1) и се разбърква.

3.13.2. Елуиращ агент Б: ацетонитрил (т. 3.4).

3.13.3. Елуиращ агент В: метанол (т. 3.5).

▼ **M9****4. Апаратура**

- 4.1. Механична клатачна машина
- 4.2. Оборудване за триградиентна HPLC:
 - 4.2.1. Колона за течна хроматография, Hypersil ODS, пълнеж от 3 μm , 100 mm $\times$ 4,6 mm, или еквивалентна.
 - 4.2.2. UV детектор с настройка на дължината на вълната или детектор с диодна матрица.
- 4.3. Ротационен тънкослоен изпарител
- 4.4. Мембранен филтър (напр. Химически устойчив найлон), 0,45 μm .
- 4.5. Спринцовка за еднократна употреба, 5 ml
- 4.6. Вакуумен колектор.
- 4.7. Ултразвукова вана

5. Процедура**5.1. Общи положения****5.1.1. Фураж без добавки**

Анализира се фураж без добавки, за да се провери дали не той не е замърсен с диклазурил или други вещества. Фуражът без добавки трябва да е аналогичен по вид на този от пробата и при анализа да не се открие диклазурил или други нежелани вещества.

5.1.2. Тест за аналитичен добив

Провежда се тест за аналитичен добив, като се анализира проба от фураж без добавки, обогатена чрез прибавяне на близко до наличното в пробата за изследване количество диклазурил. За да се обогати фуражът до равнище 1 mg/kg, се добавят 0,1 ml от основния стандартен разтвор (т. 3.8.1) към 50 g от фуража без добавки, смесва се и се изчаква 10 min, като се рамесва няколко пъти, преди да се премине към следващия етап (т. 5.2).

Като алтернатива, ако не е наличен фураж, подобен на този, от който е взета пробата (вж. т. 5.1.1), тестът за аналитичен добив може да се извърши чрез стандартния метод на добавяне. В този случай пробата, която ще се анализира, се обогатява с количество диклазурил, близко до вече съдържащото се в пробата. Тази проба се анализира заедно с необогатената проба, като стойността на аналитичен добив се пресмята чрез изваждане.

5.2. Екстракция**5.2.1. Комбиниран фураж**

Претеглят се точно до 0,01 g около 50 g от пробата. Претегленото количество се прехвърля в конична колба от 500 ml, прибавя се 1,00 ml от разтвора на вътрешния стандарт (т. 3.9.2), 200 ml екстракционен разтворител (т. 3.12) и колбата се запущва. Сместа се поставя в клатачна машина (т. 4.1) и се оставя в нея до следващия ден. Сместа се оставя да се утаява в продължение на 10 минути. Прехвърлят се 20 ml аликвотна част от супернатанта в подходящ стъклен съд и се разрежда с 20 ml вода (т. 3.1). Този разтвор се прехвърля в патрон за екстракция (т. 3.11) и се прекарва през последния чрез подаване на вакуум (т. 4.6). Патронът се промива с 25 ml смес от екстракционния разтворител (т. 3.12) и вода (т. 3.1), 65 + 35 (V + V). Събраните фракции се отстраняват и съединенията се елуират с 25 ml смес от екстракционния разтворител (т. 3.12) и вода, 80 + 20 (V + V). Тази фракция се изпарява до сухо, като се използва ротационният изпарител (т. 4.3) при 60 °C. Остатъкът се разтваря в 1,0 ml DMF (т. 3.6), добавят се 1,5 ml вода (т. 3.1) и се разбърква. Филтрира се през мембранен филтър (т. 4.4), прикрепен към спринцовка за еднократна употреба (4.5). Пристъпва се към определяне чрез HPLC (т. 5.3).

▼ **M9**

5.2.2. Премикси

Претеглят се точност до 0,001 g около 1 g от пробата. Претегленото количество се прехвърля в конична колба от 500 ml, прибавя се 1,00 ml от разтвора на вътрешния стандарт (т. 3.9.3), 200 ml екстракционен разтворител (т. 3.12) и колбата се запущва. Сместа се поставя в клатачна машина (т. 4.1) и се оставя в нея до следващия ден. Сместа се оставя да се утаява в продължение на 10 минути. Аликвотна част с обем 10 000/p ml (p = номинално съдържание на диклазурил в премикса в mg/kg) от супернатанта се прехвърля в облодънна колба с подходящ размер. Течността се изпарява при понижено налягане и при 60 °C до сухо, като се използва ротационният изпарител (т. 4.3). Остатъкът се разтваря отново в 10,0 ml DMF (т. 3.6), прибавят се 15,0 ml вода (т. 3.1) и се разбърква. Пристъпва се към определяне чрез HPLC (т. 5.3).

5.3. *Определяне с помощта на HPLC*

5.3.1. Параметри

Дават се следните указания за условията на провеждане на анализа. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати:

- Колона за течна хроматография (т. 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, пълнеж от 3 µm, или еквивалентна.
- Подвижна фаза
 - Елуиращ агент А (т. 3.13.1): Воден разтвор на амониев ацетат и тетрабутиламониев хидроген сулфат.
 - Елуиращ агент Б (т. 3.13.2): ацетонитрил.
 - Елуиращ агент В (т. 3.13.3): метанол.
- Начин на елуиране - линеен градиент
 - начални условия: A + Б + В = 60 + 20 + 20 (V + V + V);
 - след 10 min се провежда градиентно елуиране в продължение на 30 min до: A + Б + В = 45 + 20 + 35 (V + V + V);
 - след което се промива с Б в продължение на 10 min.
- Скорост на изтичане: 1,5—2 ml/min;
- Обем на впръскване: 20 µl
- Дължина на вълната, на която е настроен детекторът: 280 nm.

Проверява се стабилността на хроматографската система, като се впръсква неколkokратно калибрационният разтвор (т. 3.10.2), съдържащ 2 µg/ml диклазурил и вътрешен стандарт, докато височината на пиковите (или площите) и времето на задържане останат постоянни.

5.3.2. Хроматографски анализ на калибрационни разтвори

Впръскват се два пъти по 20 µl от всеки калибрационен разтвор (т. 3.10.1, т. 3.10.2, т. 3.10.3, т. 3.10.4 и т. 3.10.5) идентифицират се и се интегрират пиковите на диклазурил и на вътрешния стандарт и калибрационната крива се построява въз основа на съотношението на средната височина или площ на пика на диклазурила и средната височина или площ на пика на вътрешния стандарт, спрямо концентрацията на диклазурил в калибрационните разтвори (µg/ml).

5.3.3. Хроматографски анализ на разтвори на проби

Впръскват се два пъти по 20 µl от пробния разтвор (т. 5.2.1 или т. 5.2.2.) и се определят средната височина или площ на пика на диклазурила и на пиковите на вътрешния стандарт.

▼ M9

6. Изчисляване на резултатите

6.1. Комбиниран фураж

Съдържанието на диклазурил w (mg/kg) в пробата се пресмята по следната формула:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ или } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

където:

- $Height(d,s)$ е височината на пика на диклазурил в пробния разтвор (т. 5.2.1)
- $Area(d,s)$ е площта на пика на диклазурил в пробния разтвор (т. 5.2.1)
- $Height(i,s)$ е височината на пика на вътрешния стандарт в пробния разтвор (т. 5.2.1)
- $Area(i,s)$ е височината (площта) на пика на вътрешния стандарт в пробния разтвор (т. 5.2.1)
- b е пресечната точка с калибрационната крива, построена от калибрационните разтвори (т. 3.10.1, т. 3.10.2, т. 3.10.3, т. 3.10.4 и т. 3.10.5) в съответствие с т. 5.3.2.
- a е низходящата линия на калибрационната крива, построена от калибрационните разтвори (т. 3.10.1, т. 3.10.2, т. 3.10.3, т. 3.10.4 и т. 3.10.5) в съответствие с т. 5.3.2
- m е теглото на частта от пробата за анализ в грамове
- V е крайният обем на екстракта от пробата в милилитри след повторно разтваряне в съответствие с т. 5.2.1 (напр. 2,5 ml)

6.2. Премикси

Съдържанието на диклазурил w (mg/kg) в пробата се пресмята по следната формула:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ или } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

където:

- $Height(d,s)$ е височината на пика на диклазурил в пробния разтвор (т. 5.2.2)
- $Area(d,s)$ е площта на пика на диклазурил в пробния разтвор (т. 5.2.2)
- $Height(i,s)$ е височината на пика на вътрешния стандарт в пробния разтвор (т. 5.2.2)
- $Area(i,s)$ е височината (площта) на пика на вътрешния стандарт в пробния разтвор (т. 5.2.2)
- b е пресечната точка с калибрационната крива, построена от калибрационните разтвори (т. 3.10.1, т. 3.10. 2, 3.10.3, 3.10.4 и 3.10.5) съгласно 5.3.2
- a е низходящата линия на калибрационната крива, построена от калибрационните разтвори (т. 3.10.1, т. 3.10.2, т. 3.10.3, т. 3.10.4 и т. 3.10.5) в съответствие с т. 5.3.2
- m е теглото на частта от пробата за анализ в грамове
- V е крайният обем на екстракта от пробата в милилитри след повторно разтваряне в съответствие с т. 5.2.2 (напр. 25 ml)
- p е номиналното съдържание на диклазурил в mg/kg в премикса

▼ **M9****7. Потвърждаване на резултатите****7.1. Идентичност**

Идентичността на анализа може да бъде потвърдена чрез кохроматография или като се използва детектор с диодна матрица, с помощта на който се сравняват спектрите на екстракта на пробата (т. 5.2.1 или т. 5.2.2) и на калибрационния разтвор (т. 3.10.2).

7.1.1. Кохроматография

Обогатява се екстракт от пробата (т. 5.2.1 или т. 5.2.2), като се добави подходящо количество калибрационен разтвор (т. 3.10.2). Количеството добавен диклазурил трябва да бъде близко до откритото в екстракта от пробата.

След като се вземат под внимание както добавеното количество, така и разреждането на екстракта, увеличават се само височината на пика на диклазурила и тази на пика на вътрешния стандарт. Широчината на пика при половината от височината му трябва да бъде в границите на ± 10 % от оригиналната широчина на пика на диклазурила или на пика на вътрешния стандарт на необогатения екстракт от пробата.

7.1.2. Детектиране с диодна матрица

Резултатите се оценяват според следните критерии:

- а) Дължината на вълната на максимална абсорбция на пробата трябва да бъде същата като тази на спектрите на стандарта, регистрирана в най-високата точка на хроматограмата и при отклонение, определено от разделителната способност на детектиращата система. При детектиране с диодна матрица отклонението обикновено е в рамките на ± 2 nm.
- б) в границите от 230 до 320 nm, регистрираните при максимума на пика на хроматограмата спектри на пробата и на стандартите не трябва да се различават за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между двата спектъра не надвишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ.
- в) в границите от 230 и 320 nm спектрите на възходящата линия, максимума и низходящата линия на пика, получени при анализа на екстракта на пробата, не трябва да се различават един от друг за тези части от спектъра, които попадат в диапазона между 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между спектрите не надвишава 15 % от абсорбцията на спектъра на най-високата точка.

Ако някой от критериите не е изпълнен, наличието на анализа не се потвърждава.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две независими измервания, извършени върху две подпроби, не трябва да надвишава:

- 30 % от по-високата стойност, за съдържание на диклазурил от 0,5 mg/kg до 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg при съдържание на диклазурил между 2,5 mg/kg и 5 mg/kg;
- 15 % от по-високата стойност, за съдържание на диклазурил над 5 mg/kg.

▼ M9

7.3. Аналитичен добив

При обогатена (празна) проба, аналитичният добив трябва да е най-малко 80 %.

8. Резултати от съвместно изследване

Бяха организирани две съвместни изследвания. В първото, проведено от друга група лаборатории през 1994 г., анализирани проби бяха два премикса (O 100, A 100) и три проби от допълващ фураж за домашни птици (L1, Z1, K1). Едната проба от премикс беше смесена с органична матрица (O 100), а другата — с неорганична матрица (A 100). Теоретичното съдържание на диклазурил беше 100 mg/kg. Лабораториите бяха инструктирани да анализират всяка от пробите един или два пъти. (По-подробна информация за първото съвместно изследване може да се открие в *Journal of AOAC International*, том 77, бр. 6, 1994 г., стр. 1359—1361).

Във второто съвместно изследване бяха подложени на анализ три комбинирани фуража за домашни птици, съдържащи диклазурил в концентрации от 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) и фураж без добавки (MAT 3). Подробна информация за второто изследване може да се открие в техническия доклад на Съвместния изследователски център от 2016 г. и в *Journal of AOAC International*, том 102, бр. 2, 2019 г., стр. 646—652). Резултатите от двете съвместни изследвания са представени в следната таблица:

	Проба 1A 100	Проба 2O 100	Проба 3 L1	Проба 4 Z1	Проба 5 K1	Проба 6 MAT 1	Проба 7 MAT 2	Проба 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Средна стойност, [mg/ kg]	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Номинално съдържание (mg/ kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Позовавания (*)	Първо изследване от 1 994 г.	Първо изследване от 1 994 г.	Първо изследване от 1 994 г.	Първо изследване от 1 994 г.	Първо изследва- не от 1 994 г.	Второ изследва- не от 2 015 г.	Второ изследва- не от 2 015 г.	Второ изследва- не от 2 015 г.

L = брой на лабораториите

n = брой отделни стойности

S_r = стандартно отклонение на повтаряемостта

CV_r = коефициент на вариация на повтаряемостта

S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта

CV_R = коефициент на вариация на възпроизводимостта

LOQ = Граница на количествено определяне

(*) Първо изследване от 1994 г.: *Journal of AOAC International*, том 77, бр. 6, 1994 г., стр. 1359—1361; Второ изследване от 2015 г.: Технически доклад на Съвместния изследователски център „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study“ (2016 г.).

▼ M9

9. **Общи бележки**

Необходимо е предварително да е доказано, че реакцията спрямо диклазурил е линейна в интервала на измерваните стойности.

За анализа на диклазурил, наред с други, в комбинирани фуражи с високо съдържание на мастни вещества (за целта надвишаващо 12 %), методът за анализ може да бъде заменен с други методи, основани на HPLC, напр. метода, основан на високоефективна течна хроматография, съчетана с маспектрометрия (HPLC-MS), при условие че алтернативният метод е с еквивалентни характеристики за оценка на ефективността (стойност на аналитичен добив, прецизност при повторяемост и условия на възпроизводимост).

Ж. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛАЗАЛОЦИД-НАТРИЙ

Натриева сол на полиетерна монокарбонова киселина, получена от Streptomyces lasaliensis.

Съдържанието на лазалоцид натрий се определя посредством

- Метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и tandemна маспектрометрия (LC-MS/MS), или
- чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза (HPLC) с помощта на спектрофлуориметричен (флуоресцентен) детектор, съгласно описаното в точки 1—8 по-долу.

1. **Цел и обхват**

Методът дава възможност за определяне на количеството на лазалоцид-натрий във фуражи. Границата на откриване е 5 mg/kg, а границата на количествено определяне е 10 mg/kg.

2. **Принцип**

Лазалоцид натрий се извлича от пробата в подкислен метанол и се определя чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с обратна фаза, с помощта на спектрофлуориметричен (флуоресцентен) детектор.

3. **Реагенти**

3.1. Калиев дихидроген фосфат (KH_2PO_4)

3.2. Ортофосфорна киселина, w (w/w) = 85 %

3.3. Разтвор на ортофосфорна киселина, c = 20 %

Разреджат се 23,5 ml ортофосфорна киселина (т. 3.2) до 100 ml с вода.

3.4. 6-Метил-2-хептиламин (1,5-диметилхексиламин), w (w/w) = 99 %

3.5. Метанол, с чистота за HPLC

3.6. Солна киселина, плътност = 1,19 g/ml

3.7. Буферен разтвор на фосфат, c = 0,01 мол/л

Разтварят се 1,36 g KH_2PO_4 (т. 3.1) в 500 ml вода (т. 3.11), добавят се 3,5 ml ортофосфорна киселина (т. 3.2) и 10,0 ml 6-метил-2-хептиламин (т. 3.4). Стойността на pH се коригира до 4,0 чрез прибавяне на разтвор на ортофосфорна киселина (т. 3.3) и разтворът се разрежда до 1 000 ml с вода (т. 3.11).

▼ **M9**

3.8. Подкислен метанол

Прехвърлят се 5,0 ml солна киселина (т. 3.6) в градуирана колба от 1 000 ml, допълва се с метанол (т. 3.5) до пълния обем и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

3.9. Подвижна фаза за HPLC, фосфато буферен метанолен разтвор 5 + 95 (V + V)

Смесват се 5 ml от фосфатния буферен разтвор (т. 3.7) с 95 ml метанол (т. 3.5).

3.10. Стандартно вещество лазалоцид натрий с гарантирана чистота, $C_{34}H_{53}O_8Na$ ((натриева сол на полиетерна монокарбонова киселина, получена от *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Изходен стандартен разтвор на лазалоцид натрий, 500 µg/ml

Претеглят се с точност до 0,1 mg 50 mg лазалоцид натрий (т. 3.10) и се поставят в градуирана колба от 100 ml, разтварят се в подкислен метанол (т. 3.8), допълва се със същия разтворител до пълния обем, и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

3.10.2. Междинен стандартен разтвор на лазалоцид натрий, 50 µg/ml

Отмерват се с пипета 10,0 ml от изходния стандартен разтвор (т. 3.10.1) в градуирана колба от 100 ml, допълва се с подкислен метанол (т. 3.8) до пълния обем и се разбърква. Разтворът трябва да бъде приготвен непосредствено преди употреба.

3.10.3. Калибрационни разтвори

В няколко колби от 50 ml се прехвърлят 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 и 10,0 ml от междинния стандартен разтвор (т. 3.10.2). Допълва се с подкислен метанол (т. 3.8) до пълния обем и се разбърква. Тези разтвори съдържат съответно 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 и 10,0 µg/ml лазалоцид натрий. Разтворите трябва да бъдат приготвени непосредствено преди употреба.

3.11. Вода, с чистота за HPLC

4. Апаратура

4.1. Ултразвукова вана (или вибрираща водна баня) с регулиране на температурата

4.2. Мембранни филтри, 0,45 µm.

4.3. Оборудване за HPLC със система за впръскване, подходяща за впръскване на обеми от 20 µl.

4.3.1. Колона за течна хроматография 125 mm × 4 mm, обратна фаза C_{18} , пълнеж от 5 µm, или еквивалентна

4.3.2. Спектрофлуорометър с регулатор на дължината на вълната на възбуждане и излъчване

5. Процедура

5.1. Общи положения

5.1.1. Фураж без добавки

За провеждането на теста за аналитичен добив (т. 5.1.2) се анализира фураж без добавки, за да се провери дали не е замърсен с лазалоцид натрий или с други вещества. Фуражът без добавки трябва да е подобен по вид на този от изследваната проба и в него не трябва да се откриват лазалоцид натрий или нежелани вещества.

▼ **M9**

5.1.2. Тест за аналитичен добив

Тестът за аналитичен добив се извършва, като се анализира пробата от фуража без добавки, обогатена чрез прибавяне на близко до наличното в пробата количество лазалоцид натрий. За да се обогати пробата до ниво до 100 mg/kg, 10,0 ml от стандартния разтвор (т. 3.10.1) се прехвърлят в конична колба от 250 ml и се подлагат на изпарение, докато количеството на разтвора намалее до около 0,5 ml. Добавят се 50 g от фуража без добавки, разбърква се старателно и се оставя за 10 min, като се разбърква неколкостранно, преди да се премине към етапа на екстракция (т. 5.2).

Като алтернатива, ако не е наличен фураж, подобен на този, от който е взета пробата (вж. т. 5.1.1), тестът за аналитичен добив може да се извърши чрез стандартния метод на добавяне. В този случай пробата, която ще се анализира, се обогатява с такова количество лазалоцид натрий, което е близко до наличното в пробата. Тази проба се анализира заедно с необогатената проба, като извличането се пресмята чрез изваждане.

