

СЛУЖБА ЖИВОТНОВОДСТВА И ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ ФАО



руководство

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА
РАБОТЫ ЛАБОРАТОРИЙ ПО
АНАЛИЗУ КОРМОВ ДЛЯ
ЖИВОТНЫХ



Фотографии на обложке:

Слева: ©FAO/Giuseppe Bizzarri
В центре: ©FAO/Ishara Kodikara
Справа: ©FAO/Jon Spaull

СЛУЖБА ЖИВОТНОВОДСТВА И ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ ФАО
руководство

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА РАБОТЫ ЛАБОРАТОРИЙ ПО АНАЛИЗУ КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Джим Белтроп, Бенедикт Бранд, Ричард Э. Кауи,
Юрген Данье, Йохан де Бувер, Леон де Йонге,
Фелисити Джексон, Хариндер П.С. Маккар, Крис Пиотровски

Информация для пользователей данного Руководства

Если вы столкнулись с какой-либо проблемой при использовании методов, описанных в данном руководстве, или у вас есть вопрос касательно использования метода, вы можете связаться с экспертами из Сети экспертов ФАО:

http://www.fao.org/ag/againfo/home/documents/Network_Quality-control.pdf

Рекомендуемый вариант для цитирования

ФАО. 2013 год. *Обеспечение качества работы лабораторий по анализу кормов для животных*. Руководство ФАО по вопросам животноводства и здоровья животных, № 14, Рим.

Используемые обозначения и представление материала в настоящем информационном продукте не означают выражения какого-либо мнения со стороны Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций относительно правового статуса или уровня развития той или иной страны, территории, города или района, или их властей, или относительно делимитации их границ или рубежей. Упоминание конкретных компаний или продуктов определенных производителей, независимо от того, запатентованы они или нет, не означает, что ФАО одобряет или рекомендует их, отдавая им предпочтение перед другими компаниями или продуктами аналогичного характера, которые в тексте не упоминаются.

Мнения, выраженные в настоящем информационном продукте, являются мнениями автора (авторов) и не обязательно отражают точку зрения или политику ФАО.

ISBN 978-92-5-407050-2 (печатное издание)

e-ISBN 978-92-5-407808-9 (PDF)

© ФАО 2013

ФАО приветствует использование, тиражирование и распространение материала, содержащегося в настоящем информационном продукте. Если не указано иное, этот материал разрешается копировать, скачивать и распечатывать для целей частного изучения, научных исследований и обучения, либо для использования в некоммерческих продуктах или услугах при условии, что ФАО будет надлежащим образом указана в качестве источника и обладателя авторского права, и что при этом никоим образом не предполагается, что ФАО одобряет мнения, продукты или услуги пользователей.

Для получения прав на перевод и адаптацию, а также на перепродажу и другие виды коммерческого использования, следует направить запрос по адресу: www.fao.org/contact-us/licence-request или copyright@fao.org.

Информационные продукты ФАО размещаются на веб-сайте ФАО (www.fao.org/publications); желающие приобрести информационные продукты ФАО могут обращаться по адресу: publications-sales@fao.org.

Оглавление

Предисловие	v
Авторы	vii
Выражаем благодарность	ix
Глоссарий	xi
Введение	1
ЧАСТЬ I	
Процедуры обеспечения качества и принципы надлежащей лабораторной практики	3
Формирование системы качества лабораторных исследований	5
Качество и системы контроля качества	5
Цели и руководящие принципы по обеспечению качества	6
Структура лаборатории и обязанности персонала	8
Обучение и квалификация персонала	8
Аналитические процедуры – отбор и верификация	9
Стандартные операционные процедуры (СОП)	10
Техническое и сервисное обслуживание оборудования	11
Представление аналитических данных	13
Точность и эталонные образцы	13
Прецизионность и двойные слепые образцы	14
Прослеживаемость результатов	15
Квалификационные испытания (внешний контроль качества)	15
Контрольные карты - статистический контроль процесса	16
Документация и контроль документов	18
Техника безопасности в лаборатории	20
Проверки / Корректирующие действия / Анализ со стороны руководства	21
Процедуры обеспечения качества	23
Валидация новых методов	23
Присвоение квалификации (обучение) специалистов лаборатории	30
Реагенты и химикаты	32
Тест на выбросы	35
Контрольный перечень проверки качества лаборатории	36
Получение лабораторных образцов	46
Обращение с образцами кормов и их подготовка	48
Использование весов	53

Использование пипеток	58
Эксплуатация рН-метра	62
Эксплуатация Спектрофотометра	63
Лабораторная вода	65
Процедуры очистки стеклянной лабораторной посуды	66
Техника безопасности в лаборатории	70
Общие процедуры – правильное использование лабораторного оборудования	80
ЧАСТЬ II	
Аналитический раздел	95
Аналитические методы	97
Введение	97
Сухое вещество	100
Сырая зола	103
Зола, нерастворимая в соляной кислоте	105
Азот и определение сырого белка – метод Кьельдаля	108
Азот и определение сырого белка – сгорание	112
Сырой жир – эфирный экстракт	114
Сырая клетчатка – метод фильтрации	117
Нейтрально-детергентная клетчатка (NDF) – метод фильтрации	120
Кислотно-детергентная клетчатка (ADF) и лигнин (ADL) – метод фильтрации	123
Крахмал – ферментативный метод	126
Редуцирующий сахар – метод Люффа-Скурла	131
Валовая энергия	136
Летучие жирные кислоты (VFA) в силосе – газовая хроматография	140
Молочная кислота в силосах – ферментативный метод	143
Мочевина – спектрофотометрический метод	145
Микроэлементы – атомно-абсорбционный спектрофотометр	148
Кальций – спектрофотометрический метод	154
Фосфор – спектрофотометрический метод	156
Хлор – метод титрования	158
Афлатоксин – метод ВЭЖХ	161
Фумонизины – метод ВЭЖХ	170
Зеараленон (ZON) – метод ВЭЖХ	181
Деоксиниваленол (DON) – метод ВЭЖХ	189
Усвояемость сухого вещества – анализ в лабораторных условиях с использованием рубцовой жидкости	197
БИК-анализ	202

Предисловие

Питание животных оказывает влияние на многие области сельского хозяйства: производительность, выбросы в окружающую среду, загрязнение воды, землепользование, здоровье животных, безопасность продукции, качество продукции и благополучие животных.

Каждый сектор отрасли животноводства, связанные с ним услуги и благополучие одновременно животных и людей находятся в непосредственной зависимости от питания животных. Правильное питание животных заключается в поддержании режима питания, сбалансированного в отношении всех питательных веществ и свободного от вредных компонентов, предоставляемого на уровне, соответствующем целям производства, с учетом физиологического состояния животного, и такое питание обеспечивает создание продуктов животноводства, которые являются безопасными для потребления человеком. Наличие точных, достоверных и воспроизводимых аналитических данных необходимо для разработки правильного состава кормов. Также только достоверные аналитические данные могут привести к получению значимых научных данных.

Отчеты международных экспертов, посетивших лаборатории по питанию животных, занимающиеся анализом кормов и кормовых ингредиентов в развивающихся странах, свидетельствуют о необходимости укрепления системы обеспечения качества в этих лабораториях. Ввиду того, что не внедрены надлежащие системы обеспечения качества, персонал лабораторий не в состоянии оценить качество получаемых данных. Различные тесты на кольцевые реакции, проведенные в развитых странах, показали неприемлемый уровень отклонения для некоторых аналитов, регулярно определяемых в лабораториях по анализу кормов. Аналогичные факты, полученные от предприятий кормовой промышленности развивающихся стран касательно достоверности данных анализа кормов, говорят о том, что эти данные являются противоречивыми, поэтому возникла необходимость срочной подготовки документа, охватывающего системы обеспечения качества.

Настоящий документ был разработан и подготовлен группой из девяти экспертов. Акцент в нем делается на проведении базового анализа, используемого для определения питательной ценности кормов и кормовых ингредиентов. В документе всесторонне рассматриваются принципы надлежащей лабораторной практики, процедуры обеспечения качества и примеры стандартных операционных процедур, используемых в отдельных специализированных лабораториях. Внедрение этих практик и процедур поможет лабораториям в плане признания их компетентности, что является необходимым условием для их сертификации и аккредитации, а также будет способствовать повышению качества данных, представляемых лабораториями по анализу кормов. Кроме того, следование принципам надлежащей лабораторной практики, представленным в документе, будет способствовать повышению безопасности работников лабораторий, защите окружающей среды от выбрасываемых лабораториями загрязняющих веществ и повышению эффективности функциониро-

вания лабораторий. Документ также предоставит прочную основу для лабораторий, на базе которой они смогут разработать системы, соответствующие требованиям международных стандартов. Документ будет полезен для специалистов лабораторий, руководителей лабораторий, студентов-исследователей и преподавателей, и есть надежда, что он позволит специалистам отрасли животноводства, включая отрасль производства аквакультур, понять важность обладания проверенными достоверными данными и связанными с ними подходами по обеспечению качества. Этот документ, посредством повышения навыков и знаний персонала лабораторий и исследователей, также приведет к тому, что системы обеспечения качества станут неотъемлемой частью функционирования лабораторий по анализу кормов. Он поможет странам инициировать процесс аккредитации их лабораторий по анализу кормов в соответствии с международными стандартами.

Дополнительная польза от внедрения и принятия этих подходов по контролю/обеспечению качества будет заключаться в укреплении научно-образовательного потенциала студентов, выпускаемых научно-исследовательскими учреждениями, и улучшении торговых отношений между развивающимися и развитыми странами. Это приведет к долгосрочным выгодам и будет способствовать привлечению инвестиций в развитие кормовой промышленности и функционирование научно-исследовательских учреждений.

Этот документ будет также служить в качестве основы для разработки электронного модуля для самообучения и организации учебных семинаров для руководителей и технических специалистов лабораторий по вопросам контроля/обеспечения качества. На основе полученных отзывов от пользователей этот документ будет в будущем расширен путем включения в него важных технологий, касающихся кормовых добавок, микробиологии, остатков лекарственных препаратов и других нежелательных веществ.



Берхе Г. Текола

Директор

*Служба животноводства и здоровья животных
Продовольственная и сельскохозяйственная
организация Объединенных Наций*

Авторы

Джим Белтроп

Office of the Texas State Chemist
Quality Assurance Manager
P.O. Box 3160
College Station, Texas 77841, USA

Бенедикт Бранд

Staatliches Veterinäruntersuchungsamt
Arnsberg
Dez. 43: Verbraucherschutz, Futtermittel
Zur Taubeneiche 10-12
59821 Arnsberg
Germany

Ричард Э. Кауи

Senior Quality Assurance Manager
SAC
Ferguson Building
Craibstone Estate
Aberdeen
AB21 9YA
Scotland

Юрген Данье

c/o Bioanalytic Weihenstephan Unit
Research Center for Nutrition and Food
Science, Technische Universität München
Alte Akademie 10, 85354 Freising
Germany

Йохан де Бувер

Institute for Agricultural and Fisheries
Research
Animal Sciences Unit Scheldeweg 68
9090 Melle
Belgium

Леон де Йонге

Animal Nutrition Group
Wageningen University PO Box 338
6700 AH Wageningen
The Netherlands

Фелисити Джексон

Manager, Nutrition Laboratory
Institute of Food, Nutrition &
Human Health
Private Bag 11222, Riddet Rd
Massey University Palmerston North 4474
New Zealand

Хариндер П.С. Маккар

Animal Production Officer
Animal Production and Health Division
Food and Agriculture Organization of the
United Nations
Viale delle Terme di Caracalla
00153, Rome, Italy

Крис Пиотровски

Director, Aunir
Aunir - a division of AB Agri
The Byre, Pury Hill Business Park
Alderton, Nr Towcester
Northants, NN12 7LS
England

Выражаем благодарность

Мы выражаем благодарность д-ру Джиму Балтропу за подготовку первоначального варианта документа. Особая благодарность также выражается г-же Фелисити Джексон и г-ну Леону де Йонгу за их неустанные усилия по сбору информации от других авторов и приведение содержимого документа к единому формату. Мы также благодарны профессору Тиму Херману за предложенные им идеи на начальном этапе подготовки руководства. Отличная поддержка была оказана г-ном Саймоном Маком, бывшим руководителем Подотдела животноводческих производственных систем (AGAS); Филиппом Анкером, текущим руководителем AGAS, и Сэмюэлем Джутзи, бывшим директором Службы животноводства и здоровья животных. Английская версия данного руководства была переведена с помощью сотрудника Субрегионального бюро ФАО для стран Центральной Азии г-на Абдулы Баки Мехрабана. Благодарим г-на Ахроржона Аскарлова за перевод руководства с английского на русский язык.

Глоссарий

Точность. Разница между наблюдаемым или измеренным значением и принятым или «истинным значением». Поскольку точность зависит как от случайных, так и от систематических ошибок, то она может быть определена как сумма систематических и случайных ошибок.

Пустая проба. Проба, не содержащая добавленного аналита, или проба, обработанная таким образом, что желаемая реакция не происходит, например, один из реагентов, используемых для осуществления реакции, отсутствует.

Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение). Стандартное отклонение, поделенное на среднее значение и умноженное на 100.

Контрольная карта. Графический метод для записи измеренных значений, который, посредством использования пределов допустимых отклонений (контрольных границ), помогает определить, является ли процесс устойчивым и соответствующим поставленной цели. Все контрольные карты характеризуются тремя основными компонентами:

Средняя линия – это обычно среднее математическое значение всех нанесённых на график проб. Верхний и нижний статистические контрольные пределы определяют ограничения общепричинных вариаций и технические параметры, наносимые на график с течением времени. Использование карт статистического контроля процесса позволяет отслеживать изменения лабораторных анализов в течение определенного периода времени.

Документ. Контролируемая служебная инструкция, процедура или руководство по эксплуатации, определяющие то, что люди должны делать и как это они должны делать. Слово «контролируемая» означает, что в документе указано, кто его подготовил или кто санкционировал осуществление политики или процедуры, когда он был выпущен, а также его номер версии во избежание использования документа, который больше не актуален. Контроль над документацией, как правило, осуществляется со стороны Менеджера по качеству.

Предел обнаружения (LOD). Самый низкий воспринимаемый сигнал выше фона для определенной процедуры. LOD определяется как среднее значение пустой пробы плюс три стандартных отклонения от среднего значения пустой пробы.

Предел количественного определения (LOQ). Самый низкий экспериментально измеряемый сигнал, полученный в отношении существующего аналита с использованием определенной процедуры. LOQ определяется как среднее значение пустой пробы плюс десять стандартных отклонений от среднего значения пустой пробы.

Линейность. Случай, когда набор точек характеризуется менее чем 3%-м отклонением от прямой линии.

Выпадающее значение (выброс). Данные наблюдений, которые отличаются столь сильно от других данных наблюдений, что вызывает сомнения в отношении того, что они были получены в результате другой или ошибочной процедуры.

Прецизионность. Величина разброса данных вокруг среднего значения.

Квалификационная проба (Внешняя проба по качеству). Проба, предоставляемая внешним источником для сравнения результатов лабораторных исследований между лабораториями, которая может быть использована в качестве внутренней контрольной пробы.

Обеспечение качества. Планируемые и систематические мероприятия, осуществляемые в лаборатории, которые обеспечивают уверенность в точности и надежности полученных результатов.

Контроль качества. Мероприятия, осуществляемые для мониторинга процесса либо для проверки результата и обеспечения того, что все мероприятия выполняются в соответствии с заранее определенными рамками, установленными в лаборатории.

Протоколы. Могут быть электронными или бумажными. К примерам протоколов относятся документы, связанные с цепочкой обеспечения сохранности образцов в лаборатории, результаты проб, данные процессов обеспечения/контроля качества, результаты проверок, протоколы калибровки и т.д.

Стандартная операционная процедура (СОП). Документ, описывающий указанные шаги, предпринимаемые в рамках метода. Этим методом может являться конкретная аналитическая процедура или политика, управляющая более общим аспектом осуществляемой деятельности (например, сведения о профессиональной подготовке, рассмотрение жалоб или использование остатков).

Прослеживаемость. Свойство результатов измерений, в соответствии с которым они могут быть соотнесены с указанными эталонами, обычно представляющими собой международные стандарты, посредством непрерывной цепочки сравнений.

Рабочий контрольный образец. Внутренняя контрольная проба известного значения, анализируемая с каждой группой проб для того, чтобы отслеживать эффективность метода и работу лаборанта (см. таблицу 2).

Введение

Доступность кормов для животных и наличие эффективного питания являются основами для успешного производства животноводческой продукции. Предоставление сбалансированного рациона и правильного состава кормов увеличивает производительность животных, качество продукции и благополучие животных. Также это необходимо для уменьшения загрязнения окружающей среды в результате животноводства, а также предоставления рациона, соответствующего физиологическому состоянию животного.

Обязательным условием для наилучшей защиты здоровья одновременно животных и людей, а также развития торговли между развивающимися и неразвитыми странами, является гармонизация подходов по обеспечению качества.

Устойчивая Система менеджмента качества обеспечивает механизм для соблюдения всех этих критериев и представляет собой систему для осуществления постоянного мониторинга результатов лабораторных исследований и определения возможностей для улучшения.

Наличие Системы менеджмента качества добавляет уверенности руководству, сотрудникам и заказчикам в том, что все технические, административные и человеческие аспекты, которые влияют на качество получаемых результатов, находятся под постоянным контролем с целью предотвращения несоответствия и определения возможностей для улучшения.

Настоящее руководство было подготовлено с целью описания Системы менеджмента качества, которая может быть использована лабораториями по питанию / анализу кормов животных и служить в качестве справочника, который отдельные лаборатории могут использовать для реализации протоколов, соответствующих их конкретным ситуациям. Тем не менее изложенные принципы являются обобщенными и не могут применяться к любой из ситуаций, возникающих в лабораториях.

Система менеджмента качества, описанная в данном руководстве, основана на принципах ISO 17025:2005 и предназначена для того, чтобы помочь персоналу лабораторий поддерживать соответствующие стандарты, предоставляя при этом последовательные, надежные, эффективные и профессиональные услуги в соответствии с уровнем качества, требуемым со стороны заказчиков лабораторий. Эта политика осуществляется посредством приверженности руководства и персонала на всех уровнях применению лабораторной практики, обеспечивающей качество услуг по проведению испытаний, а также получаемых результатов.

Поскольку деятельность различных лабораторий сильно варьируется, важно иметь гибкую, но в то же время обстоятельную Систему менеджмента качества. Персонал лабораторий должен иметь представление о принципах, лежащих в основе обеспечения качества, и должен применять их во всех областях своей деятельности. Только таким образом лаборатории смогут поддерживать доверие к себе, что является самым важным свойством любой лаборатории. Настоящее руководство предоставляет прочную основу для лабораторий, на базе которой они смогут

разработать свою Систему менеджмента качества, соответствующую требованиям международных стандартов.

Руководство разделено на две основные части. В Части I представлены общие аспекты процедур обеспечения качества и принципы надлежащей лабораторной практики, которые должны быть внедрены в лаборатории по анализу кормов. Часть II содержит некоторые базовые процедуры для определения питательных веществ и микотоксинов. Методы, описанные для различных аналитов, были взяты из официально признанных методов, а также из лабораторий, представители которых внесли свой вклад в подготовку настоящего документа. Специалисты этих лабораторий уже используют эти методы в течение многих лет, и эти методы доказали свою надежность. Однако другие методы или варианты методов, представленные в данном руководстве, также могут быть использованы.

В следующую редакцию данного руководства планируется включить ряд важных методов, касающихся кормовых добавок, микробиологических агентов, остатков лекарственных препаратов и других нежелательных веществ, а также связанные с ними подходы по обеспечению качества.

ЧАСТЬ I

**Процедуры обеспечения качества и
принципы надлежащей
лабораторной практики**

Формирование системы качества лабораторных исследований

КАЧЕСТВО И СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

В этом разделе объясняется то, что подразумевается под Качеством и Системой менеджмента качества, и то, как это скажется на деятельности лаборатории и улучшение условий труда в ней.

Что означает «качество»?

Качество определить не легко, однако оно должно устанавливаться аккредитованной лабораторией. Оно может означать разное для разных людей. Тем не менее, во всех аспектах ведения бизнеса понятие «качества» имеет очень важное значение. Будь то производственная или многопрофильная организация, все успешные организации хотят быть ассоциированы со словом «качество».

Так что же такое «качество»? Учебник определяет его так: Качество – это пригодность для конкретной цели.

Международная организация по стандартизации (ISO) выпустила документ под названием «Системы менеджмента качества – основные положения и словарь», в котором слово «качество» определяется как: *Степень соответствия присущих характеристик требованиям.*

Это ясно указывает на то, что достижение качества означает выполнение требований. Требования могут поступать от заказчиков и в некоторых случаях от регулирующих органов.

Как качество может быть достигнуто?

Качество является обязанностью каждого, оно должно формироваться на каждом этапе процесса: от выявления потребностей заказчика, в ходе планирования и реализации, и вплоть до момента выхода аналитических результатов.

В некоторых случаях необходимо осуществлять проверку качества даже после передачи продукции заказчику, так как удовлетворенность заказчика может иметь огромное влияние на оцениваемый ими уровень качества.

Сделаем это реальностью!

Следует понимать, что качество не приходит само собой. Отправной точкой является выявление потребностей заказчика, в результате чего должен быть сформирован план в отношении процессов и ресурсов, а также применения механизмов контроля. Специалист лаборатории должен постоянно оценивать свою деятельность в связи со своими целями и принятыми стандартами с тем, чтобы стремиться к совер-

шенствованию. Поскольку качество не приходит само собой, то существует необходимость создания эффективной Системы менеджмента качества для обеспечения того, чтобы требования выполнялись эффективно и результативно. Настоящее руководство является началом для достижения этой цели.

Система менеджмента качества

Система менеджмента качества направляет и контролирует организацию в части качества путем внедрения стандартных операционных процедур (СОП), которых придерживаются все согласованным образом. Это, в сочетании с регулярными внутренними проверками (аудитами), системой изучения возникающих проблем (отклонений от нормы) и постоянно выявляемыми возможностями для совершенствования, приводит к сокращению случаев появления недостоверных результатов.

Почему необходимо внедрять Систему менеджмента качества?

Наличие документированной системы способствует тому, что весь персонал работает в соответствии с общими стандартами, а заказчики уверены в том, что анализы достоверны и предоставляемые услуги взаимосвязаны. Система менеджмента качества, соответствующая международным стандартам, будет признана во всем мире и соответствовать требованиям международных рынков.

Что должен делать специалист лаборатории с целью обеспечения соответствия требованиям?

При поступлении на работу всем новым сотрудникам должна быть выдана копия настоящего руководства. Сотрудники должны прочитать его и понять его содержание (при необходимости). Сотрудникам также должна быть выдана Карточка учета профессиональной подготовки, где они смогут указать свой опыт и знания в части соблюдения стандарта и следования Системе менеджмента качества, а также свои познания в области процедур проведения анализа на питательную ценность.

Карточка учета профессиональной подготовки

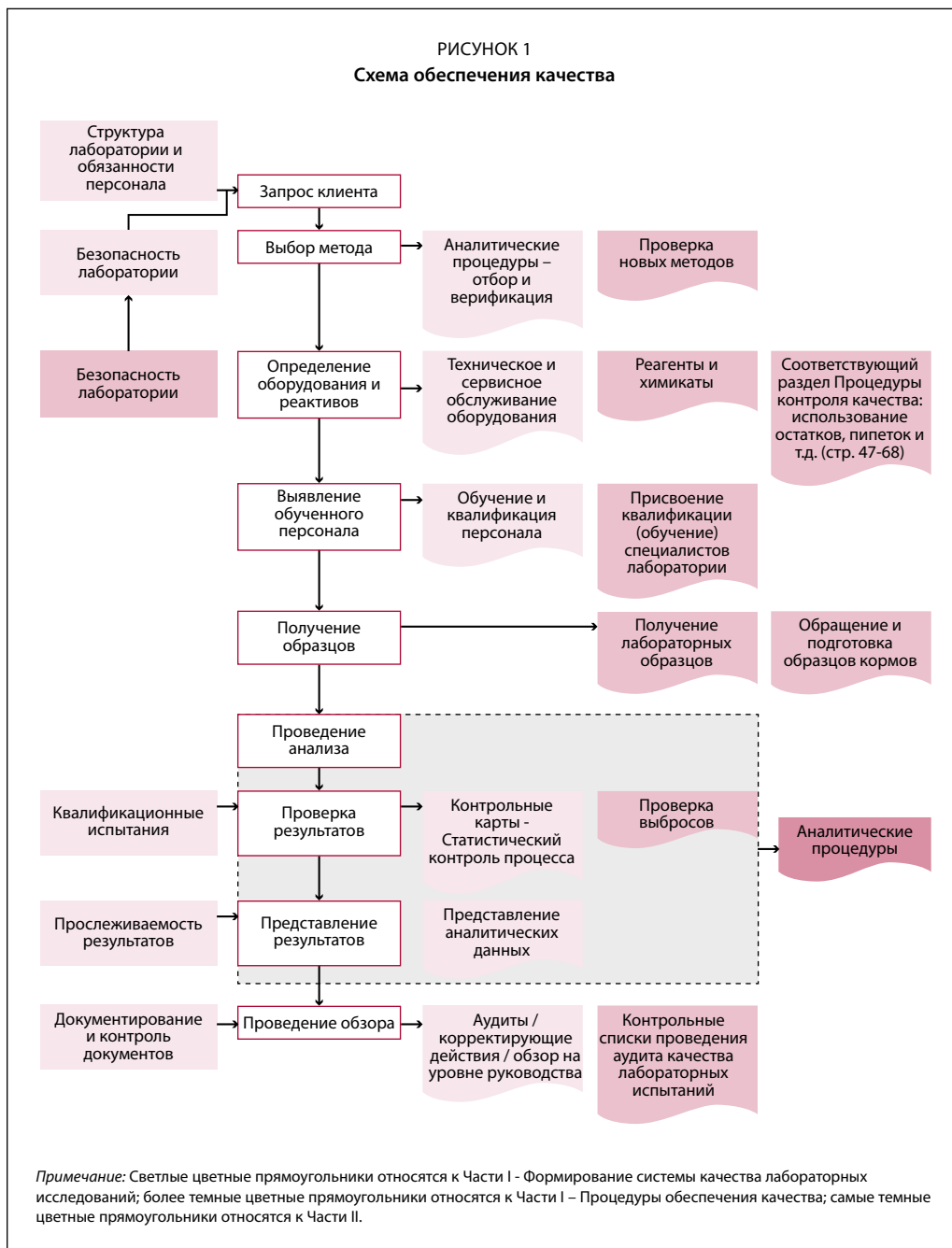
Карточка учета профессиональной подготовки должна отражать опыт и знания для выполнения работы, возложенной на сотрудника. Эта карточка должна храниться у сотрудника и обновляться по мере прохождения обучения согласованно с его руководителем. Карточка учета профессиональной подготовки должна содержать должностные инструкции, организационную структуру, CV (резюме) и доказательство прохождения соответствующего обучения до настоящего времени. После прохождения очередного обучения данный факт проверяется непосредственным руководителем и включается в карточку вместе с описанием самого обучения. Текущий опыт также должен быть отражен посредством включения фактов участия в программах EQA (внешнего контроля качества) и IQA (внутреннего контроля качества), проводимых лабораторией.

ЦЕЛИ И РУКОВОДЯЩИЕ ПРИНЦИПЫ ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ КАЧЕСТВА

Программы по обеспечению качества лабораторных работ являются важной частью улучшения деятельности сельскохозяйственных лабораторий в развиваю-

щихся странах. Руководство по обеспечению качества лабораторных работ является важным источником для информирования сотрудников лабораторий о том, каким образом должны проводиться лабораторные испытания. Строгое соблюдение принципов, изложенных в руководстве по обеспечению качества, со стороны сотрудников лабораторий является необходимым условием для обеспечения каче-

РИСУНОК 1
Схема обеспечения качества



ства и согласованности их действий. Признавая тот факт, что Руководство может не охватить все ситуации и случаи, возникающие в лабораторных условиях, любые существенные отклонения должны быть одобрены менеджментом и должным образом задокументированы.

Руководство лаборатории несет ответственность за качество и целостность всех данных, получаемых в лаборатории. Руководство, в совокупности, обеспечивает это качество путем соблюдения руководящих принципов, лежащих в основе деятельности лаборатории, плана обеспечения качества, а также путем разработки и соблюдения стандартных операционных процедур.

Схема на рисунке 1 представляет собой упрощенное представление Системы менеджмента качества, описанной в данном руководстве, и она не является заменой для процедур, содержащихся в нем.

СТРУКТУРА ЛАБОРАТОРИИ И ОБЯЗАННОСТИ ПЕРСОНАЛА

Каждый сотрудник лаборатории должен иметь четко определенные и задокументированные обязанности (Должностные инструкции). Организационная структура должна быть включена в документ лаборатории по качеству и доступна в сведениях о профессиональной подготовке персонала.

Руководитель/директор лаборатории несет полную ответственность за обеспечение системы качества.

Менеджер по качеству подчиняется непосредственно менеджеру/директору лаборатории и несет ответственность за поддержание и развитие процедур обеспечения качества, используемых в лаборатории.

Лаборанты несут ответственность за соблюдение всех процедур обеспечения качества и определение возможностей для улучшения.

ОБУЧЕНИЕ И КВАЛИФИКАЦИЯ ПЕРСОНАЛА

Наличие квалифицированного и обученного персонала является необходимым условием для получения аналитических результатов приемлемого качества. Руководство лаборатории обеспечивает, чтобы персонал лаборатории обладал знаниями, умениями и навыками для выполнения своих обязанностей. Квалификация сотрудника зависит от его уровня образования, опыта работы, демонстрируемых навыков и профессиональной подготовки. Карточки учета профессиональной подготовки сотрудников содержат информацию об образовании, опыте, навыках и обучении, полученном в рамках занимаемой должности.

Лаборанты проходят через программы обучения в соответствии с методами обучения, принятыми в лаборатории. Лаборант должен продемонстрировать и документально подтвердить свои знания аналитического метода, прежде чем начать предоставлять результаты заказчикам лаборатории. Первым шагом для получения квалификации в части проведения нового анализа является ознакомление со стандартными операционными процедурами (СОП). Копия этого документа может быть получена у менеджера/директора лаборатории. Метод должен быть рассмотрен лаборантом при участии кого-то, кто знаком с процедурой, а затем лаборант должен провести опыты применительно к определенному числу

известных проб или эталонов. Обучение должно быть задокументировано в индивидуальной карточке учета профессиональной подготовки. В целях обеспечения безопасности окружающих, обучаемый должен ознакомиться с Паспортом безопасности материалов (MSDS) для получения информации о каждом химическом веществе, используемом в анализе. Необходимо четко понимать уровни токсичности и способы утилизации отходов перед началом любого анализа. Количество проб и анализируемые эталоны должны определяться руководителем. Результаты должны сопоставляться с полученными ранее результатами с использованием парного t-критерия (критерия Стьюдента). Если нет значительной разницы при уровне достоверности в 95%, то новый лаборант может считаться аттестованным. Компетентность должна подтверждаться участием на регулярной основе в программах Внутреннего контроля качества (IQA) или в тестах на кольцевые реакции.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ – ОТБОР И ВЕРИФИКАЦИЯ

Если заказчик не указал метод, который должен использоваться, то предпочтение отдается признанному (ISO, CEN, AOAC, FDA и др.) стандартному методу. Если стандартный метод не был найден, то лаборатория может использовать любой нестандартный метод или изменить метод для использования по согласованию с заказчиком. Лаборатория информирует заказчика в случае, когда метод, предложенный заказчиком считается неподходящим для достижения поставленной цели. Правильность стандартного и нестандартного или модифицированного метода должна быть в достаточной степени подтверждена лабораторией, прежде чем он будет использоваться для представления данных.

Когда лаборатория разрабатывает методы для своего собственного использования, у нее существует порядок по их внедрению.

Нестандартные методы – это методы, взятые не из авторитетных, проверенных источников. Нестандартный метод не претерпел валидации, к которой, например, относятся совместные исследования или процессы для оценки эффективности возможностей метода.

Нестандартные методы выбираются для использования в случаях, когда запрос заказчика не может быть решен посредством использования стандартного метода. Такие методы являются предметом согласования с заказчиком и проходят через соответствующую валидацию.

Валидация представляет собой подтверждение правильности метода посредством проведения исследования и предоставления объективных доказательств того, что соблюдаются конкретные спецификации для предполагаемого использования.

Лаборатория осуществляет валидацию стандартных методов, нестандартных методов, разработанных в лаборатории методов и модифицированных стандартных методов, включая их использование за пределами предусмотренной области применения. Валидация проводится с целью подтверждения того, что методы подходят для использования по назначению. Рабочие характеристики всех методов проверяются до их применения для формирования отчетных данных.

Процесс валидации направлен на удовлетворение потребностей данной области применения. Параметры и цели качества данных включают в себя, но не ограничиваются следующими:

- Точность
- Прецизионность
- Предел обнаружения (LOD)
- Предел количественного определения (LOQ)
- Линейность

Искомые пределы точности и прецизионности могут быть взяты из AOAC (Horwitz). Прецизионность или повторяемость рассчитывается как относительное стандартное отклонение (коэффициент изменчивости), а точность рассчитывается как процентная мера выхода (табл. 1).

СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ (СОП)

СОП зависят от места применения, для которого они написаны. Утверждение SOP означает, что определенная область может подвергаться определенному действию или поведению. СОП могут быть написаны компетентным сотрудником внутри лаборатории. Содержимое SOP затем анализируется и утверждается руководителем или менеджером в отношении области применения, для которой будут использоваться СОП. После того, как SOP были рассмотрены и признаны приемлемыми руководителем или менеджером, SOP передаются Менеджеру по качеству для их утверждения и выпуска.

Формат написания СОП должен включать в себя следующие пункты, при необходимости:

- Принцип
- Область применения
- Ответственности сторон
- Оборудование
- Реагенты
- Метод
- Контроль качества
- Расчеты
- Поиск и устранение проблем
- Примечания
- Полезные ссылки
- Приложение (блок-схемы, таблицы, список литературы и т.д.)

СОП являются контролируруемыми документами и должны включать в себя дату выпуска (или вступления в силу), фамилии автора (ов) и лица (лиц), разрешающих использование SOP, дату внесения изменений и номер версии. При выходе новой версии SOP, «Журнал обновлений» в начале документа будет содержать внесенные изменения. При выходе новой версии SOP все предыдущие контролируемые версии должны быть отозваны.

Рекомендуется запретить доступ к неконтролируемым версиям СОП.

ТЕХНИЧЕСКОЕ И СЕРВИСНОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ

Процедуры, используемые для определения, поддержания и мониторинга рабочих характеристик приборов, являются неотъемлемой частью программы контроля качества, так как они вселяют высокую уверенность в получаемых аналитических результатах. Каждая процедура описана в соответствующих СОП для оборудования. Все основное испытательное оборудование имеет свои СОП и журнал технического обслуживания, в котором документируются проводимое текущее, калибровочное и плановое техническое обслуживание. Сотрудники, применяющие в своей работе основное оборудование, должны обладать соответствующей подготовкой, которая указывается в их карточке учета профессиональной подготовки.

Техническое обслуживание. Полные и точные инструкции по установке, руководства по эксплуатации, руководства по запасным частям, руководства по техническому обслуживанию и письменные гарантии или договора хранятся вместе с каждым прибором для обеспечения их надлежащего функционирования. Важное значение имеет проведение программы профилактического технического обслуживания, которая включает в себя испытание оборудования на соответствие требованиям и осуществление процедур частой калибровки, проверки и очистки. Рабочие характеристики приборов и оборудования оцениваются на регулярной основе, чтобы гарантировать то, что оборудование или прибор продолжает функционировать должным образом и имеет соответствующие данные за прошлый период в целях проведения последующей проверки и оценки. Плановые работы по техническому обслуживанию, включающие в себя очистку, регулировку, замену частей или смазку, выполняются на каждом приборе ответственным лицом в соответствии с инструкциями, приведенными в руководстве по эксплуатации прибора, или на основе предыдущего опыта.

Все задачи по обслуживанию и ремонту, выполняемые лаборантом или представителем сервисной службы, отражаются в текущем операционном журнале прибора отдельно для каждого прибора. Лаборанты должны сообщать обо всех неисправностях немедленно лицу, ответственному за прибор, и четко указывать, что он «НЕ В ПОРЯДКЕ», когда происходит сбой.

При наличии такой возможности должны быть заключены контракты на техническое обслуживание, включающие в себя полугодичное/годовое техническое обслуживание некоторых частей оборудования.

Калибровка. Достоверность получаемых аналитических результатов тесно связана со значениями рабочих характеристик приборов, используемых для проведения анализа. Поэтому очень важно, чтобы для каждого прибора и каждого метода были установлены надлежащие процедуры калибровки, а результаты калибровки фиксировались и использовались в качестве основы для регулярной оценки значений рабочих характеристик прибора. Калибровочные требования метода включаются как часть метода. Процедуры калибровки оборудования/прибора и соответствие результатов национальным стандартам должны документироваться. Сертифицированные весы и термометры должны быть в наличии и использоваться, а документация храниться в лаборатории.

Инвентаризация. Постоянная инвентарная ведомость всего оборудования хранится у Менеджера/Директора лаборатории. Эта ведомость содержит наименова-

ние оборудования, номер модели, серийный номер, наименование производителя, дату приобретения, первоначальную стоимость и текущее местонахождение, а также любой уникальный идентификатор, присвоенный на месте.

Запасные части и расходные материалы. Лаборант должен вести список имеющихся в наличии запасных частей, необходимых для обеспечения функционирования прибора, а также пересматривать этот список как минимум один раз в год. Этот список должен храниться в операционном журнале прибора.

Ответственный сотрудник. Ответственный сотрудник закрепляется за основным оборудованием. Этот человек, как правило, является основным пользователем системы. В случае, если оборудование используется совместно, ответственный сотрудник осуществляет выполнение проверок и технического обслуживания, а операторы осуществляют проверку калибровки, проверяют на соответствие стандартам, эксплуатируют прибор правильным образом, записывают данные в соответствии с требованиями и информируют ответственного работника о каких-либо отклонениях от нормы или сбоях.

В обязанности ответственного сотрудника входят следующие:

- 1) Хорошо ознакомиться, посредством прохождения обучения и накопления опыта, с функционированием, техническим обслуживанием и применением прибора.
- 2) Инструктировать и помогать другим в использовании прибора.
- 3) Проводить плановые проверки рабочих характеристик прибора, как это указано в руководствах по прибору и лабораторных инструкциях.
- 4) Выполнять плановые задачи по обслуживанию в соответствии с руководством по прибору.
- 5) Обеспечивать заполнение операционного журнала или книги при каждом использовании прибора.
- 6) Обеспечивать легкую доступность и обновление (по мере необходимости) руководств по прибору.
- 7) Формировать перечень запасных частей, необходимых для поддержания работоспособности прибора, а также обеспечивать наличие достаточного количества этих запасных частей. В качестве альтернативы с подходящим субподрядчиком может быть заключен договор на сервисное и техническое обслуживание.
- 8) Должен быть определен и назначен его заместитель для выполнения этих задач в отсутствие Ответственного сотрудника.

Операционный журнал прибора. Основная цель операционного журнала прибора заключается в обеспечении постоянной регистрации значений рабочих характеристик прибора; этот журнал используется как основа для валидации данных и планирования работ по ремонту и замене частей, а также для новых приобретений. Если это применимо, то номер контракта на сервисное обслуживание также записывается в журнале.

Каждый раз при использовании прибора лаборанту необходимо записывать необходимую информацию в журнал, что предоставит лаборатории информацию о применении прибора, его рабочих характеристиках, а также любом проведенном техническом обслуживании и ремонте.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Каждая процедура должна указывать на применимый диапазон аналита, к которому она может быть применена с гарантией определенной практической значимости (ограничение испытания). Лаборант обязан выдавать численные значения, которые включают только те цифры, в которых он уверен, плюс одна цифра, определяемая по итогам оценки. Эту группу цифр называют значащим разрядом. Если выдана более чем одна недостоверная цифра, то пользователь может быть введен в заблуждение относительно точности, с которой проводится измерение или серия измерений. Для стандартизации представления лабораторных данных должны быть использованы два условия. Первое условие касается округления чисел, а второе – представления значащих цифр. Когда нужно округлить данные, необходимо округлить число в большую сторону, если его правая цифра ≥ 5 . Если последняя отбрасываемая цифра < 5 , то необходимо оставить последнюю оставшуюся цифру неизменной. Если цифрой справа является 5, за которой следуют только нули, то необходимо округлить до ближайшего четного числа.

Определение, предложенное для значащих цифр, заключается в том, что они включают в себя все достоверные цифры в результате плюс одно недостоверное значение. Положение десятичной точки не имеет значения. При представлении данных необходимо использовать следующие правила для определения количества значащих цифр:

- 1) Представьте ровно столько значащих цифр, сколько находятся в наименее точном измерении, и
- 2) Предоставьте пользователю наиболее лучшую оценку погрешностей в измерении.

Некоторые примеры: Если справа и слева от нуля находится другая цифра, это всегда важно; так число 306 имеет три значащие цифры. Если нуль используется для фиксации десятичной точки, это никогда не важно; так число 0,0024 имеет две значащие цифры, а число 0,00240 имеет три значащие цифры.

ТОЧНОСТЬ И ЭТАЛОННЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для обеспечения точности процедуры контрольный образец (рабочий эталон) с известными и стабильными значениями должен применяться с каждой серией и оцениваться посредством контрольной карты (см. раздел по контрольным картам).

Эталонный материал может являться Эталонным материалом (RM) чистого вещества, а восстановление аналита будет мерой точности метода.

Для большинства анализов кормов, однако, используется Сертифицированный эталонный материал (CRM) или лабораторный эталонный образец (HRM).

CRM может быть получен у организаций, занимающихся проведением квалификационных испытаний кормов для животных (Таблица 4), а эталонные значения определяются несколькими лабораториями посредством применения нескольких независимых подтвержденных методов испытаний. Лаборатория может также сама получить свой эталонный образец. Должен быть выбран такой кормовой материал, который был бы репрезентативным для основной массы образцов кормов, анализируемых в лаборатории. Этот образец должен быть проанализирован в двух повторностях, по крайней мере в рамках 6 различных опытов, проведенных в тече-

ние нескольких дней/недель. В рамках этих опытов предпочтение отдается анализу CRM, и только тогда, когда значения CRM находятся в рамках контрольных границ, результаты HRM могут быть приняты во внимание. Прежде чем вычислить среднее значение и значение стандартного отклонения, сильно отклоняющиеся результаты необходимо удалить. Из HRM необходимо выделить достаточную долю материала; эта доля должна быть достаточной для, по крайней мере, шести месяцев, а оставшаяся доля должна быть помещена в морозильную камеру. Контрольная карта должна регулярно оцениваться на предмет выявления тенденций, которые могут указывать на ухудшение качества выделенной доли. Тот же самый HRM может использоваться для нескольких методов в лаборатории.

ПРЕЦИЗИОННОСТЬ И ДВОЙНЫЕ СЛЕПЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для увеличения прецизионности результатов (уменьшения разброса) все анализы предпочтительно проводить в двух повторностях. Поскольку это не всегда возможно из-за финансовых причин или количества образцов, рекомендуется, чтобы опыты над не менее 10% образцов в партии проводились в двух повторностях. Дублируемые образцы должны быть по возможности неизвестны лаборанту (двойной слепой подход), что обеспечит прецизионность образцов, анализируемых единожды. Допустимый диапазон повторяющихся результатов варьируется в зависимости от метода, требований заказчика и матрицы проб. Относительный диапазон или относительная процентная разница может быть рассчитана следующим образом:

Относительная процентная разница = $(X_1 - X_2) \times 100 /$ среднее повторных значений, где:

X_1 = наибольшее повторное значение

X_2 = наименьшее повторное значение

Инструкции по аналитической вариации, которую можно ожидать при анализа образца дважды (Таблица 1). Аналитическая вариация в этом случае в два раза превышает коэффициент вариации или относительное стандартное отклонение:

ТАБЛИЦА 1

Аналитические вариации (aV) в [%]; x = концентрация аналита

аналит	aV (%)
Влажность (сухая масса)	12
Белки	$20/x + 2$
Жиры	10
Сырая клетчатка	$30/x + 6$
Зола	$45/x + 3$
Всего сахара, инвертного	12
Кальций	10
Фосфор	$3/x + 8$
Соль	$7/x + 5$
Витамин а	30

Источник: Американская ассоциация государственного контроля за качеством кормов, Официальная публикация, 2011 год, стр. 298-299.

Инструкции касательно точности или процента восстановления образцов контроля качества можно найти в документе AOAC «Международные руководящие принципы для единичной лабораторной валидации химических методов» (Таблица 2).

ТАБЛИЦА 2

Допустимые пределы восстановления

Концентрация	Пределы восстановления (%)
100%	98 - 101
10%	95 - 102
1%	92 - 105
0,1%	90 - 108
0,01%	85 - 110
10 мкг/г (частей на миллион)	80 - 115
1 мкг/г (частей на миллион)	75 - 120
10 мкг/кг (частей на миллиард)	70 - 125

Для вычисления процента восстановления эталонного материала:

Процент восстановления % = $(X_r / X_k) \times 100$,

где:

X_r = наблюдаемое значение эталонного материала

X_k = подтвержденное или истинное эталонного материала

ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку все измерения, проводимые лабораторией, должны быть прослеживаемыми в соответствии с Международной системой единиц (СИ), привлекаемые по контракту метрологи должны представить доказательства прослеживаемости своих собственных измерительных эталонов и измерительных приборов в соответствии с системой СИ. Кроме того, они должны предоставить документы, подтверждающие способность проведения измерений и свою компетентность для выполнения калибровочных работ, запрашиваемых лабораторией. Калибровочные сертификаты на лабораторные приборы (весы, пипетки и т.д.) должны включать в себя результаты измерений наряду с погрешностями измерений, а также отчет о соответствии установленной метрологической спецификации. Приобретенные эталоны должны сопровождаться сертификатами анализа.

КВАЛИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ (ВНЕШНИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА)

Участие в программах квалификационных испытаний образцов позволяет оценить точность и прецизионность проведения лабораторных работ. Где это возможно, матрицы и испытания в рамках программы должны совпадать с лабораторными. Для оценки эффективности работы лаборатории рассчитывается значение «Z». Любое значение $Z \leq 2$ является удовлетворительным, значения между 2 и 3 являются сомнительными, а любое значение ≥ 3 является неудовлетворительным, тре-

бующим расследования и корректирующего действия. Значение Z рассчитывается на основе разницы между результатом лаборатории и результатом, полученным в рамках программы, и деления этой разницы на стандартное отклонение, полученное в рамках программы. Другими словами, значение Z определяет то, на сколько стандартных отклонений результаты лаборатории отличаются от согласованного значения. Американская ассоциация государственного контроля за качеством кормов (AAFCO), Американская ассоциация химиков по переработке зерновых продуктов (AACC), Американское общество нефтехимиков (AOCS) предоставляют такие программы. Европейская информационная система по схемам проверки профессиональной компетентности (EPTIS) поддерживает текущий список доступных квалификационных программ. В лаборатории должен иметься график участия в квалификационных схемах (Таблица 3).

ТАБЛИЦА 3

Организации, предоставляющие профессиональный анализ и эталонные образцы кормов для животных

Организация	Адрес	Телефон	E-mail	Веб-сайт
AAFCO (Американская ассоциация государственного контроля за качеством кормов)	175 S. University Street IN47907-2063 West Lafayette Indiana USA	+1 7654941565	vsiegel@purdue.edu	www.aafco.org
IAG – Feedingstuffs (Международная аналитическая группа, раздел корма)	191 Spargelfeldstrasse 1220 Vienna Austria	+43 5055532700	renate.oeschlmueeller@ages.at	www.ages.at
BIPEA (Международное Бюро аналитических исследований)	6-14 av. Louis Roche F-92230 Gennevilliers France	+33 147335460	Contact@bipea.org	www.bipea.org
FAPAS (Схема оценки проведения испытаний пищевых продуктов)	Sand Hutton YO41 1 LZ York UK	+44 1904462100	info@fapas.com	www.fapas.com
LGC (Лаборатория правительственных химиков)	1 Chamberhall Business Park BL9 0aP Lancashire UK	+44 1617622500	customersservices@lgcpt.com	www.lgc.co.uk
WEPAL (Программы оценки университета Wageningen для аналитических лабораторий)	P.O. box 8005 NL-6700 EC Wageningen The Netherlands	+31 317482337	info.wepal@wur.nl	www.wepal.nl

КОНТРОЛЬНЫЕ КАРТЫ - СТАТИСТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОЦЕССА

Для обеспечения статистически управляемого состояния лабораторных методов работа лаборатории должна оцениваться при помощи контрольных карт. Карты средних значений или X-гистограммы предназначены для нанесения на них изменений значений долгосрочных средних показателей для образца, анализируемого посредством конкретного метода. Карты диапазона или R-гистограммы предназначены для нанесения на них изменений в повторяемости процедуры. Если статистическое программное обеспечение не доступно, то данные могут быть построены с использованием следующих процедур:

Постройте основные карты, рассчитав долгосрочные или общие средние значения и общий средний размах путем усреднения, по крайней мере, 6 комплектов дубликатов, полученных в течение 3 дней. Создайте X-гистограмму, нарисовав непрерывную горизонтальную линию по центру страницы, обозначьте ее "0", нарисуйте пунктирные линии на уровне $\pm 1,25$ (они представляют собой предупреждающие границы при 95%-й уверенности). Нарисуйте еще две линии на уровне $\pm 1,88$. Они представляют собой контрольные границы при 99%-й уверенности. Нанесите на оси у эти значения и что они собой представляют; так 1,88 является верхней контрольной границей, а -1,88 – нижней контрольной границей. Найдите среднее значение двух результатов контрольных образцов. Рассчитайте и нанесите Z-значения вдоль оси Y с соответствующей датой вдоль оси X. Z-значение = (среднее двух контрольных значений за минусом общего среднего), разделенное на общий средний размах. Постройте R-гистограмму, нарисовав непрерывную горизонтальную линию в нижней части страницы и обозначив ее "0". Нарисуйте пунктирные линии: одну на уровне $\pm 2,51$, что представляет собой предупреждающую границу при 95%-й уверенности, а вторую на уровне $\pm 3,27$, что представляет собой контрольную границу при 99%-й уверенности. Разделите разность между двумя контрольными образцами на общее среднее значения размаха контрольных значений и нанесите это значение на карту вдоль оси Y с соответствующей датой вдоль оси X.

Контрольные карты должны оцениваться после проведения анализа и проверки каждой группы образцов с тем, чтобы убедиться, что они находятся в пределах спецификации, прежде чем результаты доводятся до сведения заказчика.

Процесс находится под контролем, если:

- 1) Все точки на X-гистограммах и R-гистограммах находятся внутри контрольных границ (с учетом ограничений, перечисленных ниже).
- 2) Одно и только одно среднее значение среди последних 20 значений находится вне контрольных границ, а значение диапазона не так.
- 3) Одно и только одно значение диапазона среди последних 20 значений находится вне контрольных границ, а среднее значение не так.
- 4) Конкретная причина нахождения точки за пределами контрольной границы была выявлена и устранена.

Процесс вышел из-под контроля в отношении среднего значения (X-гистограмме), если:

- 1) Более одной средней точки среди последних 20 точек превысили верхнюю или нижнюю контрольные границы, однако диапазон находится под контролем.
- 2) Оба отдельных значения средней величины для данного контрольного значения находятся вне предупреждающей границы, даже если средняя величина не так.
- 3) Семь последовательных средних величин находятся на одной стороне линии "0".
- 4) Семь последовательных средних величин попадают в последовательную восходящую или нисходящую модель.

5) Существует серия из четырех средних величин между верхней предупреждающей границей и верхней контрольной границей или между нижней предупреждающей границей и нижней контрольной границей.

Процесс вышел из-под контроля в отношении диапазона (R-гистограмма), если:

- 1) Более одной точки среди последних двадцати точек превысили контрольную границу и оба значения x находятся вне предупреждающих границ на X -гистограмме.
- 2) Точки на X -гистограмме и R -гистограмме находятся вне контрольных границ.
- 3) Семь последовательных точек попадают в последовательную восходящую или нисходящую модель точек.
- 4) Существует серия из четырех точек между предупреждающей границей и контрольной границей.

Метод не вышел из-под контроля, если лаборант знает, что он сделал что-то не то или что испытал некоторые трудности с методом или оборудованием при испытании данного набора. Это должно быть зафиксировано в соответствующем журнале. Контрольные карты позволяют только определить, может ли наблюдаемая вариация быть описана посредством случайной вариации. Приемлемая вариация или границы определяются заказчиком лаборатории.

На Рисунках 2 и 3 приведены примеры Контрольных карт средних значений и диапазона.

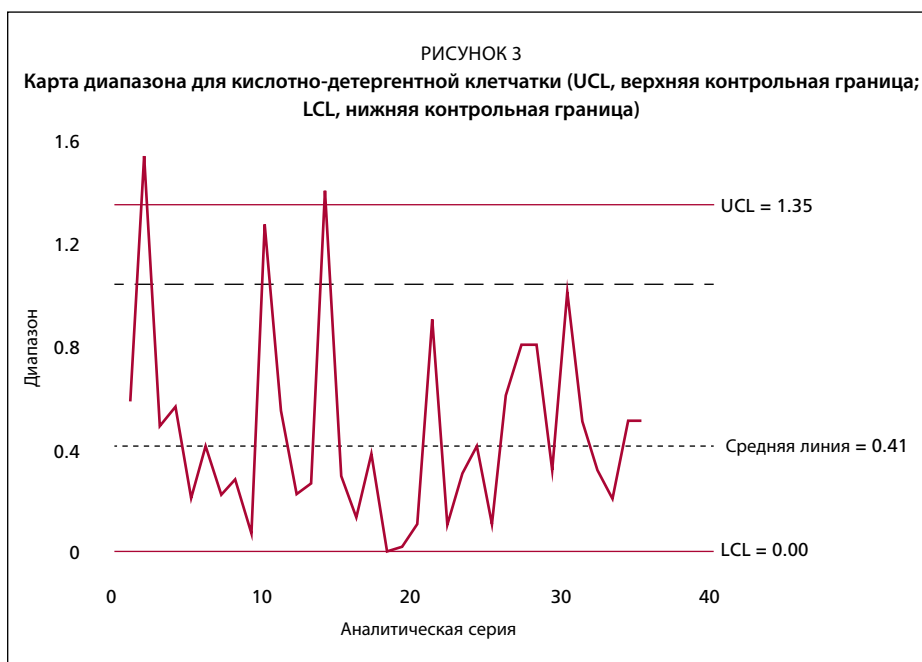
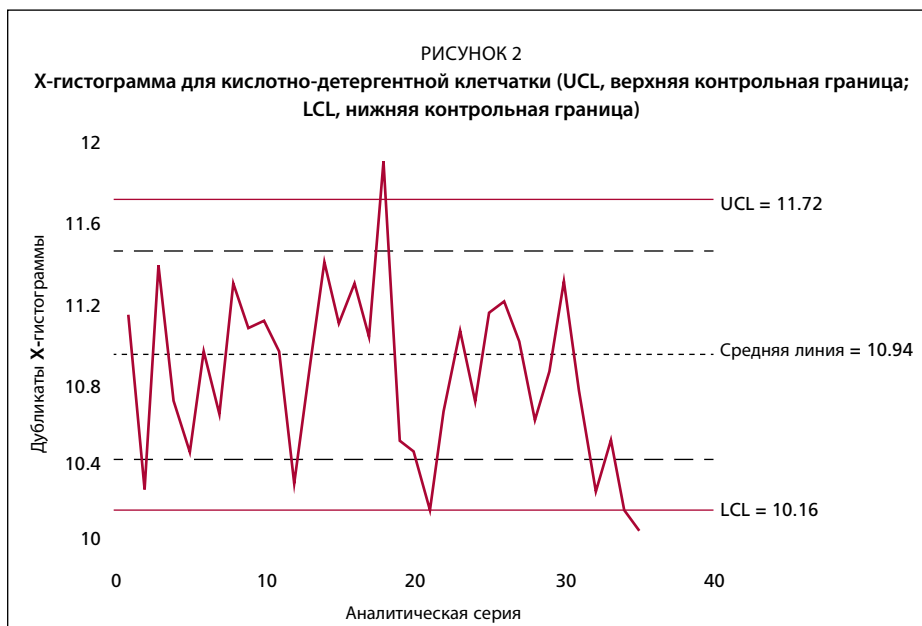
ДОКУМЕНТАЦИЯ И КОНТРОЛЬ ДОКУМЕНТОВ

В отношении документов по качеству, составляющих систему менеджмента качества, необходимо осуществлять должный контроль. Процедуры контроля документов в лаборатории описывают процесс контроля таких документов по качеству, необходимых для формирования лабораторных данных. Эти документы включают в себя документы, опубликованные лабораторией, а также документы, опубликованные внешними организациями. Поступившие извне документы включают в себя регламенты, стандарты, методики испытаний, инструкции и руководства.

Прежде чем выдать для использования сотрудниками лаборатории документов, являющиеся частью системы менеджмента качества, они должны пройти через проверку и утверждение в соответствии с процедурами контроля и управления документами, действующими в лаборатории. В «мастер-листе» процедур лаборатории указывается статус текущей версии и порядок распространения документов. За счет использования такого «мастер-листа» обеспечивается передача персоналу только качественных документов, чтобы предотвратить использование устаревших документов.

Наличие у лаборатории «мастер-листа» и процедуры контроля и управления документами гарантирует, что:

- Официальные документы системы менеджмента качества и внешние документы доступны в местах их использования.
- Документы анализируются и пересматриваются в соответствии с графиком в целях обеспечения постоянной пригодности и соответствия требованиям системы менеджмента, а соответствующая дата изменения указывается для каждого документа.



- Недействительные или устаревшие документы оперативно изымаются из всех мест выпуска или использования для недопущения их непреднамеренного использования.
- Устаревшие документы, сохраняемые в юридических или информационных целях, помечаются как архивные или устаревшие.

- Во избежание одновременного использования различных процедур в разных местах не должны быть разрешены ручные правки или неконтролируемые копии.
- Контрольный заголовок документа, как это указано в процедурах контроля и управления документами, действующих в лаборатории, однозначно определяет документы системы менеджмента, разработанные лабораторией. Такая идентификация включает в себя дату изменения, идентификационный номер, сведения об организации, выпустившей документ, и общее число страниц.
- Предлагаемые изменения в документах анализируются и утверждаются в соответствии с процедурами контроля и управления документами, действующими в лаборатории. Эта процедура должна осуществляться теми же сотрудниками, которые делали первоначальный анализ или утверждение, если специально не назначены другие лица.
- Измененный или новый текст должен быть идентифицирован в документе, на титульной странице или в соответствующих приложениях. Журнал изменений, добавленный на первую страницу нового документа, упрощает идентификацию любых изменений.
- В процедурах контроля и управления документами, действующими в лаборатории, указывается порядок контроля электронных документов системы менеджмента качества.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ

Являясь сотрудником лаборатории вы обязаны делать свою работу хорошо и безопасным образом. Одним из приоритетов лаборатории является предоставление своим сотрудникам рабочего места без явных и предотвратимых рисков для их здоровья и безопасности.

Безопасность, однако, не может быть предоставлена в качестве полномочий; также она не является чем-то, что можно передать сотруднику. Скорее, сотрудники должны сами осуществлять сознательные действия для обеспечения безопасных условий для себя и других сотрудников в рамках рабочей зоны. Это требует от сотрудников понимания потенциальных рисков на рабочем месте и знания процедур и правил, необходимых для минимизации этих рисков.

В любой рабочей среде, особенно в лаборатории, неизбежно имеются источники риска. Во избежание рисков телесных повреждений каждый сотрудник должен знать, как использовать инструменты и оборудование безопасным образом, и должен быть проинформирован о том, что делать в случае пожара, травмы или другой чрезвычайной ситуации. Тем не менее, одной информации недостаточно. Безопасность на рабочем месте обеспечивается надлежащим отношением к данному вопросу, равно как и познаниями в этой области. Это означает признание того, что несчастные случаи не ограничиваются лишь теми людьми, которые не знают, как их предотвратить. Зачастую жертвой несчастного случая становится «закаленный в боях» ветеран, человек, который «знает лучше всех», у которого эта осведомленность притупляет чувство осторожности.

Ваши действия всегда должны быть осознанными. Это включает в себя вашу личную приверженность делать каждую работу безопасным образом.

Другие сотрудники должны предупреждаться об опасности, если они не придерживаются мер безопасности; эти случаи **должны документироваться**.

Должны быть определены руководители и сотрудники по технике безопасности. Эти сотрудники должны немедленно уведомляться в случае наличия дефектного оборудования или других потенциальных опасностей.

Принимая участие в работе комитетов по безопасности, оказывая помощь в проведении инспекций по безопасности и каждый раз обеспечивая выполнение всех мер безопасности, вы можете гарантировать, что все работы выполняются в безопасном режиме.

Никакая работа не важна, если нет времени, чтобы сделать ее правильно и безопасно!

Для получения дополнительной информации по вопросам охраны труда и техники безопасности в лаборатории см. раздел «Техника безопасности в лаборатории» (см. стр. 61).

ПРОВЕРКИ / КОРРЕКТИРУЮЩИЕ ДЕЙСТВИЯ / АНАЛИЗ СО СТОРОНЫ РУКОВОДСТВА

Внутренние проверки (аудиты) проводятся по мере необходимости (минимум один раз в год). Внутренние проверки проводятся для того, чтобы убедиться в том, что деятельность по-прежнему соответствует требованиям системы менеджмента качества.

Программа внутренней проверки должна охватывать все элементы системы менеджмента, включая деятельность по проведению испытаний. Менеджер по качеству лаборатории отвечает за координацию проведения внутренних проверок в дополнение к другим дополнительным проверкам, осуществляемым по требованию руководства или в результате выявленных отклонений от нормы.

Обученные и квалифицированные сотрудники несут ответственность за проведение внутренних проверок. Такие сотрудники могут проводить проверки в рамках своей области компетенции, но не должны проверять свою собственную работу.

Если в результате проведенной проверки возникают сомнения в эффективности деятельности либо в правильности или достоверности результатов проведенных испытаний, то лаборатория должна своевременно предпринять корректирующие действия.

Заказчик уведомляется, если расследования показывают, что несоответствия, связанные с результатами проверки, затронули работу, выполненную для заказчика. Это уведомление документируется и проводится оценка воздействия для выявления возможных неправильных результатов, полученных до выявления проблемы.

Область проверяемой деятельности, результаты проверки и корректирующие и предупреждающие действия (CAPA), которые вытекают из них, регистрируются в соответствии с процедурой проверки, действующей в лаборатории.

Последующие проверки проводятся для того, чтобы удостовериться и зафиксировать результаты выполнения корректирующих действий и их эффективность. Такие меры включаются в качестве части процесса анализа со стороны руководства.

Процедура анализа со стороны руководства в лаборатории включает в себя график проведения анализа со стороны руководства. Этот анализ проводится

исполнительным руководством лаборатории для обеспечения постоянной пригодности и результативности системы менеджмента, а также внесения необходимых изменений и выявления возможностей для совершенствования.

Процесс анализа со стороны руководства включает в себя следующие элементы системы менеджмента, но не ограничивается ими:

- пригодность политики и процедур;
- отчеты руководящих и контролирующих сотрудников;
- результаты последних внутренних проверок;
- корректирующие и предупреждающие действия;
- оценки, проведенные сторонними органами;
- результаты межлабораторных сравнительных испытаний (квалификационных испытаний);
- изменения объема и вида работы;
- обратную связь с заказчиками;
- претензии; и
- другие факторы, такие как деятельность по управлению качеством, ресурсы и подготовка персонала.

Выводы и действия, которые вытекают из анализа со стороны руководства, регистрируются в соответствии с процедурой анализа со стороны руководства, принятой в лаборатории. Каждое такое действие включает в себя установленные сроки для принятия решения.

Процедуры обеспечения качества

ВАЛИДАЦИЯ НОВЫХ МЕТОДОВ

Общая информация

Эта процедура описывает то, каким образом лаборатория должна выбирать и осуществлять валидацию новых лабораторных аналитических процедур. Лаборатория будет использовать методы, которые отвечают потребностям их заказчиков. Стандартные методы являются более предпочтительными; однако, нестандартные методы и методы, разработанные лабораторией, могут быть использованы тогда, когда они считаются более подходящими.

Область применения

Эта процедура применяется для всех аналитических процедур, используемых в лаборатории.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Процедуры

Выбор метода

Необходимость в новом методе определяется в каждом конкретном случае. Этот процесс может инициироваться Менеджером лаборатории, Менеджером по качеству, Лаборантом или заказчиком.

Доступные методы изучаются и оцениваются Лаборантом и Менеджером лаборатории. В качестве части процесса оценки осуществляется анализ затрат-выгод. Выбранный метод утверждается Менеджером по качеству.

Валидация/Верификация метода

1. Определение процедур разработки методов (Менеджер по качеству).
2. Руководитель/директор лаборатории назначает лаборанта(ов) для проекта.
3. Лаборант закупает соответствующие химические вещества, материалы и оборудование.
4. Лаборант готовит письменную документацию, описывающую процедуры, которые будут использованы. ПРИМЕЧАНИЕ: Зачастую требуется вносить изменения в используемые процедуры.

5. Менеджер по качеству утверждает процедуры.
6. Лаборант собирает предварительные данные и представляет результаты для рассмотрения Менеджеру по качеству.
7. Лаборант завершает сбор данных.
8. Руководитель/директор лаборатории анализирует данные, готовит краткие выводы и предоставляет отчет Менеджеру по качеству.
9. Определяются СОП.

Минимальные критерии приемки

1. **Точность/Выход.** Минимум 7 независимых анализов в расчете на один уровень концентрации, охватывающий аналитический диапазон. Желательно использовать сертифицированные эталонные материалы (CRM). Если CRM не доступны, то могут быть использованы образцы программ квалификационных испытаний. Очищенные эталоны/химические вещества могут быть использованы, если не имеется других эталонных образцов. Также могут потребоваться спайковые пробы. Наименее предпочтительным методом для определения точности является сравнение результатов с теми результатами, которые были получены с помощью другой, уже прошедшей через валидацию процедурой.
2. **Прецизионность.** Обычно для проведения одной лабораторной валидации Лаборант должен выполнить r повторных анализов m проб образца в течение d дней для каждого типа (матрицы) образца n , где r – количество повторов (2, 3, ...), m – количество проб образца в каждой группе, d – количество дней, а n – количество различных типов образцов.
 $r \times m$ никогда не должно быть менее
 n должно быть не менее 2 (желательно больше)
 d должно быть не менее 2
3. **Калибровка.** Калибровочная линия должна включать в себя 4-5 контрольных точек. Калибровки по одной точке должны использоваться с осторожностью. Достижение коэффициента корреляции $> 0,99$ должно являться целью, однако с современным программным обеспечением для построения кривых по точкам также приемлемыми считаются нелинейные калибровочные линии.

ТАБЛИЦА 1

Искомые пределы точности и прецизионности

Концентрация	Повторяемость (%)	Выход (%)
100 %	1,3	98 – 102
10 %	1,9	98 – 102
1 %	2,7	97 – 103
0,1 %	3,7	95 – 105
0,01 %	5,3	90 – 107
0,001 %	7,3	80 – 110
1 частей на миллион	11	80 – 110
100 частей на миллиард	15	80 – 110
10 частей на миллиард	21	60 – 115
1 частей на миллиард	30	40 – 120

4. **Пределы обнаружения (LOD) и Пределы количественного определения (LOQ).** Для некоторых заказчиков необходимо демонстрировать также значение LOD. Как правило, оно определяется как концентрация аналита, в 3 раза превышающая сигнал, производимый при анализе пустой пробы. Для многих лабораторий значение LOD не является столь значимым, как значение LOQ. Как правило, оно определяется как концентрация аналита, в 10 раз превышающая сигнал, производимый при анализе пустой пробы. Однако полезным значением LOQ является самый низкий уровень аналита, который может измерить лаборатория с точностью и прецизионностью, приемлемой для ее заказчиков. Если не указано иное, лаборатория должна документировать типичные значения LOD/LOQ (в 3 и 10 раз превышающие пустую пробу). *ПРИМЕЧАНИЕ:* Обычные лаборатории могут не сообщать какие-либо аналитические результаты, которые не ограничены калибровочной кривой.
5. **Критерии.** Искомые пределы точности и прецизионности могут быть взяты из АОАС (Horwitz). Прецизионность или повторяемость рассчитывается как относительное стандартное отклонение (коэффициент изменчивости), а точность рассчитывается как процентная мера выхода (табл. 1).

Валидация калибровок БИК-диапазона

Принцип

Образец, представляющий химический состав материала образца, анализируют посредством БИК-спектрометрии. Спектральные данные в ближнем инфракрасном диапазоне (БИК) собираются и трансформируются в составные или параметрические концентрации по калибровочным моделям, разработанным на основе репрезентативных образцов.

Приборы ближнего инфракрасного (БИК) диапазона

БИК-приборы основаны на измерении диффузного отражения или пропускания в ближнем инфракрасном диапазоне с длинами волн в 700–2500 нм ($14300\text{--}4000\text{ см}^{-1}$) или его сегментах, либо при определенных длинах волн или волновых чисел. Оптический принцип может быть дисперсионным (например, дифракционные монохроматоры), интерферометрическим или нетепловым (например, светодиоды, лазерные диоды и лазеры). Прибор должен быть снабжен диагностической тестовой системой для тестирования фотометрического шума и воспроизводимости, точности длины волны/волновых чисел и прецизионности длины волны/волновых чисел (для сканирования спектрофотометров). Прибор должен измерять достаточно большой объем или поверхность образцов, чтобы исключить любое значительное влияние неоднородности, происходящей от химического состава или физических свойств анализируемого образца. Длина пути образца (толщина образца) в ходе измерения пропускания должна быть оптимизирована в соответствии с рекомендациями производителя в отношении интенсивности сигнала для получения линейности и максимального соотношения сигнал/шум. В ходе измерения отражения кварцевое стекло или другой соответствующий материал, во исключение эффекта высыхания, желательно должно покрывать взаимодействующий поверхностный слой образца.

Калибровка и начальная валидация

Прибор перед использованием должен быть откалиброван. Эта процедура относится к калибровкам приборов, произведенным в лаборатории или приобретенным у внешнего поставщика.

В ходе калибровки должно иметься достаточное количество репрезентативных образцов, охватывающих такие вариации, как:

- a) Комбинации и структурные диапазоны основных и второстепенных компонентов образцов;
- b) Сезонные, географические и генетические воздействия на грубые корма, кормовое сырье и крупы;
- c) Методы и условия обработки;
- d) Условия хранения; и
- e) Температура образцов и прибора.

Калибровка должна сопровождаться статистической информацией о ее результатах, таких как количество и типы образцов, корреляция, стандартная ошибка калибровки и предсказания, причем в формате, позволяющем определять выбросы.

Эталонные анализы и БИК-измерения

Международно-признанные эталонные методы должны использоваться для определения уровня влаги, жира, белка и других компонентов и параметров.

Эталонный метод, используемый для калибровки, должен находиться в статистически управляемом состоянии, т. е. для любого образца, изменчивость должна состоять из случайных вариаций воспроизводимой системы. Важно знать прецизионность эталонного метода.

Выбросы

Во многих ситуациях во время калибровки и валидации наблюдались статистические выбросы. Выбросы могут быть связаны со спектральными выбросами (в дальнейшем именуемыми как *x*-выбросами) или ошибками в эталонных данных или образцах с различным отношением между эталонными данными и БИК-данными (в дальнейшем именуемыми как *y*-выбросы).

С целью валидации образцы не следует рассматривать как выбросы, если они удовлетворяют следующим условиям:

- a) они находятся в пределах рабочего диапазона компонентов/параметров в ходе калибровки(ок);
- b) они находятся в пределах спектральной вариации калибровочных образцов, например, оцениваемых посредством расстояния Махаланобиса, и
- c) и если спектральный остаток ниже предела, определенного процессом калибровки.

Работа с выбросами. Если образец выглядит как выброс, то он должен быть проверен сначала на предмет того, является ли он *x*-выбросом. Если он превышает пределы *x*-выбросов, определенных для калибровки, то его следует удалить. Если он не является *x*-выбросом, то должны быть проверены как эталонное значение,

так и прогнозируемое значение БИК. Если они соответствуют исходным значениям, то образец не должен быть удален, а статистика по валидации должна включать этот образец. Если повторные значения показывают, что как исходные эталонные значения, так и прогнозируемые значения БИК были ошибочны, тогда должны быть использованы новые значения.

Валидация калибровочных моделей. Перед использованием калибровочные характеристики должны быть пройдены через валидацию локально, используя независимый тестовый набор, который является репрезентативным образцом анализируемой выборки. Для определения смещения необходимы по крайней мере 10 образцов; для определения стандартной ошибки предсказания (SEP) требуются по крайней мере 20 образцов.

Валидация должна проводиться для каждого типа образца, компонента/параметра и температуры.

ПРИМЕЧАНИЕ: Валидация действительна только для типов, диапазона и температуры образцов, используемых в валидации.

Результаты, полученные на независимом тестовом наборе, наносятся на график, сопоставляются с БИК, а остатки соотносятся с эталонными образцами, с целью обеспечения наглядного представления результатов калибровки. SEP рассчитывается, а остаточный график данных с поправкой на среднюю систематическую ошибку (смещение) проверяется на выбросы, то есть образцы с остатком, более чем в 3 раза превышающим SEP.

Если процесс валидации показывает, что модель не может предоставить приемлемую статистику, то она не должна использоваться.

Критерии валидации

Следующим шагом является сопоставление БИК и эталонных данных посредством линейной регрессии (эталон = $a + b \times \text{БИК}$) для получения статистических данных, описывающих результаты валидации.

Коррекция смещения. Данные также анализируются на смещение между методами. Если разница между средними величинами прогнозируемых и эталонных значений БИК существенно отличается от нуля, это означает, что калибровка смещена. Смещение может быть устранено путем регулировки постоянного члена в калибровочной характеристике.

Регулировка уклона. Если уклон (b) значительно отличается от 1, то калибровка искажена.

Регулировка уклона/точки пересечения калибровки, как правило, не рекомендуется, если только калибровка не применяется для новых типов образцов или приборов. Если в ходе повторного изучения калибровки не обнаруживаются выбросы, особенно выбросы с высокой нагрузкой, желательно расширить калибровочный набор включением в него большего количества образцов.

Однако, если уклон был отрегулирован, калибровка должна быть затем проверена на новом независимом тестовом наборе.

Расширение калибровочного набора. Если ошибка калибровки не отвечает ожиданиям, калибровочный набор должен быть расширен включением в него большего количества образцов, или должна быть проведена новая калибровка. Во всех случаях, когда разрабатывается новая калибровка на расширенном калибровочном наборе, процесс валидации должен быть повторен на новом валидационном наборе. При необходимости расширение калибровочного набора следует повторить, пока не будут получены приемлемые результаты на калибровочном наборе.

Изменение условий проведения измерений и функционирования приборов. Если не осуществляется дополнительная валидация, то локальная валидация метода БИК, устанавливающая точность метода, может в целом не считаться валидной в случае изменений условий проведения измерений.

Например, калибровка, осуществленная для определенной выборки образцов, не может быть признана валидной для образцов за пределами этой выборки, хотя диапазон концентрации аналита остается неизменным. Калибровка, осуществленная на силосе из злаковых культур с одной территории, не может дать такую же точность, как и осуществленная на силосе с другой территории, если генетические параметры, параметры выращивания и параметры переработки отличаются.

Изменения в методе представления образцов или в условиях измерения (например, температуры), не входящие в калибровочный набор, могут также оказать влияние на аналитические результаты.

Калибровка, осуществленная на определенном приборе, не всегда может быть использована в отношении идентичного прибора, работающему по тому же принципу. Может понадобиться выполнение корректировки смещения и уклона/пересечения калибровочных характеристик. Во многих случаях будет необходимо стандартизировать два прибора по отношению друг к другу перед тем, как смогут быть переданы калибровочные характеристики. Процедуры стандартизации могут быть использованы для передачи калибровки между приборами различных типов при условии, что образцы измеряются одним и тем же образом (отражение, пропускание) и спектральная область является схожей.

Если условия изменились, должна быть выполнена дополнительная валидация.

Калибровка должна проверяться всякий раз, когда любая основная часть прибора (оптическая система, детектор) была подвергнута изменению или ремонту.

Статистика измерения рабочих характеристик

Рабочие характеристики модели прогнозирования должны определяться набором валидационных образцов. Этот набор состоит из образцов, которые не зависят от калибровочного набора. На заводе этим будет являться новая партия; в сельском хозяйстве этим будет являться новый урожай или новое место проведения эксперимента. Этот набор образцов должен быть тщательно проанализирован в соответствии с эталонными методами. Необходимо внимательно подходить к анализу валидационных образцов, а прецизионность этих результатов является более важной в отношении валидационного набора, чем в отношении образцов, применяемых на фазе калибровки.

Количество валидационных образцов должно быть не менее 20 для определения статистических данных с определенной долей уверенности.

Нанесение результатов на график. Важно визуализировать результаты на графиках, то есть отображать прогнозируемые относительно эталонных значений или остаточные относительно прогнозируемых значений.

Остатки определяются как:

$$\text{Остаток} = y - x,$$

где

y – эталонные значения, определяемые с помощью стандартного метода, и

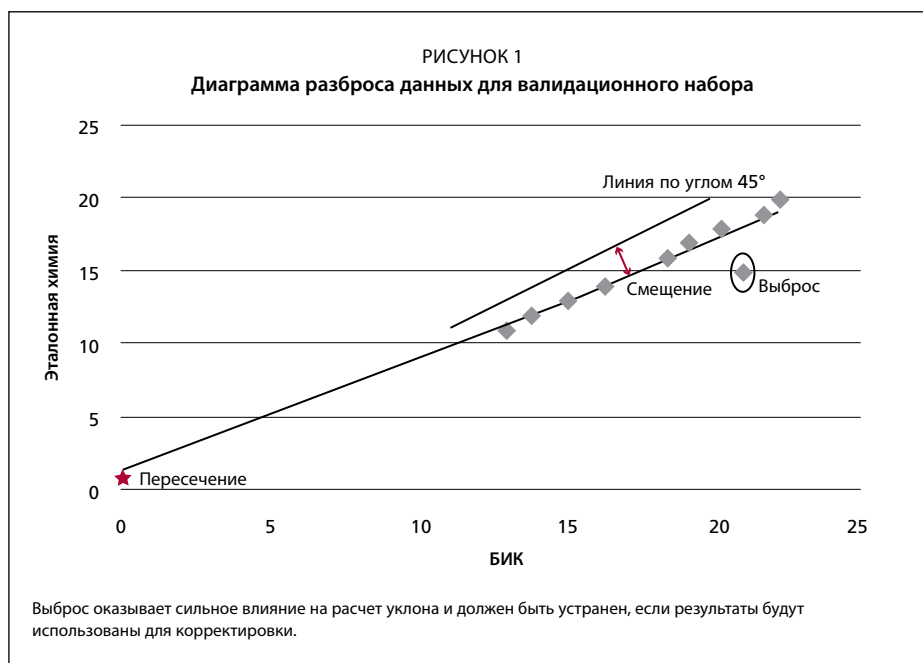
x – прогнозируемые значения, получаемые при применении многомерной БИК-модели.

Способ, посредством которого рассчитываются разницы, отразит отрицательное смещение, когда прогнозные значения слишком высоки, и положительное смещение, когда прогнозные значения слишком малы по сравнению с эталонными значениями.

График данных сразу дает представление о корреляции, смещении, уклоне и пересечении и наличии очевидных выбросов (рис. 1).

Смещение. В большинстве случаев смещение или систематическая ошибка – это то, что наблюдается в БИК-моделях. Смещение может произойти из-за нескольких причин: новые образцы типа, ранее не отмеченного в модели, отклонение прибора, отклонение в мокрой химии, изменения в процессе, в подготовке образцов. Если n – число независимых образцов, то смещение (или отклонение) – это средняя разница, которая может быть определена как:

Смещение = Среднее значение (эталонные данные) – Среднее значение (прогнозируемые данные БИК)



Если смещение существенно отличается от 0, тогда значение смещения может быть добавлено к постоянному значению в калибровочной модели для исправления этой систематической ошибки.

Уклон. Уклон b простой регрессии $y = a + bx$ часто упоминается в отчетах и публикациях по БИК.

Обратите внимание, что уклон должен быть рассчитан посредством эталонных значений в качестве зависимой переменной и посредством прогнозируемых БИК-значений в качестве независимой переменной, если расчетный уклон предназначен для корректировки БИК-результатов. Уклон может быть рассчитан в Excel как функция = уклон (значения REF, значения БИК).

Если уклон значительно отличается от 1, то калибровка может быть скорректирована в соответствии с инструкциями поставщиков, однако рекомендуемой процедурой является включение валидационных образцов в калибровочный набор и осуществление повторной калибровки.

Для корректировки калибровки посредством уклона также требуется точка пересечения; она может быть рассчитана в Excel как функция = пересечение (значения REF, значения БИК)

Коэффициент детерминации (R^2). Корреляция (r) указывает на степень соответствия. Значения, указанные в валидации, не должны значительно отличаться от исходных калибровочных статистических данных. Коэффициент детерминации (R^2) может быть рассчитан в Excel как функция = RSQ (значения REF, значения БИК).

Если корреляция значительно отличается от калибровочных статистических данных, то валидационные образцы необходимо добавить в калибровочный набор и осуществить повторную калибровку.

Стандартная ошибка предсказания (SEP). SEP предоставляет информацию о точности БИК-предсказания относительно эталонных значений. SEP может быть рассчитана в Excel как функция = STEYX (значения REF, значения БИК).

Если SEP существенно отличается от калибровочных статистических данных, то валидационные образцы необходимо добавить в калибровочный набор и осуществить повторную калибровку.

ПРИСВОЕНИЕ КВАЛИФИКАЦИИ (ОБУЧЕНИЕ) СПЕЦИАЛИСТОВ ЛАБОРАТОРИИ **Общая информация**

Этот документ описывает Стандартные операционные процедуры (SOP) для присвоения квалификации Лаборанту в использовании аналитического метода. Существуют определенные этапы, которые необходимо соблюдать в систематическом порядке для достижения этой цели. Этот документ служит для уточнения процедур/критериев для присвоения квалификации.

Область применения

Эта процедура распространяется на всех лаборантов и лабораторные методы.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные и демонстрирует текущую компетенцию.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные и демонстрирует текущую компетенцию.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Процедуры

Сбор информации

Первым шагом для получения квалификации в части проведения нового анализа является ознакомление со стандартными операционными процедурами (СОП). Копия этого документа может быть получена у менеджера/директора лаборатории.

В целях обеспечения безопасности окружающих, обучаемый должен ознакомиться с Паспортом безопасности материалов (MSDS) для получения информации о каждом химическом веществе, используемом в анализе. Необходимо четко понимать уровни токсичности и способы утилизации отходов перед началом любого анализа. Если вы не можете найти текущий вариант MSDS, обратитесь к сотруднику по технике безопасности лаборатории.

Наблюдение и практика

После ознакомления с протоколом и реагентами, обучаемый наблюдает за тем, как квалифицированный и компетентный лаборант выполняет процедуры. Для обеспечения полного понимания обучаемым процесса анализа, он (она) должен выполнить по крайней мере один тренировочный набор до начала работы с настоящими квалификационными наборами. Тренировочный набор должен состоять из различных типов образцов и включать в себя сложные образцы, если они доступны. Квалификация присваивается, если 1) фактические контрольные значения соответствуют требованиям точности и прецизионности в тренировочном наборе и 2) менеджер/директор лаборатории предоставляет соответствующее разрешение обучаемому. Обучаемый должен проконсультироваться с менеджером/директором лаборатории в отношении того, какие конкретные реагенты должны быть приготовлены для анализа.

Выполнение квалификационных наборов

Руководитель/директор лаборатории или их представитель выбирает образцы, с которыми будет работать обучаемый. Желательно использовать образцы, с которыми проводились анализы в двух повторностях и использовать средний результат для сравнительных целей. Наборы должны состоять из различных типов образцов. Искомые значения образцов будут предоставлены обучаемому.

Количество и типы анализируемых образцов определяются менеджером/директором лаборатории. Образцы могут включать в себя: лабораторные образцы, квалификационные пробы, фактические контрольные образцы, стандартные эталонные образцы и пустые пробы. Как минимум три набора должны быть проанализированы.

Интерпретация квалификации

Достаточное количество доступных образцов – Выбросы оцениваются и удаляются с помощью критерия Диксона. Остальные данные сравниваются с использованием парного t-критерия (критерия Стьюдента). Если нет значительных различий ($P > 0,05$), то лаборант считается квалифицированным, чтобы выполнять аналитические процедуры. Если существует значительная разница в данных ($P < 0,05$), то менеджер/директор лаборатории должен проконсультироваться с менеджером по качеству.

Недостаточное количество доступных образцов – Менеджер/директор лаборатории должен проконсультироваться с менеджером по качеству для разработки квалификационной процедуры, подходящей для метода.

Документация

Руководитель/директор лаборатории представляет менеджеру по качеству докладную записку (с приложенными данными) касательно квалификации лаборанта. Эта докладная записка должна быть добавлена в индивидуальную карточку учета профессиональной подготовки.

РЕАГЕНТЫ И ХИМИКАТЫ

Общая информация

Эта процедура описывает необходимую маркировку и использование сыпучих реагентов и приготовленных растворов. Она включает в себя подготовку необходимой информации, которая указывается на этикетках реагентов и препаратов.

Область применения

Эта процедура применяется в отношении всех химикатов и реагентов, используемых в лаборатории.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Процедуры

Общие требования

Сыпучие реагенты, химикаты и растворы должны быть соответствующим образом маркированы.

Срок годности должен соответствовать руководящим принципам и исключениям, указанным в СОП аналита.

Химикаты и подготовленные растворы (реагенты) с истекшим сроком годности должны правильно утилизироваться. Отходы не должны храниться в лаборатории, за исключением предназначенного для этого контейнера для отходов.

Сыпучие реагенты

Сыпучие реагенты – это химические вещества, полученные от дистрибьютора или производителя в оригинальной заводской упаковке, такой как бутылки, банки, пакеты, ведра и т.д. Такие реагенты используются в том виде, в каком они были получены, либо для приготовления растворов, используемых в аналитических процедурах.

На всех сыпучих реагентах должна присутствовать маркировка с указанием даты получения и срока годности. Этикетки на сыпучих реагентах должны содержать (как минимум) следующую информацию:

- Дату получения
- Инициалы лица, принявшего товар
- Назначенный срок годности
- Дату открытия
- Инициалы лица, открывшего товар

Все сыпучие реагенты, независимо от размера контейнера, должны иметь этикетку.

Некоторые производители оставляют место на своих этикетках для информации, которую необходимо указывать на этикетках сыпучих реагентов. Заполнение этой информации на этикетке производителя не освобождает от необходимости заполнения этикетки сыпучего реагента, подготовленной в лаборатории.

Общим правилом для определения сроков годности сыпучих химикатов является необходимость их использования в течение 10 лет, если только производитель не указал другой срок годности (эфир, сертифицированные титранты), или если об этом не упомянуто в конкретной Стандартной операционной процедуре (СОП).

Следите за запасами с тем, чтобы в первую очередь использовать химикаты с наиболее близким сроком годности.

Не храните большое количество (более 6-месячных запасов) растворителей.

Если срок годности записывается в формате месяц/год, то считается, что срок истекает в конце месяца. Срок годности всех химикатов должен просматриваться не реже, чем раз в месяц. Химикаты с истекшим сроком годности должны утилизироваться: любые исключения из этого должны одобряться со стороны менеджера/директора лаборатории. Утилизируйте химикаты только посредством утвержденной системы обращения с отходами.

В отношении некоторых химикатов предоставляется Сертификат о проведении анализа и осуществляется анализ партии. Сертификат о проведении анализа необходим для стандартных эталонных материалов. Сертификаты должны храниться в том же месте, что и аналитические результаты.

Сыпучие реагенты, перемещенные в другой контейнер (пластиковые бутылки, диспенсеры и т.д.), должны сопровождаться (как минимум) следующей информацией:

- Наименование реагента
- Исходный номер партии контейнера для сыпучих реагентов
- Инициалы
- Срок годности
- Информация по мерам безопасности, в случае необходимости

Следующие сыпучие химикаты могут храниться в стандартных, предварительно маркированных промывалках, которые можно приобрести:

- Деионизированная вода
- Этанол
- Ацетон
- Изопропанол
- Метанол

На этих бутылках должна содержаться такая информация, как наименование химиката, молекулярная формула, информация о наиболее уязвимых органах и путях проникновения, CAS-номер и знаки (ромб) предупреждения об опасности или CLP-пиктограммы.

Приготовленные растворы (реагенты)

Существует два требования к маркировке приготовленных растворов (реагентов). Требования зависят от того, планируется ли использовать раствор в тот же день, когда она был подготовлен, или же он будет храниться в течение более длительного периода времени.

В тот же день – Растворы, приготавливаемые каждый день, должны сопровождаться следующей информацией:

- Наименование реагента (состав)
- Концентрация
- Дата приготовления
- Инициалы лаборанта
- Информация по мерам безопасности, в случае необходимости

Более длительное использование – Растворы реагентов, которые не будут утилизированы в тот же день, должны сопровождаться следующей информацией на этикетке:

- Наименование реагента (состав)
- Концентрация
- Дата приготовления
- Инициалы лаборанта (лица, готовившего раствор)
- Номер препарата
- Срок годности
- Информация по мерам безопасности, в случае необходимости

Номер препарата необходим для всех растворов собственного производства за исключением следующего: разбавление основного эталонного раствора с целью подготовки калибровочной кривой. Номера препаратов не требуются в этом случае, однако должны быть указаны номер препарата или информация по маточному раствору.

Общим правилом для сроков годности растворов собственного производства является необходимость их использования в течение одного года. Исключением из этого правила являются химикаты, для которых производитель указал срок годности. Исключение может быть также указано в аналитической процедуре.

ПРИМЕЧАНИЕ: Срок годности раствора не должен превышать срок годности любого из его компонентов.

Одним из форматов, который может использоваться для номеров препаратов, является формат XXXX-YYYY, где

XXXX – это номер лабораторного журнала, а YYYY – это последовательное число, начинающееся с 0001. Предшествующие нули необходимы для обеспечения четырехзначности числа.