5.2. Екстракция

5.2.1. Фураж

Претеглят се 5 g до 10 g от пробата с точност до 0,01 g и се поставят в конична колба от 250 ml със запушалка. Прибавят се с пипета 100,0 ml подкислен метанол (т. 3.8). Запушва се хлабаво със запушалката и се разклаща, за да може съдържанието да се диспергира. Колбата се поставя в ултразвукова вана (т. 4.1) при температура приблизително 40 °C за 20 минути, след което се изважда и охлажда до стайна температура. Оставя се да престои около 1 час до утаяване на суспензията, след което през мембранен филтър от 0,45 µm (т. 4.2) се филтрира в подходящ съд една аликвотна част. Пристъпва се към определяне чрез HPLC (т. 5.3).

5.2.2. Премикси

Около 2 g несмлян премикс се претеглят с точност до 0,001 g и се поставят в градуирана колба от 250 ml. Прибавят се 100,0 ml подкислен метанол (т. 3.8) и се разклаща, за да може съдържанието да се диспергира. Колбата със съдържанието си се поставя в ултразвукова вана (т. 4.1) при температура приблизително 40 °C за 20 минути, след което се изважда и охлажда до стайна температура. Разрежда се с подкислен метанол (т. 3.8) до пълния обем и се разбърква старателно. Оставя се да престои около 1 час до утаяване на суспензията, след което през мембранен филтър от 0,45 µm (т. 4.2) се филтрира една аликвотна част. Подходящ обем от чистия филтрат се разрежда с подкислен метанол (т. 3.8), за да се получи окончателен разтвор за анализ, който съдържа около 4 µg/ml лазалоцид натрий. Пристъпва се към определяне чрез HPLC (т. 5.3).

5.3. Определяне с помощта на HPLC

5.3.1. Параметри

Дават се следните указания за условията на провеждане на анализа. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати:

Колона за течна хроматография (т. 4.3.1):	125 mm × 4 mm, обратна фаза C ₁₈ , пълнеж от 5 µm, или еквивалентна
Подвижна фаза (т. 3.9):	Смес от разтвор на фосфатен буфер (т. 3.7) и метанол (т. 3.5), 5 + 95 (V + V)
Скорост на изтичане:	1,2 ml/min
Дължина на вълната за откриване:	Възбуждане: 310 nm Излъчване: 419 nm
Обем на впръскване:	20 µl

▼ **M9**

Проверява се стабилността на хроматографската система, като се впръсква неколнократно калибрационният разтвор (т. 3.10.3), съдържащ 4,0 µg/ml, докато височината на пиковите (или площите) и времето на задържане останат постоянни.

5.3.2. Калибрационна крива

Всеки калибрационен разтвор се впръсква (3.10.3) по няколко пъти и се определят средните пикови височини (площи) за всяка концентрация. Построява се калибрационна крива, като за ординати се използват средните височини на пиковите (площите), а за абсциси — съответните концентрации в µg/ml.

5.3.3. Пробен разтвор

Впръскват се няколко пъти получените в т. 5.2.1. или т. 5.2.2 екстракти от изследваната проба, като се взима същият обем като при калибрационния разтвор, и се определят средните пикови височини (площи) на пиковите на лазалоцид натрий.

6. Изчисляване на резултатите

Като се използва средната пикова височина (площ), получена при впръскване на пробния разтвор (т. 5.3.3), чрез сравняване с калибрационната крива се определя концентрацията на лазалоцид натрий (µg/ml).

6.1. Фураж

Съдържанието на лазалоцид натрий w (mg/kg) в пробата се пресмята по следната формула:

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

където:

c = концентрация на лазалоцид натрий в пробния разтвор (т. 5.2.1) в µg/ml

V_1 = обем на екстракта от пробата, съгласно т. 5.2.1 в ml (т.е. 100)

m = тегло на частта от пробата за анализ в грамове

6.2. Премикси

Съдържанието на лазалоцид натрий w (mg/kg) в пробата се пресмята по следната формула:

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

където:

c = концентрация на лазалоцид натрий в пробния разтвор (т. 5.2.2) в µg/ml

V_2 = обем на екстракта от пробата, съгласно т. 5.2.2 в ml (т.е. 250)

f = фактор на разреждане, съгласно т. 5.2.2

m = тегло на частта от пробата за анализ в грамове

▼ M9

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Методите, които се базират на спектрофлуориметрията, са по-малко податливи на смущения, отколкото тези, при които се използва UV детекция. Идентичността на анализа може да се потвърди чрез ко-хроматография.

7.1.1. Кохроматография

Обогатява се екстракт от пробата (т. 5.2.1 или т. 5.2.2), като се добави подходящо количество калибрационен разтвор (т. 3.10.3). Количеството добавен лазалоксид натрий трябва да бъде близко до откритото в екстракта от пробата. Увеличава се само височината на пика на лазалоксид натрий, като се вземе предвид добавеното количество лазалоксид натрий и степента на разреждане на екстракта. Широчината на пика на половината от височината му трябва да бъде в рамките на ± 10 % от първоначалната широчина, получена за екстракта от необогатената проба.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени с една и съща проба, не трябва да превишава:

- 15 % от по-високата стойност, за съдържание на натриев лазалоксид от 30 mg/kg до 100 mg/kg;
- 15 mg/kg при съдържание на натриев лазалоксид от 100 mg/kg до 200 mg/kg;
- 7,5 % от по-високата стойност, за съдържание на лазалоксид натрий над 200 mg/kg.

7.3. Аналитичен добив

За обогатената проба от фуража, аналитичният добив трябва да бъде най-малко 80 %. При обогатените проби от премикси, аналитичният добив трябва да е най-малко 90 %.

8. Резултати от съвместно изследване

Проведено беше съвместно изследване (*), при което 2 премикса (проби 1 и 2) и 5 вида фураж (проби 3—7) бяха подложени на анализ от 12 лаборатории. За всяка проба са проведени по два анализа. Резултатите са представени в следната таблица:

	Проба 1 Премикс за пилета	Проба 2 Премикс за пуйки	Проба 3 Пелети за пуйки	Проба 4 Трохи за пилета	Проба 5 Фураж за пуйки	Проба 6 Фураж за дом. птици А	Проба 7 Фураж за дом. птици Б
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Средна стойност [mg/ kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s _r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV _r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s _R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV _R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70

▼ M9

	Проба 1 Премикс за пилета	Проба 2 Премикс за пуйки	Проба 3 Пелети за пуйки	Проба 4 Трохи за пилета	Проба 5 Фураж за пуйки	Проба 6 Фураж за дом. птици А	Проба 7 Фураж за дом. птици Б
Номинално съдържание, [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L = брой на лабораториите

n = брой индивидуални резултати

s_r = стандартно отклонение на повторемостта

s_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта

CV_r = коефициент на вариация на повторемостта, %

CV_R = коефициент на вариация на възпроизводимостта, %

(*) Analyst, 1995 г., 120, стр. 2175—2180

(**) Заявено от производителя съдържание.

(+) Фураж, подготвен в лабораторията.

3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АМПРОЛИУМ ХИДРОХЛОРИД

*1-[(4-амино-2-пропил-5-пиримидин)метил]-2-метилпиридин хлорид
монохидрохлорид*

1. Цел и обхват

Настоящият метод дава възможност за определяне на количеството на ампролиум във фуражи. Границата на откриване е 1 mg/kg, а границата на количествено определяне е 5 mg/kg.

2. Принцип

Пробата се подлага на екстракция със смес от метанол и вода. След разреждане с подвижната фаза и филтрация с мембранен филтър, съдържанието на ампролиум се определя чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с катионен обмен, с използване на UV детектор.

3. Реагенти

3.1. Метанол

3.2. Ацетонитрил, с чистота за HPLC

3.3. Вода, с чистота за HPLC

3.4. Разтвор на натриев дихидроген фосфат, $c = 0,1$ mol/l

Разтворете във вода (3.3) 13,80 g натриев дихидроген фосфат монохидрат в мерителна колба от 1 000 ml, допълнете до маркировката с вода (3.3) и разбъркайте.

3.5. Разтвор на натриев перхлорат, $c = 1,6$ mol/l

Разтварят се 224,74 g натриев перхлорат монохидрат във вода (т. 3.3) в градуирана колба от 1 000 ml, допълва се с вода (т. 3.3) до пълния обем и се разбърква.

3.6. Подвижна фаза за HPLC (вж. забележка 9.1).

Смес от ацетонитрил (т. 3.2), разтвор на натриев дихидроген фосфат (т. 3.4) и разтвор на натриев перхлорат (т. 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Преди употреба разтворът се филтрира през мембранен филтър с размер на порите 0,22 μ m (т. 4.3) и се обезгазва (напр. в ултразвукова вана (т. 4.4) в продължение най-малко на 15 минути).

3.7. Стандартно вещество: чист ампролиум, 1-[(4-амино-2-пропил-5-пиримидинил)метил]-2-метил пиридин хлорид, E 750 (вж. т. 9.2)

▼ M9**3.7.1. Изходен стандартен разтвор на ампролиум, 500 µg/ml**

Претеглет 50 mg ампролиум (3.7) с точност до 0,1 mg в мерителна колба от 100 ml, разтворете в 80 ml метанол (3.1) и поставете колбата в ултразвукова вана (4.4) за 10 минути. След обработката с ултразвук, разтворът се охлажда до стайна температура, допълва се с вода до пълния обем и се разбърква. При температура $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на 1 месец.

3.7.2. Междинен стандартен разтвор на ампролиум, 50 µg/ml

Отмерват се с пипета 5,0 ml от изходния стандартен разтвор (т. 3.7.1) в градуирана колба от 50 ml, допълва се до пълния обем с екстракционен разтворител (т. 3.8) и се разбърква. При температура $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на 1 месец.

3.7.3. Калибрационни разтвори

Прехвърлят се съответно 0,5, 1,0 и 2,0 ml от междинния стандартен разтвор (т. 3.7.2) в поредица от градуирани колби от 50 ml. Колбите се допълват до пълния обем с подвижната фаза (т. 3.6) и съдържанието им се разбърква. Тези разтвори отговарят съответно на 0,5, 1,0 и 2,0 µg ампролиум на ml. Разтворите трябва да бъдат приготвени непосредствено преди употреба.

3.8. Екстрахиращ разтворител

Смес от метанол (т. 3.1) и вода, 2 + 1 (v + v)

4. Апаратура**4.1. Оборудване за HPLC със система за впръскване, подходяща за впръскване на обеми от 100 µl.****4.1.1. Колона за течна хроматография 125 mm × 4 mm, пълна с Nucleosil 10 SA за катионен обмен от 5 или 10 µm, или еквивалентна.****4.1.2. UV детектор с настройка на дължината на вълната или детектор с диодна матрица.****4.2. Мембранен филтър от материал PTFE, 0,45 µm.****4.3. Мембранен филтър, 0,22 µm****4.4. Ултразвукова вана****4.5. Механичен или магнитен миксер****5. Процедура****5.1. Общи положения****5.1.1. Фураж без добавки**

За изпълнението на теста за аналитичен добив (т. 5.1.2) се анализира празна проба фураж, за да се провери за наличие на ампролиум и интерфериращи вещества. Фуражът от празната проба трябва да е подобен по вид на този от изследваната проба и в него не трябва да бъдат открити ампролиум или интерфериращи вещества.

5.1.2. Тест за аналитичен добив

Извършва се тест за аналитичен добив, като се анализира пробата от фураж без добавки, обогатена чрез прибавяне на известно количество ампролиум, сходно с наличното в изследваната проба. За да се обогати пробата до равнище 100 mg/kg, 10,0 ml от изходния стандартен разтвор (т. 3.7.1) се прехвърлят в конична колба от 250 ml и се подлагат на изпарение, докато количеството на разтвора намалее до около 0,5 ml. Добавете 50 g празна проба, разбъркайте добре и оставете 10 минути като разбърквате няколко пъти преди да продължите с етапа на екстракция (5.2)

▼ M9

Като алтернатива, ако не е наличен фураж, подобен на този, от който е взета пробата (вж. т. 5.1.1), тестът за аналитичен добив може да се извърши чрез стандартния метод на добавяне. В този случай пробата, която ще се анализира, се обогатява с такова количество ампролиум, което е близко до вече съдържащото се в пробата. Тази проба се анализира заедно с необогатената проба, като стойността на аналитичен добив се пресмята чрез изваждане.

5.2. *Екстракция*

5.2.1. Премикси (съдържание < 1 % ампролиум) и фуражи

Претеглят се с точност до 0,01 mg от 5 g до 40 g от пробата, в зависимост от съдържанието на ампролиум, в конична колба от 500 ml, и се добавят 200 ml екстракционен разтворител (т. 3.8). Колбата се поставя в ултразвукова вана (точка 4.4) и се оставя да престои 15 мин. Колбата се изважда от ултразвуковата вана, разклаща се в продължение на 1 час с клатачна машина или се разбърква с магнитна бъркалка (т. 4.5). Една аликвотна част от екстракта се разрежда с подвижната фаза (т. 3.6) до получаване на съдържание на ампролиум от 0,5 до 2 µg/ml и се разбърква (вж. забележка 9.3). Филтрират се 5 до 10 ml от този разреден разтвор през мембранен филтър (т. 4.2). Пристъпва се към определяне чрез HPLC (т. 5.3).

5.2.2. Премикси (съдържание ≥ 1 % ампролиум)

Претеглят се с точност до 0,001 g от 1 до 4 g премикс, в зависимост от съдържанието на ампролиум, в конична колба от 500 ml, и се добавят 200 ml екстракционен разтворител (т. 3.8). Колбата се поставя в ултразвукова вана (точка 4.4) и се оставя да престои 15 мин. Колбата се изважда от ултразвуковата вана, разклаща се в продължение на 1 час с клатачна машина или се разбърква с магнитна бъркалка (т. 4.5). Една аликвотна част от екстракта се разрежда с подвижната фаза (т. 3.6) до получаване на съдържание на ампролиум от 0,5 до 2 µg/ml и се разбърква. Филтрират се 5 до 10 ml от този разреден разтвор през мембранен филтър (т. 4.2). Пристъпва се към определяне чрез HPLC (т. 5.3).

5.3. *Определяне с помощта на HPLC*

5.3.1. Параметри

Дават се следните указания за условията на провеждане на анализа. Могат да се използват и други параметри, при условие че дават равностойни резултати:

Колона за течна хроматография (т. 4.1.1): 125 mm × 4 mm, за катионен обмен Nucleosil 10 SA, пълнеж от 5 или 10 µm, или еквивалентна

Подвижна фаза (т. 3.6): Смес от ацетонитрил (т. 3.2), разтвор на натриев дихидроген фосфат (т. 3.4) и разтвор на натриев перхлорат (т. 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Скорост на изтичане: 0,7—1 ml/min

Дължина на вълната за откриване: 264 nm

Обем на впръскване: 100 µl

Проверява се стабилността на хроматографската система, като се впръсква неколккратно калибрационният разтвор (т. 3.7.3), съдържащ 1,0 µg/ml, докато височината на пиковите (или площите) и времето на задържане останат постоянни.

5.3.2. Калибрационна крива

Всеки калибрационен разтвор се впръсква (3.7.3) по няколко пъти и се определят средните пикови височини (площи) за всяка концентрация. Построява се калибрационна крива, като за ординати се използват средните височини на пиковите (площите) на калибрационните разтвори, а за абсциси — съответните концентрации в µg/ml.

▼ **M9**

5.3.3. Пробен разтвор

Екстрактът от пробата за изследване (т. 5.2) се впръсква няколко пъти, като се използва същият обем като при калибрационните разтвори, и се определя средната височина (площ) на пиковите на ампролиум.

6. Изчисляване на резултатите

От средната височина (площ) на пиковите на ампролиум в пробния разтвор чрез сравняване с калибрационната крива (т. 5.3.2) се определя концентрацията на пробния разтвор в $\mu\text{g/ml}$.

Съдържанието на ампролиум w в mg/kg в пробата се определя по формулата:

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

където:

V = обем на екстракционния разтворител (т. 3.8) в ml , съгласно т. 5.2 (т.е. 200 ml)

c = концентрация на ампролиум в екстракта на пробата (т. 5.2) в $\mu\text{g/ml}$

f = фактор на разреждане, съгласно т. 5.2

m = тегло на частта от пробата за анализ в грамове

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез кохроматография или чрез използване на детектор с диодна матрица, с помощта на който се сравняват спектрите на екстракта на пробата (т. 5.2) и на калибрационния разтвор (т. 3.7.3), съдържащ 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Кохроматография

Обогатява се екстракт от пробата (т. 5.2), като се добави подходящо количество калибрационен разтвор (т. 3.7.3). Количеството добавен ампролиум трябва да бъде близко до това, открито в екстракта на пробата.

Увеличава се само височината на пика на ампролиум, след като се вземат под внимание както добавеното количество, така и степента на разреждане на екстракта. Широчината на пика при половината от височината му трябва да бъде в границите на $\pm 10\%$ от първоначалната широчина на пика на ампролиум при необогатения екстракт от пробата.

7.1.2. Детектиране с диодна матрица

Резултатите се оценяват според следните критерии:

а) Дължината на вълната на максимална абсорбция на пробата трябва да бъде същата като тази на спектрите на стандарта, регистрирана в най-високата точка на хроматограмата и при отклонение, определено от разделителната способност на детектиращата система. При детектиране с диодна матрица отклонението обикновено е в рамките на $\pm 2\text{ nm}$.

б) В границите от 210 до 320 nm , регистрираните при максимума на пика на хроматограмата спектри на пробата и на стандартите не трябва да се различават за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между двата спектъра не надвишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ.

▼ M9

- в) В границите от 210 до 320 nm спектрите на възходящата линия, максимума и низходящата линия на пика, получен от екстракта на пробата, не трябва да се различават един от друг за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато са налице едни и същи максимуми и когато в нито една регистрирана точка отклонението между спектрите не надвишава 15 % от абсорбцията на спектъра на най-високата точка.

Ако един от тези критерии не е спазен, наличието на анализа не е потвърдено.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определения, извършени с една и съща проба, не трябва да превишава:

- 15 % от по-високата стойност, за съдържание на ампролиум от 25 mg/kg до 500 mg/kg;
- 75 mg/kg при съдържание на ампролиум между 500 mg/kg и 1 000 mg/kg;
- 7,5 % от по-високата стойност, за съдържание на ампролиум над 1 000 mg/kg.

7.3. Аналитичен добив

При обогатена (празна) проба, аналитичният добив трябва да е най-малко 90 %.

8. Резултати от съвместно изследване

Проведено беше паралелно изследване, при което бяха анализирани три фуража за домашни птици (проби 1—3), един минерален фураж (проба 4) и един премикс (проба 5). Резултатите са представени в следната таблица:

	проба 1 (фураж без добавки)	проба 2	проба 3	проба 4	проба 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Средна стойност в [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
номинално съдържание [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: брой на лабораториите

n: брой отделни стойности

s_r: стандартно отклонение на повторяемостта

CV_r: коефициент на вариация на повторяемостта

s_R: стандартно отклонение на възпроизводимостта

CV_R: коефициент на вариация на възпроизводимостта

▼ M9

9. **Забележки**

- 9.1. Ако пробата съдържа тиамин, неговият пик в хроматограмата се появява малко преди пика на ампролиума. Ако се следва този метод, ампролиумът и тиаминът трябва да се разделят. Ако те не се разделят с помощта на колоната (т. 4.1.1), използвана в настоящия метод, следва да се заменят до 50 % от ацетонитрила в подвижната фаза (т. 3.6) с метанол.
- 9.2. Съгласно Британската фармакопея, спектърът на разтвор на ампролиум ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) в солна киселина ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) показва максимуми при 246 nm и 262 nm. Абсорбцията достига 0,84 при 246 nm и 0,80 при 262 nm.
- 9.3. Екстрактът винаги трябва да бъде разреден с подвижната фаза фаза, тъй като в противен случай времето на задържане на пика на ампролиума може значително да се измени, поради промени в йонната сила на разтвора.

И. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НАРАЗИН

Съдържанието на наразин се определя посредством

- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ. Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и тандемна масспектрометрия (LC-MS/MS), или
- метода, предвиден в стандарт EN 14183 – Фуражи. Определяне съдържанието на монензин, наразин и салиномицин. Течен хроматографски метод, използващ пост-колонна дериватизация.

Й. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИКАРБАЗИН

Съдържанието на никарбазин се определя посредством

- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ. Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и тандемна масспектрометрия (LC-MS/MS) или
- метода, предвиден в стандарт EN 15782 Фуражи. Определяне на никарбазин - метод чрез високоефективна течна хроматография.

К. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ДЕКОХИНАТ

Съдържанието на декохинат се определя посредством:

- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и тандемна масспектрометрия (LC-MS/MS), или
- метода, предвиден в стандарт EN 16162 Фуражи. Определяне на декохинат чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с флуоресцентно откриване.

▼ **M9****Л. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МОНЕНЗИН**

Съдържанието на монензин се определя посредством

- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и тандемна масспектрометрия (LC-MS/MS), или
- метода, предвиден в стандарт EN 14183 – Фуражи. Определяне съдържанието на монензин, наразин и салиномицин. Течен хроматографски метод, използващ пост-колонна дериватизация.

М. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА САЛИНОМИЦИН

Съдържанието на салиномицин се определя посредством

- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и тандемна масспектрометрия (LC-MS/MS), или
- метода, предвиден в стандарт EN 14183 – Фуражи – Определяне съдържанието на монензин, наразин и салиномицин – Течен хроматографски метод, използващ пост-колонна дериватизация.

Н. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕМДУРАМИЦИН

Съдържанието на семдурамицин се определя посредством:

- метода за анализ, предвиден в стандарт EN 17299 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Скрининг и определяне на разрешени кокцидиостатици на ниво добавка, на 1 % и 3 % кръстосано замърсяване, както и на нерегистрирани кокцидиостатици и антибиотик на ниво фуражни компоненти в комбинирани фуражи чрез високоефективна течна хроматография и тандемна масспектрометрия (LC-MS/MS) или
- метода, предвиден в стандарт EN 16158 – Фуражи – Определяне съдържанието на семдурамицин – Метод чрез течна хроматография, използващ аналитичния подход на дървото на решенията.

О. EN СТАНДАРТИ

При прилагането на член 34, параграф 2, буква а) от Регламент (ЕС) 2017/625 се вземат предвид следните EN стандарти:

EN ISO 30024 – Фуражи – Определяне на фитазната активност

EN 17050 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на йод във фураж чрез анионно-обменна масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS)

EN 17550 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на каротеноиди в комбинирани фуражи и предварителни смеси чрез високоефективна течна хроматография с ултравиолетово детектиране (HPLC-UV)

EN 15784 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Откриване и изброяване на *Bacillus* spp., използвани като фуражна добавка

▼ M9

EN 15785 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне и преброяване на *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Откриване и изброяване на *Pediococcus* spp., използвани като фуражна добавка

EN 15787 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Откриване и изброяване на *Lactobacillus* spp., използвани като фуражна добавка

EN 15788 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Откриване и изброяване на *Enterococcus* (*E. faecium*) spp., използвани като фуражна добавка

EN 15789 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Откриване и изброяване на *Saccharomyces cerevisiae*, използвани като фуражна добавка

EN 15510 – Фуражи: Методи за вземане на проби и за анализ – Определяне на калций, натрий, фосфор, магнезий, калий, желязо, цинк, мед, манган, кобалт, молибден и олово чрез ICP-AES (за анализа на фуражните добавки кобалт и молибден)

EN 15621 – Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на калций, натрий, фосфор, магнезий, калий, сяра, желязо, цинк, мед, манган и кобалт след разлагане под налягане чрез ICP-AES (за анализа на фуражната добавка кобалт)

EN 16159 Фуражи – Определяне на селен чрез атомноабсорбционна спектроскопия с генериране на хидриди (HGAAS) след микровълново разлагане (разлагане с 65 % азотна киселина и 30 % водороден пероксид)(за анализа на фуражната добавка селен)

EN 17053: Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на микроелементи, тежки метали и други елементи във фуражи чрез маспектроскопия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) (мултиметод) (за анализа на фуражните добавки кобалт, молибден и селен)

▼ M9

ПРИЛОЖЕНИЕ V

МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ С ЦЕЛ КОНТРОЛ НА НЕЖЕЛАНИ ВЕЩЕСТВА ВЪВ ФУРАЖИТЕ

A. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИВАТА НА ДИОКСИНИ (PCDD/PCDF) И РСВ

ГЛАВА I

МЕТОДИ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ АНАЛИЗА

1. Обхват и определения

Пробите, предназначени за официалния контрол на нивата на полихлорирани дибензо-р-диоксини (PCDD), полихлорирани дибензофурани (PCDF), диоксиноподобни полихлорирани бифенили (PCB) ⁽¹⁾ и недиоксиноподобни РСВ във фуражите, се вземат в съответствие с разпоредбите на приложение I. Прилагат се количествените изисквания във връзка с контрола на равномерно разпределени във фуражите вещества или продукти, посочени в точка 5.1. от приложение I. Така получените съставни проби се разглеждат като представителни за партидите или подпартидите, от които са взети. Съответствието с максимално допустимите количества, посочени в Директива 2002/32/ЕО, се определя въз основа на количествата, установени в лабораторните проби.

⁽¹⁾ Таблица за Таблица за TEF (= коефициенти на токсична еквивалентност) на PCDD, PCDF и диоксиноподобните PCB: КТЕ на СЗО за оценка на риска за хора, изготвени въз основа на заключенията на работния семинар на експертите в рамките на Международната програма за химическа безопасност (МПХБ) — на Световната здравна организация (СЗО), проведен в Женева през юни 2005 г. (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Конгенер	Стойност на TEF	Конгенер	Стойност на TEF
Дибензо-р-диоксини (PCDD) и дибензо-р-фурани (PCDF)		Диоксиноподобни PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Не-орто PCB + Моно-орто PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Не-орто PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Моно-орто PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Използвани съкращения: „Т“ = тетра; „Ре“ = пента; „Хх“ = хекса; „Нр“ = хепта; „О“ = окта; „CDD“ = хлоридибензодиоксин; „CDF“ = хлоридибензофуран; „CB“ = хлоробифенил.

▼ M9

За целите на настоящата част се прилагат определенията от приложение I към Регламент за изпълнение (ЕС) 2021/808 на Комисията ⁽²⁾.

Освен посочените определения, за целите на настоящата част се прилагат следните определения:

„Скрининг методи“ означава методи, използвани за отсяване на пробите с нива на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB, които надвишават максимално допустимите количества или праговете. Те позволяват икономически целесъобразна обработка на голям брой проби, като по този начин се увеличава вероятността за откриване на нови инциденти с висока степен на изложеност и рискове за здравето на потребителите. Скрининг методите се основават на биоаналитични методи или методи на GC-MS. Резултатите от пробите, които надвишават граничната стойност, използвана за проверка на съответствието спрямо максимално допустимото количество, се проверяват посредством пълен повторен анализ от оригиналната проба чрез метод за потвърждение.

„Методи за потвърждение“ означава методи, които дават пълна или допълнителна информация, позволяваща идентифицирането и еднозначното количествено определяне на PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB по отношение на максимално допустимото количество или при необходимост, на прага. При тези методи се използва газова хроматография/маспектрометрия с висока разделителна способност (GC-HRMS) или газова хроматография/тандемна маспектрометрия (GC-MS/MS).

2. Съответствие на партидата или подпартидата с максимално допустимото количество

2.1. По отношение на недоксиноподобните PCB

Партидата или подпартидата съответства на максимално допустимото количество, ако резултатът от анализа за сумата от PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 и PCB 180 (наричани по-нататък „недиоксиноподобни PCB“) не надвишава максимално допустимото количество, установено с Директива 2002/32/ЕО, като се отчита разширената неопределеност на измерването ⁽³⁾. Партидата или подпартидата не съответства на максимално допустимото количество, установено с Директива 2002/32/ЕО, ако средната стойност от два горногранични ⁽⁴⁾ резултата от анализа, получени при повторен анализ ⁽⁵⁾, чрез използването на метод за потвърждение, като се отчита разширената неопределеност на измерването, без съмнение надвишава максимално допустимото количество, т.е. за оценката на съответствието се използва анализираната концентрация след приспадане на разширената неопределеност на измерването.

⁽²⁾ Регламент за изпълнение (ЕС) 2021/808 на Комисията от 22 март 2021 г. относно изпълнението на аналитични методи за остатъци от фармакологичноактивни субстанции, използвани при животни, отглеждани за производство на храни, и относно тълкуването на резултати, както и относно методите, които трябва да се използват за вземане на проби, и за отмяна на решения 2002/657/ЕО и 98/179/ЕО (ОВ L 180, 21.5.2021 г., стр. 84).

⁽³⁾ Когато е целесъобразно се спазват принципите, описани в „Насоки относно неопределеността на измерването за лаборатории, извършващи анализ на PCDD/PCDF и PCB чрез използване на маспектрометрия с изотопно разреждане“ (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf).

⁽⁴⁾ Принципът „горна граница“ изисква използването на границата за количествено определяне за изчисляване на участието на всеки конгенер, който не е количествено определен. Принципът „долна граница“ изисква използването на стойност нула за изчисляване на участието на всеки конгенер, който не е количествено определен. Принципът „средна граница“ изисква използването на половината от границата за количествено определяне за изчисляване на участието на всеки конгенер, който не е количествено определен.

⁽⁵⁾ Повторен анализ: отделен анализ на аналитите от значение с използване на втора аликутна част от същата хомогенизирана проба. В общия случай се прилагат изискванията за повторен анализ, предвидени в приложение II, глава В, точка 3. За методите, при които се използва маркиран с ¹³C вътрешен стандарт за съответните аналити, повторният анализ е необходим само ако резултатът от първото определяне сочи несъответствие. Повторният анализ е необходим, за да се изключи възможността от вътрешно кръстосано замърсяване или от случайно смесване на пробите. В случай че анализът се провежда в контекста на инцидент, при който е налице замърсяване, потвърждението чрез повторен анализ може да не се извършва, ако избраните за анализ проби могат да бъдат проследени и свързани с инцидента, при който е получено замърсяването, и откритото количество е значително над максимално допустимото количество.

▼ M9

Разширената неопределеност на измерването е изчислена, като е използван коефициент на покритие 2, което дава доверителна вероятност приблизително 95 %. Дадена партида или подпартида не съответства на разпоредбите, ако средната аритметична величина на измерените стойности минус разширената неопределеност на средната аритметична величина е над максимално допустимото количество.

Правилата, посочени в параграфите от настоящата точка, се прилагат по отношение на резултата, получен при анализа на пробата за целите на официалния контрол. При извършване на анализ за второ експертно становище или за справка се прилагат националните правила.

2.2. По отношение на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB

Партидата или подпартидата съответства на максимално допустимото количество, ако резултатът от еднократен анализ:

- извършен чрез скрининг метод с дял на фалшивите резултати за съответствие под 5 %, сочи, че нивото не надвишава съответното максимално допустимо количество на PCDD/PCDF, нито сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB, както е предвидено в Директива 2002/32/ЕО;
- извършен чрез метод за потвърждение, не надвишава съответното максимално допустимо количество на PCDD/PCDF, нито сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB, както е предвидено в Директива 2002/32/ЕО, като се отчита разширената неопределеност на измерването.

При скрининг анализите трябва да се установят гранични стойности с оглед определянето на съответствието на пробата на максимално допустимите количества, установени за PCDD/PCDF или за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB.

Партидата или подпартидата не съответства на максимално допустимото количество, установено с Директива 2002/32/ЕО, ако средната стойност от два горногранични ⁽⁶⁾ резултата от анализа, получени при повторен анализ ⁽⁷⁾ чрез използването на метод за потвърждение, като се отчита разширената неопределеност на измерването, без съмнение надвишава максимално допустимото количество, т.е. за оценката на съответствието се използва анализираната концентрация след приспадане на разширената неопределеност на измерването.

Разширената неопределеност на измерването е изчислена, като е използван коефициент на покритие 2, което дава доверителна вероятност приблизително 95 %. Дадена партида или подпартида не съответства на разпоредбите, ако средната аритметична величина на измерените стойности минус разширената неопределеност на средната аритметична величина е над максимално допустимото количество.

⁽⁶⁾ Принципът „горна граница“ изисква използването на границата за количествено определяне за изчисляване на участието на всеки конгенер, който не е количествено определен, към токсичния еквивалент (TEQ). Принципът „долна граница“ изисква използването на стойност нула за изчисляване на участието на всеки конгенер, който не е количествено определен, към TEQ. Принципът „средна граница“ изисква използването на половината от границата за количествено определяне за изчисляване на участието на всеки конгенер, който не е количествено определен, към TEQ.

⁽⁷⁾ В общия случай се прилагат изискванията за повторен анализ, предвидени в приложение II, глава В, точка 3. За методите за потвърждение, при които се използва маркиран с ¹³C вътрешен стандарт за съответните аналити, повторният анализ е необходим само ако резултатът от първото определяне сочи несъответствие. Повторният анализ е необходим, за да се изключи възможността от вътрешно кръстосано замърсяване или от случайно смесване на пробите. В случай че анализът се провежда в контекста на инцидент, при който е налице замърсяване, потвърждението чрез повторен анализ може да не се извършва, ако избраните за анализ проби могат да бъдат проследени и свързани с инцидента, при който е получено замърсяването, и откритото количество е значително над максимално допустимото количество.

▼ M9

За сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB се използва сумата от оценената разширена неопределеност на отделните резултати от анализа на PCDD/PCDF и на диоксиноподобните PCB.

Правилата, посочени в параграфите от настоящата точка, се прилагат по отношение на резултата, получен при анализа на пробата за целите на официалния контрол. При извършване на анализ с цел защита или за справка се прилагат националните правила.

3. **Резултати, превишаващи праговете, определени в Приложение II към Директива 2002/32/ЕО**

Праговете са инструмент за отсяване на проби в случаите, в които е необходимо да се идентифицира източникът на дадено замърсяване и да се вземат мерки за неговото намаляване или отстраняване. Чрез скрининг методите трябва да се установят подходящи гранични стойности за отсяване на посочените проби. В случай че са необходими значителни усилия за идентифициране на източника и за намаляване или отстраняване на замърсяването, е целесъобразно надвишаването на праговете да се потвърди чрез повторен анализ при използване на метод за потвърждение и като се отчита разширената неопределеност на измерването.⁽⁸⁾

ГЛАВА II

ПОДГОТОВКА НА ПРОБИТЕ И ИЗИСКВАНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ ЗА АНАЛИЗ, ИЗПОЛЗВАНИ ЗА ЦЕЛИТЕ НА ОФИЦИАЛНИЯ КОНТРОЛ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ДИОКСИНИ (PCDD/PCDF) И НА ДИОКСИНОПОДОБНИ PCB ВЪВ ФУРАЖИТЕ

1. **Приложно поле**

Изискванията, изложени в настоящата глава, се прилагат при анализа на фуражи за целите на официалния контрол на съдържанието на заместени на 2,3,7,8 позиция PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB, както и по отношение на подготовката на пробите и аналитичните изисквания за други регулаторни цели, включващи контрола, извършван от операторите във фуражния сектор с цел осигуряване на съответствие с Регламент (ЕО) № 183/2005 на Европейския парламент и на Съвета⁽⁹⁾.

Наблюдението за наличие на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB във фуражите може да се извършва чрез два различни вида аналитични методи:

а) *Скрининг методи*

Целта на скрининг методите е отсяване на пробите с нива на PCDD/PCDF и на диоксиноподобни PCB, които надвишават максимално допустимите количества или праговете. С тези методи се осигурява икономически целесъобразна обработка на голям брой проби, като по този начин се увеличава вероятността за откриване на нови инциденти с висока степен на изложеност и рискове за здравето на потребителите. С прилагането им се цели избягване на фалшивите резултати за съответствие. Скрининг методите могат да включват биоаналитични методи и методи GC-MS.

Чрез тях се извършва сравнение на резултата от анализа с граничната стойност и се получава отговор от вида „да/не“ относно евентуалното надвишаване на максимално допустимото количество или прага. Концентрацията на PCDD/PCDF и сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB в пробите, за които има съмнение за несъответствие спрямо максимално допустимото количество, се определя или потвърждава чрез метод за потвърждение.

Освен това скрининг методите може да дадат индикация за количествата на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB, които се съдържат в пробата. При прилагане на биоаналитични скрининг методи резултатът се изразява като биоаналитични еквиваленти (BEQ), докато при прилагане на физикохимични GC-MS той се

⁽⁸⁾ Обясненията и изискванията за повторен анализ за контрол на праговете са същите като тези в бележка под линия 5 относно максимално допустимите количества.

⁽⁹⁾ Регламент (ЕО) № 183/2005 на Европейския парламент и на Съвета от 12 януари 2005 г. за определяне на изискванията за хигиена на фуражите (ОВ L 35, 8.2.2005 г., стр. 1).

▼ **M9**

изразява като токсични еквиваленти (TEQ). Цифрово изразените резултати от скрининг методите са подходящи за доказване на съответствието или на съмненията за несъответствие или надвишаване на праговете и при проследяване чрез методи за потвърждение показват диапазона на нивата. Те не са подходящи за цели като извършване на оценка на фоновите нива, предварителна оценка на количеството, проследяване на тенденции във времето при нивата или повторна оценка на праговете и на максимално допустимите количества.

б) Методи за потвърждение

Методите за потвърждение позволяват еднозначното идентифициране и количествено определяне на съдържащите се в дадена проба PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB и предоставят пълна информация относно нивата на отделните конгенери. Следователно тези методи позволяват извършването на контрол на максимално допустимите количества и праговете, в т.ч. потвърждаване на резултатите, получени чрез скрининг методите. Освен това резултатите могат да бъдат използвани за други цели, като например определяне на ниски фонове нива при мониторинг на фуражите, проследяване на тенденции във времето, извършване на оценка на изложеността и създаване на база данни за евентуална повторна оценка на праговете и на максимално допустимите количества. Те са важни също така за установяването на модели на конгенери с оглед идентифицирането на източника на евентуално замърсяване. При тези методи се използва GC-HRMS. За потвърждаване на съответствието или несъответствието спрямо максимално допустимите количества може да се използва и GC-MS/MS.

2. Контекст

За да се изчислят концентрациите на TEQ, концентрациите на отделните вещества в дадена проба се умножават по съответния им коефициент за токсична еквивалентност (TEF) (вж. бележка под линия 1 от глава I) и след това се сумират, за да се получи общата концентрация на диоксиноподобните съединения, изразени като TEQ.

За целите на настоящата част А приетата „специфична граница за количествено определяне на отделен конгенер“ означава най-ниското съдържание на анализа, което може да бъде измерено при разумна степен на статистическа сигурност, при изпълнение на критериите за идентифициране, описани в международно признати стандарти, например в стандарт EN 16215:2012 (Фуражи – определяне на диоксини и диоксин-подобни полихлорирани бифенили (PCBs) и на индикаторни PCBs чрез GC/HRMS) и/или в последната редакция на методи EPA 1613 и 1668.

Границата за количествено определяне на отделен конгенер може да бъде определена като:

- а) концентрацията на даден анализ в екстракта от дадена проба, който предизвиква реакция от страна на техническото устройство за два различни йона, която трябва да се следи при съотношение S/N (сигнал/шум), равно на 3:1 за по-малко интензивния сигнал на необработени данни; или
- б) ако поради технически причини изчислението на съотношението сигнал/шум не дава надеждни резултати, най-ниската точка на концентрация на калибрационна крива, която дава приемливо ($\leq 30\%$) и постоянно (измерено поне в началото и в края на дадена аналитична серия от проби) отклонение спрямо средния относителен коефициент на отговор, изчислен за всички точки по калибрационната крива при всяка серия от проби. Границата за количествено определяне (LOQ) се изчислява от най-ниската точка на концентрация, като се отчете аналитичният добив от вътрешните стандарти и количеството на пробата.

▼ **M9**

Биоаналитичните скрининг методи не отчитат резултати на ниво конгенери, а само показват ⁽¹⁰⁾ нивото на токсичния еквивалент (TEQ), изразено в BEQ, като потвърждават факта, че не всички съдържащи се в екстракта от проба съединения, които предизвикват отговор при изпитването, могат да се подчиняват на всички изисквания на принципа на TEQ.

Скрининг методите и методите за потвърждение могат да се използват за контрол на определена матрица само ако са достатъчно чувствителни с оглед надеждното откриване на количества на нивото на прага или максимално допустимото количество.

3. Изисквания за осигуряване на качеството

- 3.1. Вземат се мерки за избягване на кръстосано замърсяване на всеки етап от процедурата за вземане на проби и от анализа.
- 3.2. Пробите се съхраняват и транспортират в подходящи за съхранение съдове от стъкло, алуминий, полипропилен или полиетилен, без да се оказва никакво влияние върху нивата на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB в пробите. От контейнера за съхранение на пробата се премахват следите от хартиен прах.
- 3.3. Съхранението и транспортирането на пробите се извършват по начин, при който се запазва целостта на фуражната проба.
- 3.4. Доколкото е уместно, всяка лабораторна проба се смила фино и се смесва оптимално чрез използване на процес, с който е доказано, че се постига пълно хомогенизиране (например смилане, което позволява преминаване през сито с размер на отворите 1 mm). Пробите се изсушават преди смилането, ако съдържанието на влага в тях е твърде високо.
- 3.5. Осъществява се контрол на реагентите, лабораторната стъклария и оборудването от гледна точка на възможното им влияние върху резултатите на база TEQ или BEQ.
- 3.6. Извършва се анализ на празна проба, като се изпълнява цялата аналитична процедура и се пропуска единствено пробата.
- 3.7. При биоаналитичните методи цялата стъклария и разтворителите, използвани при анализа, преминават изпитвания за отсъствие на съединения, които интерферира при откриването на целевите съединения в работния обхват. Стъкларията се изплаква с разтворители или се загрява до температури, подходящи за отстраняване на следи от PCDD/PCDF, диоксиноподобни и интерфериращи съединения от нейната повърхност.
- 3.8. Количеството на пробата, използвано за екстракцията, е достатъчно, за да отговаря на изискванията за достатъчно нисък работен обхват, включително концентрациите на максимално допустимото количество или на прага.
- 3.9. Специфичните процедури за подготовка на пробите, използвани при разглежданите продукти, се основават на международно приетите насоки, напр. EN ISO 6498.

⁽¹⁰⁾ Биоаналитичните методи не са характерни за конгенерите, които са включени в схемата за ТЕФ. В екстракта от пробата е възможно наличието на други структурно свързани съединения с активен AhR, които допринасят за общата реакция. Следователно биоаналитичните резултати не могат да се разглеждат като оценка, а по-скоро като показател за стойността на TEQ в пробата.

▼ M9

4. Изисквания по отношение на лабораториите

4.1. В съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕС) 2017/625 лабораториите трябва да бъдат акредитирани от признат орган, действащ в съответствие с Ръководство 58 на ISO/IEC, с цел да се гарантира осигуряване на качеството при анализите. Лабораториите трябва да бъдат акредитирани в съответствие със стандарт EN ISO/IEC 17025. Спазват се принципите, описани в „Технически насоки за приблизителното изчисляване на неопределеността на измерването и на границите на количествено определяне за целите на анализа на PCDD/PCDF и PCB“. ⁽¹¹⁾

4.2. Компетентността на лабораторията трябва да бъде доказана чрез постоянно успешно участие в междублабораторни изследвания за определяне на PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB в съответните матрици от фуражи и диапазони на концентрация.

4.3. Лабораториите, които прилагат скрининг методи за целите на рутинния контрол на пробите, трябва да установяват тясно сътрудничество с лаборатории, прилагащи метода за потвърждение, както за целите на контрола на качеството, така и за потвърждаване на аналитичния резултат за проби, за които съществува съмнение за несъответствие.

5. Основни изисквания, на които трябва да отговаря аналитичната процедура за диоксини (PCDD/PCDF) и диоксиноподобни PCB

5.1. Ниска работен обхват и граници за количествено определяне

Подлежащите на откриване количества от PCDD/PCDF са в горната граница на фемтограма (10^{-15} g) поради изключително високата токсичност на някои от тези съединения. За повечето конгенери на PCB е достатъчна граница за количествено определяне от порядъка на нанограма (10^{-9} g). За измерването на по-токсичните диоксиноподобни конгенери на PCB (и по-специално не-ортозаместените) долната граница на работния обхват достига до ниските стойности от порядъка на пикограма (10^{-12} g). За повечето от останалите конгенери на PCB граница за количествено определяне от порядъка на нанограмите (10^{-9} g) е достатъчна.

5.2. Висока избирателност (специфичност)

5.2.1. Необходимо е разграничаване между PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB и множество други налични съвместно екстрахирани и вероятно интерфериращи съединения, чиито концентрации са до няколко степени по-високи от тези на аналитите от значение. При методите GC-MS се изисква разграничаване между отделните видове конгенери, например между токсичните конгенери (напр. седемнадесетте заместени на 2,3,7,8 позиция PCDD/PCDF и дванадесетте диоксиноподобни PCB) и другите видове конгенери.

5.2.2. Биоаналитичните методи трябва да позволяват откриването на целевите съединения като сумата от PCDD/PCDF и/или диоксиноподобните PCB. С пречистването на пробите се цели отстраняване на съединения, предизвикващи фалшиви резултати за несъответствие или на съединения, които могат да доведат до понижаване на отговора, като предизвикат фалшиви резултати за съответствие.

⁽¹¹⁾ „Насоки относно неопределеността на измерването за лаборатории, извършващи анализ на PCDD/PCDF и PCB чрез използване на маспектрометрия с изотопно разреждане“ (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), „Насоки за приблизителното изчисляване на LOD и LOQ за измервания в областта на замърсителите във фуражите и храните“ (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

▼ M9

- 5.3. *Висока точност (истинност и прецизност, експериментално измерен аналитичен добив при биоанализ)*
- 5.3.1. При методите GC-MS определянето дава валидна оценка за истинската концентрация в дадена проба. Необходима е висока степен на точност, за да се избегне отхвърляне на резултата за дадена проба поради на ниска надеждност на определеното ниво на TEQ. Точността се изразява като истинност (разлика между средната стойност, измерена за даден аналит в сертифициран материал, и неговата сертифицирана стойност, изразена като процент от тази стойност) и прецизност (RSD, относително стандартно отклонение, което се изчислява на базата на резултатите, получени при условия на възпроизводимост).
- 5.3.2. За биоаналитичните методи трябва да се определи експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ. „Експериментално измерен аналитичен добив при биоанализ“ означава нивото на BEQ, изчислено от калибрационната крива на TCDD или на PCB 126, коригирано с резултатите от празната проба и след това разделено на нивото на TEQ, определено чрез метода за потвърждение. Целта му е коригирането на коефициенти като загубата на PCDD/PCDF и диоксиноподобни съединения по време на извличането и пречистването, успоредно извлечени съединения, които увеличават или намаляват силата на отговора (агонистичен и антагонистичен ефект), качеството на напасването на кривата или разликите между стойностите на TEF и стойностите на относителен потенциал (REP). Експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ се изчислява от подходящи референтни проби с представителни модели на конгенерите около нивото от значение.
- 5.4. *Валидиране в диапазона на максимално допустимите количества и общи мерки за контрол на качеството*
- 5.4.1. По време на процедурата за валидиране и по време на рутинните анализи лабораториите трябва да докажат ефективността на даден метод в диапазона на максимално допустимото количество, например на нива 0,5, 1 и 2 пъти по-високи от максимално допустимото количество при приемлив коефициент на вариация за повтарящи се анализи.
- 5.4.2. Като вътрешни мерки за контрол на качеството трябва да се извършват редовни изпитвания на празни проби и експерименти с добавка на референтен материал или анализи на контролни проби (за предпочитане е сертифициран референтен материал, ако е наличен). С цел да се гарантира, че анализите се извършват в съответствие с изискванията, диаграмите за контрола на качеството за изпитванията на празни проби, експериментите с добавка на референтен материал или анализа на контролните проби трябва да се регистрират и проверяват.
- 5.5. *Граница за количествено определяне*
- 5.5.1. За биоаналитичните скрининг методи установяването на граница за количествено определяне (LOQ) не е задължително изискване, но трябва да бъде доказано, че методът може да разграничи стойността при празна проба и граничната стойност. При представяне на нивото на BEQ трябва да се установи ниво на отчитане за обработването на проби, чийто отговор е под това ниво. Нивото на отчитане трябва да се различава най-малко три пъти от нивото при процедурите с празни проби, като отговорът е под работния обхват. Следователно това ниво се изчислява от проби, в които целевите съединения се съдържат на равнище около изискваното минимално ниво, а не от съотношението S/N или от аналитична празна проба.
- 5.5.2. При методите за потвърждение LOQ е около 1/5 от максимално допустимото количество.
- 5.6. *Аналитични критерии*
- За да се получат надеждни резултати чрез методите за потвърждение или скрининг методите, в диапазона на максимално допустимото количество трябва да бъдат изпълнени следните критерии по отношение на стойността съответно на TEQ или на BEQ, независимо дали е определена като общ TEQ (като сума от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB), или поотделно за PCDD/PCDF и за диоксиноподобните PCB:

▼ M9

	Скрининг чрез биоаналитични или физико-химични методи	Методи за потвърждение
Дял на фалшивите резултати за съответствие (*)	< 5 %	
Истинност		–20 % до +20 %
Повторяемост (RSD _r)	< 20 %	
Междинна прецизност (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Спрямо максимално допустимите количества.

5.7. Специфични изисквания по отношение на скрининг методите

5.7.1. За целите на скрининга могат да се използват както GC-MS, така и биоаналитични методи. По отношение на методите GC-MS трябва да бъдат изпълнени изискванията, посочени в точка 6. Специфичните изисквания по отношение на клетъчните биоаналитични методи са изложени в т. 7.

5.7.2. Лабораториите, които прилагат скрининг методи за целите на рутинния контрол на пробите, трябва да установят тясно сътрудничество с лаборатории, които прилагат метода за потвърждение.

5.7.3. По време на рутинните анализи се изисква проверка на ефективността на скрининг метода чрез аналитичен контрол на качеството и текущо валидиране на метода. Необходима е непрекъсната програма за контрол на резултатите, които отговарят на изискванията.

5.7.4. Проверка за възможно потискане на клетъчния отговор и цитотоксичност:

20 % от екстрактите от проби трябва да бъдат измерени при рутинен скрининг без и със добавяне на 2,3,7,8-TCDD в съответствие с максимално допустимото количество или прага с цел да се провери възможността за евентуално потискане на отговора в резултат на интерфериращите вещества, намиращи се в екстракта от пробата. Измерената концентрация на пробата с добавен референтен материал се сравнява със сумата от концентрацията на екстракта без добавка плюс концентрацията на добавката. Ако тази измерена концентрация е по-ниска от изчислената (сумарната) концентрация с повече от 25 %, това е показател за потенциално потискане на сигнала и съответната проба трябва да бъде подложена на анализ за потвърждаване чрез GC-HRMS. Резултатите трябва да се наблюдават посредством диаграми за контрол на качеството.

5.7.5. Контрол на качеството на проби, съответстващи на изискванията

В зависимост от матричната проба и опита на лабораторията приблизително между 2 и 10 % от пробите, които съответстват на изискванията, трябва да бъдат потвърдени чрез GC-HRMS.

5.7.6. Определяне на дела на грешните резултати за съответствие въз основа на данните от контрола на качеството:

Определя се дялът на фалшивите резултати за съответствие при скрининг на проби под и над максимално допустимото количество или прага. Действителният дял на фалшивите резултати за съответствие трябва да бъде под 5 %. Когато от контрола на качеството на съответстващите проби бъдат получени минимум 20 потвърдени резултата за всяка матрица/група матрици, въз основа на тази база данни се правят заключения относно дела на

▼ M9

фалшивите резултати на съответствие. Резултатите от проби с диапазон на концентрацията например до 2 пъти максимално допустимото количество, анализирани при кръгови изследвания или при инциденти със замърсяване, също могат да бъдат включени в минимума от 20 резултата за оценка на дела на фалшивите резултати на съответствие. Пробите трябва да обхващат най-често срещаните модели на конгенери, които представят различни източници.

Въпреки че целта на скрининг анализите трябва да бъде преди всичко откриването на проби, в които е надвишен прагът, критерият за определяне на дела на фалшивите резултати за съответствие е максимално допустимото количество, като се отчита разширената неопределеност на измерването на метода за потвърждение.

5.7.7. Пробите със съмнение за несъответствие предвид резултатите, получени при скрининга, винаги се проверяват чрез пълен повторен анализ на оригиналната проба чрез метод за потвърждение. Тези проби могат да бъдат използвани също така за оценка на дела на фалшивите резултати за несъответствие. При скрининг методите делът на фалшивите резултати за несъответствие е частта от резултатите, потвърдени като съответстващи чрез потвърдителен анализ, като при предишен скрининг за пробата са били установени съмнения за несъответствие. Оценката на ползите от скрининг метода трябва да се основава на сравнение на пробите с фалшиво несъответствие с общия брой на проверените проби. Това съотношение трябва да бъде достатъчно ниско, за да може използването на скрининг метода да бъде от полза.

5.7.8. При валидирането биоаналитичните методи трябва да предоставят валидна индикация за нивото на TEQ, изчислено и изразено като BEQ.

Освен това при биоаналитичните методи, прилагани в условия на повторяемост, вътрешнолабораторното RSD_r обикновено е по-малко от RSD_R в условия на възпроизводимост.

6. **Специфични изисквания по отношение на методите GC-MS, които трябва да бъдат изпълнени за целите на скрининга или потвърждението**

6.1. *Приемливи разлики между горнограничните и долнограничните резултати за WHO-TEQ*

Разликата между горнограничното и долнограничното ниво не надвишава 20 % за потвърждение на надвишаването на максимално допустимото количество или при необходимост, на прага.

6.2. *Контрол на аналитичния добив*

6.2.1. За да се валидира аналитичната процедура, още в самото начало на аналитичния метод, например преди фазата на екстракция, се добавят вътрешни стандарти за PCDD/PCDF, маркирани с ^{13}C и заместени с хлор на 2,3,7,8 позиция, както и вътрешни стандарти за диоксиноподобни PCB, маркирани с ^{13}C . Добавя се най-малко един конгенер за всяка от тетра- до октахлорираниите хомоложни групи за PCDD/PCDF и най-малко един конгенер за всяка от хомоложните групи за диоксиноподобните PCB (или най-малко един конгенер за всяка избрана йонизаписваща функция при маспектрометрията за наблюдение на PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB). При методите за потвърждение се използват всички 17 вътрешни стандарта за PCDD/PCDF, маркирани с ^{13}C и заместени на 2,3,7,8 позиция, и всички 12 вътрешни стандарта за диоксиноподобни PCB, маркирани с ^{13}C .

▼ **M9**

6.2.2. За конгенерите, за които не се добавя маркиран с ^{13}C аналог, също трябва да се определят относителните коефициенти на отговор чрез използване на подходящи калибриращи разтвори.

6.2.3. За фуражи от растителен произход и фуражи от животински произход със съдържание на мазнини под 10 % добавянето на вътрешните стандарти трябва задължително да се извърши преди екстракцията. За фуражи от животински произход със съдържание на мазнини над 10 % вътрешните стандарти се добавят или преди, или след екстракцията на мазнините. Ефикасността на екстракцията трябва да бъде валидирана по подходящ начин в зависимост от етапа, на който са били добавени вътрешните стандарти.

6.2.4. Преди анализа с GC-MS се прибавят 1 или 2 стандарта за аналитичния добив (сурогат).

6.2.5. Изисква се да се извършва контрол на аналитичния добив. При методите за потвърждение стойностите на аналитичния добив за отделните вътрешни стандарти трябва да бъдат в интервала от 60 до 120 %. Допустими са по-ниски или по-високи проценти на аналитичен добив за отделни конгенери, по-специално определени хепта- и октахлорирани дибензо-р-диоксини и дибензофурани, при условие че участието им в стойността на TEQ не надхвърля 10 % от общата стойност на TEQ (на база сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB). За скрининг методите GC-MS аналитичният добив трябва да е в диапазона от 30 до 140 %.

6.3. *Отстраняване на интерфериращи вещества*

— Отделянето на PCDD/PCDF от интерфериращите хлорирани съединения като недиоксиноподобни PCB и хлорирани дифенилови етери се извършва чрез подходящи хроматографски техники (за предпочитане с флоризилова, алуминиева и/или въглеродна колона).

— Отделянето на изомерите чрез газова хроматография трябва да бъде < 25 % от пик до пик между 1,2,3,4,7,8-HxCDF и 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Калибриране чрез стандартна крива*

Обхватът на калибрационната крива трябва да покрива съответния диапазон на максимално допустимите количества или праговете.

6.5. *Специфични критерии по отношение на методите за потвърждение*

— За GC-HRMS:

При HRMS обикновено разделителната способност е по-голяма или равна на 10 000 за целия масов обхват при минимум 10 %.

Изпълнение на други критерии за идентифициране и потвърждаване, описани в международно признати стандарти, например в стандарт EN 16215:2012 (Фуражи – Определяне на диоксини, диоксин-подобни PCBs и на индикаторни PCBs чрез GC/HRMS) и/или в последната редакция на методи EPA 1613 и 1668.

— За GC-MS/MS:

▼ **M9**

Мониторинг на най-малко 2 специфични йона прекурсори, всеки от които с един специален йон на преходен продукт, за всички маркирани и немаркирани аналити, предмет на анализа.

Максимален разрешен толеранс на относителните интензитети на йона от $\pm 15\%$ за избрани йони на преходен продукт в сравнение с изчислените или измерените стойности (средно от калибрационните стандарти), при прилагане на идентични условия MS/MS, и по-специално енергия на сблъсъка и налягане на газа при сблъсъка за всеки преход на даден аналит.

Разделителната способност за всеки квадрупол се настройва на по-добра или равна на разделителната способност на единичната маса (разделителна способност на единичната маса: достатъчна разделителна способност, която да отдели един от друг два върха на една масова единица), за да се сведат до минимум интерференциите върху аналитите от значение.

Изпълнение на другите критерии, описани в международно признати стандарти, например в стандарт EN 16215:2012 (Фуражи. Определяне на диоксини, диоксин-подобни PCBs и на индикаторни PCBs чрез GC/HRMS) и/или в последната редакция на методи EPA 1613 и 1668, с изключение на задължението за използване на GC-HRMS.

7. СПЕЦИФИЧНИ ИЗИСКВАНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ НА БИОАНАЛИТИЧНИТЕ МЕТОДИ

Биоаналитичните методи са методи, основани на използването на биологични принципи като клетъчни анализи, рецепторни анализи или имуноанализи. В настоящата точка се установяват изискванията по отношение на биоаналитичните методи като цяло.

По принцип при скрининг метода дадена проба се класифицира като съответстваща проба или като проба със съмнение за несъответствие. За тази цел изчисленото ниво на BEQ се сравнява с граничната стойност (вж. точка 7.3). Пробите със стойност под граничната се определят като съответстващи, а за пробите със стойност, равна на граничната или над нея, има съмнение за несъответствие и се налага анализ чрез метод за потвърждение. На практика ниво на BEQ, което отговаря на 2/3 от максимално допустимото количество, може да послужи като гранична стойност, при условие че е осигурен дял на фалшивите резултати за съответствие под 5 % и приемлив дял на фалшивите резултати за несъответствие. При различни максимално допустими количества за PCDD/PCDF и за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB проверката на съответствието на проби без разделяне на части изисква биоанализът да има подходящи гранични стойности за PCDD/PCDF. За гранична стойност при проверката на пробите, които надвишават праговете, може да послужи подходящ процент от съответния праг.