ТЕСТ НА ВЫБРОСЫ

Общая информация

Если результаты выборки не повторяются должным образом, то возможно необходимо выполнить тест на выбросы для того, чтобы определить, можно ли исключить конкретные результаты из рассмотрения. Тест на выбросы может потребоваться в отношении других наборов данных, таких как квалификация метода или валидация метода. Лаборатория использует тест Диксона на выбросы (Dixon, 1995) с критическими значениями, при 5% ошибке, как это указано в Wernimont (1995).

Область применения

Это стандартная операционная процедура применяется в отношении всех лабораторных данных.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Процедуры

Тест Диксона применительно к аналитическим результатам

В отношении проблемного образца, который не соответствует требованиям лаборатории по повторяемости, может быть необходимо определить, является ли конкретный аналитический результат выбросом или нет. Выполните следующие шаги, чтобы определить это.

Когда имеется четыре лабораторных аналитических результата, укажите эти четыре результата в порядке возрастания их значений (W, X, Y, Z).

Вычислите диапазон (R) значений (самое большое – самое малое) (Z - W)

Определите, какой из результатов является предполагаемым выбросом (W или Z).

Вычислите разницу (T) между предполагаемым выбросом и его ближайшим соседом:

Если W является предполагаемым выбросом: $T_w = X - W$

Если Z является предполагаемым выбросом: $T_z = Z - Y$

Вычислите соотношение (I):

Если W является предполагаемым выбросом: $I = T_w / R$

Если Z является предполагаемым выбросом: $I = T_z / R$

Если I больше или равно критическому значению ($N = 4$) 0,829, тогда предполагаемый результат является выбросом и может быть исключен из рассмотрения. Если I меньше, чем 0,829, то предполагаемый результат НЕ является выбросом и должен учитываться при рассмотрении.

Тест Диксона применительно к другим ситуациям

Указанный выше принцип может быть применен также к числовым данным, когда N отличен от 4. В Таблице 2 приведены критические значения для N в диапазоне между 3 и 40. **ПРИМЕЧАНИЕ:** Используйте различные расчеты для $N > 8$ (см. Полезные ссылки).

Если набор данных больше 40, разделите данные случайным образом на две части и проверьте на выбросы на обоих концах диапазона результатов.

Полезные ссылки

Dixon, W.J. 1953 г. *Проверка данных на выбросы, Биометрия*. Международная организация по Стандартизации (ИСО), документ ISO 5725-1981, стр. 74-89.

Wernimont, G.T. 1985 г. *Использование статистических данных для разработки и оценки аналитических методов* (под ред. W. Spendley), AOAC, 1985 г., Арлингтон, штат Вирджиния. Таблица A-9, стр. 156.

КОНТРОЛЬНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПРОВЕРКИ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРИИ

Общая информация

Цель проведения проверки качества лаборатории заключается в обеспечении системной оценки текущей деятельности лаборатории для того, чтобы гарантировать, что аналитические данные, получаемые в лаборатории, соответствует критериям качества, установленным для их предполагаемого использования. Проверка качества является инструментом, который используется для оценки эффективности программы качества, выявления возможностей для совершенствования, и также его применения в рамках подготовки сотрудников лаборатории в соответствии с требованиями политики обеспечения надлежащего качества.

Крайне важно, чтобы данные, получаемые в лаборатории, были надежными с точки зрения их аргументированности. Регулярные проверки призваны гарантировать то, что данные, получаемые в лаборатории, являются аргументированными, т. е. что они соответствуют установленным нормам по прецизионности, точности, прослеживаемости, полноте и сопоставимости.

Прилагаемый контрольный перечень охватывает основные аспекты проведения лабораторных работ. Он во многих отношениях является типовым документом. Как таковой, он может и будет развиваться по мере необходимости, чтобы отражать системные и операционные изменения.

ТАБЛИЦА 2

Критические значения для проведения теста Диксона на выбросы

n	Критическое значение	n	Критическое значение
3	0,970	22	0,468
4	0,829	23	0,459
5	0,710	24	0,451
6	0,628	25	0,443
7	0,569	26	0,436
8	0,608	27	0,429
9	0,564	28	0,423
10	0,530	29	0,417
11	0,502	30	0,412
12	0,479	31	0,407
13	0,611	32	0,402
14	0,586	33	0,397
15	0,565	34	0,393
16	0,546	35	0,388
17	0,529	36	0,384
18	0,514	37	0,381
19	0,501	38	0,377
20	0,489	39	0,374
21	0,478	40	0,371

Этот документ предназначен для содействия проведению физической проверки процесса анализа одной аналитической лабораторной процедуры. Проверка не ограничивается однако только этим. Многие вспомогательные лабораторные мероприятия (например, плановая калибровка и техническое обслуживание оборудования, безопасность, обучение, стандартные операционные процедуры, валидация и т.д.) также рассматриваются в ходе выполнения проверки. Эффективная программа обеспечения качества включает в себя интегрированный набор мероприятий, и целью проверки является тщательное изучение и анализ каждого мероприятия на регулярной основе.

В рамках подготовки к проверке проверяющий (аудитор) должен внимательно прочитать Стандартные операционные процедуры, касающиеся проверяемых аналитических процедур. Наличие перечня анализируемых элементов (реагенты, оборудование, эталоны, временные условия, температура и т.д.) помогает сфокусировать сам процесс оценки.

Вообще говоря, если ответ на вопрос проверки звучит как «нет», и если в этом вопросе есть место для «Комментариев», то требуется предоставить объяснение проблемы.

Область применения

Это стандартная операционная процедура применяется в отношении всех лабораторных операций.

ТАБЛИЦА 3

Титульный лист проверки качества

Контрольный перечень проверки качества анализа образца
Дата проведения проверки:
Аудитор:
Идентификатор образца:
Аналит:
Анализируемая дата (даты):
Аудируемый:
Текущий менеджер:
Ответственный менеджер:

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Процедуры***Некоторые термины, используемые в Контрольном перечне проверки качества (Таблица 3)***

Объект проверки (аудируемый) – ответственный лаборант, который проводил анализ проверяемого аналита.

Проверяющий (аудитор) – менеджер по качеству или его назначенный заместитель, который официально рассматривает процесс и формирует аудиторский отчет/результаты, а также выявляет возможности для совершенствования.

Укажите все документы, рассмотренные при подготовке и проведении этой проверки

СОП (в том числе номера версий): _____

Документы, касающиеся аналитических данных

Рабочие отчеты _____

Лабораторные журнал(ы) # _____

Записи о калибровке весов _____

База данных LIMS _____

Данные о рабочем контрольном образце _____

Записи о калибровке пипеток _____

Журнал(ы) мониторинга оборудования _____
 Другое: _____
 Другое: _____
 Другое: _____

Документация

1. Доступна ли лаборанту наиболее последняя утвержденная копия аналитической стандартной операционной процедуры в отношении проверяемых аналитов в месте ее использования, к которой он может обращаться во время проведения анализа?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
 Комментарии _____

2. Соответствует ли стандартная операционная процедура общепризнанному методу, который он представляет? (Нетривиальные отклонения от официального метода должны проходить валидацию до их использования.)

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
 Комментарии _____

3. Все ли данные и вспомогательные документы сразу доступны и легко получимы? Вся документация, относящаяся к определенному анализу, должна быть легко получима. Необходимые данные включают в себя, но не ограничиваются ими, журнал для записи аналитических наблюдений, рабочие отчеты о задании, лабораторные журналы с информацией по подготовке растворов, журналы технического обслуживания и калибровки, выходные данные компьютеров и приборов, контрольные карты и т. д.

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
 Комментарии _____

4. Содержит ли документация достаточно информации и пояснений с тем, чтобы отчет об анализе мог быть легко понят компетентными специалистами, кроме тех, кто был ответствен за его проведение?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
 Комментарии _____

5. Содержит ли документация достаточно информации, которая бы позволила, при необходимости, успешно повторить анализ в соответствии с исходными условиями?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
 Комментарии _____

6. Аккуратно и разборчиво ли внесены в документацию все исходные записи, и записаны ли они с помощью черных или синих водостойких чернил?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
 Комментарии _____

7. Если процедура, используемая для анализа образца, не является общепризнанной процедурой, то прошла ли процедура через валидацию?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

8. Если процедура, используемая для анализа образца, представляет собой процедуру, прошедшую через валидацию, то хранится и доступна ли документация по такой валидации?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

9. Если имеются какие-либо корректировки или изменения какого-либо текста в документации, были ли они внесены соответствующим образом? Ниже приведены правильные способы внесения поправок:

- Исключается использование ластиков, корректирующей жидкости или корректирующей ленты при внесении поправок в любые документы.
- Зачеркните одной линией неверный текст; не удаляйте полностью исходный текст – он должен быть разборчив, несмотря на зачеркивание.
- Внесите поправку как можно ближе к исходному тексту, насколько это возможно.
- Инициалы лаборанта должны быть проставлены рядом с поправкой.
- Дата внесения поправки должна быть проставлена рядом с поправкой (если только не правится сама дата, в этом случае поправка датирует себя!).
- Если причина для внесения поправки не очевидна, то должно быть предоставлено краткое объяснение того, почему были необходимы изменения. Объяснение должно быть написано рядом с поправкой, если это возможно, в противном случае можно сослаться на другие места на странице или приложенном листе посредством использования знака «*».

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

10. Предусматривает ли Журнал для записи аналитических наблюдений фиксацию времени пребывания, температуры, времени озоления, температуру ванны и т.д. для всех критических шагов, определенных в стандартной операционной процедурой?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

11. Все ли весовые значения меньше 1 грамма представляются в виде 0,xxxx (включая предшествующий нуль)?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

12. Если используются вставки (т.е. листы бумаги, как, например, хроматограммы, распечатки и т.д.), прочно ли они прикреплены (скреплены скобами, приклеены

лентой) или помещены в отдельный конверт (полностью имеют ссылки на исходный комплект и легко доступны)?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

13. В ходе проведения анализа были ли получены какие-либо выходные данные приборов? Все ли записи по выходным данным приборов имеют соответствующую маркировку (например, концентрации калибровочных эталонов, идентификатор рабочих эталонов, индивидуальные номера образцов для исследовательских образцов, растворы образцов [если отличаются от описанных в стандартной операционной процедурой], и т.д.).

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

14. Соответствует ли информация в компьютерной базе данных бумажной документации?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

15. Если какие-либо результаты были получены с использованием внешнего программного обеспечения (например, программы табличных вычислений), то прошло ли это внешнее программное обеспечение через валидацию перед использованием, а также хранится и доступна ли документация по такой валидации?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

16. Являются ли комментарии, при их наличии, обоснованными, полными и поддерживаемыми данными наблюдений в комплекте документации?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

17. Был ли комплект должным образом рассмотрен экспертом?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

18. Были ли пустые места заполнены или правильно обозначены?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

19. Пронумерована ли последовательно каждая страница документации в формате «m/n» или «m из n», где m – номер страницы и n – общее количество страниц? (Непрерывные, т.е. неразделенные, компьютерные распечатки и само-пронумерованные таблицы и распечатки приборов считаются одной страницей).

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

20. Включен ли идентификационный номер комплекта на всех необходимых страницах документации?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

21. Подписана и датирована ли ответственным лаборантом каждая требующая того страница документации?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

Реагенты и приготовление растворов

22. Были ли использованы все волюметрические и анализируемые растворы до истечения их соответствующего срока годности?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

23. Включаются ли все используемые в ходе анализа уникальные идентификационные номера для всех сыпучих реагентов, волюметрических растворов и анализируемых растворов в Журнал для записи аналитических наблюдений?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

24. Представлены ли все уникальные идентификационные номера для сыпучих реагентов, волюметрических растворов и анализируемых растворов в требуемом формате и фиксируются ли они в лабораторном журнале?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

25. Были ли все сыпучие реагенты, использованные для подготовки растворов в рамках проверяемых анализов, использованы до истечения их соответствующих сроков годности?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

26. Соответствуют ли даты подготовки в лабораторном журнале для каждого волюметрического и анализируемого раствора датам использования, указанным в Журнале для записи аналитических наблюдений?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

27. Соответствуют ли уникальные идентификационные номера текущих волюметрических и анализируемых растворов препаратам, описанным в лабораторном журнале?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

28. Хранятся ли все образцы, экстракты, реагенты, эталонные материалы и эталоны таким образом, чтобы сохранить их идентичность, концентрацию, чистоту и стабильность?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

29. Обеспечивается ли прослеживание всех калибровочных стандартных или эталонных стандартных материалов, используемых в этом анализе, к (первичному) Сертифицированному эталонному материалу, такому как NIST или USP?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

Лабораторные журналы

30. Проставил ли лаборант свои инициалы и датировал ли он каждый отдельный реагент или приготовленный раствор на соответствующей странице лабораторного журнала, и включает ли описание следующую информацию?

- Уникальный идентификационный номер для каждого приготовленного раствора.
- Наименование/концентрацию приготавливаемого волюметрического или анализируемого раствора (например, 0,15 N HCl в метаноле).
- Наименование (и молекулярную формулу, если возможна более чем одна форма) сыпучего реагента (ов), используемого при подготовке волюметрических или анализируемых растворов.
- Вес [(брутто, вес тары, нетто) или (разностный вес)] или объем, выраженный в соответствующих единицах измерения, сыпучего реагента, используемого при подготовке волюметрического или анализируемого раствора.
- Последовательность растворов (при необходимости), используемых для получения конечной концентрации волюметрического или анализируемого раствора, в том числе исходные объемы и конечные объемы.
- Уникальный идентификатор используемых весов, пипетки или диспенсера.
- Срок годности приготовленного раствора.
- Идентификатор источника воды.

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

Инструменты и оборудование

31. Есть ли в Журнале для записи аналитических наблюдений место для записи уникального идентификационного номера каждого предмета критического оборудования, которое было использовано в анализе?

(например, весы, сушильный шкаф, пипетка, диспенсер, термометр, титратор, холодильник и т.д.)?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

32. Были ли проведены должным образом калибровка и техническое обслуживание перечисленного оборудования, в отношении которого требуются такие действия?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

33. Документируется ли процесс ежедневной или еженедельной калибровки весов, используемых в рамках проверяемого анализа, в день анализа? Находятся ли весы под контролем? Находятся ли все связанные калибровки под контролем?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

34. Выходят ли за установленные пределы ежедневные температурные записи для какого-либо перечисленного оборудования, требующего ежедневного мониторинга?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

Контрольные карты

35. Имеются ли в Журнале для записи аналитических наблюдений рабочие контрольные данные для набора, и находятся ли эти данные под контролем для проверяемого анализа? Если прослеживается некая тенденция в рабочих контрольных данных за предыдущий год, уделяется ли внимание такой тенденции в журнале контрольных карт?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

36. Является ли база данных контрольных карт актуальной в отношении проверяемого анализа?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

37. Правильно ли рассчитывается статистика контрольных карт? Документируется ли она должным образом?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

Охрана труда и техника безопасности

38. Все ли сотрудники, затронутые в ходе этого аудита, используют свои средства индивидуальной защиты?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____

Комментарии _____

39. Указаны ли в аналитической документации специальные требования к хранению и обращению с химикатами?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

40. Обеспечивается ли надлежащее хранение/обращение в отношении текущих образцов, требующих того же анализа?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

41. Оснащен ли лаборант, который в настоящее время назначен для выполнения проверяемого анализа, соответствующей защитной экипировкой (т.е. лабораторным халатом, перчатками, обувью с усиленным мыском, защитной маской, маской от пыли, маской от паров, резиновым фартуком и т.д.), как это необходимо?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

42. Знает ли данный лаборант местонахождение ближайшего места для промывки глаз? огнетушителя? противопожарного одеяла? комплекта для очистки в случае утечки жидкости? пожарной сигнализации? аварийного выхода? аварийного телефона? аварийного душа? Работают ли они все и не просрочены?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

Разное

43. Имеются ли какие-либо отклонения от протокола, зафиксированные по результатам проверки документации либо по итогам проведения опроса лаборанта (ов)? Объясните.

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

44. Если имеются какие-либо отклонения от протокола, были ли они утверждены руководителем и явным образом задокументированы?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

45. Каким было Z-значение на последней контрольной выборке и были ли результаты под контролем?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

46. Прослеживается ли тенденция в контрольных картах контрольной выборки предыдущего года?

Нет _____ Да _____ Не применимо _____
Комментарии _____

ПОЛУЧЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ

Общая информация

В данном разделе определяются процедуры, используемые для обращения с образцами, представляемыми в лабораторию, от сбора и отгрузки заказчиками до подтверждения получения.

Цепочка обеспечения сохранности образцов в лаборатории начинается тогда, когда образцы физически получены. Конкретные требования к обращению с образцами определяются свойствами каждого образца, см. раздел «Обращение с образцами кормов». Лаборатория ожидает, что полностью обученные сотрудники на местах осуществляют эффективный отбор образцов в целях представления репрезентативных и последовательных лабораторных образцов для оценки. Степень представления образцом генеральной совокупности имеет решающее значение, если данные, возвращаемые заказчику, будут служить какой-либо полезной цели.

Область применения

Эта процедура применяется в отношении всех лабораторных образцов кормов и кормовых ингредиентов, представляемых в лабораторию для испытания.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Операторы образцов ответственны за получение, обращение и документирование образцов.

Процедуры

Изучение состояния образца

Каждый лабораторный образец должен прибыть в хорошем физическом состоянии и в подходящем четко маркированном контейнере и должен сопровождаться соответствующей формой представления образца. Обратите внимание на состояние образца по прибытии: заморожен, охлажден, комнатной температуры и т. д.

Принятие/Отклонение образца

Отклонение образца может произойти из-за его физического ухудшения состояния, потенциального загрязнения в результате протечки, сломанного контейнера, смешивания поставленных вместе образцов, недостаточности выборки для требуемого испытания (испытаний) и неправильно отправленных или идентифицированных образцов.

Регистрация или документирование образца

О неприемлемых образцах необходимо сообщить соответствующему руководителю, который уведомляет Заказчика и обсуждает с ним требуемые корректирующие

действия. Образец может быть все равно проанализирован по просьбе заказчика, однако все отчеты, полученные с использованием таких образцов, будут включать в себя текст с указанием их поступления в неприемлемом состоянии и описанием сути проблемы. Образцы, которые не будут анализироваться, регистрируются в системе, и о них сообщается заказчику как о «непригодных». Комментарии, касающиеся причин для объявления образца «непригодным», могут быть добавлены в документ по идентификации образца или в отчет по анализу. В Таблице 3 приведена форма регистрации образца.

Приложение

Дата: _____

Получил: _____

ПРИМЕЧАНИЕ: Обведите соответствующий Код состояния напротив каждого Номера образца

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Состояние образца по прибытию

Номер образца	Код состояния
1	A B C D E F G H J K
2	A B C D E F G H J K
3	A B C D E F G H J K
4	A B C D E F G H J K
5	A B C D E F G H J K
6	A B C D E F G H J K
7	A B C D E F G H J K
8	A B C D E F G H J K
9	A B C D E F G H J K
10	A B C D E F G H J K
11	A B C D E F G H J K
12	A B C D E F G H J K

- A Образец в приемлемом состоянии
- B Контейнер образца сломан, разорван или протекает
- C Сохранная печать нарушена
- D Сохранная печать отсутствует
- E Образец загрязнен протекающим образцом
- F Образец влажный, возможно загрязнен
- G Недостаточное количество образца
- H Образец получен без сопроводительных документов
- J Сопроводительные документы получены без образца
- K Другие проблемы

Идентификация образца

Образцу присваивается уникальный идентификационный номер – Лабораторный номер образца фиксируется на лабораторном образце (Таблица 4), в документах и на контрольных образцах, и он используется в лаборатории для отслеживания образца в ходе всего процесса испытания, т. е. он касается образцов, хранения, контейнеров, арбитражного образца, отчетов по анализу, документов, электронных таблиц и книги учета работ.

ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ КОРМОВ И ИХ ПОДГОТОВКА

Общая информация

Этот протокол описывает надлежащее обращение/измельчение/подготовку образцов кормов лаборантами в лаборатории. Конкретные требования к обращению с образцами определяются свойствами каждого образца. Цепочка обеспечения сохранности образцов в лаборатории начинается тогда, когда образцы физически получены.

Область применения

Эта процедура применяется в отношении всех лабораторных образцов кормов и кормовых ингредиентов.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Отбор образцов

Отбор образцов может быть представлен одним из двух типов: репрезентативным отбором или избирательным отбором.

Репрезентативный отбор

В результате репрезентативного отбора берется небольшая часть из большого объема вещества таким образом, что определение необходимого свойства этой части будет соответствовать среднему значению свойств всей выборки.

Избирательный отбор

Если заметная разница наблюдается в части анализируемой выборки, то эта часть должна быть отделена от всей выборки и рассматриваться как отдельная партия. Если это не возможно, то вся выборка должна быть проанализирована, и доля выборки, в отношении которого была замечена разница, должна быть зафиксирована.

В любом случае детали этого должны быть зафиксированы в окончательном отчете, представляемом заказчику.

Статистические соображения

Приемочный отбор образцов является обычным методом отбора образцов для лабораторий по анализу кормов для животных. Для отбора образцов по определенным свойствам существует теоретический план отбора образцов, основанный на биномиальном распределении. Этот план был упрощен до отношения квадратного корня между размером партии и количеством приращений.

В случае сыпучих образцов продукта дисперсия, как ожидается, является однородной, если для партий до 2-5 тонн принимается по меньшей мере семь приращений, а для партии между 2-5 и 8 тоннами число принятых приращений равно, по крайней мере, $\sqrt{20m}$ (где m = масса образца в тоннах). Если партия превышает 80 тонн, то отношение квадратного корня все еще применяется, но оно будет менее точным.

Оборудование

Дробилки или мельницы. Они должны уметь измельчать корма, не вызывая никаких заметных изменений уровня содержания влаги у образца, и не должны вызывать перегрева образца (что может оказать отрицательное воздействие на образец). Если произошло увеличение или уменьшения уровня содержания влаги у анализируемого корма, то к результатам необходимо применить поправочный коэффициент. Этот коэффициент определяется путем сравнения уровня содержания влаги у подготовленного (раздробленного или измельченного) образца с частью исходного образца до его обработки. Подвергшийся раздроблению или измельчению образец можно провести через подходящее сито. Дробилки или мельницы должны тщательно очищаться после использования во избежание перекрестного загрязнения.

Рифлёр / Гомогенизатор (или механическая мешалка), для получения однородной массы влажного корма. Мясорубка с пластинами диаметром 4 мм может также оказаться полезной для замороженных кормов.

Сита с размерами пор 1,0 мм, 2,8 мм и 4,0 мм из металлической проволоки или аналогичные.

Аналитические весы, используемые для определения массы образца (см. раздел 8 «Использование весов»).

Механический встряхиватель, используемый для встряхивания вязкого жидкого образца кормовой патоки.

Прибор для разделения и квартования – такое оборудование, как, например, конический разделитель или многослотный разделитель с системой сортировки, обеспечит равномерное разделение лабораторных образцов.

Инструменты, молоток, используемые для удара по отвертке/ стамеске.

Отвертка/стамеска, используемые для разбиения кусков кормовой патоки на более мелкие части.

Шпатель, используемый для зачерпывания образцов; *ступка и пестик* для измельчения образцов.

Передаточная пипетка, используемая для доставки мокрых кормов и жидких кормов.

Контейнеры для образцов; они должны быть пригодны для обеспечения целостности образцов, исключая любые изменения или воздействия со стороны влаги, температуры или света. Контейнер для образцов должен быть подходящего размера, чтобы иметь возможность хранить в нем достаточное количество образцов для завершения всех необходимых анализов (не менее 100 г), и после его заполнения в нем должно остаться некоторое воздушное пространство (для обеспечения возможности эффективного перемешивания перед отбором образцов для всех требуемых тестов). Контейнер должен иметь надежно закрывающуюся крышку и должен быть однозначно идентифицирован идентификатором образца, нанесенном на самом контейнере, а не на его крышке.

Если предполагается проведение микробиологического анализа образца, то с ним следует обращаться в стерильных условиях в целях сохранения микробиологической нагрузки.

Процедура

Во избежание контакта с атмосферой процессы измельчения или дробления должны осуществляться как можно быстрее. Может быть необходимо расколоть или раздавить образец перед применением дробилки или мельницы.

Мелкокомковые образцы

Если образец может пройти через сито с размером пор в 1,0 мм, его необходимо тщательно перемешать и разделить, используя прибор для разделения или квартования (см. 7).

Крупнокомковые образцы

Если образец не проходит через сито с размером пор в 1,0 мм, но проходит через сито с размером пор в 2,8 мм, его необходимо раздробить до состояния, когда он будет проходить через сито с размером пор в 1,0 мм и станет мелкокомковым образцом. Аналогичные действия необходимо предпринять, если образец проходит через сито с размером пор в 4,0 мм, но не проходит через сито с размером пор в 2,8 мм.

Трудные для измельчения образцы

Если образец трудно размельчить с помощью дробилки или мельницы, то необходимо определить уровень содержания влаги в подвыборке из исходного образца, а оставшуюся часть измельчить с помощью ступки и пестика до состояния, пока она не пройдет через сито с размером пор в 1,0 мм. Затем необходимо определить уровень содержания влаги в измельченном образце с целью установления поправочного коэффициента.

Трава или силос из злаковых культур

Весь образец должен быть измельчен и перемешан. Некоторые образцы могут потребовать заблаговременной нарезки на мелкие части. Если образец не пригоден для измельчения или нарезки, его можно высушить в сушильном шкафу, оставив его в нем на ночь (при температуре 60-70°C), а затем измельчить. Необходимо определить уровень содержания влаги, а затем применить поправочный коэффициент.

Жидкие образцы

Образец необходимо перемешать с помощью гомогенизатора или мешалки для обеспечения полного рассредоточения в нем разделенных веществ, а затем образец забирается с помощью пипетки с широким отверстием.

Поиск и устранение проблем

Ошибочно высокие/низкие результаты для конкретного аналита и/или плохая дубликация могут быть отнесены к одной или нескольким из следующих проблем:

1. Неполное или непоследовательное смешивание сухих, жидких и влажных образцов до взвешивания.
2. Необеспечение согревания охлажденных или замороженных образцов до комнатной температуры перед взвешиванием.
3. Необеспечение сбора частей образца из разных мест по всей кормовой патоке/лизунцу до взвешивания или неосуществление анализа достаточно большой части образца (вес образца, возможно, должен быть увеличен для последовательной дубликации).
4. Образцы должны быть подготовлены таким образом, чтобы взвешенные количества, как это предусмотрено в методах анализа, являлись однородными и схожими с конечными образцами.

Обращение с образцами

Подготовка образцов сухих кормов

1. Разделите образец. Как правило, необходимо разделить исходный образец до получения удовлетворительного размера подвыборки. Поместите отделенный, неразмельченный образец в маркированный пакет с застежкой (или аналогичный контейнер), а оставшиеся части неразмельченного образца назад в пакет с образцом для его сохранения. Пометьте каждый контейнер (сумку, бутылку и т.д.) соответствующим идентификационным номером (например, штрих-кодом).
2. Раздробите одну из частей (из тех, что в пакете) с помощью соответствующей мельницы.
3. Раздробление и размельчение некоторых образцов может привести к увеличению или уменьшению уровня содержания влаги и летучих веществ; необходимо сделать соответствующие допущения в отношении этого. Процесс раздробления необходимо осуществить как можно скорее в целях недопущения контакта с атмосферой.

4. Поместите измельченный образец на оберточную бумагу.
5. Тщательно перемешайте образец, прежде чем взять из него лабораторную порцию.
6. Заполните бутылку лабораторного образца достаточным количеством размельченного образца, пропустив ее через смешанный образец.
7. Верните образец в комнату хранения образцов сразу же после анализа.

Процедура получения лабораторного образца

1. Позвольте образцу нагреться до комнатной температуры, если он хранился в морозильнике или холодильнике.
2. Смешайте образец, вращая и наклоняя бутылку слева направо в течение нескольких секунд. Не встряхивайте. Некоторые образцы, возможно, потребуют дополнительного перемешивания (например, 41% образцов семян хлопчатника).
3. Взвесьте образец способом, соответствующим желаемому методу.
4. Верните образец в соответствующее место его хранения.

Жидкие образцы патоки

1. Образцы следует хранить в холодильнике.
2. Позвольте образцу нагреться до комнатной температуры.
3. Встряхивайте образец энергично в течение 1 минуты, чтобы обеспечить тщательное перемешивание. В отношении тех образцов, которые являются слишком вязкими, чтобы быть встряхнутыми вручную, необходимо использовать механический встряхиватель. Встряхивайте образец в течении не менее 15 минут или так долго, как это описано в протоколе метода, чтобы обеспечить тщательное перемешивание.
4. Взвесьте образец способом, соответствующим желаемому методу. (Вытрите всю разлившуюся жидкость с поверхности бутылки).
5. Верните образец в соответствующий холодильник.

Образцы кусков кормовой патоки/лизунца

1. Образцы следует хранить в холодильнике.
2. Позвольте образцу нагреться до комнатной температуры.
3. Что касается мягких кусков, то с помощью шпателя отрезайте от них небольшие порции образца из разных мест куска до достижения желаемой массы.
4. Что касается жестких кусков, то обрубайте стамеской небольшие порции образца из разных мест куска до достижения желаемой массы. (Используйте молоток и отвертку/стамеску, обеспечьте применение соответствующих средств индивидуальной защиты).
5. Верните образец в холодильник.

Образцы для определения микотоксинов

1. Размельчите весь образец (с помощью лабораторной мельницы Romer или аналогичной мельницы). **ПРИМЕЧАНИЕ:** Мельница Romer обеспечивает

разделение образца на две неравные части. Одна из частей будет составлять примерно $\frac{1}{3}$ от всего образца, а другая часть будет составлять примерно $\frac{2}{3}$ от всего образца.

2. Размельчите $\frac{1}{3}$ часть образца для прохождения частиц через сито с размером пор в 1,5 мм с использованием соответствующей дробилки (например, Retsch SR 300 производства Германии или аналогичной дробилки).
3. Поместите измельченный образец на оберточную бумагу и заверните его.
4. Очистите дробилку сжатым воздухом или измельчите ей небольшое количество (200 г) незагрязненного зерна.

Полезные ссылки

ISO 6497. 2002 г. *Корма для животных - отбор проб.* Женева, Швейцария.

EN ISO 6498. 2009 г. *Корма для животных. Руководящие указания по приготовлению проб для испытаний.* Женева, Швейцария.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕСОВ

Общая информация

Этот документ содержит процедуры для калибровки, очистки, взвешивания материалов, а также осуществления планового технического обслуживания лабораторных весов с верхней загрузкой и аналитических весов.

Область применения

Это стандартная операционная процедура распространяется на всех лаборантов, использующих весы с верхней загрузкой и аналитические весы.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Оборудование

Комплект гирь, нержавеющая сталь, ежегодная сертификация NIST/NVLAP или аналогичная

Диапазон гирь: 0,1 г, 1 г, 10 г, 50 г и 100 г

Процедуры

Чистка

Чистка весов необходима при их повседневном использовании для поддержания качества работы лаборатории, так как взвешивание является самым базовым и вместе с тем одним из самых важных шагов при проведении анализа. Неизбежно, что весы и гири становятся грязными при их повседневном использовании. Поэтому,

очень важно тщательно соблюдать соответствующие процедуры, чтобы обеспечивать получение наиболее точных результатов. Следующие процедуры очистки весов и гирь были разработаны для обеспечения качества результатов.

Отключите весы перед чисткой и не используйте какие-либо агрессивные или абразивные чистящие средства. Не позволяйте, чтобы во внутренний механизм весов попадали какие-либо вещества. Также с осторожностью обращайтесь с чашками весов, не касайтесь основания чашки весов, на котором она держится, или места, где чашка касается весов. При очистке чашки весов при помощи жидкого раствора снимите чашку и очистите ее отдельно от весов для предотвращения попадания любых жидкостей во внутренние электронные элементы и нарушения работоспособности. Если какое-либо вещество попало внутрь весов, то немедленно сообщите об этом руководителю, что принять надлежащие меры во избежание поломки весов.

Весы должны чиститься по мере необходимости. Для простой очистки, такой как удаление образца с чашки весов, необходимо использовать мягкую щетку из верблюжьей шерсти. Убедитесь в том, что на чашке весов не осталось ни одной мелкой частицы, так как даже самое маленькое количество вещества может повлиять на показание или вызвать коррозию чашки весов.

Если чашка весов не может быть очищена просто с помощью щетки, то может потребоваться использовать воду для протирки чашки весов. Необходимо использовать безворсовую салфетку, чтобы вытереть грязь и воду с чашки. Водой необходимо смачивать салфетку, а не весы.

В случае необходимости можно использовать 1%-й мыльный раствор, чтобы очистить чашку весов, но его необходимо использовать с осторожностью. Мыльный раствор необходимо тщательно смыть. Мыло может оставить осадок на весах, тем самым повлияв на результаты взвешивания. Необходимо использовать безворсовую салфетку, чтобы вытереть воду с чашки весов.

Что касается аналитических весов, то окошки могут быть очищены при помощи очистителя для стекол и безворсовой салфетки. Очиститель для стекол необходимо распылить на салфетку, а затем протереть ей окошки. Это позволит предотвратить образование какого-либо осадка от распыления.

Управление гирями должно осуществляться при помощи безворсовой салфетки или пинцета. Что касается более крупных гирь, то в случае необходимости могут использоваться неопудренные перчатки. Отпечатки пальцев будут влиять на результаты взвешивания и снизят точность и прецизионность результатов.

Для очистки гирь используйте этиловый эфир и безворсовую салфетку. Эфир может использоваться только в растворенном состоянии. Протирайте гирю до тех пор, пока она не является визуально чистой и на ней не осталось эфира. Гири необходимо чистить по мере необходимости.

Калибровка

Калибровка является важным фактором в обеспечении качества результатов. Без надлежащей калибровки весы не в состоянии обеспечивать результаты, которые являются устойчивыми и последовательными. Таким образом, важно регулярно

осуществлять калибровку весов. Существует три метода, которые необходимо включить в процесс в качестве общепринятой практики.

Прежде всего, весы должны проверяться и калиброваться сертифицированным специалистом один раз в год. Протоколы ежегодного технического обслуживания весов должны содержаться в журнале весов вместе с протоколами еженедельной калибровки. Факт технического обслуживания протоколируется вместе с указанием даты, компании, специалиста и причин проведения технического обслуживания. Калибровочные гири должны быть проверены также в этом случае. Любые поправочные коэффициенты должны быть зафиксированы и использоваться до следующей калибровки.

Во-вторых, каждую неделю лаборант или его представитель должен проводить калибровку весов в своей соответствующей лаборатории с использованием стандартизированных на национальном уровне гирь. Протоколы еженедельной калибровки должны включать в себя: описательное наименование, имя, производителя, номер модели, серийный номер, номер помещения, необходимую частоту калибровки, дозволённые «рабочие» пределы, инициал и дату калибровки и анализ ответственного лаборанта. Гири должны быть в пределах диапазона точности, который определяется отдельно для каждого веса.

Наконец, на ежедневной основе и до проведения калибровочной проверки должна осуществляться внутренняя калибровка. Необходимо следовать отдельным инструкциям к весам и калибровочным протоколам для применения определенных методов калибровки. Это должно протоколироваться в соответствующем документе.

Некоторые весы имеют внутреннюю гирю, которая применяется для калибровки весов. Для других весов требуются внешняя гиря для проведения калибровки. Обратитесь к руководству по эксплуатации весов для получения информации по соответствующим процедурам.

Калибровка весов с верхней загрузкой

Следующие шаги должны соблюдаться для еженедельной проверки калибровки весов с верхней загрузкой. Калибровка, которая примерно охватывает диапазон взвешивания, должна осуществляться с использованием стандартизированного на национальном уровне комплекта гирь, причем для каждого веса необходимо одно калибровочное показание. Перед калибровкой убедитесь в том, что весы чистые. Не прикасайтесь голыми руками к гирям. Используйте обеспыленные перчатки, пинцет или безворсовую салфетку для обращения с гирями (см. процедуру очистки).

Проверьте пузырек уровня, чтобы убедиться в том, что весы выставлены по уровню. Если это не так, то выровняйте весы путем регулировки их ножек. Пузырек уровня обычно расположен в задней части весов у весов с верхней загрузкой. Поверните регулировочную ножку по часовой стрелке, чтобы поднять весы, или против часовой стрелки, чтобы опустить весы. Весы нельзя использовать после перемещения без повторной настройки и проверки уровня.

Убедитесь в том, что чашка весов является пустой, и нажмите на кнопку сброса (тарирования). Это должно привести к показанию 0,00.

Поместите чистую гирю на чашку весов с помощью безворсовой салфетки или

пинцета. Зафиксируйте значение на калибровочной форме. Если диапазон значений находится не в обозначенных пределах, прекратите использование весов и разберитесь с проблемой (см. Диапазоны и пределы весов ниже). Если у ваших весов есть функция калибровки, то также может быть осуществлена внутренняя калибровка с использованием определенных гирь (класс S), указанных в руководстве по эксплуатации весов.

Калибровка аналитических весов

Следующие шаги необходимо выполнять еженедельно, чтобы должным образом проверять калибровку аналитических весов. Калибровка, которая примерно охватывает диапазон взвешивания, должна осуществляться с помощью стандартизированного комплекта гирь. Перед калибровкой убедитесь в том, что весы чистые. Не прикасайтесь голыми руками к гирям. Используйте обеспыленные перчатки, пинцет или безворсовую салфетку для обращения с гирями (см. процедуру очистки). Убедитесь, что дверцы закрыты до калибровки и во время взвешивания, чтобы предотвратить влияние воздушных потоков на показания.

Проверьте пузырек уровня, чтобы убедиться в том, что весы выставлены по уровню. Если это не так, то выровните весы путем регулировки их ножек. Пузырек уровня обычно расположен в задней части весов у весов с верхней загрузкой. Поверните регулировочную ножку по часовой стрелке, чтобы поднять весы, или против часовой стрелки, чтобы опустить весы. Весы нельзя использовать после перемещения без повторной настройки и проверки уровня.

Убедитесь в том, что чашка весов является пустой, и нажмите на кнопку сброса (тарирования). На дисплее должно отобразиться показание 0,0000 или 0,00000.

Аналитические весы могут использовать свои внутренние гири для калибровки. Если у ваших весов имеется калибровочная кнопка, то нажмите на эту кнопку для калибровки. Показание будет меняться с С до СС. Как только это процесс закончится, показание вернется к 0,0000. Если у ваших весов имеется ручка для калибровки, то поверните ручку медленно, пока не отобразится С. Продолжайте поворачивать ручку до тех пор, пока ручка не достигнет положения калибровки. Когда калибровка будет завершена в качестве показания отобразится СС. Лаборант должен будет вернуть ручку в исходное (или среднее) положение до процедуры взвешивания; на дисплее опять отобразится 0,0000. См. Руководство по эксплуатации весов для получения информации по другим моделям.

Поместите чистую гирю на чашку весов с помощью безворсовой салфетки или пинцета. Зафиксируйте значение на калибровочной форме. Если диапазон значений находится не в обозначенных пределах, прекратите использование весов и разберитесь с проблемой (см. Диапазоны и пределы весов ниже).

Диапазоны и пределы весов

Диапазон взвешивания определяет минимальную и максимальную массу, которую могут взвесить данные весы. См. Руководства по конкретным весам.

Предел точности используется для еженедельных калибровочных проверок. Предел указывает значение, на которое масса может отличаться от стандартизиро-

ванного значения. К стандартным пределам относятся следующие:

Весы с верхней загрузкой	$< 100 \text{ г} \pm 0,10 \text{ г}; > 100 \text{ г} \pm 0,50 \text{ г}$
Аналитические весы	$\pm 0,0005 \text{ г}$

Корректирующие действия в случае проблем с весами

Если еженедельная проверка весов показала превышение допустимых пределов, то весы необходимо перепроверить. Убедитесь, что нет сквозняка или других условий, которые могут повлиять на весы. Проверьте калибровку еще раз с помощью гири. Если проверка проходит, то внесите комментарии в журнал. Если проверка не прошла для всех диапазонов взвешивания, то лаборант должен вывести весы из эксплуатации и пометить их как таковыми, чтобы предотвратить их использование. Если проверка проходит только в отношении нижнего диапазона взвешивания, то весы могут использоваться только для взвешивания в нижних диапазонах; соответствующий предупреждающий знак должен быть помещен на весы.

В случае возникновения каких-либо проблем с весами оповестите лаборанта и руководителя с тем, чтобы были предприняты меры по ремонту или замене весов.

Интерференции

Во время стандартной эксплуатации весов возможно возникновение некоторых видов проблем. Распространенным явлением является дрейф показаний весов, который может возникнуть в результате нескольких различных факторов. Для проверки весов на дрейф сбросьте показания весов и посмотрите, является ли изображение данных на дисплее стабильным.

Наиболее вероятной причиной дрейфа показаний весов являются неправильно выровненные весы. Очень важно перед каждым использованием весов проверить пузырек уровня и отрегулировать ножки весов, если весы неправильно выровнены.

Дрейф показаний весов также происходит тогда, когда дверцы на аналитических весах остаются открытыми во время взвешивания. Дверцы должны быть плотно закрыты; воздушные потоки способны повлиять на окончательный вес. Влияние воздушных потоков на показания варьируется в зависимости от условий помещения, в котором используются весы.

Колебания в помещении также приводят к дрейфу показаний весов. Эта проблема зависит от помещения и здания, в котором расположены весы.

Иногда приходится помещать весы в месте, которое подвержено серьезным колебаниям. Например, при взвешивании токсичных веществ необходимо взвешивать вещества в вытяжном шкафу. Проблема дрейфа показаний весов во многих случаях может быть решена путем размещения весов на мраморной подставке. Даже если весы не помещены в вытяжной шкаф, имеет смысл размещать аналитические весы на мраморной подставке с тем, чтобы защитить весы от легкого движения, вызванного колебаниями здания, или случайного задевания рабочей поверхности, на которой находятся весы.

При перемещении весов из одного помещения в другое необходимо выделить примерно два часа на то, чтобы весы уравнились в новой среде, в целях их

стабилизации в условиях новой температуры окружающей среды. Не двигайте откалиброванные весы. Если весы не находятся в тепловом равновесии с окружающей средой, то будет происходить дрейф показаний весов. При перемещении весов из более прохладной комнаты в более теплую комнату выделите 2 часа для уравнивания отключенных часов, чтобы избежать конденсации влаги на весах или в весах. Изменение уровней влажности и температуры могут служить причиной дрейфа показаний весов.

Одним из способов решения проблемы высокой влажности является размещение воздушной сушилки (силикагельные сушильные шкафы для весов) на внутренней стороне весов с целью удаления влаги. Идеальным местом для размещения весов является комната с кондиционером, работающим 24 часа в сутки. К оптимальным условиям относятся недопущение воздействия экстремального теплового излучения и агрессивных химических веществ.

Советы по взвешиванию

Не бросайте объект, подлежащий взвешиванию, на чашку весов; это может привести к повреждению внутренней структуры, и результаты могут перестать быть точными.

Не оставляйте образец на чашке весов в течение длительного периода времени. Кроме того, обеспечьте одинаковую температуру образца и весов. Если образец холодный, то может образоваться конденсат во время взвешивания, и результат взвешивания будет неверным. Сбрасывайте показания весов после использования.

При отключении электроэнергии необходимо, чтобы весы прогрелись в течение одного часа.

При помещении объекта на весы позвольте весам уравниваться (должно отобразиться «g»), прежде чем продолжить. После отображения «g» объект можно снять, а весы тарировать.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИПЕТОК

Общая информация

Данный документ содержит лабораторные процедуры, которые должны применяться в отношении пипеток и диспенсеров. Данный протокол включает в себя вопросы оптимальных условий калибровки, среды для калибровки, расчетов для спецификаций пипеток и решения проблем. Существует три типа пипеток, описанных в данном протоколе. Одним из них является ручная пипетка, как, например, Eppendorf и Pipetmann. Пипетки Brinkmann или Repipet прикрепляются к бутылке, и они известны как диспенсеры. Третий тип, как, например, Brinkmann Dosimat, имеет прикрепленный блок дозирования. Термин «пипетка» используется для описания всех этих типов, если не указано иное. Диспенсеры зачастую не нуждаются в калибровке, но их необходимо тестировать, чтобы гарантировать их пригодность для обозначенных целей. Пипетки Dosimat и ручные пипетки должны обслуживаться и калиброваться техническим специалистом на ежегодной основе, результаты чего должны фиксироваться в соответствующем журнале оборудования.

Область применения

Это стандартная операционная процедура распространяется на всех лаборантов, использующих лабораторные пипетки и диспенсеры.

Ответственности сторон

Лаборант исследует доступные методы, проводит испытание, получает и анализирует данные.

Руководитель/директор лаборатории оценивает и санкционирует использование методов, анализирует и утверждает данные.

Менеджер по качеству определяет требования к валидации данных и утверждает методику.

Оборудование

Аналитические весы

Пипетки или диспенсеры

Термометр

Процедуры

Калибровка

Перед калибровкой пипетку необходимо промыть водой или другим веществом, чтобы удалить полностью предыдущий раствор.

Устройство Dosimat также необходимо промыть соответствующим веществом перед калибровкой. Оптимальные условия для калибровочных измерений связаны с типом сосуда для взвешивания, средой, испытываемым веществом и техникой лаборанта. Калибровочный сосуд для взвешивания должен быть цилиндрической формы, чтобы сохранить поверхность жидкого образца постоянной. Чтобы свести к минимуму испарение, сосуды должны быть закрыты. Чтобы свести к минимуму присутствие отпечатков пальцев, используйте пинцет, перчатки или безворсовые салфетки при обращении с сосудом для взвешивания. Комната, где проводятся измерения, должна быть бесшумной, и прямой солнечный свет не должен попадать на весы. В комнате должна быть установлена нормальная температура (19-23°C); необходимо выделить время на то, чтобы пипетка достигла комнатной температуры перед калибровкой. Техника, используемая лаборантом, имеет важное значение; следуйте инструкции по эксплуатации пипетки и обеспечивайте соответствующую согласованность по времени между взвешиваниями.

Для большинства пипеток контрольной средой является деионизированная вода. Необходимо поместить часть вещества в контейнер для образцов для его уравнивания за один час до начала калибровки. Для будущих расчетов важно, чтобы температура воды измерялась с точностью до 0,1°C (см. Таблицу 5).

Могут быть случаи, когда пипетка не должна быть откалибрована с использованием воды. Эти типы пипеток должны быть откалиброваны с помощью совместимого растворителя. Если совместимый растворитель является легкоиспаряющимся, то вещество разливают в колбы, верхняя часть заменяется, и колбу взвешивают для получения окончательного веса. При использовании растворителя во внимание

должна приниматься плотность (г/мл) растворителя; это заменит Z-коэффициент, используемый при калибровке с использованием воды. Для определения плотности также должна использоваться комнатная температура.

Как минимум, пипетки, которые используются на регулярной основе, должны калиброваться ежемесячно посредством трех серий из 5 взвешиваний. Частота может быть уменьшена в случае наличия низкого риска. Пипетки, которые используются реже, необходимо калибровать при каждом использовании. Это определяет точность и прецизионность. Кроме того, необходимо проводить калибровку посредством трех серий из 5 взвешиваний после завершения основного обслуживания или при поступлении нового прибора. Обменный блок Dosimat должен калиброваться один раз в год заводом-изготовителем прибора.

Эти взвешивания необходимо выполнять для трех различных объемов пипетки. Взвешивание должно охватывать диапазон использования пипетки в лаборатории. Например, пипетка объемом в 10 мл должна тестироваться на объемах в 2 мл, 5 мл и 10 мл. Пипетка также может быть откалибрована на показания, наиболее часто используемые в лаборатории. Например, если каждый день необходимо отмерять 9 мл, то пипетка может быть откалибрована на объемы в 2 мл, 5 мл и 9 мл. Лаборант должен определить три измерения на основе потребностей своей лаборатории. Если пипетка предназначена для дозирования только определенного объема, то калибровку необходимо осуществлять только в отношении этого объема. Если пипетка используется только для заполнения объема или дозирования некритического объема, то ее не нужно калибровать. Эти специальные пипетки должны быть маркированы соответствующим образом, чтобы лаборант знал, для чего используется эта пипетка.

Технические требования (спецификации)

Технические требования определяются на основе результатов измерений, полученных в ходе калибровки. Если пипетка не соответствует техническим требованиям, то ее необходимо проверить в лаборатории или отправить производителю для повторной калибровки или замены. Если пипетка не соответствует техническим требованиям, то ее необходимо пометить соответствующей наклейкой, информирующей о ее выводе из эксплуатации. Расчет технических требований приведен ниже.

Масса образца преобразуется в объем образца путем ее умножения на Z-коэффициент (мл/г). Однако для пипеток, которые должны быть откалиброваны при помощи совместимого растворителя, используется плотность, и масса должна быть разделена на плотность (г/мл). Убедитесь в том, что используется правильная плотность растворителя в зависимости от температуры в лаборатории. Перечень Z-коэффициентов приведен в Таблице 4. Плотность можно найти в CRC, Справочнике по химии и физике.

$$\% \text{ Ошибка (или Точность)} = \frac{(\text{Средний объем} - \text{Теоретический объем}) \times 100}{\text{Теоретический объем}}$$

Прецизионность = Стандартное отклонение = Повторяемость

$$\% \text{ CV (Коэффициент вариации)} = (\text{Стандартное отклонение}) / (\text{Средний объем}) \times 100$$

ТАБЛИЦА 5

Z-коэффициенты для преобразования массы образца в объем образца

Температура воды (°C)	Z-коэффициент (мл/г)
15	1.002
15.5	1.002
16	1.0021
16.5	1.0022
17	1.0023
17.5	1.0024
18	1.0025
18.5	1.0026
19	1.0027
19.5	1.0028
20	1.0029
20.5	1.003
21	1.0031
21.5	1.0032
22	1.0033
22.5	1.0034
23	1.0035
23.5	1.0036
24	1.0037
24.5	1.0038
25	1.0039
25.5	1.004
26	1.0041
26.5	1.0042
27	1.0043
27.5	1.0044
28	1.0045
28.5	1.0046
29	1.0047

Технические требования или калибровочные пределы для данной пипетки определяются посредством ее использования в лаборатории. Существует три вида использования пипетки в лаборатории: критическое, некритическое и не нуждающееся в калибровке. Некоторые диспенсеры используются для заполнения объема,

и для таких целей они не нуждаются в калибровке. Только менеджер имеет право изменить пределы. Предлагаемые ограничения для критического и некритического использования приведены ниже.

Критическое использование:	Точность: $\leq 2,0\%$ Прецизионность: $\leq 0,75\%$
Некритическое использование:	Точность: $\leq 6\%$ Прецизионность: $\leq 2,5\%$

Поиск и устранение проблем

Неправильность объемов может возникать в случаях, когда не выполняются соответствующие процедуры пипетирования, как, например, наконечники не совсем соответствуют используемым пипеткам или они не плотно садятся на пипетку. Эти проблемы можно выявить, наблюдая за размещением ручки эжектора на пипетке. Если он мешает срабатыванию пипетки, то это значит, что что-то не так. У всех пипеток и диспенсеров ослабление или трещина в стержне влияет на объемы забора. По любым проблемам, связанным с внутренними механизмами пипетки, следует обращаться к опытному специалисту по ремонту. Объем образца также может быть неточным, если образец забрызгал пипетку.

Уход за пипетками

Пипетки должны храниться в вертикальном положении; их не следует оставлять лежащими на лабораторном столе. При использовании агрессивных или больших объемов используйте фильтры.

ЭКСПЛУАТАЦИЯ pH-МЕТРА

Общая информация

Это стандартная операционная процедура описывает метод, используемый для калибровки и использования лабораторных pH-метров.

Область применения

Это стандартная операционная процедура применяется к обычному использованию pH-метра.

Реагенты

- Дистиллированная вода
- pH-буфер $4,00 \pm 0,01$
- pH-буфер $7,00 \pm 0,01$
- Трехмолярный раствор хлорида калия – отвесьте 224 г хлорида калия (KCl), поместите в мерную колбу объемом 1 литр и затем дополните ее деионизированной водой.

Оборудование

- pH-метр
- Комбинированный электрод

- Мензурки
- Пластина для смешивания
- Магнитный мешалник
- Графин для воды

Процедуры

Калибровка (ежедневная)

- Налейте свежего рН-буфера 4 и рН-буфера 7 в небольшие мензурки (сохраните калибровочные сертификаты для буферов).
- рН-метр переведите в положение рН.
- Промойте электрод деионизированной водой.
- Поместите электрод в рН-буфер 7. Перемешайте буфер на пластине для смешивания или встряхните его вручную.
- При необходимости отрегулируйте уровень рН до 7,00 с использованием калибровочной ручки.
- Выньте электрод из рН-буфера 7.
- Промойте электрод деионизированной водой.
- Поместите электрод в рН-буфер 4. Перемешайте буфер на пластине для смешивания или встряхните его вручную.
- При необходимости отрегулируйте уровень рН до 4,00 с использованием температурной ручки.
- Выньте электрод и промойте его деионизированной водой, держите электрод в мензурке с деионизированной водой во время использования и храните его в трехмолярном растворе хлорида калия (3 М KCl) после использования.
- После использования верните рН-метр в режим ожидания.
- Утилизируйте использованный буфер.

Использование

- Поместите электрод в измеряемый раствор. Раствор можно перемешать при желании.
- После стабилизации показателя рН, зафиксируйте значение рН.
- Выньте электрод и промойте его деионизированной водой.
- Повторите для каждого образца, электрод можно держать в деионизированной воде между повторами.
- По окончании храните электрод в трехмолярном растворе хлорида калия и верните настройки в режим ожидания.

ЭКСПЛУАТАЦИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРА

Общая информация

Спектрометрия – это метод, используемый для измерения объема лучистой энергии, поглощаемой веществом при различных длинах волн света. Длина волны, при которой происходит пик поглощения, является полезной при попытке определить неизвестную величину. Путем измерения спектра поглощения вещества можно определить вещество или поместить его в тот или иной класс соединений. Закон

Бера-Ламберта описывает отношение между показателем поглощения и концентрацией растворенного вещества и длиной светового пути. Показатель поглощения прямо пропорционален концентрации и длине светового пути. Таким образом, график зависимости показателя поглощения от концентрации является прямой линией. Таким образом, создав серию эталонов, можно определить количество вещества в образце.

Область применения

Это стандартная операционная процедура применяется в отношении базового лабораторного спектрофотометра, который используется для измерения показателя поглощения в видимой области спектра (280-760 нм). Более короткие длины волн (УФ или ультрафиолетовые) или более длинные длины волн (ИК или инфракрасные) требуют использования других приборов.

Реагенты

Дистиллированная вода

Оборудование

- Спектрофотометр
- Кюветы
- Графин с водой
- Очищающие салфетки (безворсовые салфетки)

Процедура

Для того, чтобы измерить показатель поглощения конкретного вещества в реакционной смеси, необходимо сначала обнулить спектрофотометр с тем, чтобы обеспечить измерение только вещества, представляющего интерес. Это осуществляется при помощи пустой пробы или кюветы, который содержит все растворители носителей, за исключением вещества, представляющего интерес. *ПРИМЕЧАНИЕ:* отдельная пустая проба требуется для каждой уникальной реакционной смеси.

Эксплуатация спектрофотометра

Настройка

1. Включите прибор и дайте ему прогреться в течение 5-10 минут.
2. Установите длину волны с помощью соответствующего циферблата.
3. Приготовьте пустую кювету, добавив все растворители, за исключением вещества, которое должно быть измерено.
4. При отсутствии пробирки в держателе установите измеритель в положение, обеспечивающее считывание бесконечно большого уровня поглощения (0% пропускание), используя соответствующий орган управления.
5. Используя безворсовую салфетку, протрите внешнюю поверхность пустой кюветы.
6. Поднимите крышку, вставьте кювету и закройте крышку. *ПРИМЕЧАНИЕ:* Если кюветы или пробирки не имеют меток совмещения, используйте маркер, чтобы

сделать небольшие вертикальные отметки в верхней части каждой кюветы для использования в целях последовательного совмещения в держателе образца.

- Используя соответствующий орган управления настройте прибор для обеспечения возможности прочтения показателя поглощения, равного 0,00 (100% пропускание). Это также известно как установка предельного показания шкалы.

Измерение показателей поглощения или пропускания

- Удалите пустую пробу и вставьте кювету, содержащую образец. Закройте крышку.
- Прочтите показатели поглощения или пропускания, как это необходимо для образца.

ПРИМЕЧАНИЕ: При выполнении нескольких измерений при той же длине волны в течение короткого периода времени нет необходимости повторять пустую пробу для каждого образца. В течение более длительного времени устройство может дрейфовать, и, возможно, потребуется повторная калибровка. Если меняются длины волн, то необходимо осуществить повторное обнуление.

Спектрофотометр необходимо калибровать для обеспечения точности длины волны на регулярной основе (обычно калибровка осуществляется сервисным инженером при проведении регламентных работ). Все протоколы такой калибровки должны фиксироваться в Журнале оборудования.

ЛАБОРАТОРНАЯ ВОДА

Общая информация

Очищенная вода получается путем дистилляции, ионообменной очистки, обратного осмоса или другого подходящего процесса. Надежность лабораторной воды контролируется посредством следующих контрольных процедур.

Область применения

Вся вода, используемая в лаборатории для подготовки реагентов, мытья стеклянной лабораторной посуды или той, что контактирует с образцами.

Ответственности сторон

Лаборанты выполняют анализ воды в соответствии с СОП.

Руководитель/директор лаборатории обеспечивает соблюдение процедур.

Менеджер по качеству указывает, что используемые процедуры являются надлежащими.

Реагенты

- Щелочной ртуть-йодистоводородный калийный контрольный раствор. Растворите 10 г йодида калия в 10 мл воды и добавьте медленно, перемешивая, насыщенный раствор хлорида ртути, пока нерастворенным останется небольшой красный осадок. К этой смеси добавьте ледяной раствор 30 г гидроксида калия в 60 мл воды, а затем добавьте 1 мл более насыщенного

- раствора хлорида ртути. Добавьте воду до достижения объема в 200 мл. Дождитесь успокоения осадка и возьмите прозрачную жидкость.
2. Контрольный раствор перманганата калия, KMnO_4 (0,1 N). Разведите 100 мл одномолярного (1 N) раствора 1 литром воды.
 3. Контрольный раствор нитрата серебра, AgNO_3 (0,1 N).
 4. Контрольный раствор серной кислоты, H_2SO_4 (2 N). Добавьте 56 мл концентрированной H_2SO_4 к примерно 500 мл воды в 1-литровой колбе. Дополните колбу водой.
 5. Азотная кислота, HNO_3 (70% отношение веса к объему).
 6. Контрольный раствор гидроксида аммония NH_4OH (30 мкг/100 мл). Возьмите 0,1 мл NH_4OH и дополните водой мерную колбу объемом 100 мл. В мензурку объемом 100 мл добавьте 0,1 мл вышеуказанного раствора. Эта мензурка является контролем для NH_3 в воде высокой степени чистоты.

Оборудование

- Автоматическая пипетка 1 мл
- Автоматическая пипетка 5 мл
- Диспенсер
- Электроплитка

Процедуры

1. ХЛОРИД. К 100 мл контрольной воды добавьте 5 капель азотной кислоты и 1 мл раствора нитрата серебра. Не должно возникнуть помутнение. *ПРИМЕЧАНИЕ:* Используйте хлорированную водопроводную воду в качестве контроля.
2. ПРОВОДИМОСТИ. Используйте кондуктометр для проверки того, обладает ли образец воды сопротивлением больше, чем 16,6 МОм при температуре 25 °С.
3. ОКИСЛЯЕМЫЕ ВЕЩЕСТВА. К 100 мл контрольной воды добавьте 10 мл двухмолярной (2 N) серной кислоты и нагрейте до кипения. Добавьте 0,1 мл 0,1-молярного перманганата калия и прокипятите в течение 10 минут. Розовый цвет не должен полностью исчезнуть.
4. АММИАК. Добавьте 2 мл щелочного ртуть-йодистоводородного калийного контрольного раствора к 100 мл контрольной воды: любой полученный при этом желтый цвет не должен быть темнее, чем контроль, содержащий 30 мкг NH_3 , добавленного к 100 мл воды высокой степени чистоты.

ПРОЦЕДУРЫ ОЧИСТКИ СТЕКЛЯННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

Это стандартная операционная процедура описывает различные методы, используемые для очистки стеклянной посуды в лабораториях. Сломанная, сколотая, треснувшая или вытравленная стеклянная посуда изымается из обращения и передается в ремонт стеклотру, или же просто выбрасывается в урну, предназначенную для битого стекла. То, насколько внимательно необходимо относиться к процедуре очистки, определяется требованиями к чувствительности и точности результатов. В отношении стеклянной посуды по нескольким причинам необходимо применять различные методы очистки. Стеклянная посуда, используемая при подготовке

микробиологических веществ, должна быть очищена от всех бактериостатических или бактерицидных материалов. Стерильная одноразовая посуда, как, например, чашки Петри и пипетки, должны иметь сертификат стерильности от производителя до их использования в лаборатории. В некоторых случаях стеклянная посуда должна быть очищена в соответствии с чувствительностью приборов, используемых в рамках анализа. Для анализа следов металлов посуда очищается при помощи кислоты перед каждым использованием. В других случаях, как, например, в лаборатории по микотоксинам, посуда должна быть обработана с целью удаления оставшихся токсинов. Таким образом, необходимо иметь несколько отдельных процедур очистки в целях удовлетворения различных потребностей каждой лаборатории и выполняемых ею анализов.

Область применения

Это стандартная операционная процедура применяется ко всем видам стеклянной лабораторной посуды, используемой при подготовке лабораторных реагентов и/или образцов.

Ответственности сторон

Лаборанты выполняют очистку стеклянной посуды в соответствии с СОП. Руководитель/директор лаборатории обеспечивает соблюдение процедур. Менеджер по качеству указывает, что используемые процедуры являются надлежащими.

Реагенты

- Лабораторные детергенты (DeSCAL, Contrad NF, Dri-CONTRAD или аналогичные)
- Азотная кислота, соответствующая классу следов металла
- Вода, дистиллированная/деионизированная
- Отбеливатель

Оборудование

- Посудомоечная машина для стеклянной посуды
- Система очистки для деионизированной воды
- Сушильный шкаф большой емкости, обеспечивающий температуру 75 °C
- Сушильный шкаф большой емкости, обеспечивающий температуру 110 °C

Процедуры

Стеклянная посуда, используемая в лаборатории по микотоксинам/биобезопасности

1. Воспользуйтесь ацетоном, чтобы удалить имеющуюся надпись на стеклянной посуде.
2. Тщательно промойте проточной водой, тем самым обеспечив отсутствие каких-либо частиц на посуде, которые могут забить моечную машину.
3. Загрузите моечную машину таким образом, чтобы каждый предмет мог быть промыт и ополоснут надлежащим образом.

4. Запустите моечную машину. Обеспечьте промывку моечной машины в течение примерно 3 минут, а затем заполните ее водой и добавьте 350 мл детергента (DRI-CONTRAD или аналогичного).
5. Закройте дверцу моечной машины и нажмите на кнопку Старт на панели управления.
6. После завершения цикла мытья дайте посуде остыть, а затем поместите ее в соответствующий сушильный шкаф.
7. Поместите стеклянную посуду в сушильный шкаф температурой 110 °С и пластиковую посуду в сушильный шкаф температурой 75 °С. Стеклянную посуду, содержащую резиновые уплотнители (например, стакан для блендера), необходимо сушить в сушильном шкафу температурой 75 °С.

Обычная стеклянная лабораторная посуда

1. Предметы, которые слишком велики, чтобы их вымыть успешно в моечной машине, должны быть промыты в ванне при помощи 10% детергента (Contrad NF или аналогичного).
2. Воспользуйтесь ацетоном, чтобы удалить имеющуюся надпись на стеклянной посуде.
3. Тщательно промойте проточной водой, тем самым обеспечив отсутствие каких-либо частиц на посуде, которые могут забить моечную машину.
4. Загрузите моечную машину таким образом, чтобы каждый предмет мог быть промыт и ополоснут надлежащим образом.
5. Запустите моечную машину.
6. После завершения цикла мытья дайте посуде остыть, а затем поместите ее в соответствующий сушильный шкаф.
7. Поместите стеклянную посуду в сушильный шкаф температурой 110 °С и пластиковую посуду в сушильный шкаф температурой 75 °С. Стеклянную посуду, содержащую резиновые уплотнители (например, стакан для блендера), необходимо сушить в сушильном шкафу температурой 75 °С.

Стеклянная посуда, используемая для анализа следов металлов

1. Предметы, которые слишком велики, чтобы их вымыть успешно в моечной машине, должны быть промыты в ванне при помощи 10% детергента (Contrad NF или аналогичного).
2. Воспользуйтесь ацетоном, чтобы удалить имеющуюся надпись на стеклянной посуде.
3. Тщательно промойте проточной водой, тем самым обеспечив отсутствие каких-либо частиц на посуде, которые могут забить моечную машину.
4. Загрузите моечную машину таким образом, чтобы каждый предмет мог быть промыт и ополоснут надлежащим образом.
5. Запустите моечную машину.
6. Обеспечьте промывку моечной машины в течение примерно 3 минут, а затем заполните ее водой и добавьте детергента. Закройте дверцу моечной машины и нажмите на кнопку Старт на панели управления.

7. После завершения цикла мытья дайте посуде остыть, а затем поместите ее в соответствующий сушильный шкаф.
8. Поместите стеклянную посуду в сушильный шкаф температурой 110 °С и пластиковую посуду в сушильный шкаф температурой 75 °С. Стеклянную посуду, содержащую резиновые уплотнители (например, стакан для блендера), необходимо сушить в сушильном шкафу температурой 75 °С.

Процедуры очистки с использованием ванн/бочек (азотнокислотная ванна, 10%)

Всю стеклянную посуду, используемую в методах анализа минерального сырья, необходимо очищать в ванне, содержащей 10% раствор HNO_3 . Только HNO_3 , соответствующая классу следов металла, должна использоваться для приготовления кислотной ванны. **ПРИМЕЧАНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ:** Наденьте средства индивидуальной защиты, прежде чем начать работать с ванной, содержащей 10% раствор HNO_3 . Вы должны надеть защитные перчатки, защитную маску и фартук или лабораторный халат.

1. Воспользуйтесь ацетоном, чтобы удалить имеющуюся надпись на стеклянной посуде.
2. Промойте посуду как мощно тщательнее во избежание загрязнения ванны с 10% раствором HNO_3 .
3. Убедитесь, что посуда полностью погружена в ванну; оставьте посуду в ванне на не менее два часа.
4. Осторожно выньте посуду из ванны, стараясь не брызнуть кислотный раствор на себя.
5. Тщательно промойте посуду деионизированной водой.
6. Поместите стеклянную посуду в сушильный шкаф температурой 110 °С и пластиковую посуду в сушильный шкаф температурой 75 °С. Стеклянную посуду, содержащую резиновые уплотнители (например, стакан для блендера), необходимо сушить в сушильном шкафу температурой 75 °С.

Ванна с детергентом, 10% DeSCAL или Contrad NF или аналогичные детергенты

Всю стеклянную посуду, которая слишком велика, чтобы ее вымыть успешно в моечной машине, необходимо очищать при помощи ванны с детергентом. **ПРИМЕЧАНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ:** Наденьте средства индивидуальной защиты, прежде чем начать работать с ванной, содержащей 10% раствор детергента. Вы должны надеть защитные перчатки и фартук или лабораторный халат.

1. Воспользуйтесь ацетоном, чтобы удалить имеющуюся надпись на стеклянной посуде.
2. Промойте посуду как мощно тщательнее во избежание загрязнения ванны с детергентом.
3. Убедитесь, что посуда полностью погружена в ванну; оставьте посуду в ванне на не менее два часа.
4. Осторожно выньте посуду из ванны, стараясь не брызнуть раствор на себя.
5. Тщательно промойте посуду водопроводной водой, а затем дистиллированной водой.

6. Поместите стеклянную посуду в сушильный шкаф температурой 110 °С и пластиковую посуду в сушильный шкаф температурой 75 °С. Стеклянную посуду, содержащую резиновые уплотнители (например, стакан для блендера), необходимо сушить в сушильном шкафу температурой 75 °С.

Очистка стеклянных пипеток

Ванны для пипеток приготавливают из 10% раствора детергента (DeSCAL или аналогичного). Для приготовления свежей ванны для пипеток добавьте 13,5 л воды в ванну, а затем туда же 1,5 л детергента.

1. Убедитесь, что посуда полностью погружена в ванну; оставьте посуду в ванне на не менее два часа.
2. Осторожно выньте посуду из ванны, стараясь не брызнуть раствор на себя.
3. При помощи моечной машины для пипеток промойте пипетки по крайней мере три раза деионизированной водой.
4. Поставьте пипетки в сушильный шкаф температурой 110 °С для просушки.

Специальная процедура очистки

Тигли Гуча из фриттованного стекла (используются для некоторых гравиметрических методов)

1. Промойте водопроводной водой.
2. Замочите в 1:7 раствора гидроксида аммония на, как минимум, два часа.
3. Закрепите тигли Гуча на вакуумном стенде.
4. Промойте три раза дистиллированной водой.
5. Дайте высохнуть при комнатной температуре.

Мерные колбы. Будьте осторожны, не используйте слишком много тепла, так как это может привести к аннулированию калиброванного объема; необходимо провести проверку со взвешенной водой, если использовалось чрезмерное тепло.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ

Являясь сотрудником лаборатории вы обязаны делать свою работу хорошо и безопасным образом. Одним из приоритетов лаборатории является предоставление своим сотрудникам рабочего места без явных и предотвратимых рисков для их здоровья и безопасности.

Безопасность, однако, не может быть предоставлена в качестве полномочий; также она не является чем-то, что можно передать сотруднику. Скорее, сотрудники должны сами осуществлять сознательные действия для обеспечения безопасных условий для себя и других сотрудников в рамках рабочей зоны. Это требует от сотрудников понимания потенциальных рисков на рабочем месте и знания процедур и правил, необходимых для минимизации этих рисков.

В любой рабочей среде, особенно в лаборатории, неизбежно имеются источники риска. Лаборатория, конечно, не является исключением. Во избежание рисков телесных повреждений каждый сотрудник должен знать, как использовать инструменты и оборудование безопасным образом, и должен быть проинформирован о том, что делать в случае пожара, травмы или другой чрезвычайной ситуации. Тем

не менее, одной информации недостаточно. Безопасность на рабочем месте обеспечивается надлежащим отношением к данному вопросу, равно как и познаниями в этой области.

Это означает:

- признание того, что несчастные случаи не ограничиваются лишь теми людьми, которые не знают, как их предотвратить. Зачастую жертвой несчастного случая становится «закаленный в боях» ветеран, человек, который «знает лучше всех», у которого эта осведомленность притупляет чувство осторожности.
- поддержание постоянной осведомленности. Это включает в себя вашу личную приверженность делать каждую работу безопасным образом.
- предупреждение других сотрудников об опасности, если они не придерживаются мер безопасности.
- немедленное уведомление руководителей в случае наличия дефектного оборудования или других потенциальных опасностей.
- участие в работе комитетов по безопасности, оказание помощи в проведении инспекций по безопасности и постоянное обеспечение выполнения всех мер безопасности.

Безопасность является неотъемлемой частью каждой выполняемой работы; однако никакая работа не важна, если нет времени, чтобы сделать ее правильно и безопасно!

Область применения

Все лабораторные области, включая получение образцов, хранение образцов и аналитические лаборатории.

Процедуры – общие правила техники безопасности

- В лаборатории запрещается есть и пить. Продукты питания запрещается хранить в любом из лабораторных холодильников. Запрещается использовать льдогенератор для пищевых продуктов или напитков.
- Двери лаборатории необходимо держать закрытыми в целях соблюдения местных правил пожарной безопасности и сохранения воздушного баланса в лаборатории.
- Курение в лаборатории не допускается.
- Посетители, прибывшие в лабораторию не по служебным делам, не должны допускаться в лабораторию. Все посетители должны зарегистрироваться в приемной, получить средства индивидуальной защиты и сопровождаться сотрудником во время пребывания в лаборатории.
- При входе в лабораторию всем посетителям необходимо одеть индивидуальные средства защиты (защитные очки, если их собственные очки не подходят). В случае их отказа сделать это, необходимо попросить их вежливо покинуть помещение, объяснив это тем, что лаборатория не может взять на себя ответственность за риск получения травмы.
- Дети моложе трудоспособного возраста не допускаются в лабораторию без разрешения руководителя или директора.

- Держите рабочее место в чистоте и порядке.
- Все сотрудники лаборатории должны быть осведомлены об опасностях, связанных с обращением с любыми химическими веществами или результатами какой-либо процедуры, которую возможно им нужно будет выполнить. Ответственностью каждого сотрудника является надлежащая и полная информированность обо всех химических веществах, используемых в работе, и связанных с ними опасностей.
- Перед тем, как покинуть свой рабочий участок в лаборатории по какой-либо причине, убедитесь, что не возникает никакой риск вследствие оставления оборудования/процесса без присмотра.
- Никогда не выполняйте опасные лабораторные процедуры, если кто-либо еще не находится в помещении. Проконсультируйтесь со своим руководителем в отношении того, что входит в перечень опасных процедур.
- Проинформируйте соответствующих сотрудников и руководителя на вашем рабочем участке в случае возможности возникновения нестандартной опасной ситуации.
- Поместите соответствующие предупреждающие знаки в местах, где могут возникнуть нестандартные опасные ситуации.
- Запомните, где находятся огнетушители, душевые комнаты и места для промывки глаз, комплекты для очистки в случае разлива химикатов и аптечки первой помощи, а также то, как ими правильно пользоваться, чтобы можно было их применить быстро и эффективно в чрезвычайных ситуациях.
- Проверяйте душевые комнаты на регулярной основе на предмет их работоспособности и гигиены.
- Необходимо избегать работать в одиночку.

Свяжитесь со своим руководителем:

- если нет никаких конкретных правил, регулирующих безопасное обращение с химическими веществами или проведение процедур, или правила, как кажется, не применимы к конкретному случаю. Получите совет у своего руководителя или специалиста по технике безопасности, прежде чем приступить к работе.
- если у вас имеются какие-либо сомнения в отношении применения надлежащих мер предосторожности или вам не понятны инструкции или оборудование. Помните, что первостепенной задачей является обеспечение вашего здоровья, вашей безопасности и безопасности ваших коллег.
- перед выполнением процедуры в первый раз. Внимательно прочитайте инструкции и обсудите их с вашим руководителем. Это позволит избежать путаницы относительно того, как эта процедура может быть безопасно выполнена.
- Только те, кто сам прошел полное обучение (имеют актуальную информацию в Карточке учета профессиональной подготовки), могут обучать других использованию критического оборудования.

Как пользоваться огнетушителем

Если в вашей лаборатории произошел небольшой пожар, и вы уверены, что справитесь с ним, следуйте приведенным ниже инструкциям:

1. Проинформируйте других сотрудников о наличии пожара.
2. Найдите ближайший огнетушитель, подходящий для данного типа пожара.*
3. Удалите предохранительную чеку с ручки (сломайте пластиковую бирку, которая соединяет чеку с огнетушителем).
4. Направьте сопло огнетушителя на основание пламени, затем сожмите отжимной рычаг.
5. Применяйте огнетушитель указанным образом, пока пламя не погаснет, обеспечивая охват огнетушителем всей площади возгорания.
6. Убедитесь, что пожар потушен, отойдите от участка, а затем уведомите своего руководителя.
7. Обеспечивайте перезарядку огнетушителя после каждого использования, уведомив об этом Департамент гигиены и безопасности окружающей среды.

* Не применяйте водный или пенный огнетушитель в отношении электрооборудования.

Не применяйте водный огнетушитель в отношении нефти или растворителей.

Углекислотные огнетушители могут применяться в отношении большинства типов пожаров.

В СЛУЧАЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ КРУПНОГО ПОЖАРА НЕ ПЫТАЙТЕСЬ СПРАВИТЬСЯ С НИМ САМОСТОЯТЕЛЬНО, АКТИВИРУЙТЕ СИГНАЛ ТРЕВОГИ, ПОЗВОНИТЕ В ПОЖАРНУЮ СЛУЖБУ И СЛЕДУЙТЕ ПЛАНУ ЭВАКУАЦИИ:

Процедуры – Правила личной безопасности

- Надлежащие средства защиты глаз необходимо носить все время при нахождении в лаборатории, подготовительном помещении лаборатории и проходах лаборатории. Это включает в себя, по крайней мере, корректирующие очки или защитные очки. Корректирующие или защитные очки являются недостаточными для обеспечения защиты при выполнении некоторых процедур. Лабораторные очки или защитную маску нужно одевать при выполнении следующих процедур или при нахождении в непосредственной близости от этих процедур:
 1. Утилизация и очистка
 2. Работа с кислотными ваннами и мытье стеклянной посуды, которая содержит или содержала опасные вещества.
 3. Автоклавирование хлорной кислоты.
- Единственными исключениями ношения защитных очков в лаборатории являются использование микроскопа, настройка ПЦР-реакций и загрузка агарозного геля.
- Ношение лабораторных халатов является обязательным условием в большинстве лабораторий.
- беруши или средства защиты органов слуха следует использовать в любом помещении, где наблюдается высокий уровень шума.

- Надевайте соответствующие защитные перчатки, когда риск для здоровья превышает уровень 2. Риск для здоровья характеризуется числом, указываемым в синей части знака (ромба) предупреждения об опасности NFPA. Промойте свои руки после снятия защитных перчатках.
- Длинные волосы не должны мешать при работе с химическими веществами или механическими устройствами и должны быть собраны все время.
- Сотрудникам лаборатории и персоналу, занятому в подготовке образцов, не разрешается одевать сандалии или обувь с открытым носком и т.д.
- Руководящие принципы по минимизации конкретных рисков, связанных с химическими веществами, можно найти в разделе СПЕЦИАЛЬНЫЕ СЛУЧАИ данного руководства.
- Снимите перчатки до прикосновения к дверным ручкам, телефонам, выключателям освещения и т.д. во избежание загрязнения предметов общего пользования.

Процедура - Химикаты

Хранение

- Храните кислоты и основания отдельно друг от друга, ближе к полу и в маркированных соответствующим образом шкафах.
- Храните хлорную кислоту изолированно от органических материалов и от серной кислоты. Не храните хлорную кислоту на деревянной полке.
- Отделите высокотоксичные химические вещества и канцерогены от всех других химических веществ.
- Не храните перекись-образующие химикаты (например, этиловый эфир, диоксан) в течение более чем двенадцати месяцев или после даты, рекомендованной производителем.
- Храните соответствующие воспламеняющиеся вещества во взрыво- и искробезопасном холодильнике.
- Стекланные контейнеры с химикатами никогда не должны храниться на полу.
- Обеспечьте наличие лотка под бутылками на случай утечки жидкости.

Возвращайте химикаты, материалы и сопутствующее оборудование в их соответствующие места хранения после использования.

Если контейнер будет использоваться для отходов, то удалите, закройте или сотрите исходную этикетку. Затем обозначьте его маркером или этикеткой с тем, чтобы его содержимое было очевидным для всех. Если бутылка с химикатом стала пустой, также удалите или сотрите этикетку.

Электрически заземлите все контейнеры с металлами-растворителями до переноса какого-либо растворителя. Бутылки с жидкими химикатами необходимо закрепить надлежащим образом при транспортировке между лабораториями. Никогда не выливайте токсичные или нерастворимые в воде горючие растворители в раковину.

При подготовке контейнеров с этиловым эфиром к утилизации, не забудьте добавить сульфат железа, чтобы устранить опасность взрыва из-за образования перекисей.

При смешивании растворов ВСЕГДА добавляйте концентрированную жидкость в разбавленную жидкость. Всегда добавляйте кислоту в воду.

Органические вещества нельзя выпаривать в вытяжном шкафу. Используйте контейнеры для отходов, чтобы избавиться от них. Контейнеры для органических отходов должны быть закрыты, когда они не используются.

Общие риски при обращении с химикатами в лаборатории

Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех химических веществ, хранящихся в лаборатории, должны быть легкодоступны.

уксусная кислота. Опасна при контакте с хромовой кислотой, перекисью натрия или азотной кислотой; необходимо хранить вдали от окислителей.

ацетон. Летучая жидкость. Выделяет пары, которые образуют горючие и взрывоопасные смеси с воздухом; не смешивать с хлороформом.

аммиак (безводный). Вещество раздражающего действия, очень едкая жидкость и газ, бурно реагирует с сильными окислителями. Необходимо изолировать от других химических веществ, особенно от хлора и сильных кислот.

этиловый эфир. Очень летучая жидкость. Спонтанно взрывающееся вещество. Иногда в состоянии покоя образуются пероксиды. Необходимо изолировать и хранить вдали от любых источников воспламенения.

формальдегид. Воздействие в высоких концентрациях может вызвать раздражение кожи и воспаление слизистых оболочек, глаз и дыхательных путей.

муравьиная кислота. Вызывает коррозию и обладает едким воздействием на кожу. Легковоспламеняющееся вещество, может образовывать взрывоопасные смеси с воздухом.

соляная кислота. Водный раствор вызывает коррозию и раздражение. Пары вызывают коррозию и раздражение слизистых оболочек. Водород выделяется при контакте с металлами. Держать вдали от окислителей.

синильная кислота. Ядовитое вещество, вдыхание может вызвать потерю сознания и смерть. Избегайте контакта с кожей; образует взрывоопасные смеси с воздухом. Храните вдали от любых источников тепла.

плавиковая кислота. Кислота и пары высокотоксичны и вызывают раздражение кожи, глаз и дыхательных путей. Вызывает реакцию при контакте со стеклом; необходимо изолировать и хранить в вентилируемом помещении.

перекись водорода. Длительное воздействие паров раздражает глаза и легкие. Вызывает раздражение кожи. Может разлагаться сильно при попадании меди, железа или хрома; необходимо хранить в прохладном месте вдали от горючих материалов.

метанол. Горючее и токсичное вещество. Избегайте попадания в глаза и вдыхания паров.

азотная кислота. Вызывает коррозию и приводит к тяжелым ожогам при контакте с кожей. Реагирует бурно при контакте с анилином, сероводородом, горючими растворителями, гидразином и металлическими порошками.

щавелевая кислота. Образует взрывчатые соединения с серебром и ртутью. Оксалаты являются токсичными. Избегайте контакта с кожей.

цианистый калий. Очень ядовито при попадании в организм. Выделяет газ синильной кислоты при контакте с кислотами или влагой.

гидроксид калия. Выделяет тепло при контакте с водой; хранить в сухом месте.

салициловая кислота. Горючее твердое вещество; хранить в сухом месте.

гидроксид натрия. Принадлежит к тому же классу, что и гидроксид калия: необходимо изолировать от источников тепла и воды. При контакте с водой выделяет избыточное тепло и раздражающие газы.

серная кислота. Выделяет агрессивные, опасные пары при возгорании. Может воспламениться при контакте с горючими материалами; разъедает металл. Необходимо изолировать от горючих материалов. Всегда добавляйте кислоту в воду.

Другие специальные реагенты

эфиры. Очень летучие и легковоспламеняющиеся вещества; пары тяжелее воздуха и могут привести к обратному удару пламени; образуют потенциально взрывоопасные перекиси при контакте с воздухом и светом; хранить в хорошо проветриваемом помещении; **не** хранить в холодильнике, если только он не взрывозащищенного типа.

Хлорная кислота. Бурно реагирует с органическими веществами; для безопасного применения необходимо использовать специальный вытяжной шкаф с системой водяной защиты; должна храниться в условиях, не допускающих контакта с органическими материалами (например, деревом).

Процедуры – утечка химических веществ.

То, как локализуется такая утечка и как производится последующая очистка имеет важное значение. Неправильный способ локализации или очистки может сделать ситуацию еще хуже, чем если бы ее оставили как есть. В этом разделе приводятся некоторые конкретные рекомендации по локализации утечек и очистке их последствий.

Существует шесть классов опасностей, связанных с утечкой жидкостей, однако многие из них могут быть разрешены посредством применения одних и тех же методов. К базовым классам опасностей относятся:

Горючие вещества / Органические вещества	Вещества, вступающие в реакцию (с воздухом или водой)
Кислоты	Токсичные вещества
Основания	Биологические препараты

Эти классы имеют в своем составе как твердые, так и жидкие химикаты.

Локализация отходов

Обеспечьте наличие комплектов для устранения утечек ртути и кислот на рабочих местах.

Проще говоря, локализация отходов обеспечивает предотвращение дальнейшей утечки и расширения ее масштабов (миграции). В зависимости от места утечки и участвующих при этом химических веществ, локализация может быть достаточно простой, как, например, закрытие двери (для ограничения доступа и предотвращения образования пыли), или она может потребовать использования препятствий,

сливных пробок и других устройств. Локализация является первым шагом процесса очистки последствий утечек и предотвращает расширение масштабов утечки, в то время как первые ответные меры, как правило, направлены на предотвращение травм и воздействий на сотрудников. Всегда ИСПОЛЬЗУЙТЕ СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СРЕДСТВА ЛИЧНОЙ ЗАЩИТЫ до попытки устранения любых утечек. Подготовьтесь и обеспечьте защиту самого себя от наихудшего из возможных сценариев.

Утечки твердых химикатов, как правило, самолокализуемы. Примите меры для предотвращения распространения разбросанных твердых химикатов или образования пыли. Ограничьте перемещение людей вокруг этого места, а также запретите проведение любой уборки/подметания вокруг места утечки до момента полной очистки последствий утечки.

Утечки жидких химикатов требуют выставления препятствий во избежание их распространения. Желательно обеспечить локализацию пролитой жидкости к середине комнаты, если это возможно. Это особенно верно в отношении кислот и органических веществ, которые легко могут затекать под и через плинтусы, шкафы и мебель, и тем самым усугубить существенно проблему утечки. Ограждающие препятствия могут быть сделаны при помощи различных предметов: длинных универсальных мешков с сорбирующим веществом, подушек для локализации разлива, песка, глинистого наполнителя или вермикулита – всего того, что позволит предотвратить жидкость от распространения и не вступит в реакцию с пролитой жидкостью. Дренажные маты необходимы для предотвращения попадания жидкости в водопровод, канализацию и водные пути, если дренажные стоки есть рядом с местом разлива.

Используйте интуицию для предотвращения распространения утечек, например, на каждом этаже имеется некоторый уклон для этого, но небольшой величины, и пролитая жидкость всегда распространяется по этому уклону. Дренажные стоки должны быть заблокированы в первую очередь, если разлитая жидкость перетекла через препятствие. Правильная локализация обеспечит более легкую очистку последствий разлива. В некоторых случаях может быть необходимо выставить препятствие и локализовать утечку, которой будет заниматься группа по ликвидации утечки.

Всегда в первую очередь обеспечивайте личную безопасность, покиньте опасную зону и остерегайтесь испарений.

Очистка

Очистка последствий утечек, как правило, осуществляется в соответствии с общими принципами, изложенными ниже. Нестандартные процедуры очистки, скорее всего, потребуют присутствия обученной команды реагирования на утечки. В любом случае, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАДЛЕЖАЩИХ СРЕДСТВ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ И ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ОЧИСТКИ требуется для очистки последствий любых утечек безопасным и эффективным образом.

Необходимо ссылаться на местные оценки рисков.

Утечки сухих/кристаллических/порошкообразных твердых химических веществ:

1. Используя пластиковые метлу и совок зачерпните как можно больше утекшего химического вещества. Будьте осторожны при использовании

щетки, используйте ее в качестве преграды для сбора химикатов лотком, а не для проталкивания химиката в лоток. Щетка приводит к образованию пыли в процессе очистки. Если необходимо, создайте небольшой туман из воды, чтобы подавить запыленность, но ТОЛЬКО если это можно сделать безопасным образом.

2. Утилизируйте пролитые химикаты и все одноразовые предметы, использованные для очистки, в пакет для сбора утечки. Завяжите его и прикрепите ярлык об утилизации.

Разлив жидких химикатов (включая органические вещества / горючие вещества, кислоты и основания):

1. После осуществления локализации (описанной выше), начните размещать подушки для устранения разлива вдоль внутренней стороны преграды, потихоньку двигаясь по направлению к центру зоны разлива. Заменяйте пропитанные подушки сухими по мере необходимости. НЕ пытайтесь устранить пролитые химикаты (или подушки для устранения разлива) при работе с разливом кислоты/основания. Это потенциально может привести к большим проблемам (образованию ядовитого газа или ненужному выделению тепла).
2. Используйте экстренную вытяжную вентиляцию во время очистки, чтобы удалить накопившиеся пары. Убедитесь в том, что вытяжные шкафы полностью открыты.
3. После удаления пролитой жидкости, удалите все следы химического вещества из зоны разлива. В случае разлива кислоты или основания нейтрализуйте уровень pH в зоне разлива. Промойте шваброй зону разлива уксусным раствором (в случае разлива оснований) или раствором пищевой соды (в случае разлива кислот). Проверьте уровень pH зоны разлива с помощью лакмусовой бумаги (при наличии таковой) после уборки; уровень pH зоны разлива должен быть нейтральным (pH 5-9).
4. ВНИМАНИЕ: Если разлился раствор, содержащий тяжелые металлы (кадмий, мышьяк, селен, свинец и ртуть), то промывную воду необходимо собрать и потом должным образом утилизировать.
5. В случае разлива органических/легковоспламеняющихся растворителей, необходимо промыть зону разлива мыльной водой и высушить при помощи подушек для устранения разлива. В зависимости от химического вещества доступ к зоне разлива, возможно, должен быть ограничен ввиду возможности испарения любых остатков.
6. Утилизируйте использованные подушки для устранения разлива и все одноразовые предметы, использованные для очистки, в пакет для сбора утечки. Завяжите его и прикрепите ярлык об утилизации.

Следующие типы химических веществ классифицируются как *особые случаи*. Устранение утечек таких веществ требует использования специальных средств индивидуальной защиты, очистного оборудования/материалов и/или применения специальных методов. В случае таких утечек (за исключением биологических уте-

чек) необходимо уведомлять сотрудника по технике безопасности, либо с целью его привлечения для ликвидации утечки, либо для получения консультаций относительно собственных действий в этом случае.

Ртуть и ее соединения способны причинить большей вред здоровью и окружающей среде, потому что они образуют пары, которые легко всасываются через кожу. В случаях разлива их локализацию и очистку необходимо проводить с особой осторожностью. Небольшие, локализованные разливы могут быть устранены при помощи имеющихся в продаже наборов для очистки разливов ртути. Очисткой более крупных или нелокализованных разливов (включая разливы чистых образцов) или ртути, обнаруженной в сифоне раковины, должен заниматься Департамент гигиены и безопасности окружающей среды. Серная пыль не должна использоваться при очистке разлива ртути; хотя она и способна хорошо впитывать ртуть, она будет только усугублять усилия по восстановлению зоны разлива к нормальному состоянию.