Ако ориентировъчното ниво е изразено в BEQ, резултатите за пробите следва да бъдат в рамките на работния обхват и да превишават границата на отчитане (вж. точки 7.1.1 и 7.1.6).

7.1. Оценка на отговора на изследването

7.1.1. Общи изисквания

- При изчисляване на концентрациите от калибрационна крива за TCDD стойностите във високата част на кривата ще показват висока вариация (висок коефициент на вариация (CV)). Работният обхват е областта, в която CV е под 15 %. Долната граница на работния обхват (границата на отчитане) трябва да бъде зададена на ниво поне три пъти над равнището при процедурите с празни проби. Горната граница на работния обхват обикновено се представя чрез стойност EC₇₀ (70 % от максимална ефективна концентрация), но с по-ниска стойност,

▼ M9

ако в този обхват CV е над 15 %. Работният обхват се определя по време на валидирането. Граничните стойности (вж. точка 7.3) трябва задължително да бъдат в рамките на работния обхват.

- За стандартните разтвори и екстрактите от проби се провеждат три или поне два анализа. При повторните анализи стандартният разтвор или контролният екстракт, изследвани в между четири и шест ямки, разпределени върху лабораторната плака, дават отговор или концентрация (възможно само в рамките на работния обхват) на база CV < 15 %.

7.1.2. Калибриране

7.1.2.1. Калибриране чрез стандартна крива

- Нивата в пробите се оценяват чрез сравняване на отговора на изследването с калибрационна крива на TCDD (или PCB 126 или стандартна смес от PCDD/PCDF/диоксиноподобни PCB), за да се изчисли нивото на BEQ в екстракта, а след това и в пробата.
- Калибрационните криви съдържат 8 до 12 концентрации (поне при повторните анализи) с достатъчно концентрации в долната част на кривата (работния обхват). Трябва да се обърне специално внимание на качеството на съответствието на кривата спрямо работния обхват. При оценката на степента на съответствие при нелинейна регресия стойността R^2 като такава има малко или никакво значение. По-голямо съответствие се постига чрез свеждане до минимум на разликата между изчислените и наблюдаваните нива в работния обхват на кривата, например чрез свеждане до минимум на сбора от квадратите на остатъците.
- Впоследствие оцененото ниво в екстракта от пробата се коригира за нивото на BEQ, изчислено за матрица или празна проба разтворител (за да се вземат предвид примесите от използваните разтворители и химикали), както и за експериментално измерения аналитичен добив (изчислено от нивото на BEQ на подходящи референтни проби с представителни модели на конгенера около максимално допустимото количество или прага). За извършване на корекция за аналитичен добив експериментално измерения аналитичен добив трябва да бъде в рамките на необходимия обхват (вж. точка 7.1.4.). Референтните проби, които се използват за корекция за аналитичен добив, следва да отговарят на изискванията, посочени в точка 7.2.

7.1.2.2. Калибриране с референтни проби

Като алтернатива може да се използва калибрационна крива, съставена въз основа на поне четири референтни проби (вж. точка 7.2.4): една празна проба от матрица плюс три референтни проби със стойност 0,5, 1 и 2 пъти нивото на максимално допустимото количество или прага), като така не се налага корекция за празна проба и за аналитичен добив, ако свойствата на матрицата на референтните проби съответстват на тези на неизвестните проби. В този случай отговорът на изследването, съответстващ на 2/3 от максимално допустимото количество (вж. точка 7.3), може да бъде изчислен пряко от тези проби и да бъде използван като гранична стойност. За гранична стойност при проверката на пробите, които надвишават праговете, се използва подходящ процент от тези прагове.

▼ M9

7.1.3. Отделно определяне на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB

Екстрактите могат да бъдат разделени на части, съдържащи PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB, което позволява отчитане на нивата на TEQ (изразени като BEQ) поотделно за PCDD/PCDF и за диоксиноподобните PCB. За предпочитане е да се използва калибрационна крива със стандарт PCB 126 при оценката на резултатите за частта, която съдържа диоксиноподобни PCB.

7.1.4. Експериментално измерени аналитични добиви при биоанализ

„Експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ“ се изчислява от подходящи референтни проби с представителни модели на конгенери около максимално допустимото количество или прага и се изразява като процент от нивото на BEQ спрямо нивото на TEQ. В зависимост от вида на анализа и на използваните TEF ⁽¹²⁾ разликите между факторите TEF и REP за диоксиноподобните PCB могат да доведат до ниски експериментално измерени аналитични добиви за диоксиноподобните PCB в сравнение с PCDD/PCDF. Следователно, ако се извършва отделно определяне на PCDD/PCDF и на диоксиноподобните PCB, експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ е: за диоксиноподобни PCB — от 20 до 60 %, за PCDD/PCDF — от 50 до 130 % (интервалите се прилагат за калибрационната крива за TCDD). Тъй като делът на диоксиноподобните PCB в сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB може да варира между различните матрици и проби, експериментално измереният аналитичен добив при биоанализ за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB отразява тези разлики и трябва да бъде между 30 % и 130 %. Всяко отражение на преразглежданите в значителна степен стойности на TEF върху законодателството на Съюза, свързано с PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB, изисква преразглеждане на тези интервали.

7.1.5. Контрол на аналитичния добив при пречистване

Загубата на съединения по време на пречистването трябва да бъде проверена при валидирането. Празна проба, към която е добавена смес от различните конгенери, се подлага на пречистване (най-малко $n = 3$), а аналитичният добив и вариациите се проверяват чрез метод за потвърждение. Аналитичният добив трябва да бъде между 60 % и 120 % особено за конгенери, чийто дял в нивото на TEQ в различни смеси е над 10 %.

7.1.6. Граница на отчитане

При отчитане на равнищата на BEQ границата на отчитане се определя от съответните матрични проби, които включват типични модели на конгенери, а не от калибрационната крива на стандартите поради ниската прецизност в долната част на кривата. Взема се предвид въздействието на екстракцията и на пречистването. Границата на отчитане се установява поне три пъти над нивото при процедурите с празни проби.

7.2. Използване на референтни проби

7.2.1. Референтните проби представляват матрични проби, модели на конгенери и диапазони на концентрация за PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB около максимално допустимото количество или прага.

7.2.2. Във всяка серия от изпитвания се включва празна проба от матрица, а когато това не е възможно — процедура с празна проба, както и референтна проба с ниво, равно на максимално допустимото количество или на прага. Тези проби се подлагат на екстракция и се изследват по едно и също време при еднакви условия. Референтната проба следва да покаже много по-ясен отговор в сравнение с празната проба, като по този начин се гарантира пригодността на изпитването. Тези проби могат да се използват за корекция за празна проба и за аналитичен добив.

⁽¹²⁾ Настоящите изисквания се базират на TEF, публикувани в: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ M9

- 7.2.3. Референтните проби, които са избрани за корекция за аналитичен добив, трябва да бъдат представителни по отношение на пробите за изпитване, което означава, че моделите на конгенерите не може да водят до подценяване на нивата.
- 7.2.4. При контрола на максимално допустимото количество или прага могат да се включат допълнителни референтни проби със стойности например 0,5 и 2 пъти стойността на максимално допустимото количество или прага с цел установяване ефективността на изпитването в интервала от значение. Съчетани, тези проби могат да се използват за изчисляване на равнищата на BEQ в пробите за изпитване (вж. точка 7.1.2.2).
- 7.3. *Определяне на гранични стойности*

Установява се връзката между биоаналитичните резултати, изразени в BEQ, и резултатите от методите за потвърждение, изразени в TEQ, например чрез калибрационни експерименти, при които се отчита влиянието на матрицата върху калибрационните прави и които включват референтни проби с добавка 0, 0,5, 1 и 2 пъти максимално допустимото количество с 6 повторения на всяко ниво ($n = 24$). Коефициентите за корекция (за празна проба и за аналитичен добив) могат да бъдат оценени въз основа на посочената връзка, но те трябва да бъдат проверявани в съответствие с точка 7.2.2.

Граничните стойности се установяват с оглед вземане на решение за съответствието на пробите спрямо максимално допустимите количества или за контрол на праговете, ако е от значение, като съответните максимално допустими количества или прагове се задават или поотделно за PCDD/PCDF и за диоксиноподобните PCB, или за сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB. Тези стойности са представени чрез *долната* крайна точка на разпределението на биоаналитичните резултати (коригирани за празна проба и за аналитичен добив), съответстваща на критичната граница при метода за потвърждение въз основа на 95-процентна доверителна вероятност, което предполага процент на фалшивите резултати за съответствие $< 5 \%$, и при $RSD_R < 25 \%$ Критичната граница при метода за потвърждение е максимално допустимото количество, като се отчита разширената неопределеност на измерването.

Граничната стойност (изразена в BEQ) може да бъде изчислена в съответствие с някой от подходите, изложени в точки 7.3.1., 7.3.2. и 7.3.3. (вж. графика 1).

- 7.3.1. Използване на *долната* граница на 95-процентния интервал на предвиждане при критична граница при метода за потвърждение

$$\text{Гранична стойност} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_I - \bar{x})^2/Q_{xx}}$$

където:

BEQ_{DL}	BEQ съответства на критичната граница при метода за потвърждение, която представлява максимално допустимото количество при отчитане на разширената неопределеност на измерването
$s_{y,x}$	остатъчно стандартно отклонение
$t_{\alpha,f=m-2}$	коефициент на Стюдент ($\alpha = 5 \%$, $f =$ степени на свобода, едностранни)
m	общ брой калибрационни точки (индекс j)
n	брой повторения на всяко ниво

x_i концентрация на пробата (изразена в TEQ) в калибрационна точка i , определена чрез метод за потвърждение

$\bar{x}$ средна стойност на концентрациите (изразена в TEQ) на всички калибрационни проби

$Q_{xx} = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2$ параметър за сумата на квадрат, $i =$ индекс за калибрационна точка i

▼ M9

- 7.3.2. Изчисляване въз основа на биоаналитични резултати (коригирани за празна проба и за аналитичен добив) от множество анализи на проби ($n \geq 6$), замърсени на нивото на критичната граница при метода за потвърждение, като *долната* крайна точка на разпределението на данните при съответната осреднена стойност на BEQ:

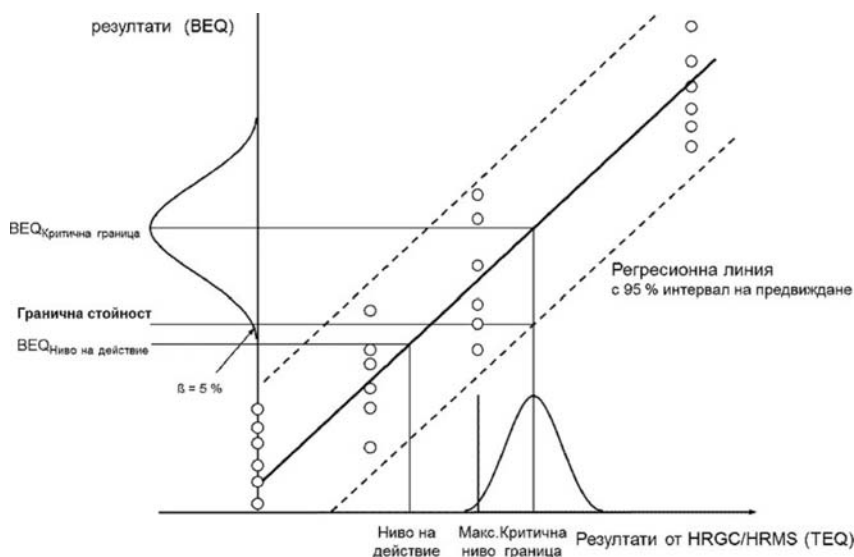
$$\text{Гранична стойност} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

където:

SD_R стандартно отклонение на резултатите на биоанализа при BEQ_{DL} , измерено в условия на вътрешнолабораторна възпроизводимост

- 7.3.3. Изчисляване като средна стойност на биоаналитични резултати (изразени в BEQ, коригирани за празна проба и за аналитичен добив) от множество анализи на проби ($n \geq 6$), замърсени на ниво 2/3 от максимално допустимото количество или прага, като се има предвид наблюдението, че това ниво ще бъде около граничната стойност, определена съгласно точка 7.3.1 или 7.3.2. Изчисляване на гранични стойности въз основа на 95-процентна доверителна вероятност, при което делът на фалшивите резултати на съответствие е $< 5 \%$, а RSD_R е $< 25 \%$:
1. от *долната* граница на 95-процентния интервал на предвиждане при критичната граница при метода за потвърждение.
 2. от множество анализи на проби ($n \geq 6$), замърсени на нивото на критичната граница при метода за потвърждение, като *долната* крайна точка на разпределението на данните (представен на графика 1 чрез камбановидна крива) при съответната осреднена стойност на BEQ.

Графика 1



- 7.3.4. Ограничения за граничните стойности

Граничните стойности на база BEQ, които са изчислени от RSD_R , постигнато по време на валидирането при използване на ограничен брой проби с различни модели на матриците/конгенерите, могат да бъдат по-високи от максимално допустимите количества или праговете на база TEQ поради по-голямата прецизност в сравнение с постиганата при рутинни условия, при които трябва да се контролира неизвестен спектър от възможни модели на конгенери. В такива случаи граничните стойности се изчисляват при $\text{RSD}_R = 25 \%$ или, за предпочитане — на 2/3 от максимално допустимото количество или прага.

▼ **M9**

- 7.4. *Характеристики за оценка на ефективността*
- 7.4.1. Тъй като при биоаналитичните методи не могат да се използват вътрешни стандарти, за да се получат данни за стандартното отклонение в рамките на изпитванията и между различните серии изпитвания, се извършват изпитвания за повторяемост на биоаналитичните методи. Повторяемостта трябва да бъде под 20 %, а вътрешнолабораторната възпроизводимост — под 25 %. Това се базира на изчислените като BEQ нива след корекция за празна проба и за аналитичен добив.
- 7.4.2. Като част от процеса на валидиране следва да се докаже, че чрез изследването се постига разграничаване между празна проба и ниво, равно на граничната стойност, което позволява да се идентифицират пробите над съответната гранична стойност (вж. точка 7.1.2).
- 7.4.3. Определят се целевите съединения, възможните интерференции, както и максимално допустимите количества в празната проба.
- 7.4.4. Процентното стандартно отклонение в отговора или в концентрацията, изчислена от отговора (възможно само в работния обхват) при трикратно определяне на екстракт от проба, не може да надхвърля 15 %.
- 7.4.5. Некоригираните резултати от референтната/референтните проба/проби, изразени в BEQ (празна проба и на нивото на максимално допустимото количество или на прага), се използват за оценка на ефективността на биоаналитичния метод спрямо постоянен период от време.
- 7.4.6. За да се гарантира, че анализите се провеждат в съответствие с изискванията, се регистрират и проверяват диаграми за контрол на качеството за процедурите с празни проби, както и за всеки вид референтна проба; за процедурите с празни проби по-специално това се извършва по отношение на изискваната минимална разлика спрямо ниската част на работния обхват, а за референтните проби — по отношение на вътрешнолабораторната възпроизводимост. Процедурите с празни проби се контролират стриктно, за да се избегнат фалшиви резултати за съответствие при приспадането.
- 7.4.7. Резултатите от анализите чрез методите за потвърждение на проби, за които има съмнение за несъответствие, както и на 2 — 10 % от съответстващите на изискванията проби (минимум 20 проби за матрица) се събират и се използват за оценка на ефективността на скрининг метода и на връзката между BEQ и TEQ. Тази база данни може да бъде използвана за повторната оценка на граничните стойности, които се прилагат при рутинните проби за валидираните матрици.
- 7.4.8. Ефикасността на метода може да бъде доказана също и чрез участие в кръгови изпитвания. Резултатите от пробите с концентрация например до 2 пъти максимално допустимото количество, анализирани при кръговите изпитвания, също могат да бъдат включени при оценяването на дела на фалшивите резултати за съответствие, ако лабораторията докаже своята ефективност. Пробите трябва да обхващат най-често срещаните модели на конгенери, които представляват различни източници.
- 7.4.9. При инциденти граничните стойности могат да бъдат подлагани на преоценка, която да отрази специфичната матрица и модела на конгенера при конкретния инцидент.

8. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- 8.1. *Методи за потвърждение*
- 8.1.1. Резултатите от анализа следва да включват количествата на отделните конгенери на PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB, като стойностите на TEQ се отбелязват като долна граница, горна граница и средна граница с цел да се включи максимално възможната информация при изразяването на резултатите, позволяваща тълкуването им в съответствие със специфичните изисквания.

▼ **M9**

- 8.1.2. Отчетът включва информация за метода, използван при екстракцията на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB.
- 8.1.3. Данните за аналитичния добив за отделните вътрешни стандарти се представят в случаите, в които аналитичният добив е извън обхвата, посочен в точка 6.2.5, когато максимално допустимото количество е надвишено (в този случай — аналитичния добив за един от двата повторни анализа) или в други случаи при поискване.
- 8.1.4. Тъй като при установяването на съответствието на пробата трябва да бъде взета предвид разширената неопределеност на измерването, този параметър трябва да бъде представен. Така например, аналитичните резултати се отчитат като $x \pm U$, където x е аналитичният резултат, а U — разширената неопределеност при измерване, като се използва коефициент на покритие 2, който дава ниво на сигурност от около 95 %. В случай че PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB се определят поотделно, за разширената неопределеност на сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB се използва сумата от оценената разширена неопределеност на отделните резултати от анализа на PCDD/PCDF и на диоксиноподобните PCB.
- 8.1.5. Резултатите трябва да бъдат изразени в същите единици и най-малко със същия брой значещи цифри като определените с Директива 2002/32/ЕО максимално допустими количества.
- 8.2. *Биоаналитични скрининг методи*
- 8.2.1. Резултатът от скрининга се изразява като „съответстващ“ или „със съмнение за несъответствие“ („със съмнение“).
- 8.2.2. В допълнение може да се представи ориентировъчен резултат за PCDD/PCDF и/или за диоксиноподобните PCB, изразен в BEQ, а не в TEQ.
- 8.2.3. Пробите, чийто отговор е под границата на отчитане, се изразяват като „проби под границата на отчитане“. Пробите, чийто отговор е над работния обхват, се отчитат като „надвишаващи работния обхват“, като количеството, съответстващо на горната граница, се представя в BEQ.
- 8.2.4. За всеки тип матрична проба в отчета се посочва максимално допустимото количество или прага, на което/който се базира оценката.
- 8.2.5. В отчета се посочва видът на използваното изследване, принципът, на който той се базира, както и видът на калибрирането.
- 8.2.6. Отчетът включва информация за метода, използван при екстракцията на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB.
- 8.2.7. При проби, за които има съмнение за несъответствие, отчетът трябва да включва бележка относно действията, които да бъдат предприети. Концентрацията на PCDD/PCDF и сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB в пробите с повишени количества трябва да бъдат определени/потвърдени чрез метод за потвърждение.
- 8.2.8. Резултатите за несъответствие се отчитат само ако са получени от потвърдителен анализ.
- 8.3. *Физикохимични скрининг методи*
- 8.3.1. Резултатът от скрининга се представя като „съответстващ“ или „със съмнение за несъответствие“ („със съмнение“).
- 8.3.2. За всеки тип матрична проба в отчета се посочва максимално допустимото количество или прага, на което/който се базира оценката.