Хлорированные органические растворители также опасны, как и перечисленные выше вещества, причем по тем же причинам: они легко образуют пары и легко всасываются через кожу. Хлороформ является наиболее распространенным химическим веществом этого класса, влияющим одновременно на нервную и дыхательную системы, а вдыхание его паров в больших объемах вызывает потерю сознания. Особую осторожность следует проявлять при приближении к месту разлива, вызванного этим химическим веществом, и устранении такого разлива.

Сероуглерод и гидроксид аммония выделяют пары, которые легко распространяются в другие зоны, тем самым препятствуя нормальной деятельности. Эти соединения, как известно, вызывают тяжелые респираторные и/или зрительные нарушения, даже при их наличии в небольших количествах. Лицам, подвергнувшимся существенным концентрациям паров этих химических веществ, необходимо незамедлительно обратиться за медицинской помощью. Утечки, вызванные каким-либо из этих химических веществ, требуют применения специальных средств индивидуальной защиты и методов для безопасной ликвидации последствий, локализации отходов и очистки зоны загрязнения.

Сероуглерод является чрезвычайно легковоспламеняющимся, что говорит о приоритетности устранения всех источников искр и воспламенения. Его низкая температура кипения (46 °C) требует очень быстрой реакции в случае его утечки. Средства индивидуальной защиты в этом случае должны включать в себя полную защиту лица (пары вызывают раздражение глаз), а все используемое для очистки оборудование должно быть неметаллическим. Лицам, подвергнувшимся воздействию сероуглерода, необходимо немедленно обратиться к врачу, так как длительное вдыхание паров может привести к повреждению одновременно центральной и периферической нервных систем, а также печени и почек.

Хотя он и не включен в список опасных химических веществ, **гидроксид аммония** является очень мощным и вредным основанием, который может привести в негодность фильтр противогаза при утечке объемом в литр или более того. Он вызывает сильные ожоги полости носа и дыхательных путей, а при длительном воздействии может привести к потере дыхания. Автономное дыхательное оборуду-

дование должно использоваться при локализации и очистке утечек, превышающих 4-литровую бутылку.

Биологические утечки. Эта категория утечек делится на три типа. К первому типу относится кровопролитие от тяжелой раны, происшедшей на рабочем месте. Ко второму типу относятся проколотые/рваные автоклавные мешки, из которых просачиваются отходы (перед автоклавированием). Третий тип включает в себя утечки бактериальной суспензии. Каждый из этих трех сценариев является потенциально опасным, но все они обрабатываются одним и тем же образом: одев защитную одежду начисто протрите зону утечки, а затем обработайте раствором гипохлорита натрия (5%) или отбеливателя (10%). Это уничтожит любые биологически опасные агенты, которые могут распространиться из зоны утечки. Проявляйте особую осторожность при устранении каких-либо утечек крови и воспринимайте их как зараженные ВИЧ или гепатитом в качестве меры предосторожности.

Микотоксины. Все образцы и эталоны микотоксинов, с которыми приходится иметь дело в лаборатории, очень канцерогенны, воздействуют на печень, головной мозг и центральную нервную систему. Все они опасны при вдыхании и проглатывании. При любом обращении с образцами микотоксинов необходимо одевать перчатки. Любая утечка с участием микотоксинов требует специальных мер очистки и особого внимания к обеспечению личной безопасности. Зону утечки необходимо очищать при помощи раствора гипохлорита натрия (5%) или отбеливателя (10%) в течение 30 минут, а затем еще раз еще очистить при помощи ацетона. Нажмите на кнопку аварийной вентиляции и покиньте комнату, пока не рассеются все пары.

ОБЩИЕ ПРОЦЕДУРЫ – ПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ

1. Автоклавы
2. Электрофорез
3. Микробиологическая безопасность уровня BSL2 (уровень мер предосторожности 2)
4. Микотоксиновая безопасность уровня BSL2 (уровень мер предосторожности 2)
5. Вакуум / давление
6. Электротехническое оборудование
7. Поднимание предметов
8. Легковоспламеняющиеся жидкости
9. Газовые баллоны
10. Стеклянная посуда
11. Острые предметы
12. Вытяжные шкафы
13. Особые меры предосторожности при обращении с вытяжными шкафами для работы с хлорной кислотой

1. Автоклавы

- Автоклавы работают под давлением пара в 18-20 psi (0.12-0.14 МПа). В результате достигается температура 121°C и более. Даже если новые

сотрудники хорошо знакомы с оборудованием, они должны обращаться за помощью при осуществлении эксплуатации, пакетирования, загрузки и маркировки.

- С тем, чтобы процесс автоклавирования был эффективным в рамках осуществления стерилизации, необходимо обеспечить достаточный уровень температуры, временной интервал и поступление прямого пара. Необходимо полностью удалить воздух из камеры стерилизатора и из материалов, чтобы обеспечить проникновение пара таким образом, чтобы материал, который стерилизуется в автоклаве, находился при нужной температуре в течение достаточного времени для достижения стерилизации.
- Давление оболочки останется на уровне 18-20 psi (0.12-0.14 МПа), а температура – на уровне 121 °С. Давление в камере достигнет 18-20 psi (0.12-0.14 МПа), а температура 121 °С во время стерилизации.
- Перегретые жидкости довольно часто перекипают, когда их слегка встряхивают, что может привести к ожогам. Всегда используйте защиту, рекомендуемую для работы с горячими материалами.
- Используйте соответствующий цикл (гравитационный или жидкостный) в течении периода времени, необходимого для стерилизуемого элемента.
- Если у вас возникли вопросы по поводу использования оборудования, поговорите со своим руководителем.

Пакетирование

- Используйте контейнеры с надписью «Биологически опасное вещество» для микробиологических отходов.
- Не закрывайте плотно контейнеры или мешки.
- Не помещайте острые предметы, такие как битая стеклянная посуда, в автоклавный мешок.
- Вы должны поместить полоску автоклавной ленты (которая отображает изменение цвета при стерилизации в автоклаве при 121 °С) на любой предмет, который стерилизуется в автоклаве, или вложить подходящий индикатор (например, трубу Брауна), чтобы указать, что заданная температура была достигнута.

Загрузка

- Поместите контейнеры, которые могут перекипеть или протечь (агаровые пластинки и т.д.) внутрь автоклавируемого лотка.
- Никогда не помещайте предметы непосредственно на дно автоклава.
- Не перегружайте; оставляйте достаточно места для полной циркуляции пара.
- Убедитесь в том, что съемный фильтр в нижней части автоклава чистый.

Документация

- Документируйте результаты обработки каждой загрузки автоклавируемых отходов с указанием даты обработки, объема обработанных отходов, метода обработки и инициалов сотрудника.

2. Электрофорез

Аппарат электрофореза может являться одним из основных источников опасности поражения электрическим током в лаборатории. Наличие высокого напряжения и проводящей жидкости в этом аппарате представляет собой потенциально смертельную комбинацию.

Большинство людей не знают об опасностях, связанных с этим аппаратом; даже стандартный электрофорез, работающий при напряжении в 100 вольт может произвести смертельный удар в 25 миллиампер. Кроме того, даже небольшие утечки в баке устройства могут привести к серьезному шоку.

Защитите себя от опасностей электрофореза и поражения электрическим током, соблюдая следующие меры предосторожности:

- Используйте физические барьеры для предотвращения случайного контакта с аппаратом.
- Используйте электроблокировку.
- Часто проверяйте физическую целостность оборудования электрофореза.
- Используйте предупреждающие знаки, чтобы предупредить других о возможных электрических проводах.
- Используйте только изолированные соединительные провода.
- Выключайте питание перед подключением электрических проводов.
- Подключайте один провод за раз, используя только одну руку.
- Убедитесь, что ваши руки сухие при подключении проводов.
- Держите устройство вдали от воды и водных источников.
- Выключайте питание перед открытием крышки или когда лезете в камеру.
- Не отключайте предохранительные устройства.
- Следуйте инструкциям по эксплуатации оборудования.

3. Микробиологическая безопасность уровня BSL2 (уровень мер предосторожности 2)

- Доступ в микробиологическую лабораторию ограничивается лицами, которые работают в лаборатории. **Руководитель лаборатории должен обеспечить, чтобы сотрудники, работающие в BSL2-лаборатории, имели соответствующую подготовку, касающуюся их обязанностей, необходимых мер предосторожности, чтобы предотвратить риски, а также процедур оценки рисков. Такое обучение должно быть зафиксировано в Карточке учета профессиональной подготовки этого сотрудника.**
- Лица, которые подвергаются повышенному риску заражения инфекцией (с пониженным иммунитетом), или для которых инфекция может иметь серьезные последствия (например, беременные женщины), не могут быть допущены в микробиологическую лабораторию или могут иметь ограничения по выполняемой им работе. Директор лаборатории принимает окончательное решение касательно оценки каждого обстоятельства и определения того, кто может входить и работать в микробиологической лаборатории.
- Сотрудники лаборатории будет получать соответствующие прививки или иметь доступ к соответствующим пробам на агенты, с которыми им предстоит

работать или которые потенциально присутствуют в микробиологической лаборатории.

- При необходимости, с учетом агентов, с которыми предстоит работать, будут собираться и храниться исходные образцы сыворотки для сотрудников микробиологической лаборатории и других, подверженных риску сотрудников.
- Сотрудники должны ежегодно проходить тренинги по безопасности, применимые к данной конкретной лаборатории.
- Сотрудники должны проходить дополнительные тренинги при внесении изменений в процедуры или правила.
- Состояние здоровья сотрудника может повлиять на его восприимчивость к инфекции, возможность получать прививки или участвовать в профилактических мероприятиях. Таким образом, всему лабораторному персоналу и особенно женщинам детородного возраста должна предоставляться информация о состоянии системы иммунитета и условиях, которые могут предрасполагать к инфекции. Лицам, у которых наблюдаются эти состояния, следует порекомендовать обратиться к врачу учреждения для получения соответствующих консультаций и рекомендаций.
- Процедура входа:
 - Надевайте чистый лабораторный халат всякий раз, когда вы входите в лабораторию, или тут же наденьте халат, как только зашли.
 - Надевайте защитные перчатки перед работой с потенциально инфицированными материалами.
- Лица, не указанные в списке уполномоченных лиц, помещаемом на внешней стороне двери, могут допускаться в лабораторию только с разрешения директора или руководителя микробиологической лаборатории, и они должны сопровождаться уполномоченным лицом все время.
- Выполняйте все процедуры с осторожностью, чтобы свести к минимуму образование брызг или аэрозолей.
- Очищайте все рабочие поверхности по завершению работы или в конце дня и после любого разлива или разбрызгивания жизнеспособного материала при помощи дезинфицирующих средств, которые являются эффективными против агентов, вызывающих опасение.
- Всегда необходимо соблюдать высокую предосторожность при обращении с любыми загрязненными острыми предметами, включая иглы, шприцы, предметные стекла, капиллярные трубки и скальпели.
- Пластиковая посуда должна заменяться на стеклянную посуду всякий раз, когда это возможно.
- Для инъекций или аспираций инфекционных материалов используются только шприцы с закрывающейся иглой или одноразовые шприцы.
- Использованные одноразовые иглы не разрешается сгибать, раскалывать, ломать, покрывать обратном колпачком, снимать с одноразовых шприцов или обращаться с ними иным образом до их утилизации; они должны быть аккуратно помещены в удобно расположенные, устойчивые к проколам

автоклавируемые контейнеры, используемые для утилизации острых инструментов.

- Разбитую стеклянную посуду не следует брать непосредственно рукой; ее необходимо удалить используя механические средства, такие как щетка и совок, пинцет или щипцы. Контейнеры с зараженными иглами, острыми предметами и сломанным стеклом обеззараживаются перед утилизацией в соответствии с местными правилами.
- Культуры, ткани, образцы жидкостей организма или потенциально инфицированные отходы помещаются в контейнер с крышкой, предотвращающей утечку во время сбора, обработки, переработки, хранения, транспортировки или доставки.
- Загрязненное оборудование должно быть дезинфицировано в соответствии с действующими нормами перед отправкой на ремонт или техническое обслуживание или упаковано надлежащим образом для транспортировки. Факт дезинфицирования должен быть задокументирован.
- Немедленно сообщайте обо всех пролитых жидкостях и инцидентах, в результате которых возникает риск распространения инфекционных материалов, директору лаборатории и сотруднику по технике безопасности.
- Проводите медицинскую экспертизу, осуществляйте контроль и устраняйте последствия в соответствии с требованиями и фиксируйте действия в письменном виде в протоколах.
- Немедленно сообщайте обо всех пролитых жидкостях и инцидентах, в результате которых может произойти воздействие со стороны организмов, содержащих рекомбинантную ДНК.
- Должна применяться программа контроля насекомых и грызунов.
- Надлежащим образом должен применяться шкаф биологической безопасности при проведении процедур, способных привести к образованию инфекционных аэрозолей или брызг.
- Стулья, покрытые тканью, не допускаются к использованию в микробиологической лаборатории.
- Защита лица (защитные очки, защитная маска или другие сетки от брызг) должны быть использованы для защиты от возможных инфекционных брызг или аэрозолей или других опасных материалов в лицо, когда требуется обращение с микроорганизмами вне шкафа микробиологической безопасности.
- Всегда необходимо надевать перчатки при работе с потенциально инфекционными материалами, загрязненными поверхностями или оборудованием.
- Утилизируйте перчатки, когда видно, что они откровенно загрязнены, когда работа с инфекционным материалом завершена или когда целостность перчаток поставлена под сомнение. Одноразовые перчатки не следует мыть, использовать повторно или использовать для прикосновения в «чистым» поверхностям (клавиатура, телефоны и т.д.).
- Защитный лабораторный халат следует носить во время нахождения в микробиологической лаборатории.

- Грязный лабораторный халат должен стерилизоваться и стираться по мере необходимости. Если вы планируете надеть лабораторный халат снова, повесьте его в микробиологической лаборатории на вешалку. Лабораторный халат никогда не следует одевать за пределами микробиологической лаборатории, если вы его уже одевали в микробиологической лаборатории.
- Лабораторный халат будет помещен в стиральную машину сотрудниками BSL2-лаборатории.
- Не осуществляйте или не отвечайте на телефонные звонки, находясь в микробиологической лаборатории.
- Необходимо мыть руки после обращения с жизнеспособными материалами, после снятия перчаток и **перед** тем, как покинуть микробиологическую лабораторию.
- Процедура выхода:
 - Снимите перчатки.
 - Снимите лабораторный халат.
 - Повесьте лабораторный халат на вешалку или отправьте на стерилизацию и стирку.
 - Вымойте руки.
- Кураторские функции будут возлагаться на сотрудников BSL2-лаборатории под руководством руководителя микробиологической лаборатории.
- Материалы, которые подлежат дезинфекции за пределами данной микробиологической лаборатории, помещаются в прочный, герметичный, автоклавируемый мешок для биологических отходов и закрываются для транспортировки из лаборатории.
- Все контейнеры и флаконы протираются 10% раствором гипохлоритом натрия, 5% раствором гипохлорита натрия или 70% спиртом перед тем, как переместить их из BSL2-лаборатории в место их хранения. ПРИМЕЧАНИЕ: Избегайте нанесения спирта на флаконы для предотвращения удаления маркировки.

4. Микотоксиновая безопасность уровня BSL2 (уровень мер предосторожности 2)

- Доступ в микотоксиновую лабораторию ограничивается лицами, которые работают в лаборатории.
- Лица, которые подвергаются повышенному медицинскому риску, связанному с воздействием токсинов, не могут быть допущены в микотоксиновую лабораторию. Директор лаборатории принимает окончательное решение касательно оценки каждого обстоятельства и определения того, кто может входить и работать в микотоксиновой лаборатории.
- Сотрудники лаборатории будут иметь доступ к соответствующим пробам на агенты, с которыми им предстоит работать или которые потенциально присутствуют в микотоксиновой лаборатории.
- При необходимости, с учетом агентов, с которыми предстоит работать, будут собираться и храниться исходные образцы сыворотки для сотрудников микотоксиновой лаборатории и других, подверженных риску сотрудников.

- Все сотрудники, работающие в микотоксиновой лаборатории, будут проходить соответствующие тренинги, касающиеся их обязанностей, необходимых мер предосторожности, чтобы предотвратить риски, а также процедур оценки рисков.
- Процедура входа:
 - Надевайте чистый лабораторный халат всякий раз, когда вы входите в лабораторию, или тут же наденьте халат, как только зашли.
 - Надевайте защитные перчатки перед работой с потенциально токсичными материалами.
- Лица, не указанные в списке уполномоченных лиц, помещаемом на внешней стороне двери, могут допускаться в лабораторию только с разрешения директора или руководителя микотоксиновой лаборатории, и/или они должны сопровождаться уполномоченным лицом все время.
- Токсичные образцы и эталоны могут покидать микотоксиновую BSL2-лабораторию только в ВЭЖХ-флаконах, работа с которыми проводится на анализаторе; все остальные связанные с токсинами работы должны проводиться в микотоксиновой BSL2-лаборатории.
- Все токсичные образцы, экстракты и стандарты должны храниться в микотоксиновой BSL2-лаборатории.
- Выполняйте все процедуры с осторожностью, чтобы свести к минимуму образование брызг или аэрозолей.
- Очищайте все рабочие поверхности по завершению работы или в конце дня и после любого разлива или разбрызгивания жизнеспособного материала при помощи дезинфицирующих средств, которые являются эффективными против токсинов, вызывающих опасение. Для большинства микотоксинов этим средством будет 10% отбеливатель, после которого применяется 5% ацетон.
- Всегда необходимо соблюдать высокую предосторожность при обращении с любыми загрязненными острыми предметами, включая сломанные стеклянные предметы, иглы, шприцы, предметные стекла, капиллярные трубки и скальпели.
- Пластиковая посуда должна заменяться на стеклянную посуду всякий раз, когда это возможно.
- Разбитую стеклянную посуду не следует брать непосредственно рукой; ее необходимо удалить используя механические средства, такие как щетка и совок, пинцет или щипцы. Контейнеры с зараженными иглами, острыми предметами и сломанным стеклом обеззараживаются перед утилизацией в соответствии с местными, региональными или национальными правилами.
- Потенциально токсичные отходы помещаются в контейнер с крышкой, предотвращающей утечку во время сбора, обработки, переработки, хранения, транспортировки или доставки.
- Загрязненное оборудование должно быть дезинфицировано в соответствии с действующими нормами перед отправкой на ремонт или техническое обслуживание или упаковано надлежащим образом для транспортировки в соответствии с действующими правилами, перед его изъятием из лаборатории.

- Немедленно сообщайте обо всех пролитых жидкостях и инцидентах, в результате которых возникает риск распространения токсичных материалов, директору лаборатории и сотруднику по технике безопасности.
- Проводите медицинскую экспертизу, осуществляйте контроль и устраняйте последствия в соответствии с требованиями и фиксируйте действия в письменном виде в протоколах.
- Должна применяться программа контроля насекомых и грызунов.
- Стулья, покрытые тканью, не допускаются к использованию в микробиологической лаборатории.
- Всегда необходимо надевать перчатки при работе с потенциально инфекционными материалами, загрязненными поверхностями или оборудованием.
- Утилизируйте перчатки, когда видно, что они откровенно загрязнены, когда работа с токсичным материалом завершена или когда целостность перчаток поставлена под сомнение. Одноразовые перчатки не следует мыть, использовать повторно или использовать для прикосновения в «чистым» поверхностям (клавиатура, телефоны и т.д.).
- Защитный лабораторный халат следует носить во время нахождения в микробиологической лаборатории.
- Положите грязный лабораторный халат в корзину (в которую опущен прачечный мешок, растворимый в горячей воде), расположенную в микотоксиновой лаборатории. Если вы планируете надеть лабораторный халат снова, повесьте его в микотоксиновой лаборатории на вешалку. Лабораторный халат никогда не следует одевать за пределами микотоксиновой лаборатории, если вы его уже одевали в микотоксиновой лаборатории.
- Лабораторный халат будет помещен в стиральную машину сотрудниками BSL2-лаборатории, при необходимости его нужно предварительно простерилизовать.
- Не осуществляйте или не отвечайте на телефонные звонки, находясь в микотоксиновой лаборатории.
- Необходимо мыть руки после обращения с токсичными материалами, после снятия перчаток и перед тем, как покинуть микотоксиновую лабораторию.
- Процедура выхода:
 - Снимите перчатки.
 - Снимите лабораторный халат.
 - Повесьте лабораторный халат на вешалку (находящуюся в микотоксиновой лаборатории).
 - Вымойте руки.
- Кураторские функции будут возлагаться на сотрудников BSL2-лаборатории под руководством руководителя микотоксиновой лаборатории.
- Вся стеклянная и пластиковая посуда, подлежащая отправке в мойку, должна быть дезинфицирована отбеливателем, прежде чем покинуть микотоксиновую лабораторию.

5. Вакуум / Давление

- Выключите вакуумный прибор, если он не используется.
- Используйте только вакуумные трубки для подключения к вакуумному оборудованию.
- Применяйте вакуумный прибор только в отношении стеклянной посуды, сделанной специально для этой цели, и оберните колбы гибкой лентой (трубки, электрические элементы и т. д.) до процедуры всасывания.
- Освободите вакуум медленно из всех частей системы, перед тем как открыть прибор.
- Проверьте все вакуумное оборудование на дефекты перед использованием. Удалите всю сколотую, потрескавшуюся или сломанную вакуумную стеклянную посуду.

6. Электрооборудование

- Не используйте электрооборудование, если оно не находится в хорошем рабочем состоянии. Проверяйте на наличие потертых или поврежденных шнуров питания или сломанных выключателей.
- Локальное испытание на электробезопасность должно осуществляться на регулярной основе через определенные интервалы (обычно раз в год).
- Избегайте любого контакта с водой при использовании электрооборудования.
- Используйте заземленные розетки только с автоматическими предохранителями. Не используйте удлинители.
- Убедитесь, что приборы, используемые совместно, имеют одно и то же напряжение.
- Убедитесь, что главный выключатель питания находится в положении «ВЫКЛ», а прибор отключен от сети перед его обслуживанием, если это возможно.
- Никогда не пренебрегайте никаким защитным устройством.
- Не используйте электрооборудование, такое как, например, миксеры или электроплитки, рядом с легковоспламеняющимися растворителями.
- Используйте только двуокись углерода или порошковые огнетушители в случае возникновения возгорания в электрооборудовании или около него.
- В случае отключения электроэнергии выключите или отсоедините от сети оборудование в целях предотвращения его повреждения; при наличии испарений закройте соответствующие вытяжные шкафы и двери. Обеспечьте эвакуацию в случае необходимости.
- Не используйте какой-либо электрический прибор или оборудование, которое будет превышать номинальную силу тока выделенной для этого цепи. Помните, что любые другие устройства в этой цепи также необходимо принимать во внимание при расчете общего потребляемого количества ампер. Если вы не уверены в общем количестве номинальных ампер для данной цепи, обратитесь к своему руководителю с просьбой получения помощи от соответствующего сервисного персонала.
- Если в ходе эксперимента происходит срабатывание автоматического предохранителя, выключите все электроприборы в этой цепи и уведомите своего руководителя.

- При использовании многоместных розеток будьте внимательны, чтобы не превысить установленную силу тока на участке цепи. Устройство должно иметь свой собственный автоматический предохранитель. Если у вас возникла ситуация, когда вам недостаточно розеток, следует оценить нагрузку участка цепи.

7. Поднимание предметов

- Различия в физических способностях людей говорят о нецелесообразности установления лимитов в плане их способности поднимать предметы. Рост и вес человека не обязательно указывает на его способность поднимать тяжести.
- При поднимании предметов соблюдайте следующие правила:
 - Осмотрите предмет, который необходимо поднять.
 - Посмотрите и узнайте, куда вам нужно идти.
 - Наденьте необходимую защитную экипировку, как, например, перчатки, фартук и защитную обувь.
 - Если груз слишком тяжелый или объемный, чтобы справиться в одиночку, попросите помощи.
 - Чтобы сделать работу, которая требует присутствия двух или более людей, работайте вместе. Назначьте одного человека, который будет ответственен за подачу предупреждающих сигналов.
 - Используйте правильные способы поднимания:
 - Проведите предварительную оценку перед тем, как поднять вещь, чтобы убедиться, что вы справитесь с ней.
 - Твердо расположите ваши ноги, одна нога должна быть чуть впереди другой.
 - Пригнитесь настолько ближе к грузу, насколько это возможно.
 - Держите спину прямо.
 - Крепко обхватите предмет с помощью ладоней рук.
 - Поднимите предмет с помощью ног и предплечьев для предотвращения растяжения спины.
 - Крепко держите объект при его перемещении.
 - Перед тем как положить груз, убедитесь, что пальцы ваших рук и ног не будут мешать этому.
 - Когда вам необходимо изменить направление движения, не крутите тело, используйте ноги, чтобы повернуть все тело.
- Если существует такая возможность, используйте такелажный ремень для подъема тяжелых предметов.
- Должно быть предоставлено соответствующее обучение по вопросам ручного перемещения грузов.

8. Легковоспламеняющиеся жидкости

- Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех химических веществ, хранящихся в лаборатории, должны быть легкодоступны.
- Следует осторожно обращаться со всеми растворителями, даже если они могут быть относительно неактивными с химической точки зрения. Некоторые

из наиболее часто используемых растворителей летучи и вредны, даже когда вдыхается их относительно небольшое количество. Некоторые из них легко всасываются через кожу и большинство из них воспламеняются.

- Избегайте образования статических искр при переносе легковоспламеняющихся жидкостей из барабана посредством электрического заземления барабана.
- Храните большие объемы легковоспламеняющихся жидкостей в подходящем, предназначенном для этого безопасном контейнере для хранения легковоспламеняющихся веществ. Храните минимальное количество легковоспламеняющихся жидкостей в лаборатории. Используйте реагенты с наиболее близким сроком годности в первую очередь. Все легковоспламеняющиеся жидкости должны храниться в выделенных для этого безопасных контейнерах. Никогда не возвращайте жидкость назад в первоначальный контейнер.
- Держите легковоспламеняющиеся жидкости вдали от источников тепла, прямых солнечных лучей и сильных окислителей, таких как хромовая кислота, перманганаты, хлораты или перхлораты.
- Обрабатывайте легковоспламеняющиеся материалы в вытяжном шкафу, избегая одновременного использования окислителей.
- Убедитесь, что сосуды с растворителями хранятся на поддонах.

9. Газовые баллоны

- Убедитесь, что колпачок плотно закрыт при хранении или перемещении баллона. (Это защищает шток клапана от случайного отламывания.) Перемещайте газовые баллоны при помощи соответствующей ручной тележки. Защитный колпачок должен быть помещен на свое место, прежде чем баллон будет освобожден от своей опоры.
- Всегда поддерживайте газовые баллоны ремнями, цепями или подходящими подставками, чтобы предотвратить их от падения.
- Закрывайте все баллоны и задвижки, когда они не используются.
- Убедитесь, что соответствующий регулятор используется на каждом газовом баллоне.
- Никогда не используйте баллон, содержание которого не может быть однозначно идентифицировано.
- Никогда не применяйте силу в отношении клапана баллона.
- Никогда не используйте масло или жир на регуляторе или задвижке баллона.
- Не используйте регулятор или задвижку баллона, если масло или жир присутствуют вместе с кислородом или другим окислителем. Горючие вещества в контакте с окислителем взрывоопасны.
- Реакции, требующие использование баллонов с токсичными, горючими или химически активными газами, должны выполняться в вытяжных шкафах, и должны предоставляться подходящие полки для хранения баллонов.
- В случае пожара отключите горючий газ, а затем окислительный газ, если это возможно!

- Не тушите пламя, в котором участвуют сильно горючие газы, до того, как будет отключен источник газа. В противном случае он может снова разгореться и привести к взрыву.
- Снимите регулятор с почти пустого баллона и сразу замените защитный колпачок.
- С помощью липкой ленты или этикетки промаркируйте баллон как «ПУСТОЙ».
- Для баллонов, используемых в рамках ГХ/ВЭЖХ-анализа, должны использоваться и регулярно проверяться влагоуловители.

10. Стекла́нная посуда

- Надевайте термостойкие перчатки или используйте щипцы при обращении со стеклянной посудой или оборудованием, которое было нагрето.
- Если стеклянная посуда должна быть очищена, отнесите ее в мойку и прикрепите к ней какие-либо специальные инструкции по очистке.
- Смажьте все контактные поверхности и наденьте защитные перчатки, устойчивые к порезам, при установке стекла в пробку или трубку; вставьте стекло так, чтобы применяемое усилие было направлено от вашего тела.
- Не прилагайте чрезмерных усилий.
- Не закупоривайте стеклянную колбу, содержащую горячие конденсирующиеся пары.
- Утилизируйте сломанную стеклянную посуду или посуду со сколами в резервуар для разбитого стекла. Вся сломанная стеклянная посуда должна быть незамедлительно заменена и удалена с полки или с пола и помещена в резервуар, предназначенный исключительно для этой цели.
- Не помещайте никакую стеклянную посуду в общие контейнеры для отходов.
- Сообщите своему руководителю о любых существенных поломках.
- Сломанная посуда может быть помещена в жесткий, закрытый контейнер (например, коробку). Промаркируйте контейнер как «Сломанное стекло».

11. Острые предметы

- Будьте осторожны, чтобы не уколоть себя иглой.
- Не помещайте использованные шприцы в ванночку с пипетками или другой стеклянной посудой, которые требуют сортировки.
- Не надевайте повторно колпачок на использованные иглы.
- Выбрасывайте иглы в надлежащий автоклавируемый контейнер для острых предметов.
- Убедитесь в том, что контейнер для острых предметов автоклавируется перед утилизацией.
- После того как контейнер для острых предметов простерилизован, можно залить его гипсом и дать высохнуть перед утилизацией; это обездвижит острые предметы и будет гарантировать, что никто случайно не наткнется на них.
- Иглы, лезвия и т.д. считаются опасными, даже если они стерильны, закрыты колпачками и находятся в оригинальной упаковке.

12. Вытяжные шкафы

- Вытяжные шкафы необходимо выключать, а их створки закрывать, когда они не используются. Если вытяжной шкаф является вытяжным шкафом с переменной скоростью, то он не может быть выключен; просто убедитесь в том, что его створки закрыты, когда он не используется.
- Оборудование и другие материалы должны быть размещены и все работы должны выполняться не менее чем в 15 см (6 дюймах) от открытых створок. Такая практика позволит снизить подверженность лабораторной зоны химическим испарениям из-за турбулентности воздуха.
- Когда вытяжной шкаф работает, створки должны находиться на оптимальной высоте воздушного потока. Этикетка, прикрепленная непосредственно рядом со створкой, указывает на эту высоту. Створка является вашим основным барьером для защиты от пожара и взрыва, которые могут произойти в вытяжных шкафах.
- Бумага и другие материалы не должны попадать в вытяжной канал вытяжного шкафа. Посторонние предметы могут быть втянуты в воздуховод и вытяжной вентилятор, и отрицательно повлиять на эффективность работы вытяжного шкафа.
- Вытяжные шкафы не предназначены для хранения химикатов или оборудования. Все неиспользуемые химикаты и оборудование должны храниться в местах, предназначенных для их длительного хранения.
- Оборудование и другие материалы не должны храниться в зоне турбулизатора потока (слот на задней части вытяжного шкафа). Этот турбулизатор потока способствует перемещению воздуха через вытяжной шкаф. Если он будет заблокирован, то вытяжной шкаф не будет обеспечивать последовательное движение воздуха.
- Крупное оборудование, размещенное в вытяжных шкафах, должно быть поднято как минимум на 3 - 4 см (1 дюйм) над рабочей поверхностью, чтобы обеспечить беспрепятственное перемещение воздуха под оборудованием.
- Пока сотрудники работают с вытяжным шкафом, створки должны быть опущены до уровня, который будет защищать лицо пользователя и верхнюю часть груди. Единственный раз, когда створки вытяжного шкафа должны быть полностью открыты, касается настройки оборудования для осуществления процедуры.
- Перед началом работы убедитесь, что в вытяжном шкафу имеется достаточный поток.
- Не полагайтесь на вытягивающую способность вытяжного шкафа в надежде, что это защитит вас от брызг или разлетающихся предметов.
– НАДЕВАЙТЕ ПОДХОДЯЩИЕ СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ТИПОМ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ИСПОЛЬЗУЕМЫМ ОБОРУДОВАНИЕМ.
- Если вы обеспокоены тем, работает ли вытяжной шкаф исправно, обратитесь в Департамент гигиены и безопасности окружающей среды.

13. Особые меры предосторожности при обращении с вытяжными шкафами для работы с хлорной кислотой

- Лица, использующие хлорную кислоту, должны быть хорошо знакомы со связанными с ней рисками.
- Пролитая хлорная кислота должна быть тщательно смыта большим количеством воды.
- Следует избегать использования органических материалов или химических веществ в вытяжном шкафу.
- Газовое пламя или масляные ванны не должны использоваться в вытяжном шкафу.
- Необходимо использовать защитные очки или защитную маску, а также использовать створки вытяжного шкафа при любой возможности для дополнительной безопасности.

Процедура промывки вытяжного шкафа для работы с хлорной кислотой

1. Эта процедура должна проводиться после каждого использования вытяжного шкафа для работы с хлорной кислотой.
2. Отключите все оборудование в вытяжном шкафу.
3. Закройте створки.
4. Включите смывную струю.
5. Смывная струя должна оставаться включенной в общей сложности в течение не менее 15 минут.

ЧАСТЬ II

Аналитический раздел

Аналитические методы

ВВЕДЕНИЕ

Оптимальное животноводство, в первую очередь, определяется соответствующим, с физиологической, экономической и экологической точки зрения, питанием животных. Для того, чтобы обеспечить животных необходимыми питательными веществами в целях удовлетворения их потребностей в выживании, росте, продолжении рода, а также обеспечении производства мяса, молока, яиц, шерсти и использования животных для осуществления сельскохозяйственных работ, для того, чтобы уменьшить риски для здоровья животных и свести к минимуму отходы и выбросы в окружающую среду, питательная ценность кормов, используемых в их рационе, должна быть точно определена. Большинство кормов для животных, таких как кормовые культуры и пищевые отходы, а также биоэнергетические продукты, бывают разного качества и требуют анализа каждой партии. Так как потребности в питательных веществах определяются посредством стандартных методов, крайне важно, чтобы содержание питательных веществ в кормах было проанализировано с применением аналогичных или схожих стандартных методов. Кроме того, использование стандартных методов обеспечивает прозрачность обмена данными между лабораториями, институтами и компаниями.

Во второй части данного руководства описаны наиболее типичные методы для определения как химического и минерального составов кормов, так и некоторых важных микотоксинов. Описание методов соответствует определенному порядку пунктов и начинается с описания принципов, задач, обязанностей, оборудования, реагентов, методики, расчета, контроля качества, примечаний, препятствий, выявления и устранения проблем и полезных ссылок. Что касается оборудования и реагентов, то упоминаются лишь специфические потребности лаборатории. Методика описывается вкратце, более подробная информация может быть добавлена в соответствии с конкретным оснащением каждой лаборатории. Процесс подготовки образца не описан в методике, однако инструкции по этому поводу представлены в первой части руководства. Что касается контроля качества, то для обеспечения точности крайне важным представляется использование контрольного образца в каждом опыте. Кроме того, рекомендуется проведение повторных анализов, и в этой связи приводятся строгие критерии для их оценки. Когда лаборатория не в состоянии выполнить эти критерии, должны быть определены специфические требования к внутрилабораторной воспроизводимости и, при необходимости, необходимо ссылаться на эти требования. Ниже будут описаны предпосылки и актуальность методов, используемых для анализа кормов.

С тех пор, как Хэннэнберг и Стохмэн разработали схему анализа Weende в 1860 году, основные химические компоненты кормов для животных стали анализироваться с помощью эмпирических методов, т. е. определяются показатели влажности, сырого белка, сырой клетчатки, сырого жира и сырой золы, в то время, как

остаточная фракция безазотистых экстрактивных веществ рассчитывается по разности. В 1963 году Ван Соест разработал особую схему анализа с намерением лучше охарактеризовать природу клеточных стенок. В Таблице 1 эти две схемы анализа приведены вместе с химическими компонентами, которые они включают.

Процесс определения влажности вследствие наличия сырой золы в корме приводит к определению доли органического вещества, которое в свою очередь содержит питательные вещества для животных. Сырая зола состоит из нерастворимой золы, которая является бесполезной для животных, а также минералов и микроэлементов.

Сырой белок определяется также, как и азот, и он происходит из реального белка, в основном аминокислот и пептидов, с одной стороны, и небелковых веществ, таких как аммиак, мочевина, нитраты, амины, с другой стороны; первые представляют собой основу для образования животных белков; небелковый азот (NPN) в присутствии энергии стимулирует рост бактерий рубца, источника высококачественного белка для животных.

Сырой жир, в основном, содержит жирные кислоты, а иногда и пигменты и воск; жирные кислоты являются источником энергии, представляют собой основу для образования животного жира, а также являются источником витаминов.

Наибольшую долю в большинстве кормов составляют углеводы, которые также являются источником энергии и которые могут быть чрезвычайно разнообразны по своей природе. Различают структурные и неструктурные углеводы. Существует несколько методов для определения структурных углеводов. Сырая клетчатка в основном состоит из целлюлозы, линейного полимера глюкозы и лигнина, полимера фенольных кислот. Нейтрально-детергентная клетчатка (NDF) представляет собой совокупность клеточных стенок: гемицеллюлозу, целлюлозу и лигнин. Кислотно-детергентная клетчатка (ADF) похожа на сырую клетчатку. Разница между NDF и ADF – это количество гемицеллюлозы, которая представляет собой разветвленный полимер различных сахаров. Разница между ADF и лигнином – это количество целлюлозы. Гемицеллюлоза и целлюлоза частично усваиваются в организмах жвачных животных, но почти не усваиваются в организмах животных с однокамерным желудком; их усвояемость в основном зависит от степени лигнификации. ADF может содержать азот в результате денатурации белка путем ферментативного потемнения (реакция Майларда). Пектины – это также связующие полисахариды, но они очень хорошо усваиваются. Среди неструктурных углеводов важными компонентами являются крахмал, фруктозан и сахара.

Определение валового содержания энергии в кормах дает представление об их теплотворной способности.

Корма, заготовленные в хороших климатических условиях, могут быть заsilосованы для кормления животных в менее благоприятные периоды. Во время silosования сахара ферментируются, в основном, в молочную и уксусную кислоты, в некоторое количество этанола, а иногда и в наименее желательную масляную кислоту. Определение продуктов ферментации помогает оценить качество silоса, а также может быть использована для коррекции содержания сухого вещества в silосе из-за потери летучих веществ во время сушки в печи.

ТАБЛИЦА 1
Схемы Weende и Ван Соеста для анализа кормов и соответствующих химических компонентов

Анализ Weende	Химические компоненты		Анализ Ван Соеста		
Влажность	Вода				
Сырой белок	Сухое вещество	Органическое вещество	Белок	Растворимый нейтральный детергент	
			Небелковый азот		
Сырой жир			Липиды		
			Пигменты		
Безазотистые экстрактивные вещества			Крахмал		
			Сахара		
			Органические кислоты		
			Пектины		
			Гемицеллюлоза		ADF
Сырая клетчатка			Целлюлоза		
	Лигнин				
	Волоконно-связанный азот				
Сырая зола	Неорганическое вещество	Нерастворимая зола	Кремний		
		Растворимая зола			

ADF = Кислотно-детергентная клетчатка

NDF = Нейтрально-детергентная клетчатка

Примечание: значения всех компонентов, приведенных в таблице 1 и проанализированных посредством методов, приведенных ниже, ДОЛЖНЫ БЫТЬ представлены до одного знака после запятой.

Кроме белка и энергии, животные нуждаются в минералах и микроэлементах. Кальций и фосфор – это два очень важных минерала как для развития костей животного, так и для производства молока и яиц. К другим важным минералам относятся магний, натрий и калий. Поскольку большинство растений не содержат достаточного количества натрия для питания животных и могут не содержать должного количества хлоридов, солевые добавки являются важной частью сбалансированного рациона для животных. Микроэлементы необходимы для ферментативных реакций в организме; их биологическая доступность может быть разнообразной. Наиболее важными из них являются железо, медь, цинк, марганец, кобальт, йод и селен.

Так как жвачные животные способны переваривать кормовые культуры, а также менее усваиваемые корма, такие как солома и отруби, для оценки кормов очень информативным может оказаться лабораторный метод оценки перевариваемости кормов.

Кроме питательных веществ корма могут также содержать нежелательные вещества. К таким соединениям относятся вещества или продукты, которые присутствуют в и/или на продукте, предназначенном для корма животных, и которые

представляют потенциальную опасность для здоровья животных или человека или для окружающей среды, а также могут отрицательно сказаться на продукции животноводства. К наиболее известным из таких веществ относятся диоксины, полихлорированные бифенилы (ПХБ), тяжелые металлы и микотоксины. Так как они являются типичными загрязнителями, то их невозможно полностью устранить, однако в целях предотвращения нежелательных и вредных последствий важно, чтобы их содержание в продуктах, предназначенных для кормления животных, было уменьшено, причем особое внимание необходимо уделять высокой токсичности, биоаккумуляции и разложению таких веществ.

Почти во всех странах определены максимальные пределы содержания нежелательных веществ. Если они превышены, то продукт запрещено импортировать и использовать в качестве корма. Таким образом, необходимо проводить тщательный анализ таких веществ. В этом документе приведены методы для определения наиболее важных микотоксинов (афлатоксинов, фумонизинов, дезоксиниваленола и зеараленона).

СУХОЕ ВЕЩЕСТВО

1. Принцип

Содержание сухого вещества определяется гравиметрическим методом, как остаток после сушки при температуре 103 °С в вентилируемой печи.

2. Область применения

Данный метод применяется для определения содержания сухого вещества в кормовых ингредиентах, в кормах и частично высушенных (85% сухого вещества) кормах с низким содержанием летучих кислот. Для цельного зерна, силоса и кормов с высоким содержанием сахара, необходимо использовать иные методы. (см. примечание 9.1).

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Алюминиевый сосуд (чашка) диаметром около 50 мм, глубиной 40 мм, с крышкой.
- 4.2 Аналитические электронные весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.3 Сушильная печь с нагнетаемым воздухом и температурой 103 ± 2 °С. Печь должна быть оснащена полкой, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха. Ее необходимо эксплуатировать при открытых вентиляционных отверстиях.
- 4.4 Эксикатор.

5. Реагенты

Отсутствуют.

6. Метод

- 6.1 Сушите алюминиевый сосуд (4.1), накрыв его, при температуре 103 ± 2 °C в течение не менее 2 часов.
- 6.2 Накройте сосуд и поместите его в эксикатор (4.4).
- 6.3 Незамедлительно закройте эксикатор и позвольте накрытому сосуду остыть до комнатной температуры. Не оставляйте сосуд в эксикаторе на более чем 2 часа.
- 6.4 Взвесьте сосуд с крышкой (W1) с точностью до 0,1 мг, вынимая по одному сосуду из эксикатора, при этом держите дверцу эксикатора закрытой между выниманием сосудов. Используйте щипцы для удержания пробирок.
- 6.5 Добавьте примерно 2 г молотого образца в каждый сосуд. Запишите вес сосудов с крышкой и образцом (W2) с точностью до 0,1 мг.
- 6.6 Осторожно встряхните сосуд, чтобы равномерно распределить образец и обеспечить максимальную площадь для сушки.
- 6.7 Поместите образцы (убрав крышки в сторону) в предварительно разогретую печь при температуре 103 ± 2 °C (4.3) и сушите в течение как минимум 2 часов; начинайте отсчет времени с момента, когда печь достигла нужной температуры (продолжительность сушки зависит от массы, необходимо определить это время для различных типов образцов и после этого использовать его для сушки).
- 6.8 Поместите образцы в эксикатор (4.4), закройте крышками каждый сосуд, закройте эксикатор и дайте остыть до комнатной температуры. Не оставляйте образцы в эксикаторе на более чем 2 часа.
- 6.9 Взвесьте сосуд с крышкой и высушенным образцом (W3) и зафиксируйте результат с точностью до 0,1 мг.

7. Расчеты

Содержание сухого вещества (% DM):

$$\% \text{ DM} = (W3 - W1) \times 100 / (W2 - W1),$$

где:

W1 = вес пустого сосуда (г),

W2 = вес сосуда и образца (г) и

W3 = вес сосуда и образца после сушки (г).

Уровень влажности:

$$\% \text{ влажности} = 100 - \% \text{ DM (см.примечание 9.2)}$$

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения

через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать 0,2% от абсолютного значения сухого вещества. Если разница превышает 0,2%, то необходимо повторить анализ.

9. Примечания

- 9.1 Для определения содержания сухого вещества в зерне, просушите зерно при температуре 135 ± 2 °C в течение 2 часов; силос (размер образца: как минимум 500 г) сушите при температуре 60 ± 1 °C в течение 24 часов, а корм с высоким содержанием сахара (например, патока, жом, комбикорм, содержащие более 4% сахарозы или лактозы) сушите при температуре 80-85 °C в вакуумной печи.
- 9.2 Во время сушки испаряются как влага, так и другие летучие соединения, такие как аммиак и летучие жирные кислоты. Поэтому при расчете содержания влаги, необходимо принимать этот факт во внимание.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

- 10.1 Время и температура должны быть максимально четко соблюдены.
- 10.2 Образцы должны быть помещены в сушильную печь со свободной циркуляцией воздуха.
- 10.3 Сосуды с образцами не должны быть чрезмерно плотно размещены в эксикаторе. Циркуляция воздуха необходима для охлаждения сосудов с образцами. Открывайте загруженный эксикатор очень медленно после охлаждения образцов. При охлаждении образуется вакуум, и резкое открытие приводит к турбулентности, что может привести к выбросу образцов из контейнеров.
- 10.4 Крышка эксикатора должна открываться для вынимания каждого контейнера и закрываться во время взвешивания. Если вы оставите крышку открытой, в образцы может попасть влага.
- 10.5 Эксикатор должен периодически проверяться и сушиться. Рекомендуется использование эксикатора с цветным индикатором содержания влаги.
- 10.6 Всегда используйте щипцы для удержания пробирок.

11. Полезные ссылки

АОАС 930,15. 2000 г. *Содержание влаги в кормах для животных, потери при сушке при температуре 135 °C в течение 2 часов.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

ISO 6496. 1999 г. *Корма для животных – Определение содержания влаги и других летучих веществ.* Женева, Швейцария.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009.

СЫРАЯ ЗОЛА

1. Принцип

Содержание золы определяется гравиметрическим методом, как остаток после сжигания при температуре 550 °С.

2. Область применения

Данный метод применяется для определения содержания золы в кормовых ингредиентах и в кормах. Этот метод не может быть применен в отношении минеральных смесей.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Сосуд для сжигания.
- 4.2 Аналитические электронные весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.3 Муфельная печь, способная поддерживать температуру до 550 ± 20 °С.
- 4.4 Эксикатор

5. Реагенты

Отсутствуют.

6. Метод

- 6.1 Сушите сосуд для сжигания (4.1) при температуре 103 °С в течение не менее 2 часов, выньте его из печи и охладите в эксикаторе.
- 6.2 Взвесьте пустой сосуд (4.1) с точностью до 0,1 мг (W1).
- 6.3 Добавьте примерно 5 г образца в сосуд и взвесьте с точностью до 0,1 мг (W2).
- 6.4 Поместите сосуд в муфельную печь и нагревайте при температуре 550 ± 20 °С (4.3) в течение 3-х часов.
- 6.5 Осмотрите визуально, освободился ли остаток от углеродных частиц (см. примечание 9.1).
- 6.6 Переместите сосуд в эксикатор (4.4) и дайте остыть до комнатной температуры (около 45 минут).
- 6.7 Взвесьте сосуд с точностью до 0,1 мг (W3).

7. Расчеты

Содержание золы (%ASH):

$$\% \text{ASH} = (W3 - W1) \times 100 / (W2 - W1),$$

где:

W1 = вес пустого сосуда (г),

W2 = вес сосуда и образца (г) и

W3 = вес сосуда и остатка после сжигания (г).

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать 0,2% в абсолютном выражении при уровне содержания ниже, чем 10%, и 2% относительно более высокого уровня содержания $\geq 10\%$ (с максимальной разницей в 0,5%-единиц).

9. Примечания

9.1 Если в осадке содержатся углеродные частицы, добавьте дистиллированной воды, аккуратно испарите воду досуха при температуре 103 ± 2 °C и сжигайте в течение 1 часа при температуре 550 ± 20 °C.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

- 10.1 Не допускайте охлаждения озоленного образца до температуры ниже 200 °C в печи для озоления до передачи в эксикатор, поскольку образец может поглотить влагу.
- 10.2 Не допускайте, чтобы образец оставался в эксикаторе при комнатной температуре в течение более чем 2 часов перед взвешиванием.
- 10.3 Во избежание потери золы будьте осторожны при открытии эксикатора.
- 10.4 Эксикатор должен быть чистым, а крышка эксикатора должна быть плотно закрыта при помощи высоковакуумного смазочного вещества, силиконовой смазки.
- 10.5 Убедитесь, что все поверхности, с которыми вступают в контакт сосуды, чистые, особенно это касается эксикаторов в местах, где используется вакуумная смазка.
- 10.6 Осуществляйте тарирование весов между каждым взвешиванием.
- 10.7 Печь не должна быть предварительно нагрета. Это предотвращает быстрое воспламенение образца и обеспечивает медленную потерю влаги. Быстрое зажигание может привести к воспламенению, а быстрая потеря влаги к разбросу образца; обе эти ситуации могут способствовать потере образца.
- 10.8 Знайте, что некоторые образцы вспениваются и вытекают из сосуда. Если это происходит, повторите анализ, используя промытый кислотой песок и/или используя сосуд большей вместимости.

РИСКИ: Используйте длинные щипцы и перчатки для защиты рук и кистей от ожогов при погрузке или разгрузке горячих печей, используемых для озоления. Стойте с

одной стороны и осторожно открывайте дверцу печи до половины. Не открывайте горячую печь до тех пор, пока образец полностью не превратиться в золу, иначе, может возникнуть воспламенение.

11. Полезные ссылки

АОАС 942.05. 2000 г. *Зола в кормах для животных.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

ISO 5984. 2002 г. *Корма для животных – определение содержания сырой золы.* Женева, Швейцария.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009.

ЗОЛА, НЕРАСТВОРИМАЯ В СОЛЯНОЙ КИСЛОТЕ

1. Принцип

Содержание золы, нерастворимой в соляной кислоте (AIA), определяется гравиметрическим методом, как остаток после кипячения массовой доли золы с соляной кислотой.

2. Область применения

Данный метод применяется для определения содержания золы в кормовых ингредиентах и в кормах. Этот метод не может быть применен в отношении минеральных смесей.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Сосуд для сжигания.
- 4.2 Аналитические электронные весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.3 Муфельная печь, способная поддерживать температуру до 550 ± 20 °С.
- 4.4 Эксикатор
- 4.5 Электроплитка
- 4.6 Беззольная фильтровальная бумага.
- 4.7 Сушильная печь с нагнетаемым воздухом, способная поддерживать температуру 103 ± 2 °С. Печь должна быть оснащена полкой, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха. Ее необходимо эксплуатировать при открытых вентиляционных отверстиях.

5. Реагенты

Трехмолярная соляная кислота.

6. Метод

- 6.1 Сушите сосуд для сжигания (4.1) при температуре 103 °С в течение не менее 2 часов, выньте его из печи и охладите в эксикаторе.
- 6.2 Взвесьте пустой сосуд (4.1) с точностью до 0,1 мг (W1).
- 6.3 Добавьте примерно 5 г образца в сосуд и взвесьте с точностью до 0,1 мг (W2).
- 6.4 Поместите сосуд в муфельную печь и нагревайте при температуре 550 ± 20 °С (4.3) в течение 3-х часов.
- 6.5 Осмотрите визуально, освободился ли остаток от углеродных частиц (см. примечание 9.1).
- 6.6 Переместите сосуд в эксикатор (4.4) и дайте остыть до комнатной температуры (около 45 минут).
- 6.7 Количественно переместите золу в пробирку с использованием 75 мл трехмольной соляной кислоты (5,1).
- 6.8 Нагрейте смесь на электроплитке (4.5) аккуратно, доведя до кипения, и кипятите в течение 15 минут.
- 6.9 Профильтруйте смесь через беззольную фильтровальную бумагу (4.6) и промойте горячей дистиллированной водой, пока промывная вода не будет содержать кислоту.
- 6.10 Переместите фильтровальную бумагу с остатком в сосуд для сжигания.
- 6.11 Поставьте сосуд для сжигания на ночь в сушильную печь (4.7) при температуре 103 ± 2 °С.
- 6.12 Поместите сосуд в муфельную печь (4.3) и нагревайте при температуре 550 ± 20 °С в течение 2-х часов.
- 6.13 Переместите сосуд в эксикатор (4.4) и дайте остыть до комнатной температуры (около 45 минут).
- 6.14 Взвесьте сосуд и остаток с точностью до 0,1 мг (W3).

7. Расчеты

Содержание золы, нерастворимой в соляной кислоте (% AIA):

$$\% \text{ AIA} = (W3 - W1) \times 100 / (W2 - W1)$$

где:

W1 = вес пустого сосуда (г),

W2 = вес сосуда и образца (г) и

W3 = вес сосуда и остатка после сжигания (г).

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать 10% относительно более высокого значения и с максимальной разницей в 0,5%-единиц.

9. Примечания

9.1 Если в осадке содержатся углеродные частицы, добавьте дистиллированной воды, аккуратно испарите воду досуха при температуре 103 ± 2 °C и сжигайте в течение 1 часа при температуре 550 ± 20 °C.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

- 10.1 Не допускайте охлаждения озоленного образца до температуры ниже 200 °C в печи для озоления до передачи в эксикатор, поскольку образец может поглотить влагу.
- 10.2 Не допускайте, чтобы образец оставался в эксикаторе при комнатной температуре в течение более чем 2 часов перед взвешиванием.
- 10.3 Во избежание потери золы будьте осторожны при открытии эксикатора.
- 10.4 Эксикатор должен быть чистым, а крышка эксикатора должна быть плотно закрыта при помощи высоковакуумного смазочного вещества, силиконовой смазки.
- 10.5 Убедитесь, что все поверхности, с которыми вступают в контакт сосуды, чистые, особенно это касается эксикаторов в местах, где используется вакуумная смазка.
- 10.6 Осуществляйте тарирование весов между каждым взвешиванием.
- 10.7 Печь не должна быть предварительно нагрета. Это предотвращает быстрое воспламенение образца и обеспечивает медленную потерю влаги. Быстрое зажигание может привести к воспламенению, а быстрая потеря влаги к разбросу образца; обе эти ситуации могут способствовать потере образца и, как следствие, к некачественным результатам.
- 10.8 Знайте, что некоторые образцы вспениваются и вытекают из сосуда. Если это происходит, повторите анализ, используя промытый кислотой песок и/или используя сосуд большей вместимости.

РИСКИ: Используйте длинные щипцы и перчатки для защиты рук и кистей от ожогов при погрузке или разгрузке горячих печей, используемых для озоления. Стойте с одной стороны и осторожно открывайте дверцу печи до половины. Не открывайте горячую печь до тех пор, пока образец полностью не превратиться в золу, иначе, может возникнуть воспламенение.

11. Полезные ссылки

АОАС 942.05. 2000 г. *Зола в кормах для животных.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

ISO 5985. 2002 г. *Корма для животных – определение содержания золы, нерастворимой в соляной кислоте.* Женева, Швейцария.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза* L54/1 от 26.02.2009.

АЗОТ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЫРОГО БЕЛКА – МЕТОД КЬЕЛЬДАЛЯ

1. Принцип

Для определения содержания азота образец выпаривают с использованием серной кислоты в присутствии катализатора, чтобы преобразовать азот в сульфат аммония. Раствор кислоты подщелачивают раствором гидроксида натрия. Аммиак дистиллируют и собирают в избытке раствора борной кислоты, с последующим титрованием раствором серной кислоты. Для определения содержания сырого белка значение содержания азота умножают на коэффициент 6,25 (или другой соответствующий коэффициент, см. примечание 9.3).

2. Область применения

Описанный метод применяется для определения содержания азота в кормах.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Пробирки для озоления, приспособленные для аппарата Кьельдаля для озоления.
- 4.3 Аппарат Кьельдаля для озоления с системой выведения паров.
- 4.4 Дистиллятор Кьельдаля.
- 4.5 Титровальный блок (в более сложном оборудовании 4.4 объединен с 4.5).

5. Реагенты

- 5.1 Серная кислота, концентрированная, 95-98% (отношение веса к объему), химически чистая.
- 5.2 Каталитические таблетки Кьельдаля (см. примечание 9.5).
- 5.3 Борная кислота, 10 г/л.
- 5.4 Раствор NaOH, 40% (отношение веса к объему).
- 5.5 Индикаторный раствор: Метиловый красный индикатор, растворите 1 г метилового красного (натриевая соль) в 100 мл метанола или этанола.
- 5.6 Соляная кислота, стандартный мерный раствор, $c = 0,1 \text{ M}$ (c с точностью до 0,1000 M).

6. Метод

- 6.1 Озоление
 - 6.1.1 Взвесьте примерно 1 г образца с точностью до 0,1 мг (W) и поместите в пробирку для озоления (4.2). В каждой партии используйте пробирку без образца в качестве пустой пробы.

- 6.1.2 Добавьте две таблетки Кьельдаля (5.2) и 20 мл серной кислоты (5.1). Если происходит обильное пенообразование, добавьте несколько капель антипенного вещества.
- 6.1.3 Поместите пробирки в аппарат для озоления (4.3) и подключите к системе выведения паров.
- 6.1.4 Озоляйте образец в течение не менее 1 часа при температуре 420 ± 20 °С.
- 6.1.5 Завершите озоление, уберите пробирки и дайте образцу остыть в течение 10-20 минут.
- 6.1.6 Добавьте дистиллированной воды в каждую пробирку, чтобы общий объем составил примерно 80 мл.

6.2 Дистилляция и титрование

Следующая процедура описывает ручной метод дистилляции и титрования. Если используется устройство автоматической дистилляции и титрования, то следуйте инструкциям производителя.

- 6.2.1 Поместите коническую колбу, содержащую 25-30 мл концентрированной борной кислоты (5.3) на выходе конденсатора дистилляционного устройства (4.4) таким образом, чтобы направляющие трубки находились ниже поверхности раствора борной кислоты.
- 6.2.2 Добавьте 50 мл раствора NaOH (5.4) и проведите дистилляцию аммония, следуя инструкциям производителя.
- 6.2.3 Титруйте содержимое конической колбы при помощи стандартного раствора соляной кислоты (5.6) (см. примечание 9.4) после добавления нескольких капель индикаторного раствора (5.5), используя устройство для титрования (4.5), и отметьте используемое количество титранта. Конечная точка достигается в первом следе розового цвета в содержимом.
- 6.2.4 Зафиксируйте используемое количество кислоты с точностью до 0,05 мл для пустой пробы (V_b) и для каждого образца (V_s).

7. Расчеты

Содержание азота (% N)

$$\% N = (V_s - V_b) \times M(\text{HCl}) \times 1 \times 14,007 / (W \times 10),$$

где:

V_s = объем соляной кислоты в мл, необходимый для титрования образца,

V_b = объем соляной кислоты в мл, необходимый для пустой пробы

$M(\text{HCl})$ = молярность HCl,

1 = кислотный фактор,

14,007 = молекулярная масса N,

10 = преобразование из мг/г к %,

W = вес образца (г).

Расчетное содержание сырого белка (% CP):

$$\% CP = \% N \times F,$$

где:

F = 6,25 для всех кормовых культур, кормов и комбикормов,

F = 5,70 для пшеницы, и

F = 6,38 для молока и молочных продуктов.

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях.

Используйте химические эталоны для проверки всего метода, могут быть использованы высокоочищенные (> 99,7%) и высушенные лизин-гидрохлорид, ацетанилид или триптофан. Соли аммония могут быть использованы для проверки процедур дистилляции и титрования.

Повторяемость

Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать:

0,2% в абсолютном выражении для содержания сырого белка менее 20%,

1,0% в абсолютном выражении для содержания сырого белка от 20% до 40%,

0,4% в абсолютном выражении для содержания сырого белка более 40%.

Восстановление

Испытание на восстановление должно периодически выполняться и оцениваться. Уровень восстановления для части (только дистилляция) и всей процедуры (озоление и дистилляция) должен быть на уровне > 99%.

9. Примечания

- 9.1 Для свежих образцов необходимо использовать большее количество образцов.
- 9.2 Данный метод также может быть использован для определения содержания аммиака в силосных образцах. Эта процедура должна быть выполнена без осуществления озоления.
- 9.3 Международный коэффициент преобразования (F) основан на среднем содержании аминокислот в белках в кормах. Реальный коэффициент может варьироваться для различных кормов.
- 9.4 В случае, когда серная кислота используется для титрования, кислотный фактор должен быть равен 2.
- 9.5 Катализатор также может быть приготовлен в лаборатории. Он должен содержать 3,5 г сульфата калия и 0,4 г пентагидрата медного купороса (II).

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

10.5 Пропорции реагента, подводимое количество тепла и время озоления относятся к критическим факторами – не меняйте их.

10.6 Для удобного добавления смесей порошковых катализаторов доступны диспенсеры.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ:

10.7 Аккуратно обращайтесь с кислотой. Используйте кислотостойкие вытяжные шкафы. Всегда добавляйте кислоту в воду, если иное не указано в методе. Для защиты от кислотных или щелочных брызг одевайте защитную маску и плотные перчатки. Если кислота попала на кожу, немедленно промойте большим количеством воды.

10.8 Серная кислота и гидроксид натрия могут оставить серьезные ожоги на коже, глазах и дыхательных путях. Используйте устройства для эффективного удаления газов для защиты от кислотных испарений, щелочной пыли или паров. Всегда добавляйте концентрированную серную кислоту или гранулы гидроксида натрия в воду, а не наоборот. Концентрированный раствор гидроксида натрия может быстро и легко привести к слепоте. При попадании на кожу или в глаза промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу.

10.9 Имейте при себе соду и уксус на случай разлива химических веществ.

10.10 Пары оксида серы, образующиеся в процессе озоления, являются опасными для вдыхания. Не вдыхайте их.

10.11 Чтобы не допустить бурную реакцию, в результате которой кислота может выплеснуться из колбы, смеси должны быть охлаждены до добавления в них воды. Кроме того, разбавленная смесь должна быть охлаждена до добавления в нее гидроксида натрия во избежание подобной реакции.

10.12 Проконсультируйтесь с местными органами власти касательно надлежащей утилизации медьсодержащих отходов.

11. Полезные ссылки

АОАС 984.13. 2000 г. *Белок (сырой) в кормах для животных и кормах для домашних животных: метод Кьельдаля для медного катализатора.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

АОАС 988.05. 2000 г. *Белок (сырой) в кормах для животных и кормах для домашних животных: метод Кьельдаля для смешанного $\text{CuSO}_4/\text{TiO}_2$ катализатора.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

АОСS Ba4d-90. *Модифицированный «азот-аммиак-белок» метод Кьельдаля, катализатор диоксид титана + сульфат меди.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

ISO 5983-2. 2009 г. *Корма для животных - Определение содержания азота и расчет содержания сырого белка – Часть 2: Метод с использованием блока для озоления и перегонки с водяным паром.* Женева, Швейцария.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009.

АЗОТ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЫРОГО БЕЛКА – СГОРАНИЕ

1. Принцип

Уровень содержания азота определяется посредством полного сжигания образца при температуре 950 °С в присутствии кислорода, когда азот превращается в окислы азота (NO_x) (принцип Дюма). NO_x понижается до N₂, который измеряется в термокондуктометрической ячейке. Содержание белка рассчитывается путем умножения содержания азота на 6,25 или на коэффициент преобразования белка, применимый к типу образца (см. примечание 9.3).

2. Область применения

Описанный метод применяется для определения содержания азота во всех кормах.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Аппарат Дюма, способный обеспечить полное измерение содержания.

5. Реагенты

Химические вещества и расходные материалы, необходимые для оборудования, должны быть указаны производителем.

- 5.1 EDTA, этилендиаминтетрауксусная кислота, C₁₀H₁₆N₂O₈, порошок. Это химическое вещество используется в качестве калибровочного эталона для данного анализа.

6. Метод

- 6.1 Взвесьте в жестяную чашку примерно 0,22 г образца или EDTA (5.1) с точностью до 0,1 мг (W). Жидкие образцы кормов необходимо взвешивать в жестяной капсуле с использованием пипетки (см. Примечание 9.1). Рекомендуемый вес для жидкостей: 0,2-0,5 г в зависимости от ожидаемой концентрации.
- 6.2 Осторожно закройте жестяную чашку и поместите ее в автоматический пробоотборник оборудования (4.2).
- 6.3 Проанализируйте эталон и образцы в соответствии с инструкцией производителя.
- 6.4 Рассчитайте результаты с помощью калибровочного эталона (в большинстве случаев расчет осуществляется автоматически самим оборудованием).

7. Расчеты

Содержание азота (% N) рассчитывается автоматически самим оборудованием (см. примечание 9.2).

Расчет сырого белка (% CP):

$$\% \text{ CP} = \% \text{ N} \times F,$$

где:

F = 6,25 для всех кормовых культур, кормов и комбикормов,

F = 5,70 для пшеницы, и

F = 6,38 для молока и молочных продуктов.

8. Контроль качества

Каждая партия должна включать пустую пробу (пустая чашка или капсула), один образец лизина гидрохлорида высокой чистоты и один или несколько проверочных контрольных образцов (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона. Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях.

Повторяемость

Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать:

0,2% в абсолютном выражении, для содержания сырого белка менее 20%,

1,0% в абсолютном выражении, для содержания сырого белка от 20% до 40%,

0,4% в абсолютном выражении, для содержания сырого белка более 40%.

9. Примечания

- 9.1 Для кормов с очень низким содержанием N массу образцу необходимо увеличить.
- 9.2 Расчет содержания N основан на сравнении областей максимума, полученных для калибровочного эталона (EDTA) и образцов.
- 9.3 Международный коэффициент преобразования (F) основан на среднем содержании аминокислот в белках в кормах. Реальный коэффициент может варьироваться для различных кормов.
- 9.4 Содержание азота и, соответственно, расчетные значения содержания сырого белка могут немного отличаться от тех, которые были получены с помощью метода Кьельдаля.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

10.1. Системные ошибки

10.1.1 Неправильная калибровка пустых проб и/или калибровочных эталонов.

10.1.2 После планового технического обслуживания необходимо всегда откалибровать прибор заново.

10.1.3 Превышение пределов для тиглей / аликвотных реагентных пробирок / редуцированных пробирок более чем на 20% может привести к блокировке.

10.1.4 Не перегружайте тигель.

10.1.5 Если значение балластового фильтра составляет около 800, а калибровочные и контрольные образцы работают стабильно слабо, возможно необходимо заменить балластовый фильтр. Для выявления специфических ошибок, необходимо обратиться к инструкции производителя.

10.2. Случайные ошибки

10.2.1 Значительные отклонения от весовых значений, приведенных для образца. Слишком малое или большое количество образца может привести к неточным результатам.

10.1.1 Потери образца после взвешивания из-за ненадлежащего накрытия жестяной чашки/капсулы фольгой или отверстий/трещин в фольге могут привести к недостаточной точности представленных результатов.

10.2.2 Износ части жестяной чашки/капсулы после тарирования. К ошибкам взвешивания может привести отламывание углов чашки или капсулы.

11. Полезные ссылки

АОАС 990.03. 2000 г. *Белок (сырой) в кормах для животных: метод сжигания.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

AOCS Ba4e-93. *Универсальный метод сгорания для определения содержания сырого белка. Инструкция производителя.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

СЫРОЙ ЖИР – ЭФИРНЫЙ ЭКСТРАКТ

1. Принцип

Жир извлекается из образца при помощи петролейного эфира. Растворитель дистиллируется, а осадок высушивается и взвешивается. Содержание жира может быть определено с применением или без применения предварительного гидролиза посредством соляной кислоты. Использование предварительного гидролиза приводит зачастую к более высоким результатам, особенно это касается термически обработанных кормов и кормов животного происхождения.

2. Область применения

Данный метод определения содержания жира может быть применен для кормов и кормовых ингредиентов с содержанием жира менее 20%. Что касается кормов с более высоким содержанием жира, например, семян масличных культур, см. применения 9.1 и 9.2.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Нагревательный прибор с контролем температуры.
- 4.3 Экстракционные гильзы, очищенные от жиры и промытые эфиром.
- 4.4 Нагревательный прибор.
- 4.5 Перегонный аппарат.
- 4.6 Экстрактор Сокслета.
- 4.7 Вакуумная печь с электрическим нагревом.
- 4.8 Эксикатор.
- 4.9 Воронка Бюхнера, соединенная с насосом.

5. Реагенты

- 5.1 Легкий петролейный эфир (температура кипения 40-60 °С), очищенный для извлечения жира (т.е. осадок после выпаривания должен быть менее 20 мг/л).
- 5.2 Трехмолярная соляная кислота.

6. Метод

Для определения содержания жира без применения гидролиза начните с пункта 6.2.

Для определения содержания жира с применением гидролиза начните с пункта 6.1.

В этой процедуре описаны ручные методы для проведения обоих измерений (см. примечание 9.3).

6.1 Гидролиз

- 6.1.3 Взвесьте как минимум 5 г образца в сосуд или коническую колбу и запишите вес с точностью до 0,1 мг (W1).
- 6.1.4 Добавьте в образец 100 мл соляной кислоты (5.2) и хлопья карбида кремния и накройте сосуд лабораторным стеклом или установите обратный конденсатор на коническую колбу (4.5).
- 6.1.5 Доведите смесь до слабого кипения на нагревательном приборе (4.4) и поддерживайте кипение в течение 1 часа. Перемешивайте каждые 10 минут, чтобы предотвратить прилипание продукта к стенкам емкости.
- 6.1.6 Профильтруйте смесь через обезжиренную двойную фильтровальную бумагу в воронке Бюхнера (4.9), соединенной с насосом.
- 6.1.7 Промойте осадок холодной дистиллированной водой до получения нейтрального фильтрата.
- 6.1.8 Аккуратно переместите фильтровальную бумагу с осадком на экстракционную гильзу (4.3) и сушите в вакуумной печи (4.7) в течение 60 минут при температуре 80 ± 2 °С.
- 6.1.9 Выньте гильзу из печи и накройте обезжиренным ватным тампоном. Следуйте процедуре, описанной в разделе 6.2.2.

6.2 Экстракция (извлечение)

- 6.2.1 Взвесьте как минимум 5 г образца с точностью до 0,1 мг (W1) в экстракционную гильзу (4.3) и накройте обезжиренным ватным тампоном. Этот шаг применим только для случая определения содержания жира без проведения гидролиза.

- 6.2.2 Поместите немного хлопьев карбида кремния в сухую колбу и взвесьте с точностью до 0,1 мг (W₂), добавьте 95 мл петролейного эфира (5.1).
- 6.2.3 Установите гильзу в экстрактор (4.6) и соедините его с сухой колбой (6.2.2) и перегонным аппаратом (4.5).
- 6.2.4 Экстрагируйте в течение 6 часов при помощи петролейного эфира и регулируйте нагревательный прибор (4.4) для того, чтобы получить по крайней мере 10 сифонирований в час. Или следуйте рекомендациям производителя.
- 6.2.5 Фильтруйте растворитель до тех пор, пока колба почти не освободится от растворителя, оставьте на ночь в вытяжном шкафу, чтобы весь растворитель выпарился.
- 6.2.6 Сушите колбу с осадком в течение 1,5 часов в вакуумной печи (4.7) при температуре 80 ± 2 °C.
- 6.2.7 Охладите в сушильном аппарате (4.8) и взвесьте с точностью до 0,1 мг (W₃).

7. Расчеты

Содержание сырого жира с проведением или без проведения гидролиза:

$$\% \text{ сырого жира} = (W_3 - W_2) \times 100 / W_1,$$

где:

W₁ = начальная масса образца в граммах,

W₂ = тарная масса колбы в граммах, и

W₃ = масса колбы и осадка жира в граммах.

В представленных результатах должно быть указано, использовался ли гидролиз.

8. Контроль качества

Включите в каждый анализ холостой реагент и одну или несколько контрольных проб (QC), выберите образцы контрольных проб путем сопоставления аналитических уровней и матриц образцов контрольных проб к образцам в данной партии. В каждом анализе включите, по крайней мере, один набор повторений. Например, совокупная проба жмыха масличных семян может быть использована как контрольная проба в каждой партии, можно сделать на ней 15-20 повторений и сделать допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона. Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях.

ПРИМЕЧАНИЕ: Контрольные пробы для определения содержания жира следует менять каждые 6 месяцев в связи с нестабильностью жиров. Контрольная проба должна храниться при температуре 2-8 °C.

Разница между дубликатами образцов должна быть ниже, чем 0,25% в абсолютном выражении в методе без проведения гидролиза и 0,50% в методе с проведением гидролиза.

9. Примечания

- 9.1 Образцы с высоким содержанием жира должны пройти предварительную экстракцию легким петролейным эфиром в соответствии с методикой, описанной в SOP по подготовке образца (см. стр. 42-47).
- 9.2 Для масличных семян рекомендуется двойная экстракция петролейным эфиром. Альтернативный метод для этих продуктов указан в ISO 659:2009.
- 9.3 Доступно полуавтоматическое оборудование для определения содержания жира. В этом случае следуйте инструкциям производителя.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

- 10.1 Эфир имеет крайне низкую точку воспламенения.
- 10.2 Избегайте вдыхания паров эфира.
- 10.3 Храните эфир в металлических контейнерах.
- 10.4 Обращайтесь с открытыми контейнерами (контейнеры с реагентами и сосуды с жиром) в вытяжном шкафу.
- 10.5 Проводите экстракцию в хорошо проветриваемом помещении.
- 10.6 Пероксиды могут накапливаться в открытых контейнерах с эфиром. Они взрывоопасны и чувствительны к ударам. Проверяйте каждый контейнер открытый более чем 30 дней назад на наличие пероксидов. Эфиросодержащие пероксиды должны быть утилизированы специальными методами. Для проверки уровня пероксидов используются специальные полоски.
- 10.7 Электрооборудование должно быть заземлено. Экстракторы должны быть искроустойчивыми.
- 10.8 Чтобы избежать пожара или взрыва, убедитесь, что все эфиры выпариваются из сосудов, прежде чем поместить их в печь, оставляйте сосуды в вытяжном шкафу на ночь.

11. Полезные ссылки

- АОАС 920.39.** 2000 г. Жир (сырой) или эфирный экстракт в кормах для животных. Гейтерсберг, Мэриленд, США.
- ISO 6492.** 1999 г. *Корма для животных – определение содержания жира.* Женева, Швейцария.
- Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009.** 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза* L54/1 от 26.02.2009.

СЫРАЯ КЛЕТЧАТКА – МЕТОД ФИЛЬТРАЦИИ

1. Принцип

Образец после обезжиривания последовательно обрабатывается кипящей разбавленной серной кислотой и кипящим раствором гидроксида калия. Потеря массы в результате сжигания соответствует массе сырой клетчатки.

2. Область применения

Описанный метод применяется для определения кормов с содержанием сырой клетчатки, превышающим 1%. Если образец содержит > 10% жира, то до начала анализа извлеките жир с помощью петролейного эфира.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1. Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2. Стеклянные фильтрующие тигли, P100.
- 4.3. Нагревательный прибор.
- 4.4. Оборудование для фильтрации, соединенное с вакуумной системой, например системой Фибертека.
- 4.5. Эксикатор.
- 4.6. Вентилируемая сушильная печь, способная поддерживать температуру 103 ± 2 °C.
- 4.7. Муфельная печь, способная поддерживать температуру 550 ± 20 °C.

5. Реагенты

- 5.1. Петролейный эфир (температура кипения от 40 до 60 ° C).
- 5.2. Серная кислота, 0,15 М.
- 5.3. Технический ацетон.
- 5.4. Гидроксид калия, 0,23 М.

6. Метод

- 6.1. Предварительная подготовка
 - 6.1.1. Для каждого тигля P100 (4.2) взвесьте 1 г образца с точностью до 0,1 мг (W1).
 - 6.1.2. Поместите тигли в оборудование для фильтрации (4.4), добавьте около 30 мл петролейного эфира (5.1) для каждого тигля и профильтруйте с использованием вакуума.
 - 6.1.3. Дважды промойте.
 - 6.1.4. Высушите осадок на воздухе и количественно переместите в сосуд.
- 6.2. Озоление
 - 6.2.1. Добавьте в каждый сосуд 150 мл серной кислоты (5.3) и кипятите в течение 30 ± 1 мин. Если происходит вспенивание, добавьте несколько капель антипенного вещества.
 - 6.2.2. Профильтруйте смесь через тигель (4.2) с использованием вакуума (4.4).
 - 6.2.3. Промойте осадок 5 раз, каждый раз при помощи 10 мл горячей дистиллированной воды.
 - 6.2.4. Добавьте столько ацетона (5.4), сколько нужно, чтобы только покрыть осадок. Удалите ацетон через несколько минут, применив слабое всасывание.

- 6.2.5 Количественно переместите осадок в сосуд.
- 6.2.6 Добавьте в каждый сосуд 150 мл гидроксида калия (5.1.8) и кипятите в течение 30 ± 1 мин.
- 6.2.7 Профильтруйте смесь через тигель (4.2) с использованием вакуума (4.4).
- 6.2.8 Промойте осадок горячей дистиллированной водой, пока промывка не станет нейтральной.
- 6.2.9 Промойте осадок 3 раза под вакуумом, каждый раз с 30 мл ацетона (5.4) Сушите осадок путем всасывания после каждого мытья.
- 6.3 Сушка и сжигание
 - 6.3.1 Поместите тигли в печь (4.6), нагретую до температуры 103 ± 2 °С, и сушите их там 4,0 часа. Начинайте отсчет времени сушки с момента, когда печь достигла температуры 103 °С.
 - 6.3.2 Поместите тигли в эксикатор и дайте им остыть.
 - 6.3.3 Взвесьте тигли сразу после извлечения из эксикатора (4.5) с точностью до 0,1 мг (W2).
 - 6.3.4 Поместите тигли в муфельную печь (4.7) и сжигайте образцы в течение 2 часов при температуре 550 ± 20 °С. Начинайте отсчет времени сжигания с момента, когда печь достигла температуры 550 °С.
 - 6.3.5 Поместите тигли в эксикатор (4.5) и дайте им остыть.
 - 6.3.6 Взвесьте тигли сразу после извлечения их из эксикатора с точностью до 0,1 мг (W3).

7. Расчеты

Содержание сырой клетчатки (% CF):

$$\% \text{ CF} = (W2 - W3) \times 100 / W1,$$

где:

W1 = масса образца (г),

W2 = масса тигля и осадка после сушки (г), и

W3 = масса тигля и осадка после сжигания (г).

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона. Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях.

Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать:

0,3% в абсолютном выражении для содержания сырой клетчатки менее 10%,

3% относительно большего значения для содержания сырой клетчатки, равного или превышающего 10%.

9. Примечания

- 9.1 Для определения содержания сырой клетчатки существуют и другие методы, в которых применяется автоматическая промывка мешочков описанными реагентами. Для выполнения этих методов следуйте инструкциям производителя. Использование этих методов может привести к результатам, которые отличаются от результатов, полученных при использовании метода фильтрации.
- 9.2 Если возникают проблемы с фильтрацией, то в качестве фильтрующего средства можно использовать слой морского песка.

10. Полезные ссылки

ISO 6865. 2000 г. *Корма для животных – Определение содержания сырой клетчатки – Метод с применением промежуточной фильтрации*. Женева, Швейцария.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза* L54/1 от 26.02.2009.

НЕЙТРАЛЬНО-ДЕТЕРГЕНТНАЯ КЛЕТЧАТКА (NDF) – МЕТОД ФИЛЬТРАЦИИ

1. Принцип

Образец после обезжиривания кипятят с нейтрально-детергентным реагентом (NDF) с последующей обработкой α -амилазой в буферном растворе, чтобы растворить оставшийся крахмал. Потеря веса в результате сжигания сухого остатка соответствует весу NDF.

2. Область применения

Описанный метод применяется для определения кормов с содержанием NDF, превышающим 1%.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Стеклоянные фильтрующие тигли, P100 или аналогичные.
- 4.3 Нагревательный прибор.
- 4.4 Оборудование для фильтрации, соединенное с вакуумной системой, например системой Фибертека.
- 4.5 Эксикатор.
- 4.6 Вентилируемая сушильная печь, способная поддерживать температуру 103 ± 2 °C.
- 4.7 Муфельная печь, способная поддерживать температуру 550 ± 20 °C.

5. Реагенты

- 5.1 Технический ацетон.
- 5.2 Нейтрально-детергентный раствор (NDS), который содержит в 1 л дистиллированной воды:
 - 30 г лаурилсульфата натрия (=сульфата додецилнатрия)
 - 6,81 г тетра бората натрия $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$.
 - 4,56 г гидрофосфата ди-натрия Na_2HPO_4 или 5,72 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 - 18,61 г этилендиаминтетра уксусной кислоты, ди-натриевой соли
 - 10 мл 2-этокси-этанолаДоведите pH раствора до 6.9-7.1 используя гидроксид натрия или соляную кислоту.
- 5.3 Раствор амилазы. Растворите 2,5 мг термостойкой амилазы в 60,6 мл 0,1 М динатрийгидрофосфата (Na_2HPO_4) и 39,2 мл 0,1 М дигидрофосфата калия (KH_2PO_4).

6. Метод

- 6.1 Предварительная подготовка
 - 6.1.1 Взвесьте каждый тигель P100 (4.2).
 - 6.1.2 Отмерьте 0,5 г образца с точностью до 0,1 мг (W1) в тигель.
 - 6.1.3 Поместите тигли в оборудование для фильтрации (4.4) и добавьте около 30 мл ацетона (5.1) для каждого тигля и профильтруйте с помощью вакуума.
 - 6.1.4 Дважды промойте.
 - 6.1.5 Просушите осадок на воздухе и количественно переместите в сосуд.
- 6.2 Озоление
 - 6.2.1 Добавьте в каждый тигель 50 мл NDS (5.2) и кипятите в течение 60 ± 1 мин с обратным охлаждением; в случае вспенивания добавьте несколько капель антипенного вещества.
 - 6.2.2 Профильтруйте смесь через тигель (4.2) с использованием вакуума (4.4).
 - 6.2.3 Промойте осадок дважды, каждый раз при помощи 10 мл горячей дистиллированной воды.
 - 6.2.4 Добавьте столько ацетона (5.1), сколько нужно, чтобы только покрыть осадок. Удалите ацетон через несколько минут, применив слабое всасывание.
 - 6.2.5 Количественно переместите осадок в сосуд.
 - 6.2.6 Добавьте в каждый сосуд 1-2 мл раствора α -амилазы (5.3), а затем 30 мл кипящей дистиллированной воды. Дайте постоять 5-10 минут.
 - 6.2.7 Переместите смесь в тигель (4.2), дважды промойте горячей дистиллированной водой и дважды ацетоном (5.1) до тех пор, пока промывка не станет чистой. Сушите осадок путем всасывания после каждого мытья.
- 6.3 Сушка и сжигание
 - 6.3.1 Поместите тигли в печь (4.6), нагретую до температуры 103 ± 2 °C, и сушите их там, как минимум, в течение 4 часов. Начинайте отсчет времени с момента, когда печь достигла температуры 103 °C.

- 6.3.2 Поместите тигли в эксикатор (4.5) и дайте им остыть.
- 6.3.3 Взвесьте тигли сразу же после извлечения их из эксикатора с точностью до 0,1 мг (W2).
- 6.3.4 Поместите тигли в муфельную печь (4.7) и сжигайте в течение 2 часов при температуре $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Начинайте отсчет времени сжигания с момента, когда печь достигла температуры $550\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.3.5 После сжигания поместите тигли в эксикатор (4.5) и дайте им остыть.
- 6.3.6 Взвесьте тигли сразу же после извлечения их из эксикатора с точностью до 0,1 мг (W3).

7. Расчеты

Содержание NDF (%NDF):

$$\% \text{ NDF} = (W2 - W3) \times 100 / W1,$$

где:

W1 = масса образца (г),

W2 = масса тигля и осадка после сушки (г), и

W3 = масса тигля и осадка после сжигания (г).

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать:

0,3% в абсолютном выражении для содержания NDF менее 10%,

3% относительно большего значения для содержания NDF, равного или превышающего 10%.

9. Примечания

- 9.1 Для определения содержания NDF также существуют методы, в которых применяется автоматическая промывка мешочков описанными реагентами. Для выполнения этих методов следуйте инструкциям производителя. Использование этих методов может привести к результатам, которые отличаются от результатов, полученных при использовании метода фильтрации.
- 9.2 Дополнительная инкубация ферментом может быть использована для удаления остатков нерастворимого белка в осадке.
- 9.3 По причине обогащения буферного раствора α -амилазой для растворения оставшегося крахмала, фракцию клетчатки также называют 'aNDF'. α -амилазу можно не использовать в случае, если образцы (например, солома и сено) не богаты крахмалом.

- 9.4 Если возникают проблемы с фильтрацией, то в качестве фильтрующего средства можно использовать слой морского песка.

10. Полезные ссылки

Robertson, J.B. и Van Soest, P.J. 1981 г. Дeterгентная система анализа и ее применение к продуктам питания человека, в сборнике *Анализ пищевой клетчатки в продуктах питания*. Том 3. Глава 8 (под ред. W.P.T. James и O. Theander). Marcel Dekker, Inc.: Нью-Йорк.

Van Soest, P.J. и Robertson, J.B. 1985 г. *Анализ кормов и богатой клетчаткой пищи*. Лабораторное руководство для зоохимии 613. Университет Корнел, Итака, штат Нью-Йорк, США.

КИСЛОТНО-ДЕТЕРГЕНТНАЯ КЛЕТЧАТКА (ADF) И ЛИГНИН (ADL) – МЕТОД ФИЛЬТРАЦИИ

1. Принцип

Образец после обезжиривания кипятят с кислотнo-детергентным раствором. Потеря веса в результате сжигания сухого остатка соответствует весу ADF.

Для определения содержания ADL необходимо осуществить дополнительное кипячение с концентрированной серной кислотой до измерения потери веса в результате сжигания сухого остатка.

2. Область применения

Описанный метод применяется для определения кормов с содержанием ADF или ADL, превышающим 1%.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Стекланные фильтрующие тигли, Р100 или аналогичные.
- 4.3 Нагревательный прибор.
- 4.4 Оборудование для фильтрации, соединенное с вакуумной системой, например системой Фибертека.
- 4.5 Эксикатор.
- 4.6 Вентилируемая сушильная печь, способная поддерживать температуру 103 ± 2 °С.
- 4.7 Муфельная печь, способная поддерживать температуру 550 ± 20 °С.

5. Реагенты

- 5.1 Технический ацетон.
- 5.2 Кислотно-детергентный раствор (ADS), который содержит 20 г бромиды цетилтриметиламмония в 1 л 0,5 М серной кислоты.
- 5.3 72% Серная кислота (в весовом отношении).

6. Метод

- 6.1 Предварительная подготовка
 - 6.1.1 Взвесьте пустой тигель (4.2) с точностью до 0,1 мг (см. примечание 9.4).
 - 6.1.2 Отмерьте 1 г образца с точностью до 0,1 мг (W1) в тигель (4.2).
 - 6.1.3 Поместите тигли в оборудование для фильтрации (4.4) и добавьте около 30 мл ацетона (5.1) для каждого тигля и профильтруйте с помощью вакуума.
 - 6.1.4 Дважды промойте.
 - 6.1.5 Просушите осадок на воздухе и количественно переместите в сосуд.
- 6.2 Озоление (ADS-шаг)
 - 6.2.1 Добавьте в каждый сосуд 50 мл ADS (5.2) и кипятите в течение 60 ± 1 мин с обратным охлаждением; в случае вспенивания добавьте несколько капель антипенного вещества.
 - 6.2.2 Профильтруйте смесь через тигель (4.2) с использованием вакуума.
 - 6.2.3 Промойте осадок дважды, каждый раз при помощи 10 мл горячей дистиллированной воды.
 - 6.2.4 Добавьте небольшое количество ацетона (5.1), чтобы только покрыть осадок. Удалите ацетон через несколько минут, применив слабое всасывание.
- 6.3 Первичная сушка
 - 6.3.1 Поместите тигли в печь (4.6), нагретую до температуры 103 ± 2 °C, и сушите их там, как минимум, в течение 4 часов. Начините отсчет времени с момента, когда печь достигла температуры 103 °C.
 - 6.3.2 Поместите тигли в эксикатор (4.5) и дайте им остыть.
 - 6.3.3 Взвесьте тигли сразу же после извлечения их из эксикатора с точностью до 0,1 мг (W2).
- 6.4 Озоление (ADL-шаг).

ПРИМЕЧАНИЕ: Надевайте защитные очки и перчатки при работе с 72%-ной серной кислотой.

 - 6.4.1 Добавьте 10 мл 72%-ной серной кислоты (5.3) в каждый тигель и осторожно перемешайте стеклянной палочкой для того, чтобы размешать все комочки (см. примечание 9.3)
 - 6.4.2 Наполните тигли наполовину кислотой и перемешивайте каждые 30 минут.
 - 6.4.3 Через 3 часа отфильтруйте с помощью вакуума как можно больше кислоты, и промойте содержимое горячей дистиллированной водой до полного удаления кислоты.
- 6.5 Вторичная сушка
 - 6.5.1 Поместите тигли в печь (4.6), нагретую до температуры 103 ± 2 °C, и сушите их там как минимум в течение 4 часов. Начините отсчет времени сушки с момента, когда печь достигла температуры 103 °C.

6.5.2 Поместите тигли в эксикатор (4.5) и дайте им остыть.

6.5.3 Взвесьте тигли непосредственно после извлечения их из эксикатора с точностью до 0,1 мг (W3).

6.6 Сжигание

6.6.1 Поместите тигли в муфельную печь (4.7) и сжигайте образцы в течение 2 часов при температуре 550 ± 20 °С. Начинайте отсчет времени сжигания с момента, когда печь достигла температуры 550 °С.

6.6.2 Поместите тигли в эксикатор (4.5) и дайте им остыть.

6.6.3 Взвесьте тигли непосредственно после извлечения их из эксикатора с точностью до 0,1 мг (W4).