▼ M9

- 8.3.3. Освен това могат да бъдат представени допустими количества за отделните конгенери на PCDD/PCDF и диоксиноподобни PCB, отчетени като долна граница, горна граница и средна граница. Резултатите трябва да бъдат изразени в същите единици и най-малко със същия брой значещи цифри като определените с Директива 2002/32/ЕО максимално допустими количества.
- 8.3.4. Данните за аналитичния добив за отделните вътрешни стандарти се представят в случаите, в които аналитичният добив е извън обхвата, посочен в точка 6.2.5, когато максимално допустимото количество е надвишено (в този случай — аналитичния добив за един от двата повторни анализа) или в други случаи при поискване.
- 8.3.5. В отчета се посочва приложеният GC-MS метод.
- 8.3.6. Отчетът включва информация за метода, използван при екстракцията на PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB.
- 8.3.7. При проби, за които има съмнение за несъответствие, отчетът трябва да включва бележка относно действията, които да бъдат предприети. Концентрацията на PCDD/PCDF и сумата от PCDD/PCDF и диоксиноподобните PCB в пробите с повишени количества трябва да бъдат определени/потвърдени чрез метод за потвърждение.
- 8.3.8. Решение за несъответствие може да бъде взето само след потвърдителен анализ.

ГЛАВА III

ПОДГОТОВКА НА ПРОБИТЕ И ИЗИСКВАНИЯ ПО ОТНОШЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ ЗА АНАЛИЗ, ИЗПОЛЗВАНИ ЗА ЦЕЛИТЕ НА ОФИЦИАЛНИЯ КОНТРОЛ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА НЕДИОКСИНОПОДОБНИ РСВ ВЪВ ФУРАЖИТЕ

1. **Приложно поле**

Изискванията, изложени в настоящата глава, се прилагат при анализа на фуражи за целите на официалния контрол на съдържанието на недиоксиноподобни РСВ, както и по отношение на подготовката на пробите и аналитичните изисквания за други регулаторни цели, включващи контрола, извършван от операторите във фуражния сектор с цел осигуряване на съответствие с Регламент (ЕО) № 183/2005.

2. **Приложими методи за откриване**

Газова хроматография/Електроноулавяща детекция (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS или еквивалентни методи.

3. **Идентифициране и потвърждаване на аналитите от значение**

- 3.1. Време на относително задържане спрямо вътрешните стандарти или референтните стандарти (допустимо отклонение от $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Отделяне посредством газова хроматография на недиоксиноподобните PCB от интерфериращите вещества, по-специално съвместно елуиращи PCB, особено ако количествата в пробите са в рамките на законово установените ограничения и несъответствието трябва да бъде потвърдено ⁽¹³⁾.
- 3.3. Изисквания по отношение на техниките GC-MS
- Мониторинг на най-малко посочените по-долу бройки молекулярни йони или характеристични йони от молекулярния клъстер:
- а) два специфични йона за HRMS;
 - б) три специфични йона за LRMS;

⁽¹³⁾ Конгенери, за които е установено, че често елуират съвместно, са например PCB 28/31, PCB 52/69 и PCB 138/163/164. При GC-MS трябва да се вземат предвид и възможните интерференции, причинени от фрагменти от конгенери с по-високо съдържание на хлор.

▼ M9

- в) два специфични йона прекурсори, всеки от които с един специален йон на преходен продукт за MS-MS.

Максимално допустим толеранс за интензитетното съотношение за избраните масови фрагменти:

Относително отклонение на интензитетното съотношение на избрани масови фрагменти от теоретичния интензитет или калибрационния стандарт за базовия йон (най-силно присъстващия наблюдаван йон) и за потвърдителния/потвърдителните йон/йони: $\pm 15 \%$.

3.4. Изисквания по отношение на техниките GC-ECD

Резултатите, които надхвърлят максимално допустимото количество, трябва да бъдат потвърдени с две GC колони с неподвижни фази с различна полярност.

4. Доказване на ефективността на метода

Ефективността на метода се валидира в диапазона на максимално допустимото количество (от 0,5 до 2 пъти максимално допустимото количество) с приемлив коефициент на вариация за повтарящите се анализи (вж. изисквания за междинна прецизност в точка 9).

5. Граница за количествено определяне

Сумата от LOQ ⁽¹⁴⁾ за недоксиноподобните PCB не трябва да бъде по-висока от 1/3 от максимално допустимото количество ⁽¹⁵⁾.

6. Контрол на качеството

Редовни контролни изпитвания на празни проби, анализ на проби с добавка на референтен материал, проби за контрол на качеството, участие в междулабораторни изследвания за съответните матрици.

7. Контрол на аналитичния добив

7.1. Използват се подходящи вътрешни стандарти с физикохимични свойства, сравними с тези на аналитите от значение.

7.2. Добавяне на вътрешни стандарти:

Добавяне към продукти (преди екстракцията и пречистването).

7.3. Изисквания по отношение на методите, при които се използват всички шест изотопно белязани конгенери на недоксиноподобни PCB:

а) резултатите се коригират за аналитичен добив при вътрешни стандарти;

б) аналитичният добив при изотопно белязани вътрешни стандарти е между 60 и 120 %;

в) допустима е по-ниска или по-висока степен на аналитичен добив за отделни конгенери, при които участието в сумата от шестте недоксиноподобни PCB е под 10 %.

7.4. Изисквания по отношение на методите, при които не всички шест изотопно белязани вътрешни стандарта се използват, или при които се използват други вътрешни стандарти:

а) аналитичният добив за вътрешния/вътрешните стандарт/стандарти се контролира за всяка проба;

б) аналитичният добив за вътрешния/вътрешните стандарт/стандарти е между 60 и 120 %;

в) резултатите се коригират за аналитичен добив при вътрешни стандарти

⁽¹⁴⁾ Когато е целесъобразно се спазват принципите, описани в „Насоки за приблизителното изчисляване на LOD и LOQ за измервания в областта на замърсителите във фуражите и храните“ (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>).

⁽¹⁵⁾ Препоръчително е делът на нивото на реагента при празна проба в нивото на замърсителя в дадена проба да бъде по-нисък. Лабораторията е отговорна за контрола на вариацията в нивата при празни проби, и по-специално ако нивата при празна проба се приспадат.

▼ M9

- 7.5. Аналитичният добив при небелязани конгенери се проверява чрез проби с добавен референтен материал или проби за контрол на качеството с концентрации в диапазона на максимално допустимото количество. Аналитичният добив за посочените конгенери се счита за приемлив, когато е между 60 и 120 %.

8. **Изисквания по отношение на лабораториите**

В съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕС) 2017/625 лабораториите трябва да бъдат акредитирани от признат орган, действащ в съответствие с Ръководство 58 на ISO/IEC, с цел да се гарантира осигуряване на качеството при анализите. Лабораториите трябва да бъдат акредитирани в съответствие със стандарт EN ISO/IEC 17025. Освен това се спазват принципите, описани в „Технически насоки за приблизителното изчисляване на неопределеността на измерването и на границите на количествено определяне за целите на анализа на РСВ“⁽¹⁶⁾.

9. **Характеристики за оценка на ефективността: критерии за сумата от недиоксиноподобните РСВ на нивото на максимално допустимото количество**

	Масспектрометрия с изотопно разреждане (*)	Други техники
Истинност	–20 % до +20 %	–30 % до +30 %
Междинна прецизност (% RSD)	≤ 15 %	≤ 20 %
Разлика между изчислението за горна и долна граница	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Изисква се използване на всички шест маркирани с ¹³C аналози като вътрешни стандарти

10. **Представяне на резултатите**

- 10.1. Резултатите от анализа следва да включват количествата на отделните недиоксиноподобни РСВ и сумата на конгенерите на РСВ, отчетени като долна граница, горна граница и средна граница с цел да се включи максимално възможната информация при изразяването на резултатите, позволяваща тълкуването им в съответствие със специфичните изисквания.
- 10.2. Отчетът трябва да включва данни за метода, използван за екстракция на РСВ.
- 10.3. Данните за аналитичния добив за отделните вътрешни стандарти се представят в случаите, в които аналитичният добив е извън обхвата, посочен в точка 7, когато максимално допустимото количество е надвишено или в други случаи при поискване.
- 10.4. Тъй като при установяването на съответствието на пробата трябва да бъде взета предвид разширената неопределеност на измерването, този параметър трябва също да бъде представен. Така например, аналитичните резултати се отчитат като $x \pm U$, където x е аналитичният резултат, а U — разширената неопределеност при измерване, като се използва коефициент на покритие 2, който дава ниво на сигурност от около 95 %.
- 10.5. Резултатите трябва да бъдат изразени в същите единици и най-малко със същия брой значещи цифри като определените с Директива 2002/32/ЕО максимално допустими количества.

Б. EN СТАНДАРТИ

При прилагането на член 34, параграф 2, буква а) от Регламент (ЕС) 2017/625 се вземат предвид следните EN стандарти:

⁽¹⁶⁾ (вж. бележка под линия 37).

▼ M9

EN 17194: Фуражи: методи за вземане на проби и анализ – Определяне на деоксиниваленол, афлатоксин B1, фумонизини B1 и B2, T-2 и HT-2 токсини, зеараленон и охратоксин A във фуражни суровини и комбинирани фуражи чрез LC-MS/MS

EN 17270: Фуражи: методи за вземане на проби и анализ – Определяне на теобромин във фуражни суровини и комбинирани фуражи, включително съставки, получени от какао, чрез течна хроматография

EN 17504 Фуражи: методи за вземане на проби и анализ – Определяне на госипол в семена на памук и фуражи чрез LC-MS/MS

EN 17362 Фуражи: методи за вземане на проби и за анализ – Определяне на пентахлорфенол (PCP) във фуражни суровини и комбинирани фуражи чрез течна хроматография с тандемна масспектрометрия (LC-MS/MS)

EN 16279: Фуражи – Определяне съдържанието на флуорид след обработване със солна киселина чрез метод с йон-селективен електрод (ISE)

EN 17053: Фуражи. Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на микроелементи, тежки метали и други елементи във фуражи чрез масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) (мултиметод)

EN 15550 Фуражи: методи за вземане на проби и анализ – Определяне на кадмий и олово чрез атомно-абсорбционна спектрометрия в графитна пещ (GF-AAS) след разлагане под налягане

EN 16206 Фуражи – Откриване на арсен чрез атомно абсорбционна спектрометрия с генериране на хидриди (HGAAS) след микровълново разлагане под налягане (разлагане с 65 % азотна киселина и 30 % водороден пероксид)

EN 16277 Фуражи – Определяне на живак чрез атомноабсорбционна спектрометрия на студена пара (CVAAS) след микровълново разлагане под налягане (екстракция с 65 % азотна киселина и 30 % водороден пероксид)

EN 16278 Фуражи – Определяне на неорганичен арсен чрез хидридна генерация посредством атомноабсорбционна спектрометрия (HG-AAS) след микровълнова екстракция и отделяне чрез екстракция на твърдата фаза (SPE)

EN 17374 Фуражи: Методи за вземане на проби и анализ – Определяне на неорганичен арсен във фуражи чрез анионно-обменна масспектрометрия (HPLC-ICP-MS)

▼ **M2**

ПРИЛОЖЕНИЕ VI

МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА СЪСТАВКИ ОТ ЖИВОТИНСКИ ПРОИЗХОД ЗА ЦЕЛИТЕ НА ОФИЦИАЛНИЯ КОНТРОЛ НА ФУРАЖИТЕ▼ **M8**

1. ЦЕЛ И ОБХВАТ

Определянето на съставките от животински произход във фуражите се извършва, като се използва светлинна микроскопия или полимеразна верижна реакция (PCR) в съответствие с разпоредбите, предвидени в настоящото приложение.

Тези два метода дават възможност да се установи наличието на съставки от животински произход в премиксите, фуражните суровини и комбинирания фуражи. Чрез тях обаче не може да се изчисли количеството на тези съставки в премиксите, фуражните суровини и комбинирания фуражи. И при двата метода границата на откриване е под 0,1 % (w/w).

Методът с PCR позволява да бъде установена таксономичната група, към която принадлежат съставките от животински произход, налични в премиксите, фуражните суровини и комбинирания фуражи.

Тези методи се прилагат за контрол на прилагането на забраните, посочени в член 7, параграф 1 от Регламент (ЕО) № 999/2001 на Европейския парламент и на Съвета ⁽¹⁾, в приложение IV към същия регламент и в член 11, параграф 1 от Регламент (ЕО) № 1069/2009 на Европейския парламент и на Съвета ⁽²⁾.

В зависимост от вида на изследвания фураж тези методи могат да бъдат използвани в рамките на един и същ оперативен протокол както самостоятелно, така и заедно в съответствие със стандартните оперативни процедури (СОП), установени от референтната лаборатория на ЕС за животински протеини в хранителните смеси (EURL-AP) и публикувани на нейния уебсайт ⁽³⁾.

▼ **M2**

2. МЕТОДИ

▼ **M8**

2.1. Светлинна микроскопия

2.1.1. Принцип

Съставките от животински произход, които може да са налични в изпратените за анализ премикси, фуражни суровини и комбинирани фуражи, се идентифицират въз основа на типични и установими чрез наблюдение под микроскоп характеристики като мускулни влакна и други месни частици, хрущяли, кости, рога, косми, четина, кутикулни фрагменти от безгръбначни животни, трахеални структури от насекоми, кръвни продукти, млечни глобули, лактозни кристали, пера, черупки от яйца, рибешки кости и люспи.

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 999/2001 на Европейския парламент и на Съвета от 22 май 2001 г. относно определяне на правила за превенция, контрол и ликвидиране на някои трансмисивни спонгиформни енцефалопatii (ОВ L 147, 31.5.2001 г., стр. 1).

⁽²⁾ Регламент (ЕО) № 1069/2009 на Европейския парламент и на Съвета от 21 октомври 2009 г. за установяване на здравни правила относно странични животински продукти и производни продукти, предназначени за консумация от човека, и за отмяна на Регламент (ЕО) № 1774/2002 (Регламент за страничните животински продукти) (ОВ L 300, 14.11.2009 г., стр. 1).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

▼M8

Микроскопските изследвания се извършват след подготовка на пробите чрез утаяване.

Пробите се подлагат на етап на утаяване, както следва:

- а) за откриване на съставки от животински произход, различни от сухоземни безгръбначни животни — етап на единично утаяване в тетрахлороетилен (TCE), както е описано в точка 2.1.3.4.3;
- б) за откриване на съставки от сухоземни безгръбначни животни — етап на двойно утаяване в петролеев етер/тетрахлороетилен (PE/TCE), както е описано в точка 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Реагенти и апаратура*

2.1.2.1. Реагенти

2.1.2.1.1. Концентриращо средство

- Тетрахлороетилен (относителна плътност 1,62)
- Петролеев етер (PE) точка на кипене 40—60 °C (относителна плътност 0,65)

2.1.2.1.2. Оцветяващ реагент

- Разтвор на ализариново червено (в 100 ml вода се разтварят 2,5 ml солна киселина 1M и към този разтвор се прибавят 200 mg ализариново червено).

2.1.2.1.3. Средства за фиксиране

- Основа (NaOH 2,5 % w/v или KOH 2,5 % w/v).
- Глицерол (неразреден, вискозитет: 1 490 cP) или средство за фиксиране с равностойни свойства за подготовка на предметно стъкло за непостоянна употреба
- Norland ® Optical Adhesive 65 (вискозитет: 1 200 cP) или смола с равностойни свойства за подготовка на предметно стъкло за постоянна употреба

2.1.2.1.4. Средства за фиксиране с оцветяващи свойства

- Разтвор на Лугол (2 g калиев йодид се разтварят в 100 ml вода и се прибавя 1 g йод, като се разклаща често)
- Цистинов реактив (2 g оловен ацетат, 10 g NaOH на 100 ml вода)
- Реактив на Фелинг (приготвен предварително от равни части (1/1) от два основни разтвора А и Б: разтвор А (6,9 g меден (II) сулфат пентахидрат се разтварят в 100 ml вода); разтвор Б (34,6 g натриев калиев тартарат тетрахидрат и 12 g NaOH се разтварят в 100 ml вода)
- Тетраметилбензидин/водороден прекис (1 g 3,3',5,5' тетраметилбензидин (ТМВ) се разтварят в 100 ml ледена оцетна киселина и 150 ml вода. Преди употреба 4 части от така приготвения разтвор на ТМВ се смесват с 1 част трипроцентен водороден прекис)

2.1.2.1.5. Промиващи средства

- Етанол ≥ 96 % (технически чист)
- Ацетон (технически чист)

2.1.2.1.6. Избелващ реагент

- Готов разтвор на натриев хипохлорит (9—14 % активен хлор)

▼ **M8**

2.1.2.2.

Апаратура

- Аналитична везна с точност до 0,001 g
- Апаратура за смилане: ножова или роторна мелница. Ако се използва роторна мелница, се забранява отворите на ситата да са с размер $\leq 0,5$ mm.
- Сита с квадратни отвори с размер на отвора 0,25 mm и 1 mm. С изключение на предварителното пресяване на пробата, диаметърът на ситата не трябва да надвишава 10 cm, за да се избегне загубата на материал. Не се изисква калибриране на ситата.
- Конусовидна стъклена делителна фуния с вместимост 250 ml с тefлонов или стъклен спирателен кран в основата на конуса. Диаметърът на отваряне на крана трябва да бъде ≥ 4 mm. Само за единичното утаяване в TCE е възможно като алтернатива да се използва бехерова чаша с конично дъно за утаяване, при условие че лабораторията е доказала, че нивата на откриване са еквивалентни на тези, получени при използване на конусовидна стъклена делителна фуния.



Делителна фуния

- Стереомикроскоп с обхват на общото увеличение най-малко 6,5× до 40×
- Съставен микроскоп с обхват на общото увеличение най-малко 100× до 400× с преминаваща светлина и светло поле. В допълнение могат да бъдат използвани поляризирана светлина и диференциален интерферентен контраст.
- Стандартна лабораторна стъклария
- Апаратура за подготовка на предметно стъкло: класически микроскопски предметни стъкла, предметни стъкла с ямка, покривни стъкла (20×20 mm), щипци, фини шпатули
- Лабораторна пещ
- Центрофуга
- Филтърна хартия: качествен целулозен филтър (размер на порите 4—11 μ m).

2.1.3. *Вземане на проби и подготовка на пробите*

2.1.3.1. Вземане на проби

Използва се представителна проба, взета в съответствие с приложение I.

▼M8

2.1.3.1.1. Сушене на пробите

Пробите със съдържание на влага > 14 % се подлагат на предварително сушене в съответствие с приложение III.

2.1.3.1.2. Предварително пресяване на пробите

За да се събере информация за възможното замърсяване на фуражите от околната среда, се препоръчва гранулираните фуражи и зърната да се пресяват предварително през сито с размер на отвора 1 mm, като двете получени по този начин фракции се подготвят, анализират и за тях се докладва поотделно, тъй като те трябва да се считат за отделни проби.

2.1.3.2. Необходими предпазни мерки

С цел да се избегне кръстосано замърсяване в лабораториите апаратурата за многократно ползване се почиства внимателно преди употреба. Преди почистването частите на делителните фунии се демонтират. Частите на делителните фунии и лабораторната стъклария се измиват предварително на ръка, а след това и машинно. Ситата се почистват с помощта на четка с твърд синтетичен косъм. Препоръчва се след пресяването на мастни вещества, като рибно брашно например, ситата да бъдат почиствани окончателно с ацетон и сгъстен въздух.

2.1.3.3. Подготовка на проби, които се състоят от мазнини или масла

Подготовката на проби, които се състоят от мазнини, се извършва съгласно следния протокол:

- Ако мазнината е твърда, тя се загрява в пещ до втечняването ѝ.
- С помощта на пипета 40 ml от мазнината се прехвърлят от дъното на пробата в епруветка за центрофугиране.
- Пробата се центрофугира в продължение на 10 min при 4 000 обороти в минута.
- Ако след центрофугирането мазнината е твърда, тя се загрява в пещ до втечняването ѝ.
- Центрофугирането се повтаря в продължение на 5 min при 4 000 обороти в минута.
- С помощта на малка лъжичка или шпатула половината от отделените примеси се прехвърлят на микроскопски предметни стъкла за изследване. Като фиксиращо средство се препоръчва глицерол.
- Останалите примеси се използват за подготовка на утайката, както е описано в точка 2.1.3.4.3, първо тире.

За подготовка на проби, които се състоят от масла, се използва същият протокол, с изключение на първо и четвърто тире.

2.1.3.4. Подготовка на проби, различни от мазнини или масла

2.1.3.4.1. Разделяне на пробата на части и смилане: най-малко 50 g от пробата се отделят като подпроба за целите на анализа, като впоследствие тя се смилва.

2.1.3.4.2. Подготовка на суровината: извършва се подготовка на най-малко 5 g от смляната подпроба. Тя се пресява през сито с големина на отвора 0,25 mm, като се изследват и двете получени по този начин фракции.

▼ M8

2.1.3.4.3. Единично утаяване в ТСЕ за откриване на съставки от животински произход, различни от такива от сухоземни безгръбначни животни

— Екстракция и подготовка на утайката:

10 g (с точност до 0,01 g) от смляната подпроба се прехвърля в делителна фуния или бехерова чаша с конично дъно за утаяване и се добавят 50 ml ТСЕ. Частта, която се прехвърля във фунията, е най-много 3 g за рибно брашно или други чисти животински продукти, минерални съставки или премикси, които образуват повече от 10 % утайка. Сместа се разклаща енергично в продължение на поне 30 s и внимателно се добавят още 50 ml ТСЕ, като същевременно вътрешната повърхност на фунията внимателно се облива, за да бъдат отмити полегналите частици. Така получената смес се оставя да престои най-малко 5 min, преди утайката да се отдели чрез отваряне на спирателния кран.

Ако се използва бехерова чаша с конично дъно за утаяване, сместа се разбърква енергично в продължение на поне 15 s, като всички частици по стените на бехеровата чаша се отмиват внимателно от вътрешната повърхност с най-малко 10 ml чист ТСЕ. Сместа се оставя да престои в продължение на 3 min, след което се разбърква отново за 15 s, като всички частици по стените на бехеровата чаша се отмиват внимателно от вътрешната повърхност с най-малко 10 ml чист ТСЕ. Така получената смес се оставя да престои в продължение на най-малко 5 min, като след това течната фракция се отстранява и изхвърля чрез внимателно преливане, като се внимава да няма загуба на утайка.

Утайката се събира върху филтърна хартия, поставена във фуния, за да се даде възможност за отделяне на останалото количество ТСЕ, като същевременно се избягва отлагането на мазнини върху утайката. Утайката се изсушава. Препоръчва се след това утайката да се претегли (с точност до 0,001 g), за да се провери степента на утаяване. Накрая утайката се пресява през сито с размер на отвора 0,25 mm, като се изследват и двете получени по този начин фракции, освен ако пресяването не се счита за необходимо.

— Екстракция и подготовка на плаващата фракция:

След възстановяването на утайката чрез описания по-горе метод в делителната фуния трябва да останат две фази: течна фаза, състояща се от ТСЕ, и твърда фаза, състояща се от плаващ на повърхността слой. Тази твърда фаза представлява плаваща фракция и нейното възстановяване трябва да се извърши, като цялото количество ТСЕ се излее от фунията с отварянето на спирателния кран. Чрез обръщане на делителната фуния плаващата фракция се прехвърля в голямо блюдо на Петри и се изсушава чрез въздух във вентилационен шкаф. Тя се пресява през сито с големина на отвора 0,25 mm, като се изследват и двете получени по този начин фракции.

— Използване на оцветяващи реагенти:

С цел улесняване на правилното идентифициране на съставките от животински произход, при подготовката на пробите операторът може да използва оцветяващи реагенти в съответствие с насоките, установени от EURL-AP и публикувани на нейния уебсайт.

▼ M8

Когато за оцветяване на утайката се използва ализариново червено, се прилага следният протокол:

- Изсушената утайка се прехвърля в стъклена епруветка и се изплаква два пъти с около 5 ml етанол (всеки път се използва вихров смесител в продължение на 30 s, разтворителят се оставя да се утаи за около 1 min и 30 s, след което се излива).
- Утайката се избелва, като се добавя най-малко 1 ml разтвор на натриев хипохлорит. Реакцията се оставя да протече в продължение на 10 min. Епруветката се напълва с вода, утайката се оставя да се утаи за 2—3 min, след което водата и отделените частици се изливат внимателно.
- Утайката се промива още два пъти с около 10 ml вода (използва се вихров смесител за 30 s, оставя се да се утаи, водата се излива всеки път).
- Добавят се 2 до 10 капки от разтвора на ализариново червено и сместа се разбърква с помощта на вихров смесител. Реакцията се оставя да протече в продължение на 30 s и оцветената утайка се промива два пъти с около 5 ml етанол, след което се изплаква още веднъж с ацетон (всеки път се използва вихров смесител в продължение на 30 s, разтворителят се оставя да се утаи за около 1 min, след което се излива).
- Оцветената утайка се изсушава.

2.1.3.4.4. Двойно утаяване в PE/TCE за откриване на съставки от сухоземни безгръбначни животни

Всички стъпки се осъществяват в конусовидна стъклена делителна фуния с вместимост 250 ml, както е описано в точка 2.1.2.2, четвърто тире.

- 10 g (с точност до 0,01 g) от смляната подпроба се прехвърля в делителната фуния и първо се подлага на единично утаяване в TCE, както е описано в точка 2.1.3.4.3, включително възстановяването на утайката върху филтърна хартия, поставена във фуния. Утайката може да се използва по същия начин, като получената съгласно точка 2.1.3.4.3.
- Малкият обем TCE, отцеден заедно с утайката, се прехвърля в градуиран цилиндър. Чрез отваряне на спирателния кран на делителната фуния градуираният цилиндър трябва да бъде напълнен до получаването на 30 ml TCE. След достигане на този обем спирателният кран се затваря.
- Този събран обем TCE се заменя, като в делителната фуния се добави 30 ml петролеев етер с точка на кипене 40—60 °C. Съдържанието на делителната фуния се разбърква старателно, за да се получи смес 30 % PE/70 % TCE (с плътност приблизително 1,26 g/cm³). Материалът се оставя да се утаи в продължение на 10 min. Изолират се две нови фракции: вторична утайка и плаваща фракция (< 1,26 g/cm³). Вторичната утайка трябва да се възстанови в блюдо на Петри (или върху филтърна хартия, поставена във фуния) чрез отваряне на спирателния кран дотогава, докато в делителната фуния остане само малко количество от сместа от разтворители и крайната плаваща фракция. Оставащата течност и крайната плаваща фракция се събират отделно върху филтърна хартия, поставена във фуния. Стените на делителната фуния се изплакват с PE, за да се събере целият материал от крайната плаваща фракция. Крайната плаваща фракция се оставя да изсъхне. Крайната плаваща фракция се пресява през сито с размер на отвора 0,25 mm, като и двете получени по този начин фракции се изследват за откриване на съставки от сухоземни безгръбначни животни, освен когато пресяването не се счита за необходимо.

▼ M8

2.1.4. *Микроскопско изследване*

2.1.4.1. Подготовка на предметно стъкло

Микроскопските предметни стъкла се подготвят от утайката и в зависимост от избора на оператора — от плаващата фракция или суровината. По целесъобразност, само за откриване на съставки от сухоземни безгръбначни, предметните стъкла се приготвят и от крайната плаваща фракция, получена, както е описано в точка 2.1.3.4.4. Подготовка се извършва и за двете получени фракции (ситна фракция и едра фракция). Пробите за анализ, отделени от нанесените върху предметни стъкла фракции, се считат за представителни по отношение на цялата фракция.

Необходимо е да бъдат подготвени достатъчен брой предметни стъкла, за да се осигури възможност за цялостен протокол на изследването съгласно точка 2.1.4.2.

Микроскопските предметни стъкла се фиксират с подходящи средства за фиксиране в съответствие със СОП, установена от EURL-AP и публикувана на нейния уебсайт. Предметните стъкла се покриват с покривни стъкла.

2.1.4.2. Схеми за наблюдение за откриване на частици от животински произход в комбинирания фуражи, фуражните суровини и премиксите

Подготвените микроскопски предметни стъкла се наблюдават в съответствие със схемите за наблюдение в диаграми 1 и 2.

Микроскопските наблюдения се извършват, като се използва съставен микроскоп за утайката и в зависимост от избора на оператора — за плаващата фракция или за суровината. Освен това за откриване на съставки от сухоземни безгръбначни животни наблюденията се извършват и върху крайната плаваща фракция, получена, както е описано в точка 2.1.3.4.4, в съответствие с диаграма 3. В допълнение към съставния микроскоп за едрите фракции може да се използва и стереомикроскоп. Всяко предметно стъкло се изследва цялостно при различни степени на увеличение. Точните обяснения за начина на използване на схемите са подробно описани със СОП, установена от EURL-AP и публикувана на нейния уебсайт.

Минималният брой предметни стъкла, които трябва да се наблюдават на всеки етап от схемите за наблюдение, се спазва стриктно, освен когато веществото в цялата фракция не позволява да се достигне определеният брой предметни стъкла, например когато не е получена утайка. За всяко определяне се използват не повече от 6 предметни стъкла за установяване на броя на частиците.

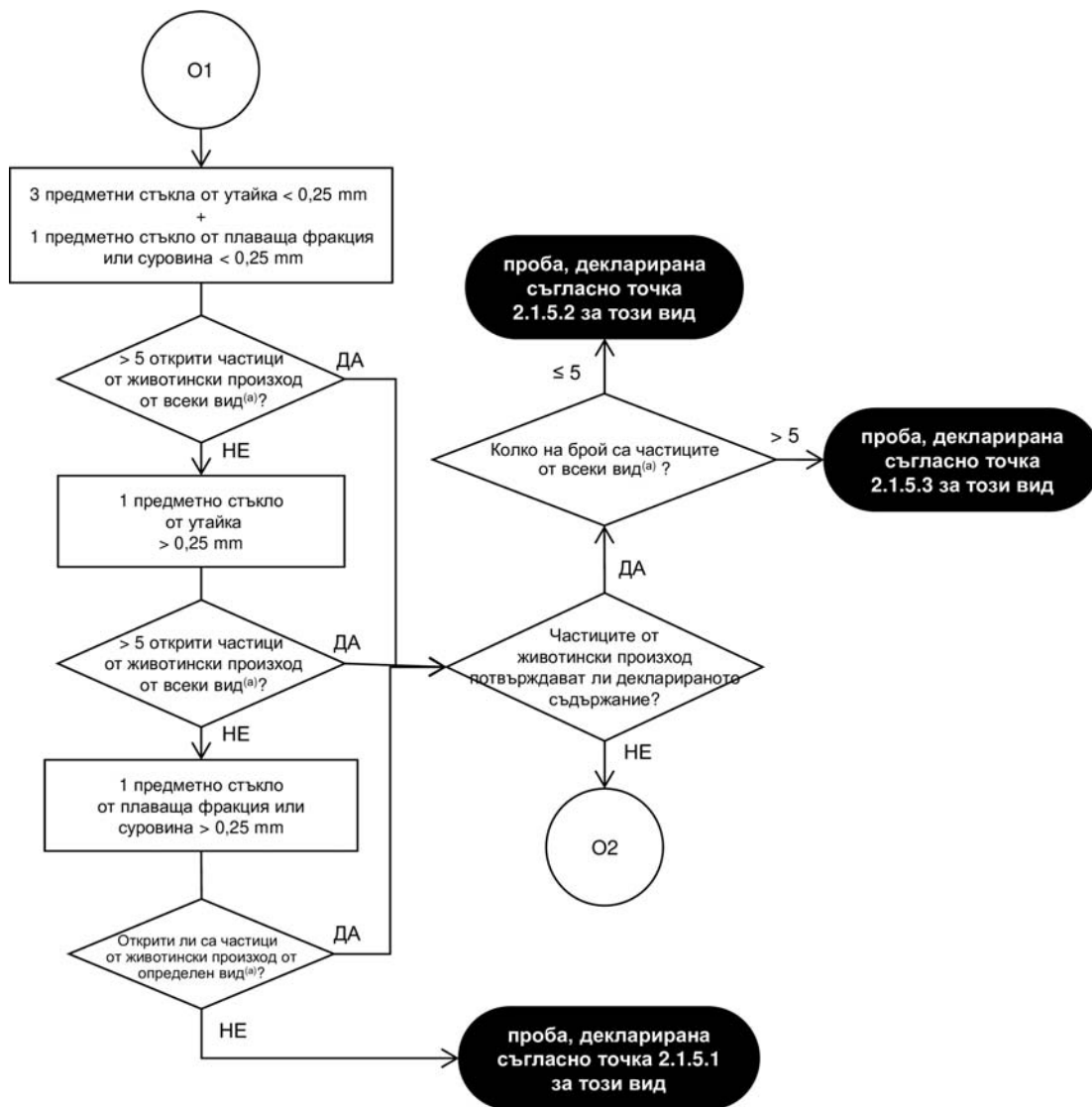
Когато се подготвят допълнителни предметни стъкла, като се използва по-специфично средство за фиксиране с оцветяващи свойства, както е описано в точка 2.1.2.1.4, за плаващата фракция или суровината за допълнително характеризане на структурите (напр. пера, косми, мускули или кръвни частици), които са били открити върху предметни стъкла, подготвени с други средства за фиксиране, както е описано в точка 2.1.2.1.3, броят на частиците се преброява въз основа на броя на предметните стъкла за всяко определяне, като той не трябва да надвишава 6, в това число допълнителните предметни стъкла с по-специфично средство за фиксиране. Допълнителните предметни стъкла, подготвени от крайната плаваща фракция, получена съгласно описаното в точка 2.1.3.4.4., за определяне на съставки от сухоземни безгръбначни животни, не се вземат предвид при идентифицирането на други видове частици (сухоземни гръбначни животни и риби).

За да се улесни идентифицирането на вида и произхода на частиците, операторът може да използва помощни средства, като например системи за подпомагане вземането на решения, бази данни с изображения и еталонни проби.

▼ M8

Диаграма 1

Схема за наблюдение след единично утаяване в ТСЕ за откриване на частици от животински произход, различни от такива от сухоземни безгръбначни животни, в комбинираните фуражи, фуражните суровини и премиксите за първото определяне

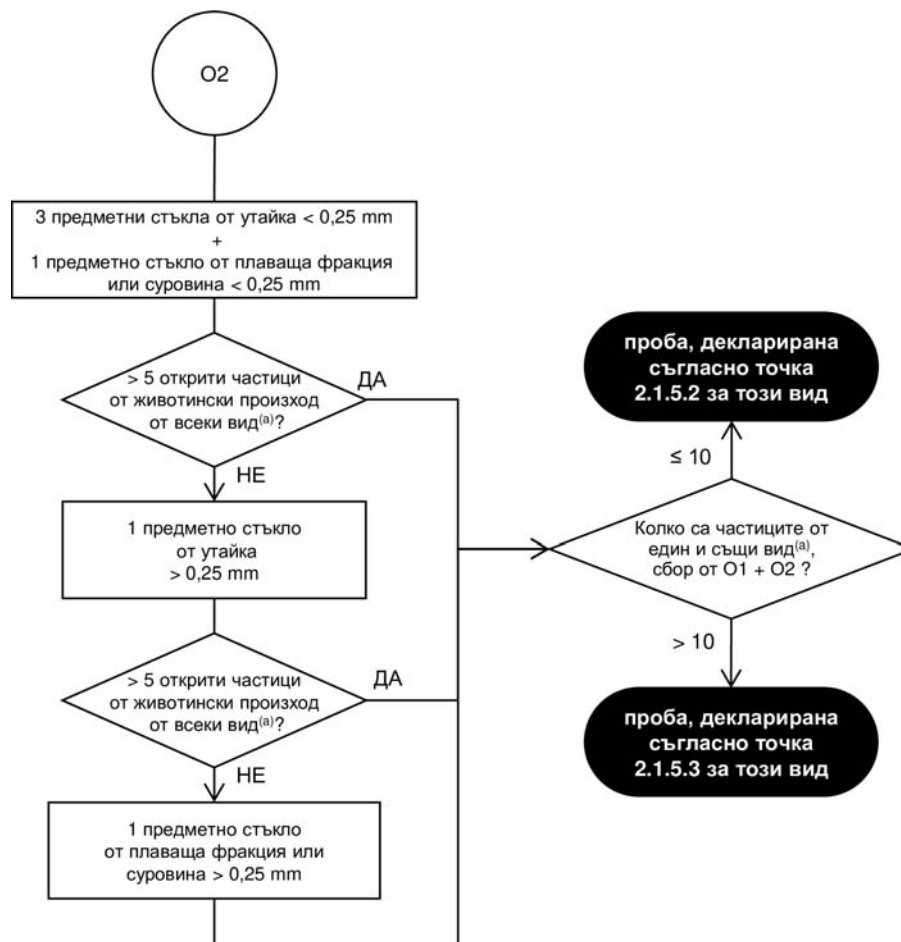


(„O1“ и „O2“ са съответно първо и второ определяне; ^(a): сухоземни гръбначни животни, риба)

▼ M8

Диаграма 2

Схема за наблюдение след единично утаяване в ТСЕ за откриване на частици от животински произход, различни от такива от сухоземни безгръбначни животни, в комбинираните фуражи, фуражните суровини и премиксите за второто определяне

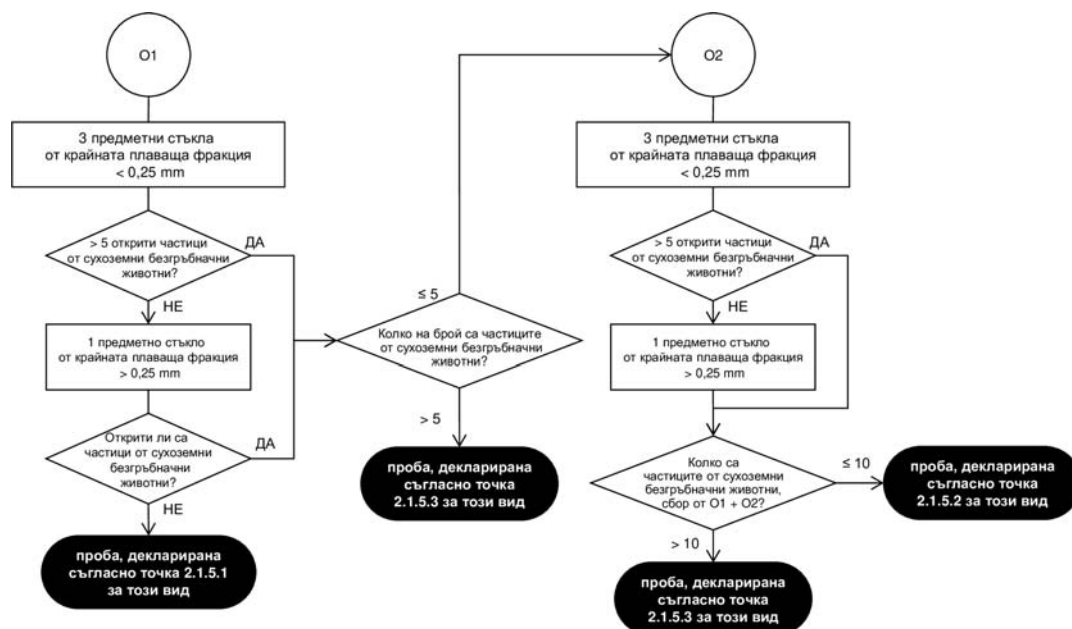


(„O1“ и „O2“ са съответно първо и второ определяне; ^(a): сухоземни гръбначни животни, риба)

▼ M8

Диаграма 3

Схема за наблюдение след двойно утаяване в PE/TCE за откриване на съставки от сухоземни безгръбначни животни в комбинираните фуражи, фуражните суровини и премиксите



(„O1“ и „O2“ са съответно първо и второ определяне)

2.1.4.3. Брой на определянията

Определянията се извършват на различни подпроби от по 50 g всяка.