7. Расчеты

Содержание ADF (% ADF):

$$\% \text{ ADF} = (W2 - W4) \times 100 / W1$$

Содержание ADL (% ADL):

$$\% \text{ ADL} = (W3 - W4) \times 100 / W1$$

где:

W1 = масса образца (г),

W2 = масса тигля и осадка после первой сушки (г),

W3 = масса тигля и осадка после второй сушки (г), и

W4 = масса тигля и осадка после сжигания (г).

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона. Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях.

Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать:

0,3% в абсолютном выражении для содержания ADF менее 10%,

3% относительно большего значения для содержания ADF, равного или превышающего 10%.

9. Примечания

9.1 Для определения содержания ADF также существуют методы, в которых применяется автоматическая промывка мешочков описанными реагентами. Для выполнения этих методов следуйте инструкциям производителя. Использование этих методов может привести к результатам, которые отличаются от результатов, полученных при использовании метода фильтрации.

- 9.2 Дополнительная инкубация амилазой может быть использована для удаления нерастворимых остатков крахмала в осадке.
- 9.3 Будьте осторожны, чтобы не повредить стеклоприпой в тигле при использовании стеклянной палочки.
- 9.4 Некоторые лаборатории не проводят шаг сжигания (6.6). В таком случае, кислотно-детергентный остаток (ADR) определяется суммой ADF и оставшейся частью золы

Содержание ADR (% ADR):

$$\% \text{ ADR} = (W_2 - W_0) \times 100 / W_1,$$

где:

W0 - масса пустого тигля, полученная на шаге 6.1.1. Если не указана поправка на наличие золы, это должно быть зафиксировано в отчете.

9.5 Если возникают проблемы с фильтрацией, то в качестве фильтрующего средства можно использовать слой морского песка.

10. Полезные ссылки

АОАС 973.18. 2010 г. *Клетчатка (кислотно-детергентная) и лигнин (H₂SO₄) в кормах для животных.* Гейтерсберг, Мэриленд, США

Robertson, J.B. и Van Soest, P.J. 1981 г. Детергентная система анализа и ее применение к продуктам питания человека, в сборнике *Анализ пищевой клетчатки в продуктах питания.* Том 3. Глава 8 (под ред. W.P.T. James и O. Theander). Marcel Dekker, Inc.: Нью-Йорк.

Van Soest, P.J. и Robertson, J.B. 1985 г. *Анализ кормов и богатой клетчаткой пищи.* Лабораторное руководство для зоохимии 613. Университет Корнел, Итака, штат Нью-Йорк, США.

КРАХМАЛ – ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД

1. Принцип

Содержание крахмала определяется посредством предварительной экстракции образца в 40%-ном этаноле для удаления растворимых сахаров, с последующим растворением крахмала с использованием диметилсульфоксида (DMSO), а затем количественного превращения крахмала в глюкозу с помощью амилоглюкозидазы. Освобожденная глюкоза измеряется спектрометрически методом гексокиназы.

2. Область применения

Этот метод может быть использован для всех кормов с содержанием крахмала выше 2% (см. примечание 9.1).

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Настольная центрифуга, способная достичь максимального ускорения в 3000 *g*.
- 4.3 Водяная ванна, способная поддерживать температуру 60 ± 1 °С.
- 4.4 Водяная ванна, обеспечивающая кипение при температуре от 95 до 100 °С.
- 4.5 Вortex-миксер.
- 4.6 pH-метр.
- 4.7 Спектрофотометр.

5. Реагенты

- 5.1 Этанол, 40%
Смешайте этанол и дистиллированную воду в объемном соотношении 2:3.
- 5.2 Диметилсульфоксид (DMSO) 90%
Смешайте чистый DMSO и дистиллированную воду в объемном соотношении 9:1.
- 5.3 Соляная кислота, 12 М.
- 5.4 Водный раствор гидроксида натрия, 4 М
Взвесьте 40 г NaOH в мерной колбе объемом 250 мл и дополните объем дистиллированной H₂O до отметки.
- 5.5 Раствор уксусной кислоты, 2 М
Добавьте в мерную колбу объемом 500 мл 200 мл дистиллированной воды и 59 мл уксусной кислоты. Разведите дистиллированной водой до уровня метки.
- 5.6 Раствор ацетата натрия, 2 М
Растворите 82 г ацетата натрия в примерно 300 мл дистиллированной воды в мерной колбе объемом 500 мл, а затем добавьте дистиллированной воды до отметки.
- 5.7 Буферный раствор ацетата натрия, 2 М, pH = 4,8
Смешайте 41 мл раствора уксусной кислоты (5.5) с 59 мл раствора ацетата натрия (5.6). Проверьте и отрегулируйте, в случае необходимости, уровень pH.
- 5.8 Раствор калийного гексацианоферрата (II), 0,25 М
В мерной колбе объемом 1 литр растворите 106 г тригидрата калийного гексацианоферрата в дистиллированной воде, а затем добавьте дистиллированной воды до отметки.
- 5.9 Ацетат цинка (1 М) в 0,5 М уксусной кислоты
В мерной колбе объемом 1 литр растворите 219,5 г дигидрата ацетата цинка и 30 г безводной уксусной кислоты в дистиллированной воде, а затем добавьте дистиллированной воды до отметки.
- 5.10 Раствор йода в йодиде калия
В мерной колбе объемом 1 литр растворите 12,7 г йода и 24 г йодида калия в дистиллированной воде, а затем добавьте дистиллированную воду до отметки.
- 5.11 Стандартный раствор глюкозы
Для образцов, содержащих 200-1000 г/кг крахмала. Подготовьте три различных раствора глюкозы (0,0194 М). В каждой мерной колбе объемом 100

мл растворите 350 мг ± 1 мг безводной глюкозы в дистиллированной воде, затем добавьте дистиллированной воды до отметки.

Для образцов, содержащих 40-200 г/кг крахмала. Подготовьте три различных раствора глюкозы (0,0039 М). В каждой мерной колбе объемом 500 мл растворите 350 мг ± 1 мг безводной глюкозы, добавьте дистиллированной воды до отметки.

Ежедневно подготавливайте свежие растворы глюкозы.

5.12 Раствор амилаглюкозидазы 160 ед/мл (AMG)

Растворите в смеси 9 мл дистиллированной H₂O + 1 мл буферного раствора ацетата натрия (5.7), 267 мг AMG (ЕС 3.2.1.3 (*Черная плесень*, Диагностика Роше, № 1 202 367, 6 ед/мг)). Следуйте инструкциям по хранению, которые указаны производителем.

ПРИМЕЧАНИЕ: 1 единица AMG способна выделить 1 мкмоль глюкозы из гликогена в 1 минуту при температуре 25 °С при pH = 4,75.

5.13 D-глюкозный УФ тестовый набор применяется для количественного определения глюкозы ферментативно методом гексокиназы (R-Biopharm, № 10 716 251 035) в соответствии с инструкциями производителя. Неиспользованные наборы могут храниться в течение 1 года при температуре 4 °С. Также для определения глюкозы посредством метода гексокиназы могут применяться другие коммерческие тестовые наборы.

6. Метод

6.1 Экстракция свободного сахара

6.1.1 Взвесьте примерно 0,2 г образца с точностью до 0,1 мг (W) в центрифужную пробирку (4.2).

6.1.2 Добавьте 10 мл 40%-ного этанола (5.1), хорошо встряхните и трясите в течение 10 минут.

6.1.3 Поместите в центрифугу на 10 минут при 3000 g и удалите супернатант.

6.1.4 Повторите шаги 6.1.2 и 6.1.3.

6.2 Распад крахмала

6.2.1 Включите пустую пробирку в качестве пустой пробы на данном этапе метода.

6.2.2 Добавьте 15 стеклянных «жемчужин» в центрифужную пробирку (6.1.4) и добавьте 10,0 мл раствора диметилсульфоксида DMSO (5.2), непрерывно смешивая встряхиванием (см. примечание 9.3), закройте пробирку завинчивающейся крышкой.

6.2.3 Встряхивайте пробирки в кипящей водяной бане в течение 30 минут.

6.2.4 Выньте пробирки, дайте им остыть, добавьте с помощью пипетки 1,7 мл соляной кислоты (5.3) и хорошо перемешайте.

6.2.5 Закройте пробирки и встряхивайте в течение 30 минут на водяной бане, доведенной до температуры 60 °С ± 1 °С.

6.2.6 Охладите пробирку и количественно переместите содержимое в мерную колбу объемом 100 мл.

6.2.7 Добавьте 5,0 мл водного раствора гидроксида натрия (5.4) и 2,5 мл

буферного раствора ацетата натрия (5.7) и тщательно перемешайте раствор. При необходимости отрегулируйте уровень pH до $4,8 \pm 0,1$ при помощи разбавленной соляной кислоты или гидроксида натрия. Доведите объем до 100 мл при помощи дистиллированной воды.

- 6.3 Ферментативное превращение крахмала в глюкозу
- 6.3.1 Отмерьте пипеткой 5,00 мл раствора (6.2.6) в другую центрифужную пробирку и добавьте 0,125 мл ферментативного раствора AMG (5.12). Закройте пробирку и тщательно перемешайте.
- 6.3.2 Выдержите в течение 16 часов на водяной бане, доведенной до температуры $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.3.3 Затем поместите пробирки в кипящую водяную баню на 15 минут, чтобы остановить реакцию.
- 6.3.4 Охладите пробирки до комнатной температуры и добавьте 0,125 мл раствора калийного гексацианоферрата (II) (5.8) и встряхивайте в течение 1 минуты.
- 6.3.5 Добавьте 0,125 мл раствора ацетата цинка (5.9), встряхивайте в течение 1 минуты, выдержите в центрифуге в течение 10 минут при 3000 g.
- 6.3.6 Переместите супернатант в другую пробирку (см. примечание 9.4).
- 6.4 Ферментативное определение содержания глюкозы
- 6.4.1 Разбавьте 0,5 мл супернатанта (6.3.6), стандартного раствора глюкозы (5.11) и пустой пробы, соответственно, 9,5 мл дистиллированной воды, в случае, если содержание крахмала $> 200\text{ г / кг}$. В случае более низкого содержания крахмала необходимо взять больший объем супернатанта, а объем довести дистиллированной водой до 10 мл.
- 6.4.2 Для того, чтобы измерить уровень глюкозы в разбавленных растворах (6.4.1) методом гексокиназы, необходимо следовать инструкциям производителя. Используя спектрофотометр измерьте показатель поглощения при длине волны в 340 нм.

7. Расчеты

Рассчитайте содержание глюкозы в анализируемом растворе с помощью линейной регрессии.

Содержание крахмала рассчитывается следующим образом:

$$\% \text{ Крахмала} = (C \times V \times DF \times 162/180) / (W \times 10),$$

где:

- C = концентрация глюкозы в анализируемом растворе (мг/л),
V = объем раствора (в литрах, то есть 0,1),
DF = коэффициент разбавления (4 или 10),
162/180 = коэффициент для преобразования глюкозы в крахмал,
W = масса образца (г) и
10 = коэффициент для преобразования г/кг в %

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма

для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать $0,5\% + 1\%$ относительно среднего значения повторных анализов. Например: Если среднее значение повторных анализов составляет 12% , то разница между ними не должна быть выше, чем $0,5\%$ плюс $0,12\%$ (1% от 12%), т. е. $0,62\%$.

9. Примечания

- 9.1 Технологическая обработка может привести к расщеплению крахмала до глюкозных олигомеров (декстринов), которые не измеряются с помощью этого метода.
- 9.2 Желательно измельчить образец до прохождения его через сито с размером пор в $0,5$ мм для определения содержания крахмала.
- 9.3 Интенсивная гомогенизация/смешивание в процессе добавления DMSO необходима для предотвращения образования комков.
- 9.4 Для того, чтобы проверить, весь ли крахмал преобразован, может быть выполнена йодная проба. Добавьте несколько мл дистиллированной воды в пробирку, кипятите 10 минут, остудите и добавьте 2 мл йода (5.10). Синий цвет указывает на присутствие крахмала и, следовательно, его неполное преобразование. В этом случае анализ должен быть повторен.
- 9.5 Если содержание крахмала в образце неизвестно, то измерения должны быть выполнены с помощью двух степеней разбавления. Разница между результатами должна находиться, по крайней мере, в рамках требований к повторным анализам.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

- 10.1 Реагенты и растворы должны быть приготовлены с использованием высококачественной лабораторной воды.
- 10.2 Эффективность ферментов и условий должна быть проверена.
- 10.3 Концентрация глюкозы $> 0,5\%$ в ферментных препаратах может повлечь за собой фоновое поглощение и повлиять на показатели образцов.

11. Полезные ссылки

ISO 15914. 2004 г. *Корма для животных – Определение общего содержания крахмала с помощью ферментов.* Женева, Швейцария.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009 – Поляриметрический метод определения содержания крахмала.

РЕДУЦИРУЮЩИЙ САХАР – МЕТОД ЛЮФФА-СКУРЛА

1. Принцип

Сахара извлекаются в растворе этанола, а затем раствор очищается растворами Карреца I и II. После удаления этанола содержание редуцирующих сахаров определяется с помощью реагента Люффа-Скурла.

Этот метод определяет количество редуцирующих сахаров и общих сахаров после инверсии, выраженных глюкозой или, в некоторых случаях, сахарозой, преобразованных коэффициентом 0,95.

2. Область применения

Этот метод применим к кормам, включая комбикорма.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1. Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2. Миксер (тумблер): примерно от 35 до 40 оборотов в минуту.
- 4.3. Устройство для титрования.

5. Реагенты

- 5.1. Раствор этанола 40%-ный (в объёмном отношении), плотность: 0,948 г/мл при 20 °С, нейтрализованный с помощью 1%-ного раствора фенолфталеина (5.18). (При необходимости его можно получить путем размещения раствора этанола на пластинке для смешивания и добавления по каплям пятимолярного (5 М) NaOH до тех пор, пока вода не станет розового цвета. Аккуратно добавьте по каплям 0,5 М H₂SO₄, пока раствор не очистится от розового цвета, а затем снова сделайте его розовым, добавив 0,5 М NaOH.).
- 5.2. Раствор I Карреца
Растворите 21,9 г ацетата цинка Zn (CH₃COO)₂·2 H₂O и 3 г ледяной уксусной кислоты в дистиллированной воде. Доведите объем до 100 мл добавлением дистиллированной воды.
- 5.3. Раствор II Карреца
Растворите 10,6 г калийного ферроцианида K₄Fe(CN)₆·3 H₂O в дистиллированной воде. Доведите объем до 100 мл добавлением дистиллированной воды.
- 5.4. Раствор метилоранжа, 0,1%-ный (отношение веса к объему).
- 5.5. Четырехмолярная (4 М) соляная кислота.
- 5.6. 0,1 М соляной кислоты.
- 5.7. 0,1 М раствора гидроксида натрия.

- 5.8 Раствор медного купороса
Растворите 25 г медного купороса, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, свободного от железа, в 100 мл дистиллированной воды.
- 5.9 Раствор лимонной кислоты
Растворите 50 г лимонной кислоты, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 50 мл дистиллированной воды.
- 5.10 Раствор карбоната натрия
Растворите 143,8 г безводного карбоната натрия примерно в 300 мл теплой дистиллированной воды. Дайте остыть.
- 5.11 Реагенты Люффа-Скурла
При перемешивании осторожно влейте раствор лимонной кислоты (5.9) в раствор карбоната натрия (5.10). Добавьте раствор сульфата меди (5.8) и доведите объем до 1 л добавлением дистиллированной воды. Оставьте отстояться в течение ночи и профильтруйте. Проверьте концентрацию реагента, полученную таким образом (Cu 0,05 М; Na_2CO_3 1 М), см. (пункт 6.4) последний абзац. Уровень pH раствора должен быть примерно равен 9,4.
- 5.12 Раствор тиосульфата натрия, 0,1 М
Растворите 24,8 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в колбе объемом 1 литр и доведите до полного объема добавлением дистиллированной воды.
- 5.13 Раствор крахмала
Добавьте смесь из 5 г растворимого крахмала и 30 мл дистиллированной воды к 1 л кипящей дистиллированной воды. Кипятите в течение 3 минут, дайте остыть и, при необходимости добавьте 10 мг йодида ртути в качестве консерванта.
- 5.14 Серная кислота, 3 М.
- 5.15 Раствор йодида калия 30%-ный (отношение веса к объему).
- 5.16 Гранулированная пемза (может быть получена, например, из Sigma-Aldrich), прокипяченная в соляной кислоте, промытая дистиллированной водой и высушенная.
- 5.17 3-метилбутан-1-ол.
- 5.18 1%-ный фенолфталеин
Отмерьте 1 г фенолфталеина в сосуд объемом 200 мл, добавьте 60 мл чистого спирта, 40 мл дистиллированной воды и перемешайте.

6. Метод

- 6.1 Экстракция (извлечение_ образца)
- 6.1.1 Взвесьте примерно 2,5 г образца с точностью до 0,1 мг и поместите в мерную колбу объемом 250 мл.
- 6.1.2 Добавьте 200 мл этанола (5.1) и встряхивайте в течение 1 часа.
- 6.1.3 Добавьте 5 мл раствора I Карреца (5.2) и перемешивайте в течение примерно 30 секунд.
- 6.1.4 Добавьте 5 мл раствора II Карреца (5.3) и перемешивайте в течение 1 минуты.
- 6.1.5 Доведите объем до 250 мл добавлением этанола (5.1), тщательно перемешайте и процедите.

- 6.1.6 Удалите 200 мл фильтрата и испарите около половины объема для того, чтобы удалить большую часть этанола.
- 6.1.7 Переместите выпаренный осадок количественно в мерную колбу объемом 200 мл с использованием теплой дистиллированной воды, охладите, доведите объем до отметки добавлением дистиллированной воды, тщательно перемешайте и отфильтруйте в случае необходимости.
Этот раствор используется для определения количества редуцирующих сахаров и, после инверсии, общего количества редуцирующих сахаров.
- 6.2 Определение редуцирующих сахаров
 - 6.2.1 Используя пипетку, извлеките не более 25 мл раствора (6.1.7), содержащего менее 60 мг редуцирующих сахаров в пересчете на глюкозу (см. примечание 9.4).
 - 6.2.2 Определите содержание редуцирующего сахара в этом растворе методом Люффа-Скурла (6.4).
- 6.3 Определение общего количества редуцирующих сахаров после инверсии
 - 6.3.1 Используя пипетку, переместите 50 мл раствора (6.1.7) в мерную колбу объемом 100 мл.
 - 6.3.2 Добавьте несколько капель раствора метилоранжа (5.4), затем, тщательно и непрерывно помешивая, добавляйте соляную кислоту (5.5) до тех пор, пока жидкость не станет определенно красного цвета.
 - 6.3.3 Добавьте 15 мл соляной кислоты (5.6) и опустите колбу в ванну с кипящей водой на 30 минут.
 - 6.3.4 Быстро охладите примерно до температуры 20 °С и добавьте 15 мл раствора гидроксида натрия (5.7). Для охлаждения может быть использована ледяная ванна.
 - 6.3.5 Доведите объем до 100 мл добавлением дистиллированной воды и тщательно перемешайте.
 - 6.3.6 Удалите не более 25 мл, содержащих менее 60 мг редуцирующих сахаров в пересчете на глюкозу (см. примечание 9.4).
 - 6.3.7 Определите содержание редуцирующих сахаров в этом растворе методом Люффа-Скурла (6.4).
- 6.4 Титрование методом Люффа-Скурла
 - 6.4.1 Используя пипетку, поместите 25 мл реагента Люффа-Скурла (5.11) в колбу Эрленмейера объемом 300 мл.
 - 6.4.2 Добавьте ровно 25 мл осветленного раствора сахара.
 - 6.4.3 Добавьте 2 гранулы пемзы (5.16), нагревайте на открытом среднем пламени и доведите жидкость до кипения примерно за 2 минуты. Во время нагревания на огне перемешивайте раствор вручную.
 - 6.4.4 Сразу же поместите колбу Эрленмейера на металлическую сетку с асбестовым покрытием с отверстием около 6 см в диаметре, под которым должно гореть пламя. Пламя необходимо регулировать таким образом, чтобы только основание колбы Эрленмейера нагревалось.
 - 6.4.5 Установите обратный конденсатор в колбу Эрленмейера. Кипятите ровно 10 минут.

- 6.4.7 Немедленно охладите в холодной воде и примерно через 5 минут начинайте титрование.
- 6.4.8 Добавьте 10 мл раствора йодида калия (5.15) и сразу после этого (осторожно, из-за опасности обильного пенообразования) добавьте 25 мл серной кислоты (5.14).
- 6.4.9 Титруйте раствором тиосульфата натрия (5.12) до тех пор, пока присутствует тусклый желтый цвет, добавьте индикатор крахмала (5.13), завершите титрование и запишите используемый объем (Vs).
- 6.4.10 Выполните ту же самую процедуру титрования на точно взвешенной смеси из 25 мл реагента Люффа-Скурла (5.8), 25 мл дистиллированной воды, 10 мл раствора йодида калия (5.15) и 25 мл серной кислоты (5.14) без кипячения и запишите используемый объем (Vb).

ТАБЛИЦА 2

Значения для 25 ml реагента Люффа-Скурламл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.1 M), 2 минуты нагревания, 10 минут кипячения

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Глюкоза, фруктоза, инвертный сахар
0.1 M	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
<i>Разница, мл</i>	<i>мг</i>
1	2.4
2	4.8
3	7.2
4	9.7
5	12.2
6	14.7
7	17.2
8	19.8
9	22.4
10	25
11	27.6
12	30.3
13	33
14	35.7
15	38.5
16	41.3
17	44.2
18	47.1
19	50

7. Расчеты

Рассчитайте для каждого образца разницу между объемами титрования, которые используются для пустой пробы (V_b) и образца (V_s). Используйте Таблицу 2, чтобы преобразовать эту разницу (отраженную в первом столбце) в соответствующее количество глюкозы в мг (отраженное во втором столбце). Выразите результат в процентах образца:

Содержание глюкозы [%] = количество глюкозы [мг] / (масса образца [г] × 10)

Пример: Для каждого расчета два взятых объема соответствуют образцу весом в 250 мг. В первом случае взято 17 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 М), что соответствует 44,2 мг потребленной глюкозы; а во втором случае взято 11 мл, что соответствует 27,6 мг глюкозы.

Разница составляет 16,6 мг глюкозы. Содержание редуцирующих сахаров (за исключением лактозы) рассчитывается как содержание глюкозы, поэтому:

Содержание глюкозы [%] = 16,6 мг / (0,25 г × 10 г) = 6,64%

ПРИМЕЧАНИЕ: Разница между содержанием общего количества редуцирующих сахаров после инверсии (в пересчете на глюкозу) и содержанием редуцирующих сахаров (в пересчете на глюкозу) при умножении на 0,95 дает значение процентного содержания сахарозы.

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна превышать 12% относительно более высокого значения.

9. Примечания

- 9.1 В случае кормов, богатых патокой, а также кормов, которые являются в высокой степени неоднородными, взвесьте 20 г и поместите вместе с 500 мл дистиллированной воды в мерную колбу объемом 1 литр. Смешивайте в течение 1 часа в смесителе. Осветлите при помощи реагентов Карреца I (5.2) и II (5.3), как это описано в п. 6.1; на этот раз, однако, необходимо четырежды использовать каждый реагент. Доведите объем до 1 литра добавлением 80%-ного водного раствора этанола (в объемном отношении). Тщательно перемешайте и процедите. Удалите этанол, как описано в процедуре 6.1. Если декстринный крахмал отсутствует, доведите объем до отметки (1 л) добавлением дистиллированной воды.
- 9.2 В случае патоки и кормовых материалов, богатых сахаром и почти не содер-

жащих крахмала (например, рожкового дерева, сушеной свекольной стружки и т.д.), взвесьте 5 г, поместите в мерную колбу объемом 250 мл, добавьте 200 мл дистиллированной воды и смешивайте в миксере в течение 1 часа, а при необходимости и больше. Осветлите при помощи реагентов Карреца I (5.2) и II (5.3), как это описано в 6.1. Доведите объем до отметки добавлением холодной дистиллированной воды, тщательно перемешайте и процедите. Для того, чтобы определить количество общих сахаров, продолжайте анализ в соответствии с тем, как это описано в п. 6.3.

- 9.3 Поскольку лактоза также является редуцирующим сахаром, этот метод также отражает содержание лактозы. При использовании заменителя молока или кормов, содержащих молоко или молочные продукты, следует иметь в виду, что в составе редуцирующих сахаров также содержится лактоза.
- 9.4 Если содержание редуцирующих сахаров в 25 мл слишком высокое, необходимо взять более меньшую аликвотную часть раствора. Общий объем должен быть скорректирован до объема 25 мл путем добавления дистиллированной воды.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

Во избежание вспенивания рекомендуется добавить (независимо от объема) примерно 1 мл 3-метилбутана-л-ол (3.14) до осуществления кипячения с реагентами Люффа-Скурла.

11. Полезные ссылки

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009.

ВАЛОВАЯ ЭНЕРГИЯ

1. Принцип

Валовая энергия определяется путем сжигания образца в избытке кислорода в калориметрической бомбе в стандартных условиях. Валовая теплотворная способность рассчитывается исходя из повышения температуры воды в сосуде калориметра и среднего значения полезной теплоемкости калориметра.

2. Область применения

Этот метод применяется для всех кормов (см. примечание 9.1).

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Весы, с точностью до 0,1 г, с предельной массой взвешивания 5000 г.
- 4.2 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.3 Калориметрическая бомба, автоматическая адиабатная
- 4.4 Устройство для насыщения кислородом.
- 4.5 Устройство для титрования (необязательно).

5. Реагенты

- 5.1 Хлопчатобумажная нить.
- 5.2 Платиновая проволока.
- 5.3 Бензойная кислота (таблетки для сжигания или кристаллы стандартного размера).
- 5.4 Фенолфталеиновый индикатор (0,1%-ный в 95%-ном этаноле).
- 5.5 Гидроксид бария 0,1 N (17,13 г/л).
- 5.6 Карбонат натрия, 0,1 N (14,2 г/л).
- 5.7 HCl, 0,1 N (поместите 500 мл в 1-литровую колбу, добавьте 8,73 мл концентрированной соляной кислоты, разбавленной до объема 1 л добавлением дистиллированной воды).
- 5.8 Метилоранж.

6. Метод

Перед тем, как проводить данную процедуру, также прочитайте инструкции производителя.

Этот метод состоит из трех частей. В первой части (6.1) описывается процесс определения гидротермального эквивалента калориметрической бомбы, и этот процесс должен проводиться ежегодно или при внесении каких-либо изменений в оборудование, например, до начала использования нового бомбового сосуда или сосуда, прошедшего через техническое обслуживание. Вторая часть (6.2) описывает процесс анализа образцов. В третьей части (6.3) описывается процесс определения кислотности, являющейся поправочным коэффициентом к полученным значениям. Лаборатория должна принять решение об использовании этого поправочного коэффициента на основании своих требований к точности (см. примечание 9.2).

- 6.1 Определите гидротермальный эквивалент (водное число) калориметрической бомбы .
 - 6.1.1 Используйте образец известной теплотворной способности (таблетки бензойной кислоты для сжигания) для определения гидротермального эквивалента (Дж/градус повышения температуры) бомбы, емкости и воды. Рассчитайте повышение температуры с помощью описанной выше процедуры. Проведите четыре измерения и вычислите среднее значение (это значение не должно меняться, за исключением случаев замены частей бомбы).
 - 6.1.2 Высушите бензойную кислоту (5.3) при температуре 105 ± 2 °C в течение ночи и охладите в эксикаторе. Взвесьте 1 г кристаллов сухой бензойной кислоты, сделайте из нее таблетку и взвесьте еще раз. Определите повышение температуры при сгорании бензойной кислоты в калориметрической бомбе.

- 6.1.3 Для проведения расчетов, необходимых для определения гидротермального эквивалента с поправками на хлопчатобумажную нить, платиновую проволоку и тепло, выделяющееся при образовании кислоты (см. п. 7. Расчеты).
- 6.2 Измерение образцов
- 6.2.1 Взвесьте около 1 г образца с точностью до 0,1 мг (*W*) (см. примечание 9.1) и поместите в сосуд для сжигания.
- 6.2.2 Присоедините 10 см платиновой проволоки (5.2) между электродами бомбы и установите тигель сгорания вместе с образцом в петлевой электрод.
- 6.2.3 Привяжите 6,5 см хлопчатобумажной нити (5.1) к середине провода. Отрегулируйте нить таким образом, чтобы она касалась образца.
- 6.2.4 Соберите бомбу, закрутите завинчивающуюся крышку, закройте клапан сброса давления и заполните кислородом до уровня 25-30 атмосфер.
- 6.2.5 Отмерьте 2000 г дистиллированной воды в калориметрическую емкость и поместите в калориметр. Установите бомбу в емкость и присоедините зажимную клемму.
- 6.2.6 Закройте крышку, опустите термометр и запустите двигатель для циркуляции воды. Снимите колпак с крышки водяной рубашки и заполните ее водой, пока вода не заполнит сливной шланг.
- 6.2.7 Отрегулируйте температуру воды во внешней водяной рубашке, чтобы она была примерно равна температуре в калориметре, добавив к ней горячую или холодную воду, и подождите 1 минуту для достижения равновесия.
- 6.2.8 Зафиксируйте и запишите начальную температуру с точностью до 0,002 °C и подожгите образец. Подождите, пока температура не достигнет максимума, зафиксируйте и запишите конечную температуру. Это также может быть сделано автоматически с помощью аппарата.
- 6.2.9 Откройте калориметр, выньте бомбу из емкости, сбросьте остаточное давление бомбы и откройте ее.
- 6.3 Определение кислотности (см. примечание 9.2)
- 6.3.1 После завершения процесса сжигания, извлеките бомбу, сбросьте давление и откройте ее. Промойте все внутренние поверхности бомбы потоком дистиллированной воды, соберите осадок после промывки в чистый сосуд и доведите объем до 100 мл.
- 6.3.2 Отфильтруйте и прокипятите для удаления диоксида углерода.
- 6.3.3 Титруйте горячий фильтрат к конечной точке фенолфталеина (5.4) с 0,1 N гидроксида бария (5.5) (A).
- 6.3.4 Добавьте 20 мл 0,1 N карбоната натрия (5.6) (B), отфильтруйте осадок и промойте дистиллированной водой.
- 6.3.5 Охладите и титруйте с 0,1 N HCl (5.7) (C), используя в качестве индикатора метилоранж (5.8).

7. Расчеты

7.1 Формула, используемая для расчета гидротермального эквивалента (He) бомбы:

$$He = \frac{W \times A - (L \times C) - 14}{T_f - T_i}$$

где:

He = гидротермальный эквивалент (Дж/град),
 W = вес образца бензойной кислоты образца (г),
 A = Джоуль на грамм бензойной кислоты, т.е. 26442 Дж/г,
 L = вес хлопчатобумажной нити (г),
 C = джоуль на грамм хлопка, т.е. 17500 Дж/г,
 14 = поправка на образование кислоты (Дж),
 T_f = конечная температура, и
 T_i = начальная температура.

Что касается хлопчатобумажной нити, то могут быть использованы значения, указанные в инструкции производителя.

Поправки в отношении сгорания платиновой проволоки очень малы и ими можно пренебречь.

Значение кислотообразования также мало и фиксируется на уровне 14 Дж. Это значение также может быть измерено в соответствии с п. 6.3 посредством использования 1 мл дистиллированной воды и вычисления поправочного значения, как это описано в п.7.3.

7.2 Формула, используемая для расчета содержания валовой энергии (GE) образцов:

$$GE \text{ (kJ/g)} = \frac{(T_f - T_i) \times He}{W}$$

где:

T_f = конечная температура (°C),
 T_i = начальная температура (°C),
 W = вес образца (г) и
 He = гидротермальный эквивалент (Дж/°C)

Результат выразите в кДж/г.

7.3 Расчет поправочного коэффициента кислотности

Расчет поправочного коэффициента кислотности осуществляется следующим образом:

Корректировка азотной кислоты (Дж) = 6,0 (B - C)

Корректировка серной кислоты (кДж/W) = $\frac{15.1 (A - (B - C))}{W}$

Образуются поправки 94,6 Дж для 0,01 г (1%) серы в горячем топливе и 6 Дж/мл 0,1 N азотной кислоты.

Вместо фиксированного значения в 14 Дж следует использовать этот коэффициент.

8. Контроль качества

Измерения с бензойной кислотой и контрольным образцом должны выполняться ежедневно.

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона. Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, должна быть $< 0,5\%$ по сравнению с более высоким значением.

9. Примечания

- 9.1 Что касается жидких образцов, то перед анализом необходимо взвесить примерно 5-10 г вещества в мешочке и высушить в вакуумной печи или методом лиофилизации.
- 9.2 Изменение в кислотообразовании лишь незначительно влияет на измеренные значения. Таким образом, большинство лабораторий используют фиксированное значение (т.е. 14 Дж) для корректировки кислотности.

10. Полезные ссылки

Hill, W.H., Seals, J. и Montiegel, E. 1958 г. Разрушение животных и растительных тканей путем сжигания в кислородной бомбе Парра. *Журнал Американской ассоциации промышленной гигиены*, 19: 378-81.

ISO 9831. 1998 г. *Корма для животных, продукция животноводства и экскременты или моча. Определение наивысшей теплотворной способности. Метод сжигания в калориметрической бомбе*. Женева, Швейцария.

Руководство Parr 120. 1948 г. *Кислородная калориметрическая бомба и методы сжигания в кислородной бомбе*. Parr Instrument Company, Молин, штат Иллинойс, США.

ЛЕТУЧИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ (VFA) В СИЛОСЕ – ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

1. Принцип

Водный экстракт из силоса подкисляют и центрифугируют. Спирты и летучие жирные кислоты (VFA) отделяются в хроматографической колонке в зависимости от их молекулярного веса, а затем они обнаруживаются, определяются, усиливаются и объединяются в области.

2. Область применения

Процедура определения спиртов и летучих жирных кислот применима только к силосу.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Газо-жидкостной хроматограф, снабженный детектором ионизации пламени.
- 4.2 Капиллярная колонка EC-1000 (L = 30 м, ID = 0,53 мм) с неподвижной фазой полиэтиленгликоля, модифицированного кислотой (толщина = 1,20 мкм) (см. примечание 9.1).
- 4.3 Интегратор (программное обеспечение или диаграммный самописец).
- 4.4 Центрифуга.
- 4.5 Вортекс-миксер.
- 4.6 Весы с точностью до 0,1 г.

5. Реагенты

- 5.1 Дигидрат щавелевой кислоты (растворитель); приготовьте растворы 0,12 М и 0,03 М.
- 5.2 Изобутанол 99,9% (внутренний эталон для спиртов); приготовьте раствор 10 мкмоль/мл.
- 5.3 Изо-капроновая кислота 99,0% (внутренний эталон для летучих жирных кислот); приготовьте раствор 10 мкмоль/мл.
- 5.4 Стандартная смесь: отмерьте пипеткой 12,5 мл раствора щавелевой кислоты (0,12 М) в градуированную колбу объемом 50 мл и добавьте 65,40 мкл уксусной кислоты, 10,60 мкл пропановой кислоты, 5,02 мкл изо-масляной кислоты, 13,00 мкл масляной кислоты, 2,48 мкл изо-валериановой кислоты, 2,98 мкл валериановой кислоты, 4,00 мкл метанола, 72,40 мкл этанола, 5,74 мкл пропанола и 1,98 мкл бутанола и доведите уровень до отметки добавлением дистиллированной воды.
- 5.5 Подготовьте пустую пробу растворитель (Bs): 5 мл раствора щавелевой кислоты (0,03 М).
- 5.6 Подготовьте пустой внутренний эталон (Bis): 4 мл раствора щавелевой кислоты (0,03 М) + 0,5 мл раствора изобутанола и 0,5 мл изо-капронового раствора.
- 5.7 Подготовьте калибровочные эталоны: 3,5 - 3,0 - 2,5 - 2,0 - 1,5 мл раствора щавелевой кислоты (0,03 М) + 0,5 мл раствора изобутанола и 0,5 мл изо-капронового раствора + 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 мл стандартной смеси (5.4).
- 5.8 Подготовьте положительный контроль, добавив 0,2 мл раствора изобутанола (5.2) и 0,2 мл изо-капронового раствора (5.3) в 1,6 мл стандартной смеси (5.4).

6. Метод

- 6.1 Отмерьте 100 г силоса в мерную колбу объемом 1 литр и добавьте дистиллированную воду до отметки. Замочите силос на 16 часов (на ночь) в холодильнике (2-8 °С). Отфильтруйте через бумажный фильтр.
- 6.2 Проведите анализ немедленно или поместите экстракт в морозильную камеру. В последнем случае, за день до анализа достаньте силос из морозильной камеры и переместите его в холодильник (2-8 °С).
- 6.3 Затем в пробирку объемом 10 мл отмерьте пипеткой 2,0 мл 0,3 М раствора щавеленной кислоты (5.1), 0,5 мл раствора изобутанола (5.2), 0,5 мл изо-капронового раствора (5.3) и 2 мл экстракта силоса. Смешайте с помощью вортекса (4.5). Поместите в центрифугу (4.4) при 2600 *g* на 5 минут. Заполните пробирку на 1,25 мл и промойте струей азота.
- 6.4 Установите газовый хроматограф (4.1) в соответствии с инструкцией производителя; среди прочих условий: поток гелия газа при 7,2 мл/мин, инжектор при 220 °С, колонка при 200 °С и детектор при 220 °С.
- 6.5 Начинайте опыты с 2 пустых проб растворителя (5.5), затем следует пустая проба внутреннего эталона (5.6), затем положительный контроль (5.8) и, наконец, пустая проба внутреннего эталона (5.6). Затем анализируются 10 образцов промежуточного контроля, содержащих последовательно пустую пробу внутреннего эталона (5.6), положительный контроль (5.8) и, наконец, пустая проба внутреннего эталона (5.6). Серия опытов заканчивается анализом, последовательно, пустой пробы внутреннего эталона (5.6), положительного контроля (5.8) и, наконец, пустой пробы внутреннего эталона (5.6).
- 6.6 Введите 1 мкл подготовленного образца с помощью инжектора для ввода проб с делением / без деления потока (деление 1/10) в макрокапиллярную колонку (4.2). Летучие компоненты отделяются с помощью газа-носителя гелия и стационарной фазы средней полярности (полиэтиленгликоль, модифицированный кислотой) с использованием температурного градиента (80 °С в течение 5 минут, 10 °С / мин до температуры 200 °С и 200 °С в течение 8 минут), и определяются детектором ионизации пламени.

ПРИМЕЧАНИЕ: Между двумя инъекциями раствор щавеленной кислоты (0,03 М) используется для промывки колонки.

7. Расчеты

Идентификация и количественное определение компонентов основывается на многоуровневой калибровке внутреннего эталона. Для каждого компонента измеряются относительное время отставания и пиковая поверхность.

Для каждого компонента устанавливается калибровочная кривая. Исходя из этого определяется концентрация компонента (мкмоль/мл) в полученном образце с учетом коэффициента дилуции (разбавления). Концентрация, %-ное содержание в силосе, рассчитывается путем умножения на молярный вес.

8. Контроль качества

Для того, чтобы предотвратить переходящее воздействие на анализ последующих образцов, необходимо постоянно добавлять пустую пробу между образцами.

Для оценки хроматографических условий необходимо осуществлять постоянный анализ пустой пробы внутреннего эталона.

Для контроля над обнаружением и количественным определением компонентов необходим постоянный анализ контрольной пробы.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, должна быть < 0,5% от среднего значения.

9. Примечания

9.1 Могут быть использованы другие виды хроматографических колонок, которые способны отделить спирты и летучие жирные кислоты.

10. Полезные ссылки

Block, H.-J. & Weissbach, F. 1982. Zur gaschromatografischen Bestimmung flüchtiger Fettsäuren in Silagen mit innerem Standard. *Arch. Tierernährung* 32 (9): 693–702.

Fussell, R.J. & McCalley, D.V. 1987. Определение летучих жирных кислот (C₂ - C₅) и молочной кислоты в силосе методом газовой хроматографии. *Analyst* 112: 1213–1216.

Jouany, J.P. 1981. Dosage des acides gras volatils et des alcools dans les ensilages par chromatographie en phase gazeuse. *Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix, I.N.R.A.* 46: 63–66.

Jouany, J.P. 1982. Определение летучих жирных кислот и спирта в дигерируемых компонентах, силосных соках, бактериальных культурах и анаэробных ферментаторных компонентах. *Sciences des aliments* 2: 131–144.

Ottenstein, D.M. & Bartley, D.A. 1971. Усовершенствованное отделение свободных кислот C₂ - C₅ в разбавленных растворах методом газовой хроматографии. *Аналитическая химия* 43 (7): 952–955.

МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА В СИЛОСАХ – ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД

1. Принцип

В водном экстракте силоса молочная кислота (D- и L-лактат) окисляется посредством никотинамид-аденин динуклеотида (NAD⁺) до пирувата в присутствии лактатдегидрогеназы (LDH). Вторая реакция катализируется с помощью глутамат-пируват трансминазы (GPT) для образования NADH. Измерение этого осуществляется посредством спектрофотометра при 340 нм, который стехиометрически эквивалентен присутствующей молочной кислоте.

2. Область применения

Метод определения содержания молочной кислоты применим только к силосам.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Центрифуга.
- 4.2 Спектрофотометр.
- 4.3 Весы с точностью до 0,1 г.

5. Реагенты

- 5.1 Ферментный набор для определения содержания D- и L-молочной кислоты.
- 5.2 Эталон лактата (D+ L).

6. Метод

- 6.1 Отмерьте 100 г силоса в мерную колбу объемом 1 литр и добавьте дистиллированной воды до отметки. Замочите силос на 16 часов (на ночь) в холодильнике (4-8 °С). Отфильтруйте через бумажный фильтр.
- 6.2 Проведите анализ немедленно или поместите экстракт в морозильную камеру. В последнем случае, за день до анализа достаньте силос из морозильной камеры и переместите его в холодильник (4-8 °С).
- 6.3 Отмерьте пипеткой 5 мл образца в пластиковую пробирку объемом 10 мл и поместите в центрифугу (4.1) при 3000 *g* на 5 минут.
- 6.4 Все растворы из ферментного набора (5.1), за исключением NAD-раствора, готовы к использованию.
- 6.5 Поместите в кварцевые кюветы объемом 2 мл буферный раствор, NAD, GPT, дистиллированную воду и образцы в количестве, указанном в инструкции к ферментному набору. Также включите пустую пробу и стандартный раствор (5.2).
- 6.6 Поместите кюветы в спектрофотометр (4.2) и измерьте показатель поглощения ровно через 5 минут (A1).
- 6.7 Добавьте раствор D-LDH в кюветы, поместите в спектрофотометр и измерьте показатель поглощения ровно через 40 минут (A2).
- 6.8 Добавьте раствор L-LDH в кюветы, поместите в спектрофотометр и измерьте показатель поглощения ровно через 40 минут (A3).
- 6.9 Если A3 > 1, то экстракт необходимо дополнительно разбавить.

7. Расчеты

D-молочная кислота в г/л = (A2 - A1) x DF x 0,3204

L-молочная кислота в г/л = (A3 - A2) x DF x 0,3232

Откорректируйте результаты для содержания сухого вещества (DM) в образце:

D-/L-молочная кислота x (1000 - DM) / 1000

где:

A1 = абсорбция через 5 минут,

A2 = абсорбция после добавления D-LDH,

A3 = абсорбция после добавления L-LDH,

DF = коэффициент разбавления, и

DM = содержание сухого вещества в %.

Так как экстракт получают путем разбавления 100 г образца в 1 л, результат выражается в % от массы силоса.

8. Контроль качества

В каждом опыте для обеспечения контроля точности должен быть проанализирован стандартный раствор D- и L-молочной кислоты.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях и разница между значениями двух повторностей не должна превышать 2,8 значения внутрिलाбораторной воспроизводимости. Последнее рассчитывается как коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение = SD в % от среднего значения) результатов на одном или двух образцах силоса, проанализированных в разные дни и разными лаборантами.

9. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

9.1 См. инструкции, включенные в ферментный набор.

10. Полезные ссылки

Gawehn, K. 1984. *D-молочная кислота / L-молочная кислота: методы ферментативного анализа* (под ред. Bergmeyer H.U.) 3-е изд, том. VI, стр. 588-592. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.

Noll, F. 1966. Methode zur quantitativen Bestimmung van L(+)-Lactat mittels Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase, *Biochem. Z.* 346: 41–49.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза* L54/1 от 26.02.2009. – Определение лактозы методом титрования.

МОЧЕВИНА – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

1. Принцип

Образец (корм или кормовой ингредиент) суспендируют в дистиллированной воде с помощью осветлителя. Содержание мочевины определяется с помощью спектрофотометра после добавления 4-диметиламинобензальдегида (4-DMAB).

2. Область применения

Метод применим к кормам и кормовым культурам. В некоторые корма была добавлена мочевины в качестве дополнительного источника азота. Этот метод описывает процесс определения содержания мочевины; процесс определения содержания аммиака не охватывается (см. замечание 9.4).

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Миксер (тумблер), примерно от 35 до 40 оборотов в минуту.
- 4.2 Пробирки, размером 160 мм х 16 мм с пробкой из матового стекла.
- 4.3 Спектрофотометр.