Ако след първото определяне, извършено в съответствие със схемата на наблюдение в диаграма 1 или, когато е целесъобразно, в диаграма 3, не се откриват частици от животински произход, не е необходимо допълнително определяне и резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, установена в точка 2.1.5.1.

Ако след първото определяне, извършено в съответствие със схемата на наблюдение в диаграма 1, се открият една или повече частици от животински произход от определен вид (т.е. сухоземни гръбначни животни или риба) и видът на откритите частици потвърждава декларираното съдържание на пробата, не е необходимо второ определяне. Ако броят на частиците от животински произход от определен вид, открити при първото определяне, е по-висок от 5, резултатът от анализа се отчита по вид животно, като се използва формулировката, установена в точка 2.1.5.3. В противен случай резултатът от анализа се отчита по вид животно, като се използва формулировката, установена в точка 2.1.5.2.

Ако след първото определяне, извършено в съответствие със схемата на наблюдение в диаграма 3, бъдат открити повече от 5 частици от сухоземни безгръбначни животни, не е необходимо второ определяне и резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, установена в точка 2.1.5.3 за съответния вид.

▼ M8

Във всички останали случаи, включително когато на лабораторията не е представена декларация за съдържание, се извършва второ определяне от нова подпроба. Ако след второто определяне, извършено в съответствие със схемата на наблюдение в диаграма 2 или, когато е целесъобразно, в диаграма 3, сборът от частиците от животински произход от определен вид, открити при двете определяния, е по-голям от 10, резултатът от анализа се отчита по вид животно, като се използва формулировката, установена в точка 2.1.5.3. В противен случай резултатът от анализа се отчита по вид животно, като се използва формулировката, установена в точка 2.1.5.2.

2.1.5. *Представяне на резултатите*

При отчитане на резултатите лабораторията посочва вида на използвания при анализа материал (утайка, плаваща фракция, крайна плаваща фракция или суровина). При отчитането ясно се посочва броят на извършените определяния и дали не е било извършено пресяване на фракциите преди подготовката на предметното стъкло в съответствие с точка 2.1.3.4.3, първо тире, трета алинея или точка 2.1.3.4.4, трето тире.

Лабораторният доклад съдържа най-малко информация относно наличието на съставки, получени от сухоземни гръбначни животни и от риба.

Отделните случаи се представят по описаните по-долу начини.

2.1.5.1. Не е установено наличие на частици от животински произход от определен вид:

- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба не са открити частици, получени от сухоземни гръбначни животни.“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба не са открити частици, получени от риба.“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба не са открити частици, получени от сухоземни безгръбначни животни.“

2.1.5.2. Открити са между 1 и 5 частици от животински произход от определен вид, когато е било извършено само едно определяне, или са открити между 1 и 10 частици от определен вид, когато са били извършени две определяния (броят на откритите частици е под критичната граница, установена в СОП на EURL-AP и публикувана на нейния уебсайт):

Когато е било извършено само едно определяне:

- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба са открити не повече от 5 частици, получени от сухоземни гръбначни животни. Частиците са идентифицирани като ... [кости, хрущяли, мускули, косми, рога, друго (моля, уточнете според случая)]. Тази ниска степен на наличие на частици е под критичната граница, установена за този микроскопски метод.“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба са открити не повече от 5 частици, получени от риба. Частиците са идентифицирани като ... [рибешки кости, рибешки люспи, хрущяли, мускули, отолити, хриле, друго (моля, уточнете според случая)]. Тази ниска степен на наличие на частици е под критичната граница, установена за този микроскопски метод.“

▼ M8

Когато са били извършени две определяния:

- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при двете определяния в подложената на изследване проба са открити не повече от 10 частици, получени от сухоземни гръбначни животни. Частиците са идентифицирани като ... [кости, хрущяли, мускули, косми, рога, друго (моля, уточнете според случая)]. Тази ниска степен на наличие на частици е под критичната граница, установена за този микроскопски метод.“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при двете определяния в подложената на изследване проба са открити не повече от 10 частици, получени от риба. Частиците са идентифицирани като ... [рибешки кости, рибешки люспи, хрущяли, мускули, отолити, хриле, друго (моля, уточнете според случая)]. Тази ниска степен на наличие на частици е под критичната граница, установена за този микроскопски метод.“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при двете определяния в подложената на изследване проба са открити не повече от 10 частици, получени от сухоземни безгръбначни животни. Частиците са идентифицирани като ... [кутикулни фрагменти, части от устата, мускули, трахеални структури, друго (моля, уточнете според случая)]. Тази ниска степен на наличие на частици е под критичната граница, установена за този микроскопски метод.“

Освен това:

- Когато е използвано предварително пресяване на пробата, в лабораторния доклад се посочва в коя фракция (пресятата фракция, гранулираната фракция или зърната) са открити частиците от животински произход, доколкото откриването им само в пресятата фракция би могло да означава замърсяване от околната среда.
- Когато са открити само частици от животински произход, които не могат да бъдат категоризирани като сухоземни гръбначни животни или риба (напр. мускулни влакна), в доклада се посочва, че са открити само такива частици от животински произход и че не може да се изключи те да произхождат от сухоземни гръбначни животни.

2.1.5.3. Открити са повече от 5 частици от животински произход от определен вид, когато е било извършено само при едно определяне, или са открити повече от 10 частици от определен вид, когато са били извършени две определяния:

Когато е било извършено само едно определяне:

- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба са открити повече от 5 частици, получени от сухоземни гръбначни животни. Частиците са идентифицирани като ... [кости, хрущяли, мускули, косми, рога, друго (моля, уточнете според случая)].“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба са открити повече от 5 частици, получени от риба. Частиците са идентифицирани като ... [рибешки кости, рибешки люспи, хрущяли, мускули, отолити, хриле, друго (моля, уточнете според случая)].“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в подложената на изследване проба са открити повече от 5 частици, получени от сухоземни безгръбначни животни. Частиците са идентифицирани като ... [кутикулни фрагменти, части от устата, мускули, трахеални структури, друго (моля, уточнете според случая)].“

▼ **M8**

Когато са били извършени две определяния:

- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при двете определяния в подложената на изследване проба са открити повече от 10 частици, получени от сухоземни гръбначни животни. Частиците са идентифицирани като ... [кости, хрущяли, мускули, косми, рога, друго (моля, уточнете според случая)].“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при двете определяния в подложената на изследване проба са открити повече от 10 частици, получени от риба. Частиците са идентифицирани като ... [рибешки кости, рибешки люспи, хрущяли, мускули, отолити, хриле, друго (моля, уточнете според случая)].“
- „Доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при двете определяния в подложената на изследване проба са открити повече от 10 частици, получени от сухоземни безгръбначни животни. Частиците са идентифицирани като ... [кутикулни фрагменти, части от устата, мускули, трахеални структури, друго (моля, уточнете според случая)].“

Освен това:

- Когато е използвано предварително пресяване на пробата, в лабораторния доклад се посочва в коя фракция (пресятата фракция, гранулираната фракция или зърната) са открити частиците от животински произход, доколкото откриването им само в пресятата фракция би могло да означава замърсяване от околната среда.
- Когато са открити само частици от животински произход, които не могат да бъдат категоризирани като сухоземни гръбначни животни или риба (напр. мускулни влакна), в доклада се посочва, че са открити само такива частици от животински произход и че не може да се изключи те да произхождат от сухоземни гръбначни животни.

▼ **M2**

2.2. Полимеразна верижна реакция (PCR)

2.2.1. Принцип

Фрагментите от дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) от животински произход, които е възможно да се намират във фуражните суровини и комбинирания фуражи, се откриват посредством техника за генетична амплификация чрез полимеразна верижна реакция (PCR), насочена към секвенции на ДНК, които са специфични за конкретен животински вид.

При метода чрез PCR е необходимо най-напред да бъде извършено извличане на ДНК. На следващия етап извлечената ДНК се подлага на амплификация с цел да бъдат установени животинските видове, предмет на анализа.

2.2.2. Реагенти и апаратура

2.2.2.1. Реагенти

2.2.2.1.1. Реагенти при фазата на извличане на ДНК

Следва да бъдат използвани единствено реагенти, които са одобрени от EURL-AP и са публикувани на нейната интернет страница.

2.2.2.1.2. Реагенти при фазата на генетична амплификация

▼ M2

2.2.2.1.2.1. Праймери и сонди

Следва да се използват единствено праймери и сонди със секвенции на олигонуклеотиди, които са валидирани от EURL-AP ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Реактивни смеси (Master Mix)

Следва да бъдат използвани само разтвори на реактивни смеси, в чийто състав липсват реагенти, които биха могли да доведат до грешни резултати поради присъствие на животинска ДНК ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Реагенти за обеззаразяване

2.2.2.1.2.3.1. Разтвор на солна киселина (0,1N)

2.2.2.1.2.3.2. Избелване (разтвор на натриев хипохлорит при 0,15 % активен хлор)

2.2.2.1.2.3.3. Некорозивни химични реагенти за обеззаразяване на скъпа апаратура, като аналитични везни (например DNA EraseTM на MP Biomedicals)

2.2.2.2. Апаратура

2.2.2.2.1. Аналитична везна с точност до 0,001 g

2.2.2.2.2. Апаратура за смилане

2.2.2.2.3. Термоциклично устройство, позволяващо извършване на PCR в реално време

2.2.2.2.4. Микроцентрифуга за микроцентрифужни епруветки

2.2.2.2.5. Набор от микропипети, позволяващи пипетиране от 1 µl до 1 000 µl

2.2.2.2.6. Стандартни пластмасови консумативи за молекулярна биология: микроцентрифужни епруветки, пластмасови накрайници с филтър за микропипети, лабораторни плаки, подходящи за термоциклично устройство.

2.2.2.2.7. Фризери за съхранение на проби и реагенти

2.2.3. *Вземане на проби и подготовка на пробите*

2.2.3.1. Вземане на проби

Използват се представителни проби, взети в съответствие с разпоредбите в приложение I.

2.2.3.2. Подготовка на пробите

Подготовката на лабораторните проби до момента на извличането на ДНК се осъществява в съответствие с изискванията, посочени в приложение II. Най-малко 50 g от пробата се отделят като част от пробата за целите на анализа, като впоследствие тя се смилва.

Подготовката на пробите се извършва в помещения, различни от предназначения за извличане на ДНК и за реакции за генетична амплификация съгласно стандарт ISO 24276.

Подготвят се две проби за анализ, като всяка от тях е поне 100 mg.

2.2.4. *Извличане на ДНК*

Извличането на ДНК се извършва от всяка подготвена проба за анализ в съответствие със СОП, определени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница.

За всяка серия по извличане се подготвят по две контролни проби на извличането съгласно стандарт ISO 24276.

— празна контролна проба за извличане,

— положителна контролна проба за извличане на ДНК.

⁽¹⁾ Списъкът с тези праймери и сонди за всеки от животинските видове, предмет на анализ, е на разположение на интернет страницата на EURL-AP.

⁽²⁾ Примери за използвани реактивни смеси са публикувани на интернет страницата на EURL-AP.

▼ **M2**2.2.5. *Генетична амплификация*

Генетичната амплификация се извършва, като се използват валидираните методи за всеки от животинските видове, за които се изисква идентификация. Тези методи са установени в СОП, определени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница. Всяка извлечена ДНК се анализира при най-малко две различни разреждания, за да се прецени наличието на инхибиране.

Подготвят се две контролни проби на амплификацията за всеки изследван животински вид съгласно стандарт ISO 24276.

- за всяка плака или серия от PCR анализи се извършва положителна контролна проба за ДНК от изследвания животински вид,
- за всяка плака или серия от PCR анализи се извършва контролна проба на реагентите при амплификация (наричана още контролна без матрица).

2.2.6. *Тълкуване и отчитане на резултатите*

При отчитането на резултатите лабораторията посочва информация най-малко относно теглото на използваните проби за анализ, използваната техника за извличане, броя на извършените определяния, както и относно границата на откриване на метода.

Резултатите не следва да се тълкуват и докладват, ако положителната контролна проба за извличане на ДНК и положителната контролна проба за ДНК от изследвания животински вид не дават положителни резултати по отношение на изследвания животински вид, а контролната проба на реагентите при амплификация е отрицателна.

В случай че е налице несъответствие между резултатите от двете проби за анализ, е необходимо повторно извършване най-малко на фазата на генетична амплификация. В случай на опасения от страна на лабораторията, че екстрактите на ДНК могат да са причина за несъответствието, преди да се пристъпи към тълкуване на резултатите, е необходимо да се извърши ново извличане на ДНК и последваща генетична амплификация.

Окончателното отчитане на резултатите следва да бъде извършено чрез обединяване и тълкуване на резултатите от двете проби за анализ в съответствие със СОП, определени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница.

2.2.6.1. *Отрицателен резултат*

Отрицателният резултат се отчита по следния начин:

В разглежданата проба не бе установено наличие на ДНК от X (X — животинските видове или групата от животински видове, предмет на анализа).

2.2.6.2. *Положителен резултат*

Положителният резултат се отчита по следния начин:

В разглежданата проба бе установено наличие на ДНК от X (X — животинските видове или групата от животински видове, предмет на анализа).

▼ **M9***ПРИЛОЖЕНИЕ VII***МЕТОД ЗА ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА ЕНЕРГИЙНАТА СТОЙНОСТ НА
ФУРАЖИТЕ ЗА ДОМАШНИ ПТИЦИ****1. Метод за изчисляване и изразяване на енергийната стойност**

Енергийната стойност на комбинираните фуражи за домашни птици трябва да бъде изчислявана в съответствие с посочената по-долу формула въз основа на процентното съдържание на определени аналитични компоненти във фуража. Тази стойност трябва да бъде изразена в мегаджаули (MJ) обменна енергия (OE) с коригиран азот, на килограм от хранителната смес:

$$\text{MJ/kg OE} = 0,1551 \times \% \text{ суров протеин} + 0,3431 \times \% \text{ сурови мазнини} + 0,1669 \times \% \text{ нишесте} + 0,1301 \times \% \text{ общо захари (изразени като захароза)}$$

2. Допустими отклонения от декларираните стойности

Ако официалната проверка установи несъответствие (по-висока или по-ниска енергийна стойност на фуража), позволеното отклонение между резултата от проверката и декларираната енергийна стойност е 0,4 MJ/kg OE.

3. Изразяване на резултата

След прилагането на горепосочената формула, полученият резултат трябва да бъде отчетен до първия знак след десетичната запетая.

4. Методи за вземане на проби и анализ

Вземането на проби от комбинирания фураж и определянето на съдържанието на компонентите за анализ, посочени в метода за изчисление, трябва да бъде извършено в съответствие с методите на Съюза за вземане на проби и за анализ, използвани при официалния контрол на фуражите.

Трябва да се прилагат следните методи:

- за определяне на съдържанието на сурови мазнини: процедура Б от метода за определяне на сурови масла и мазнини, изложена в част Ж от приложение III.
- за определяне на съдържанието на нишесте: полариметричния метод, изложен в част К от приложение III

**МЕТОД ЗА ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА ЕНЕРГИЙНАТА СТОЙНОСТ ВЪВ
ФУРАЖНИТЕ СУРОВИНИ И В КОМБИНИРАНИТЕ ФУРАЖИ ЗА
КОТКИ И КУЧЕТА**

Енергийната стойност във фуражните суровини и в комбинираните фуражи за котки и кучета се изчислява в съответствие със стандарт EN 16967 – Фуражи: методи за вземане на проби и за анализ. Прогностични уравнения за обменна енергия в комбинирани фуражи и добавки за котки и кучета, включително диетични фуражи

▼ M9▼ B

ПРИЛОЖЕНИЕ IX

ТАБЛИЦИ НА СЪОТВЕТСТВИЕТО, ПОСОЧЕНИ В ЧЛЕН 6

1. Директива 71/250/ЕИО

Директива 71/250/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1, първа алинея	Член 3
Член 1, втора алинея	Член 2
Член 2	—
Член 3	—
Приложение, част 1	Приложение II
Приложение, част 2	—
Приложение, част 3	—
Приложение, част 4	Приложение III, част О
Приложение, част 5	Приложение III, част М
Приложение, част 6	Приложение III, част Н
Приложение, част 7	Приложение III, част Р
Приложение, част 9	Приложение III, част К
Приложение, част 10	—
Приложение, част 11	—
Приложение, част 12	Приложение III, част Й
Приложение, част 14	Приложение III, част Г
Приложение, част 16	—

2. Директива 71/393/ЕИО

Директива 71/393/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 2	—
Член 3	—
Приложение, част I	Приложение III, част А
Приложение, част II	Приложение III, част Д
Приложение, част III	Приложение III, част П
Приложение, част IV	Приложение III, част З

3. Директива 72/199/ЕИО

Директива 72/199/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 2	—
Член 3	—
Член 4	—
Приложение I, част 1	Приложение III, част Л
Приложение I, част 2	Приложение III, част В
Приложение I, част 3	—
Приложение I, част 4	—
Приложение I, част 5	Приложение V, част А
Приложение II	—

▼B**4. Директива 73/46/ЕИО**

Директива 73/46/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 3	—
Член 4	—
Приложение I, част 1	Приложение III, част Б
Приложение I, част 2	—
Приложение I, част 3	Приложение III, част И

5. Директива 76/371/ЕИО

Директива 76/371/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	Член 1
Член 2	—
Член 3	—
Приложение	Приложение I

6. Директива 76/372/ЕИО

Директива 76/372/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	—
Член 2	—
Член 3	—
Приложение	—

7. Директива 78/633/ЕИО

Директива 78/633/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 2	—
Член 3	—
Приложение, част 1	—
Приложение, част 2	—
Приложение, част 3	Приложение IV, част В

8. Директива 81/715/ЕИО

Директива 81/715/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	—
Член 2	—
Член 3	—
Приложение	—

9. Директива 84/425/ЕИО

Директива 84/425/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	—
Член 2	—
Член 3	—
Приложение	—

▼B**10. Директива 86/174/ЕИО**

Директива 86/174/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	Член 4
Член 2	—
Член 3	—
Приложение	Приложение VII

11. Директива 93/70/ЕИО

Директива 93/70/ЕИО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 2	—
Член 3	—
Приложение	Приложение IV, част Г

12. Директива 93/117/ЕО

Директива 93/117/ЕО	Настоящият регламент
Член 1	Членове 3 и 5
Член 2	—
Член 3	—
Приложение, част 1	Приложение IV, част Д
Приложение, част 2	Приложение VIII, част А

13. Директива 98/64/ЕО

Директива 98/64/ЕО	Настоящият регламент
Член 1	Членове 3 и 5
Член 2	—
Член 3	—
Член 4	—
Приложение, част А	Приложение III, част Е
Приложение, част В	Приложение VIII, част Б

14. Директива 1999/27/ЕО

Директива 1999/27/ЕО	Настоящият регламент
Член 1	Членове 3 и 5
Член 2	—
Член 3	—
Член 4	—
Член 5	—
Член 6	—
Член 7	—
Приложение, част А	Приложение VIII, част В
Приложение, част Б	Приложение IV, част Е
Приложение част В	Приложение VIII, част Г

▼B**15. Директива 1999/76/ЕО**

Директива 1999/76/ЕО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 2	—
Член 3	—
Член 4	—
Приложение	Приложение IV, част Ж

16. Директива 2000/45/ЕО

Директива 2000/45/ЕО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 2	—
Член 3	—
Член 4	—
Приложение, част А	Приложение IV, част А
Приложение, част Б	Приложение IV, част Б
Приложение част С	Приложение III, част Ж

17. Директива 2002/70/ЕО

Директива 2002/70/ЕО	Настоящият регламент
Член 1	Член 1
Член 2	Членове 2 и 3
Член 3	—
Член 4	—
Член 5	—
Приложение I	Приложение I и приложение V, част Б (I)
Приложение II	Приложение II и приложение V, част Б (II)

18. Директива 2003/126/ЕО

Директива 2003/126/ЕО	Настоящият регламент
Член 1	Член 3
Член 2	—
Член 3	—
Член 4	—
Член 5	—
Член 6	—
Приложение	Приложение VI