5. Реагенты

- 5.1 Раствор 4-диметиламинобензальдегида (4-DMAB)
Растворите 1,6 г 4-DMAB в 100 мл 96%-ного водного этанола и добавьте 10 мл HCl (37% HCl или $\rho_{20} = 1,19$ г/мл). Этот реагент может храниться в течение не более двух недель.
- 5.2 Раствор I Карреца
Растворите 21,9 г ацетата цинка $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$ и 3 г ледяной уксусной кислоты в дистиллированной воде. Доведите объем до 100 мл добавлением дистиллированной воды.
- 5.3 Раствор II Карреца
Растворите 10,6 г калийного ферроцианида $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ в дистиллированной воде. Доведите объем до 100 мл добавлением дистиллированной воды.
- 5.4 Активированный уголь, который не впитывает мочевины (проверьте это перед использованием).
- 5.5 Мочевина, 0,1% раствор (отношение веса к объему).

6. Метод

- 6.1 Анализ образцов
 - 6.1.1 Взвесьте 2 г образца с точностью до мг и поместите вместе с 1 г активированного угля (5.4) в мерную колбу объемом 500 мл.
 - 6.1.2 Добавьте 400 мл дистиллированной воды и 5 мл раствора I Карреца (5.2), перемешайте в течении примерно 30 секунд и добавьте 5 мл раствора II Карреца (5.3).
 - 6.1.3 6.1.3 Перемешивайте в течении 30 минут и доведите уровень до отметки добавлением дистиллированной воды, перемешайте и профильтруйте.
 - 6.1.4 Переместите 5 мл прозрачного бесцветного фильтрата в пробирку с матовой пробкой, добавьте 5 мл раствора 4-DMAB (5.1) и перемешайте.
 - 6.1.5 Поместите пробирки в водяную баню при температуре 20 ± 4 °C.
 - 6.1.6 Через 15 минут измерьте показатель поглощения раствора образца с использованием спектрофотометра при 420 нм. Сравните с соответствующим раствором пустой пробы (содержащим 5 мл 4-DMAB и 5 мл дистиллированной воды, свободной от мочевины).
- 6.2 Калибровочная кривая
 - 6.2.1 Переместите 1, 2, 4, 5 и 10 мл раствора мочевины (5.5) в мерную колбу объемом 100 мл и доведите уровень до отметки добавлением дистиллированной воды.
 - 6.2.2 Возьмите аликвоту объемом 5 мл из каждого раствора, добавьте 5 мл раствора 4-DMAB (5.1), хорошо перемешайте и измерьте показатель поглощения в сравнении с пустой пробой, содержащей 5 мл 4-DMAB и 5 мл воды, свободной от мочевины.

6.2.3 Измерьте показатель поглощения при 420 нм с помощью спектрофотометра и отобразите на графике калибровочную кривую.

7. Расчеты

Концентрация мочевины в растворе образца определяется на основе линейной регрессии калибровочной кривой (6.2.3).

$$c_s = \frac{A_s - b}{m}$$

где:

c_s = концентрация мочевины в растворе образца в мг на 100 мл,

A_s = показатель поглощения раствора образца,

B = у-пересечение линии регрессии, и

m = наклон линии регрессии.

Содержание мочевины в образце с учетом условий, упомянутых в 6.1 (вес 2 г в 500 мл растворителя) рассчитывается по формуле:

$$\text{мочевина } [\%] = c_s \cdot 0.25$$

Содержание мочевины в образце в целом рассчитывается как:

$$\text{мочевина } [\%] = \frac{c_s \cdot V \cdot F}{w \cdot 1000}$$

где:

V = объем раствора образца в мл,

F = коэффициент разбавления, и

w = вес образца в г.

8. Контроль качества

Контрольный образец, содержащий 2% мочевины, должен участвовать в каждой серии опытов. Этот образец может быть подготовлен путем смешивания 2 г мочевины в 98 г сухого корма, не содержащего мочевины, который схож с анализируемым образцом. Коэффициент восстановления должен быть между 90 и 110%, в противном случае опыты должны быть повторены.

ПРИМЕЧАНИЕ: Контрольный образец корма, содержащий мочевины, следует хранить в эксикаторе. Старый образец (изготовленный более одного месяца назад) не должен использоваться.

Разница между повторностями должна быть ниже 5% по отношению к более высокому значению.

9. Примечания

9.1 Если концентрация мочевины превышает 3%, снизьте вес образца до 1 г или разведите исходный раствор так, чтобы не было более 50 мг мочевины в 500 мл.

- 9.2 Если концентрация мочевины низкая, увеличьте количество образца пробы (до тех пор, пока фильтрат остается прозрачным и бесцветным).
- 9.3 Показатель поглощения сильно зависит от температуры. В связи с этим рекомендуется проводить измерения в отношении калибровочной кривой и тестируемых образцов в одно и то же время.
- 9.4 Жвачные животные могут гидролизовать мочевины в аммиак, тем самым используя аммиак для превращения в источник белка. Однако, если мочевины добавляют в корм в избытке, для животных это может быть токсично.

10. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

- 10.1 Так как многие аминокислоты в условиях, описанных выше, характеризуются максимальным показателем поглощения при 415 нм, то определение мочевины при 420 нм может сопровождаться существенными отклонениями. При 435 нм показатель поглощения, вызываемого аминокислотами, существенно ниже, а показатель поглощения, вызываемого мочевиной, лишь немного ниже чем при 420 нм. Так как большинство образцов кормов содержат простые азотистые соединения, такие как аминокислоты, то, как правило, рекомендуется проводить измерения в отношении тестовых образцов и калибровочной кривой при 435 нм.

11. Полезные ссылки

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009.

Heckman, M. 1967 г. Колориметрическое определение мочевины в кормах (Доклад комитета АОАС). *Ассоциация химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе*. 50: 56-58 (1967), Ralston Purina Co., Сент-Луис, Миссури (США).

Augustin, T. & Eckstein, M. 2010. Отчет о кольцевой реакции мочевины Nr. 387Q. *Landesbetrieb Hessisches Landeslabor. Kassel, Am Versuchsfeld 13, 34128 Kassel.*

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ – АТОМНО-АБСОРБЦИОННЫЙ СПЕКТРОФОТОМЕТР

1. Принцип

Кормовой материал сжигают в муфельной печи, а полученную в результате этого золу растворяют в соляной кислоте. После фильтрации и соответствующего разбавления микроэлементы (следовые элементы) определяются при помощи атомно-абсорбционного спектрофотометра.

2. Область применения

Описанная процедура применяется для определения содержания кальция (Ca), меди (Cu), железа (Fe), магния (Mg), марганца (Mn), калия (K), натрия (Na) и цинка (Zn) во всех кормах для животных.

3. Область применения

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Электрическая муфельная печь, способную поддерживать температуру на уровне 550 ± 20 °С.
- 4.3 Электроплитки.
- 4.4 Атомно-абсорбционный спектрофотометр (AAS).
- 4.5 Стеклопосуда должна быть прочного боросиликатного типа, и рекомендуется использовать аппарат, который предназначен исключительно для определения микроэлементов.

5. Реагенты

Используйте химически чистые вещества и деионизированную воду, если не указано иное.

- 5.1 Соляная кислота, $c = 12$ М.
- 5.2 Соляная кислота, $c = 6$ М.
- 5.3 Соляная кислота, $c = 0,6$ М.
- 5.4 Раствор нитрата лантана
Растворите 133 г $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ в 1 л деионизированной воды
- 5.5 Раствор хлорида цезия
Растворите 100 г CsCl в 1 л деионизированной воды
- 5.6 Маточный (исходный) раствор Cu, Fe, Mn и Zn
Смешайте 100 мл деионизированной воды и 125 мл соляной кислоты (12 М) в мерной колбе объемом 1 л. Отмерьте следующее:
392,9 мг меди (II) сульфат пентагидрата, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
702,2 мг аммония железа (II) сульфат гексагидрата $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
307,7 мг марганца сульфат моногидрата, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
439,8 мг цинка сульфат гептагидрата, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Переместите взвешенные соли в мерную колбу и растворите. Разведите до отметки добавлением деионизированной воды.
- 5.7 Стандартный раствор Cu, Fe, Mn и Zn
Разведите 20 мл маточного раствора деионизированной водой в мерной колбе объемом 1 л и разбавьте до отметки добавлением дистиллированной воды.
- 5.8 Стандартный раствор Ca, K, Mg и Na
Разведите 25 мл маточного раствора (5.8) разбавленной соляной кислотой (5,3) до 250 мл в мерной колбе. Содержание Ca, K и Na составляет 100 мкг/мл, содержание Mg составляет 20 мкг/мл. Приготовьте свежий раствор для использования в течение недели и храните его в полиэтиленовой бутылке.

- 5.9 Раствор пустой пробы Лантана цезия
Добавьте 5 мл раствора нитрата лантана (5.4), 5 мл раствора хлорида цезия (5.5) и 5 мл соляной кислоты (5.3) в мерную колбу объемом 100 мл. Разведите до отметки добавлением дистиллированной воды.

6. Метод

6.1 Подготовка образцов

- 6.1.1 Поместите 5-10 г образца, взвешенного с точностью до 0,2 мг, в кварцевый или платиновый тигель, высушите в духовке при температуре 105 ± 2 °С и поместите тигель в холодную муфельную печь (4.2).
- 6.1.2 Закройте печь и постепенно повышайте температуру до 550 ± 20 °С в течение примерно 90 минут. Поддерживайте эту температуру от 4 до 16 часов (например, в течение ночи), чтобы удалить углеродистый материал, а затем откройте печь и дайте ей остыть.
- 6.1.3 Увлажните золу деионизированной водой и переместите ее в сосуд объемом 250 мл. Промойте тигель с помощью в целом около 5 мл соляной кислоты (5.1). *ПРИМЕЧАНИЕ:* Добавляйте кислоту медленно и осторожно в сосуд (может возникнуть бурная реакция в связи с выделением CO_2).
- 6.1.4 Добавляйте соляную кислоту (5.1) по каплям, перемешивая, пока не прекратится образование пены.
- 6.1.5 Выпарьте досуха, время от времени помешивая стеклянной палочкой.
- 6.1.6 Добавьте 15 мл 6-молярной соляной кислоты (5.2) к остатку, а затем 120 мл деионизированной воды. Перемешайте стеклянной палочкой, которую следует оставить в сосуде, и накройте сосуд предметным стеклом.
- 6.1.7 Осторожно доведите до кипения и поддерживайте кипение до тех пор, пока больше не будет видно золы, которую надо растворить.
- 6.1.8 Профильтруйте через беззольную фильтровальную бумагу и соберите фильтрат в мерную колбу объемом 250 мл.
- 6.1.9 Промойте сосуд и фильтр 5 мл горячей 6-молярной соляной кислоты (5.2) и дважды кипящей водой.
- 6.1.10 Доведите уровень до отметки добавлением деионизированной воды (концентрация HCl примерно равна 0,5 М).
- 6.1.11 Если остаток на фильтре черного цвета (уголь), то поместите его обратно в печь и опять осуществляйте озоление при температуре от 450 до 475 °С. На это озоление требуется около 3-5 часов, и оно завершается тогда, когда зола становится белой или почти белой.
- 6.1.12 Растворите остаток примерно 2 мл соляной кислоты (5.1), выпарьте досуха и добавьте 5 мл 6-молярной соляной кислоты (5.2).
- 6.1.13 Разогрейте, профильтруйте раствор в мерную колбу и доведите уровень до отметки добавлением деионизированной воды (концентрация HCl примерно 0,5 м).
ПРИМЕЧАНИЕ: Другие методы озоления могут быть использованы при условии, что они демонстрируют аналогичные результаты (например, микроволновое озоление).

Если образец не содержит органических веществ (например, минеральный корм), то предварительного озоления не требуется. Действуйте так, как описано в п.б.1.3.

6.2 Спектрофотометрическое определение содержания Fe, Cu, Mn и Zn

6.2.1 Условия проведения измерения

Настройте атомно-абсорбционный спектрофотометр (AAS, 4.4) в соответствии с инструкциями производителя и оптимизируйте отклик прибора с помощью окислительного воздушно-ацетиленового пламени на следующих длинах волн:

Fe: 248,3 нм

Cu: 324,8 нм

Mn: 279,5 нм

Zn: 213,8 нм

6.2.2 Подготовка калибровочных кривых

1. Подготовьте ряд соответствующих калибровочных растворов путем разбавления стандартного раствора (5.7) разбавленной соляной кислотой (5.3).

2. Измерьте показатель поглощения соляной кислоты (5.3) и показатель поглощения калибровочных растворов и вычте показатель поглощения, измеренный для соляной кислоты.

3. Нарисуйте калибровочную кривую, нанеся откорректированные значения показателей поглощения относительного соответствующих значений содержания Cu, Fe, Mn и Zn.

6.2.3 Измерение анализируемого раствора

1. Измерьте параллельно с калибровочными растворами, при одинаковых условиях, показатель поглощения анализируемого раствора и раствора пустой пробы. Вычте последний показатель поглощения из первого показателя поглощения.

2. При необходимости, разбавьте аликвоту анализируемого раствора и раствор пустой пробы разбавленной соляной кислотой (5.3) для получения показателя поглощения в линейной части калибровочной кривой.

6.3 Спектрофотометрическое определение содержания Ca, Mg, K и Na

6.3.1 Условия проведения измерения

Настройте атомно-абсорбционный спектрофотометр (AAS, 4.4) в соответствии с инструкциями производителя и оптимизируйте отклик прибора с помощью окислительного воздушно-ацетиленового пламени на следующих длинах волн

Ca: 422,6 нм

Mg: 285,2 нм

K: 766,5 нм

Na: 589,6 нм

6.3.2 Подготовка калибровочных кривых

1. Разведите стандартный раствор (5.8) деионизированной водой. К 100 мл разбавленного стандартного раствора добавьте 5 мл раствора

нитрата лантана (5.4), 5 мл раствора хлорида цезия (5.5) и 5 мл соляной кислоты (5.2). Обеспечьте разведение таким образом, чтобы получить соответствующие калибровочные растворы.

2. Измерьте показатель поглощения раствора пустой пробы лантана цезия (5.9).

3. Измерьте показатель поглощения калибровочных растворов и вычте показатель поглощения, измеренный для раствора пустой пробы лантана цезия (5.9).

4. Нарисуйте калибровочную кривую, нанеся откорректированные значения показателей поглощения относительного соответствующих значений содержания Ca, Mg, K и Na.

6.3.3 Измерение анализируемого раствора

1. Разбавьте аликвоту анализируемого раствора и раствора пустой пробы деионизированной водой. К 100 мл разбавленного стандартного раствора добавьте 5 мл раствора нитрата лантана (5.4), 5 мл раствора хлорида цезия (5.5) и 5 мл соляной кислоты (5.2).

2. Измерьте параллельно с калибровочными растворами, при одинаковых условиях, показатель поглощения разбавленного анализируемого раствора и разбавленного раствора пустой пробы. Вычте последний показатель поглощения из первого показателя поглощения.

3. При необходимости, разбавьте аликвоту анализируемого раствора и раствор пустой пробы раствором пустой пробы лантана цезия (5.9) для получения показателя поглощения в линейной части калибровочной кривой.

7. Расчеты

С помощью калибровочной кривой (6.2.2 и 6.3.2) рассчитайте концентрацию микроэлементов в растворе:

$$c_s = \frac{A_s - b}{m}$$

где:

c_s = концентрация микроэлемента в растворе образца (мкг/мл),

A_s = показатель поглощения раствора образца,

b = у-пересечение линии регрессии, и

m = наклон линии регрессии.

Содержание микроэлементов в образце в мг/кг, с учетом процессов разбавления, рассчитывается по формуле:

$$\text{микроэлемент [мг/кг]} = \frac{c_s \cdot v \cdot F}{w}$$

где:

v = объем раствора образца (мл),

F = коэффициент разбавления, и

w = вес образца (г).

Выразите результат в миллиграммах микроэлемента на килограмм массы образца (миллионных долей (м.д.)), и макроэлементов в граммах на килограмм (г/кг).

8. Контроль качества

- Дубликаты рабочего контроля должны применяться с каждой серией и сравниваться с пределами, обозначенными на контрольных картах. В результате применения спайковой пустой пробы уровня средней концентрации калибровочной кривой мы должны получить уровень восстановления между 80 и 120%.
- Одна пустая проба должна применяться с каждой серией. 10 мл аликвоты будет взято и использовано в качестве образца. Расчетная концентрация должна быть <0,5 м.д.
- Сразу же после создания калибровочной кривой, контрольный эталон значения 0 м.д. следует понимать в качестве образца. Расчетная концентрация измерения должна быть <0,1 м.д.
- Сразу же после измерения контрольного эталона значения 0 м.д., в качестве образца для измерения необходимо использовать контрольный эталон значения 10 м.д. Результат измерения должен находиться в пределах 2,5% от 10 м.д. (9.75-10.25 м.д.).
- Если результаты анализов пустой пробы и/или эталона значения 10 м.д. являются не удовлетворительными, то прибор должен быть откалиброван заново путем формирования совершенно новой калибровочной линии, используя все контрольные эталоны. Сразу же после повторной калибровки, стандарт значения 0 м.д. и эталон 10 м.д. должны быть повторно проанализированы и должны соответствовать критериям приемки, указанным выше.
- Эталоны значений 0 и 10 м.д. должны применяться в начале и в конце каждой серии анализов и через каждые 10 образцов.

9. Проблемы, устранение проблем и техника безопасности

- 9.1 Ионизирующий буфер лантана должен быть добавлен к каждому образцу. О его присутствии говорит наличие зеленого пламени во время анализа. Будут получены низкие результаты, если будет исключен ионизирующий буфер.
- 9.2 Во время этапа фьюмингования соляной кислоты, некоторые гидролизаты внезапно изменяют внешний вид (цвет, форму частиц), образуя менее растворимые компоненты. Возможно, нужно будет подвергнуть новый образец повторному гидролизу до достижения момента, когда соляная кислота начнет дымить.

10. Полезные ссылки

АОАС 968.08. 2000 г. *Минералы в кормах для животных и пище для животных, атомно-абсорбционный спектрофотометрический метод.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

АОАС 965.09. 2000 г. *Питательные вещества (микро) в удобрениях, атомно-абсорбционный спектрофотометрический метод.* Гейтерсберг, Мэриленд, США.

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009.

ISO 6869. 2000 г. *Корма для животных – Определение содержания кальция, меди, железа, магния, марганца, калия, натрия и цинка. Метод с применением атомно-абсорбционной спектроскопии.* Женева, Швейцария.

КАЛЬЦИЙ – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

1. Принцип

Образец сжигают при температуре 550°C, чтобы сжечь все органические вещества. Оставшиеся минералы озоляют в 6-молярной HCl, чтобы освободить кальций, содержание которого затем определяется с помощью спектрофотометрического анализа на основе реакции кальция с о-крезолфалеин комплексом (CPC) в щелочном растворе. Магний маскируют посредством 8-оксихинолина.

2. Область применения

Этот метод применим для корма, продуктов питания, переваренной пищи и фекалий. Этот метод не применим к минеральной смеси кормов.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Термостойкие сосуды, например сосуды из пирексного стекла.
- 4.3 Муфельная печь, способная поддерживать температуру до 550 ± 20 °C.
- 4.4 Электроплитка.
- 4.5 Спектрофотометр.

5. Реагенты

- 5.1 Соляная кислота, 6-молярная (6 M).
- 5.2 Эталонный раствор кальция.
- 5.3 Тестовый набор для кальция, например Ref No. 11489216 216 от компании Roche. Наборы от других производителей, основанные на методе CPC, также могут использоваться.

6. Метод

- 6.1 Подготовка образца
 - 6.1.1 Отмерьте примерно 1 г с точностью до 0,2 мг (W) в сосуд (4.2) и поместите в холодную муфельную печь (4.3).

- 6.1.2 Закройте печь и постепенно повышайте температуру до 550 °С в течение примерно 90 минут. Поддерживайте эту температуру в течение 16 часов (например, в течение ночи), чтобы удалить углеродистый материал, а затем откройте печь и дайте ей остыть (см. примечание 9.1).
- 6.1.3 Добавьте 10 мл 6-молярной соляной кислоты (5.1) в каждый сосуд и положите на предварительно нагретую электроплитку (около 250°С), накройте сосуды стеклянной пластиной, озольте в течение 20 минут.
- 6.1.4 Дайте сосудам остыть и снимите их с электроплитки.
- 6.1.5 Количественно переместите содержимое сосудов в мерную колбу объемом 25 мл, доведите уровень до отметки добавлением дистиллированной воды и хорошо перемешайте.
- 6.1.6 Измерьте содержимое кальция в растворах (6.1.5) и эталонах (5.2) методом СРС, следуя инструкциям производителя тестового набора (5.3), измерьте показатель поглощения при 578 нм (см. примечание 9.2).

7. Расчеты

Рассчитайте содержание кальция в измеряемом растворе с помощью линейной регрессии. Содержание кальция рассчитывается по формуле:

$$\% \text{ Кальция} = (C \times V \times DF) / (W \times 10)$$

где,

C = концентрация кальция в измеряемом растворе (мг/л),

V = объем раствора (в литрах, то есть 0,025 л),

DF = коэффициент разбавления (как правило, 1),

W = вес образца (г) и

10 = коэффициент преобразования г/кг в %.

8. Контроль качества

Кальций высокой степени очистки, содержащий соль, может быть использован в качестве контрольного эталона, можно сделать на нем 15-20 повторений и сделать допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона. Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, должна быть <5% от среднего значения.

9. Примечания

- 9.1 Другие методы озольнения могут быть использованы при условии, что они были проверены на то, что демонстрируют аналогичные результаты (например, микроволновое озольнение).

- 9.2 Содержание вещества может быть измерено автоматически с помощью автоматического анализатора. Это позволит повысить точность и эффективность метода.

10. Полезные ссылки

AOAC 968.08d. 2000 г. *Кислотный гидролиз*. Гейтерсберг, Мэриленд, США.

Tietz, N.W.. 1995 г. Определение содержания кальция. *Клиническое руководство к лабораторным испытаниям, 3 Auflage*. Филадельфия, Пенсильвания: WB Saunders Company.

Gosling, P. 1986 г. Аналитические обзоры в клинической биохимии: Измерение кальция. *Ann Clin Biochem* 23: 146-156.

ФОСФОР – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

1. Принцип

Кормовой материал озоляют после гидролиза в соляной кислоте. Добавляется реагент молибдованадата, что приводит к характерной желтой окраске после реакции с фосфором, который измеряется спектрофотометрически.

2. Область применения

Метод применим к животным кормам с содержанием фосфора <50 г/кг. Для образцов с более высоким содержанием фосфора рекомендуется использовать гравиметрический метод, т.е. хинолина фосфоромолибдат.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.2 Термостойкие сосуды, например сосуды из пирексного стекла.
- 4.3 Муфельная печь, способная поддерживать температуру 550 ± 20 °С.
- 4.4 Электроплитки.
- 4.5 UV-VIS спектрофотометр.

5. Реагенты

- 5.1 6-молярная (6 М) соляная кислота.
- 5.2 14-молярная (14 М) азотная кислота.
- 5.3 Раствор аммония гептамолибдата
Растворите 100 г тетра гидрата аммония гептамолибдата $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ в горячей дистиллированной воде. Добавьте 10 мл аммиака (NH_4OH : 14 М; $\rho(\text{NH}_4\text{OH}) = 0.91$ г/мл) и доведите объем до 1 л добавлением дистиллированной воды.

- 5.4 Раствор аммония монованадата
Растворите 2,35 г аммония монованадата (NH_4VO_3) в 400 мл горячей дистиллированной воды. Постоянно помешивая, постепенно добавьте 7 мл азотной кислоты (5.2) и доведите объем до 1 л добавлением дистиллированной воды.
- 5.5 Реагент молибдованадата
В мерной колбе объемом 1 л смешайте 200 мл раствора аммония гептамолибдата (5.3), 200 мл раствора аммония монованадата (5.4) и 135 мл азотной кислоты (5.2). Доведите объем до отметки добавлением дистиллированной воды. Профильтруйте, если присутствуют нерастворимые частицы.
- 5.6 Эталонный раствор фосфора (1 мг/мл)
В мерной колбе объемом 1 л растворите 4,394 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4), предварительно высушенного при температуре $103 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Доведите объем до отметки добавлением дистиллированной воды.
- 5.7 Калибровочная кривая.
Разведите эталонный раствор фосфора в концентрациях 5, 10, 20 и 40 мкг/мл. Используйте дистиллированную воду в качестве пустой пробы.

6. Метод

- 6.1 Подготовка образца
- 6.1.1 Отмерьте примерно 1 г с точностью до 0,2 мг (W) в сосуд (4.2) и поместите в холодную муфельную печь (4.3).
- 6.1.2 Закройте печь и постепенно повышайте температуру до 550°C в течение примерно 90 минут. Поддерживайте эту температуру в течение 16 часов (например, в течение ночи), чтобы удалить углеродистый материал, а затем откройте печь и дайте ей остыть (см. примечание 9.1).
- 6.1.3 Добавьте 10 мл 6-молярной соляной кислоты (5.1) в каждый сосуд и положите на предварительно нагретую электроплитку (около 250°C), накройте сосуды стеклянной пластиной, озоляйте в течение 20 минут.
- 6.1.4 Дайте сосудам остыть и снимите их с электроплитки.
- 6.1.5 Количественно переместите содержимое сосудов в мерную колбу объемом 25 мл, доведите уровень до отметки добавлением дистиллированной воды и хорошо перемешайте.
- 6.1.6 Дайте растворам отстояться в течении ночи.
- 6.2 Измерение содержания фосфора
- 6.2.1 Разведите аликвоту раствора (6.1.6) дистиллированной водой, чтобы получить содержание фосфора, не превышающего 40 мкг/мл.
- 6.2.2 Перелейте 10 мл разведенного раствора (6.2.1) и эталонных растворов (5.7) в отдельные пробирки. Возьмите тестовую пробирку с 10 мл воды (пустая проба). В каждую пробирку добавьте 10 мл реагента молибдованадата (5.5). Перемешайте и оставьте на 10 минут при температуре 20°C .
- 6.2.3 Измерьте показатель поглощения раствора (6.2.2) при 430 нм в течение 45 минут, используя спектрофотометр, по сравнению с пустой пробой.

7. Расчеты

Рассчитайте содержание фосфора в измеряемом растворе с помощью линейной регрессии. Содержание фосфора рассчитывается по формуле:

$$\% \text{ Фосфора} = (C \times V \times DF) / (W \times 10)$$

где,

C = концентрация фосфора в измеряемом растворе (мг/л),

V = объем раствора (в литрах, то есть 0,025 л),

DF = коэффициент разбавления (как правило, 1),

W = вес образца (г) и

10 = коэффициент преобразования г/кг в %.

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, должна быть <5% от среднего значения.

9. Примечания

9.1 Другие методы озоления могут быть использованы при условии, что они были проверены на то, что демонстрируют аналогичные результаты (например, использование различных кислот или микроволнового озоления).

10. Полезные ссылки

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза* L54/1 от 26.02.2009.

ISO 6491. 1998 г. *Корма для животных – определение содержания фосфора – спектрометрический метод.* Женева, Швейцария.

ХЛОР – МЕТОД ТИТРОВАНИЯ

1. Общая информация

Хлориды растворяют в дистиллированной воде. Если продукт содержит органические вещества, то он очищается. Раствор слегка окисляют азотной кислотой и хлоридами, выпадающими в осадок в виде хлорида серебра с помощью раствора нитрата серебра. Избыток нитрата серебра титруют раствором тиоцианата аммония. Концентрация хлорида выражается содержанием хлорида натрия.

2. Область применения

Метод применяется для кормов для животных.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг
- 4.2 Миксер
- 4.3 Оборудование для титрования.

5. Реагенты

- 5.1 Раствор тиоцианата аммония, 0,1 М.
- 5.2 Раствор нитрата серебра, 0,1 М.
- 5.3 Насыщенные железо-аммониевые квасцы $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 5.4 Азотная кислота, $\rho = 1,38$ г/мл.
- 5.5 Диэтиловый эфир.
- 5.6 Ацетон.
- 5.7 Раствор I Карреца
Растворите 21,9 г ацетата цинка $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ и 3 г ледяной уксусной кислоты в дистиллированной воде. Доведите объем до 100 мл добавлением дистиллированной воды.
- 5.8 Раствор II Карреца
Растворите 10,6 г калийного ферроцианида $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде. Доведите объем до 100 мл добавлением дистиллированной воды.
- 5.9 Активированный уголь.

6. Метод

- 6.1 Подготовка раствора
В зависимости от природы образца приготовьте раствор как указано в пп. 6.1.1, 6.1.2 или 6.1.3.
Одновременно проведите измерение на пустой пробе, избегая образцы, которые должны быть проанализированы.
Образцах, не содержащие органические вещества.
 - 6.1.1 Отмерьте не более 10 г образца с точностью до 1 мг (W) в мерную колбу объемом 500 мл (см. примечание 9.1). Добавьте 400 мл дистиллированной воды в колбу и перемешивайте в течение 30 минут. Доведите объем до 500 мл добавлением дистиллированной воды, тщательно перемешайте и отфильтруйте.
Образцы, содержащие органические вещества, исключая продукты, перечисленные в п. 6.1.3.

- 6.1.2 Отмерьте не более 5 г образца с точностью до 1 мг (W) и 1 г активированного угля (5.9) в мерную колбу объемом 500 мл. Добавьте 400 мл дистиллированной воды и 5 мл Раствора I Карреца (5.7) в колбу и перемешивайте в течение 30 минут. Добавьте 5 мл Раствор II Карреца (5.8) в колбу и перемешивайте в течение 30 минут. Доведите объем до 500 мл добавлением дистиллированной воды, гомогенизируйте и профильтруйте. Приготовленные кормы, льняные жмыхи и мучные продукты, богатые льняной мукой, и другие продукты, богатые растительным клеем или коллоидными веществами.
- 6.1.3 Приготовьте раствор так, как это описано в п. 6.1.2, но не фильтруйте. Удалите 100 мл супернатанта и перелейте в мерную колбу объемом 200 мл. Доведите объем до 200 мл добавлением ацетона (5.6), тщательно перемешайте и отфильтруйте.
- 6.2 Титрование
- 6.2.1 Используя пипетку, переместите от 25 до 100 мл полученного фильтрата (6.1) в колбу Эрленмейера (см. примечание 9.2).
- 6.2.2 Разбавьте, если это необходимо, объем до не менее 50 мл добавлением дистиллированной воды, добавьте 5 мл азотной кислоты (5.4), 20 мл насыщенного раствора железо-аммониевых квасцев (5.3) и две капли раствора тиоцианата аммония (5.1)
- 6.2.3 Используя бюретку, переместите раствор нитрата серебра (5.2) в колбу Эрленмейера (это соответствует 5 ммоль ионов серебра по отношению к 4,23 М ионам хлорида, когда 150 мг хлора предполагается как максимальное содержание, см. примечание 9.3) таким образом, чтобы образовался избыток объемом 5 мл (см. примечание 9.5). Добавьте 5 мл диэтилового эфира (5.5) и сильно встряхните для коагуляции осадка.
- 6.2.4 Титруйте избыток нитрата серебра раствором тиоцианата аммония (5.1), пока в течение как минимум 1 минуты не будет наблюдаться красновато-коричневый оттенок.

7. Расчеты

Количество хлора (X), выраженное в % хлорида натрия, рассчитывается по следующей формуле:

$$X = 5.845 (V_1 - V_2) / W$$

где:

V_1 = объем добавленного 0,1 М раствора нитрата серебра (в мл),

V_2 = объем добавленного 0,1 М раствора тиоцианата аммония (в мл), и

W = вес образца (г).

Если пустая проба показывает, что был потреблен нитрат серебра, вычте это значение из объема ($V_1 - V_2$).

8. Контроль качества

В каждой партии должен быть проанализирован контрольный образец (контрольная проба). Лабораторная контрольная проба может быть сделана из образца корма

для животных, который аналогичен по составу анализируемым образцам. Возьмите 3-4 кг выбранной контрольной пробы, размельчите для прохождения через сито с размером пор в 1 мм и положите для хранения в прохладное сухое место. Проанализируйте контрольную пробу 15-20 раз, возьмите среднее значение и сделайте допущение ± 2 стандартного отклонения в качестве приемлемого диапазона.

Образцы должны быть проанализированы в двух повторностях. Разница между значениями двух параллельных измерений, выполняемых на одном и том же образце, не должна быть $<5\%$ от среднего значения.

9. Примечания

- 9.1 Образец не должен содержать более 3 г хлора в виде хлоридов.
- 9.2 Часть аликвоты не должна содержать более 150 мг хлора.
- 9.3 В зависимости от содержания хлорида объем раствора нитрата серебра должен быть скорректирован для титрования значительного объема раствора тиосульфата.
- 9.4 Титрование может также осуществляться потенциометрически.
- 9.5 Имеющаяся информация или знания о содержании хлора в образце должны быть использованы для определения этого избытка. Этот избыток может быть проверен по объему тиоцианата аммония, необходимого во время титрования (6.2.4), объем которого должен быть не менее 4,5 мл.

10. Полезные ссылки

Регламент Комиссии (ЕС) № 152/2009. 27 января 2009 г. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за кормами. Приложение III, *Официальный журнал Европейского Союза L54/1* от 26.02.2009.

АФЛАТОКСИН – МЕТОД ВЭЖХ

1. Принцип

Афлатоксины В₁, В₂, G₁ и G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) экстрагируют из образца корма при помощи водного ацетона. Экстракт очищают посредством иммуноаффинной хроматографии, а аналиты количественно определяют посредством обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с пост-колоночной дериватизацией (ПКД) с применением бромирования. ПКД достигается посредством электрохимически образованного брома или пиридиния гидробромид пербромид (РВРВ), за чем следует флуоресцентная детекция.

2. Сфера применения

Данный метод предназначен для определения содержания афлатоксинов в кормах для животных. Он применим к кормам для животных с содержанием жира до 50%.

Предел количественного определения должен быть не менее 1 мкг/кг для афлатоксина В₁ (соотношение сигнал-шум, равное 6). Фактически этот метод был продемонстрирован в целях достижения предела количественного определения менее 0,5 мкг/кг для афлатоксина В₁.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее:

- 4.1 Вертикальный или горизонтальный встряхиватель (регулируемый).
- 4.2 Фильтровальная бумага, \varnothing 24 см, предварительно сложенная (например, Whatman 2V).
- 4.3 Колба Эрленмейера с завинчивающейся пробкой или стеклянной пробкой.
- 4.4 Фильтровальная бумага из стекловолокна, \varnothing 5 см (например, Whatman GF/A).
- 4.5 Емкость объемом 75 мл с наконечником Люэра для иммуноаффинной колонки.
- 4.6 Ручной насос, 20 мл шприц с насадкой Люэра или резиновой пробкой для иммуноаффинной колонки.
- 4.7 Мерная стеклянная посуда объемом 5 мл, 10 мл и 20 мл, обладающая точностью не менее 0,5%.
- 4.8 ВЭЖХ-насос, пригодный для скорости потока, равной $1,000 \pm 0,005$ мл/мин.
- 4.9 Система ввода проб
Обеспечивающая ввод проб посредством полной калиброванной петли (рекомендуется клапан с петлей менее 100 мкл).
- 4.10 ОФ-ВЭЖХ колонка, например, SUPELCOSIL LC-18 (Supleco) или Octadecylsilane (ODS)-2 LC (Phenomenex).
Необязательна, но рекомендуется: пре-колонка.
- 4.11 Система пост-колоночной дериватизации с РВРВ (альтернатива п. 4.12)
Второй безимпульсный ВЭЖХ-насос, Т-образная трубка мертвого объема, реакционная трубка с минимальным внутренним диаметром PTFE (политетрафторэтилен) 45 см x 0,5 мм (время реакции должно быть не менее 4 секунд до обнаружения).
- 4.12 Система дериватизации с применением электрохимически образованного брома (например, ячейка КОБРА), устройство должны быть установлено в соответствии с инструкциями производителя.
ПРИМЕЧАНИЕ: Для того, чтобы подтвердить содержание афлатоксина В₁, ВЭЖХ-колонка должна быть отключена от устройства для бромирования и должна быть подключена непосредственно к флуоресцентному детектору (отключение электрического тока с подключенным устройством для бромирования не рекомендуется в связи с возможным наличием остатка брома в клеточной мембране устройства).
- 4.13 Флуоресцентный детектор, с длиной волны $\lambda = 360$ нм в случае фильтра возбуждения и длиной волны $\lambda > 420$ нм в случае фильтра отсеечения выбросов, или эквивалентом этого.
Рекомендуемые настройки для регулируемых детекторов следующие:
Возбуждение = 365 нм, Выброс = 435 нм, Ширина полосы = 18 нм.
- 4.14 Блок одноразовых фильтров (0,45 мкм).

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед использованием его необходимо проверить на предмет того, что не происходит потерь афлатоксина во время фильтрации (испытания на восстановление), так как существует вероятность того, что различные фильтрующие материалы могут удерживать афлатоксин В₁.

- 4.15 Пипетки объемом 1 мл, 2 мл, 5 мл и 10 мл.
- 4.16 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.17 Лабораторные весы с точностью до 0,01 г.
- 4.18 Калиброванные микролитровые шприцы или микролитровые пипетки (20-500 мкл).
- 4.19 Испаритель (необязателен; необходим только для варианта В, раздел 6.3)

5. Реагенты

Используют реагенты признанной аналитической степени чистоты, если не указано иное.

Все растворы готовятся при помощи растворителей ВЭЖХ-класса и химически чистых материалов, если не указано иное.

5.1 Дважды дистиллированная или деминерализованная вода.

5.2 Фосфатный буферный раствор, PBS, рН 7.4

PBS может быть подготовлен из хлорида калия (0,20 г), калия дигидрофосфата (0,20 г), безводного динатрийгидрофосфата (1,16 г) [или динатрийгидрофосфата.12 Н₂О (2,92 г)] и хлорида натрия (8,00 г), добавленного к 900 мл дважды дистиллированной воды. После растворения уровень рН должен быть отрегулирован до рН 7.4 (при помощи 0,1 М НСl или 0,1 М NaOH при необходимости) и раствор доведен до объема 1,0 л добавлением дважды дистиллированной воды. Как вариант, могут быть использованы имеющиеся в продаже фосфатные буферные таблетки с аналогичными свойствами.

5.3 Пиридиния гидробромид пербромид, PBPB, CAS 39416-48-3.

Этот реагент не требуется в случае использования ячейки КОБРА®.

ТАБЛИЦА 3

Приготовление рабочих калибровочных растворов

Рабочий эталон	Вариант А		Вариант Б	
	Аликвотный маточный раствор [мкл]	Концентрация [нгAFB1/мл]	Аликвотный маточный раствор [мкл]	Концентрация [нг AFB1/мл]
1	20	0.050	100	0.250
2	45	0.113	225	0.563
3	70	0.175	350	0.875
4	95	0.238	475	1.188
5	120	0.300	600	1.500
6	145	0.363	725	1.813
7	170	0.425	850	2.125
8	195	0.488	975	2.438
9	220	0.550	1100	2.750

- 5.4 Бромид калия.
Этот реагент не требуется в случае использования реагента РВРВ.
- 5.5 Ацетонитрил ВЭЖХ-класса.
- 5.6 Метанол ВЭЖХ-класса.
- 5.7 Чистый ацетон.
- 5.8 Вода ВЭЖХ-класса (также может использоваться дважды дистиллированная или деминерализованная вода).
- 5.9 Экстрагирующий растворитель.
ацетон (5.7): дважды дистиллированная вода, (85:15, в объемном отношении).
- 5.10 Азотная кислота, $c(\text{HNO}_3) = 4 \text{ M}$
Этот реагент не требуется в случае использования реагента РВРВ.
- 5.11 Иммуноаффинная колонка
Аффинная колонка должно содержать антитела, полученные на фоне афлатоксина В₁. Колонка должна обладать вместимостью не менее 40 нг афлатоксина В₁ и должна характеризоваться уровнем восстановления не менее 80% для афлатоксина В₁ при применении в качестве эталонного раствора в ацетоне: дважды дистиллированная вода (85:15, в объемном отношении), содержащая 0,25 нг афлатоксина В₁.
- 5.12 Растворитель А подвижной фазы ВЭЖХ, для использования только с пост-колоночным реагентом РВРВ: раствор дважды дистиллированной воды (5.8): ацетонитрила (5.5): метанола (5.6) (6:2:3, в объемном отношении). Соотношение растворителей может быть откорректировано для получения наилучших параметров разделения.
- 5.13 Растворитель В подвижной фазы ВЭЖХ, для использования только с электрохимически образованным бромом: раствор дважды дистиллированной воды (5.8): ацетонитрила (5.5) и метанола (5.6) (6:2:3, в объемном отношении)), содержащий 120 мг бромида калия (5.4) и 350 мкл азотной кислоты (5.10) на литр подвижной фазы. Соотношение растворителей может быть откорректировано для получения наилучших параметров разделения.
- ПРИМЕЧАНИЕ:* Растворитель подвижной фазы (5.12/5.13) должен быть дегазирован.
- 5.14 Пост-колоночный реагент
Для использования только с пост-колоночным реагентом РВРВ:
Растворите 25 мг РВРВ (5.3) в 500 мл дважды дистиллированной Н₂О. Раствор может быть использован в срок до 4 дней, если хранить его в темном месте при комнатной температуре. Этот пост-колоночный реагент должен использоваться только в сочетании с растворителем А подвижной фазы ВЭЖХ (5.12), но не в сочетании с растворителем В подвижной фазы ВЭЖХ (5.13).
- 5.15 Тoluол: ацетонитрил (98:2, в объемном отношении).
- 5.16 Эталонный материал афлатоксина В₁.
Эталон афлатоксина В₁ в виде кристаллов или сухой пленки для целей проведения анализа.
- 5.17 Калибровочные маточные растворы для ВЭЖХ.
- 5.17.1 Общее
Приготовьте маточный раствор афлатоксина В₁ (5.16), содержащего 50,0 нг/мл в толуол:ацетонитриле (5.15).

5.17.2 Вариант А (см. описание метода в п. 6.3)

Отмерьте пипеткой из раствора (5.16) объемы, указанные в Таблице 3 (вариант А) в набор из нескольких калиброванных мерных колб объемом 20 мл. Выпарьте раствор толуол:ацетонитрила до состояния сухости в потоке азота при комнатной температуре. В каждую колбу добавьте 7 мл метанола, позвольте афлатоксинам раствориться, а затем доведите объем до отметки добавлением дважды дистиллированной воды и хорошо взболтайте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Имейте в виду, что в результате смешивания метанола и дважды дистиллированной воды происходит уменьшение объема.

5.17.3 Вариант Б (см. описание метода в п. 6.3)

Отмерьте пипеткой из раствора (5.16) объемы, указанные в Таблице 3 (вариант Б) в набор из нескольких калиброванных мерных колб объемом 20 мл. Выпарьте раствор толуол:ацетонитрила до состояния сухости в потоке азота при комнатной температуре. В каждую колбу добавьте 10 мл метанола, позвольте афлатоксинам раствориться, а затем доведите объем до отметки добавлением метанола (но не водного метанола) и хорошо взболтайте. Ровно 1 мл этого рабочего калибровочного раствора затем переносят в промытый кислотой стеклянный пузырек, выпаривают досуха, как описано в варианте Б в п. 6.3, а затем повторно растворяют в точно таком же объеме, который будет использоваться для повторного растворения образцов до их введения (6.3). Рассчитайте концентрацию афлатоксина В₁ в выпаренном и вновь растворенном растворе в нг/мл. Используйте эти значения концентрации для расчетов, указанных в разделе 6.6. В этом случае калибровочный диапазон останется неизменным.

6. Метод

6.1 Кондиционирование иммуноаффинных колонок

Имуноаффинные колонки (5.11) должны быть комнатной температуры перед кондиционированием. Для кондиционирования следуйте инструкциям производителя. Если не указано иное, добавьте 10 мл PBS (5.2) к верхней части колонки и позвольте ему пройти со скоростью 2-3 мл/мин через колонку (самотеком). Убедитесь в том, что небольшая часть (0,5 мл) PBS остается на колонке, пока применяется раствор образца.

6.2 Экстракция (извлечение)

6.2.1 Отмерьте, с точностью до 0,1 г, примерно 50 г пробы в колбу Эрленмейера объемом 500 мл с завинчивающейся пробкой или стеклянной пробкой.

6.2.2 Добавьте 250 мл экстракционного растворителя ацетона:дважды дистиллированной воды (5.9).

6.2.3 Встряхивайте интенсивно рукой в течение первых 15-30 секунд, а затем в течение 30 мин с помощью встряхивателя (4.1).

6.2.4 Отфильтруйте экстракт с использованием предварительно сложенный фильтровальной бумаги (4.2).

6.2.5 Отмерьте пипеткой 5 мл прозрачного фильтрата в мерную колбу объемом 100 мл и доведите до отметки добавлением PBS или дважды дистиллированной воды (Разбавляющий растворитель – PBS или дважды дистиллированная вода – должен быть выбран в соответствии со спецификациями производителя иммуноаффинной колонки. Если не указано иное, разбавление должно быть осуществлено при помощи PBS.).

Если раствор не является прозрачным, повторно отфильтруйте через фильтр из стекловолокна (4.4) и отмерьте ровно 50 мл прозрачного фильтрата в емкость, которая находится на кондиционируемой иммуноаффинной колонке (если раствор прозрачен, то разбавленный раствор может быть непосредственно добавлен в иммуноаффинную колонку).

6.2.6 Добавьте раствор к колонке, как это описано в п. 6.3.

6.3 Иммуноаффинная очистка

ПРИМЕЧАНИЕ: Методы для кондиционирования, загрузки, промывки и элюирования отличаются незначительно у разных производителей иммуноаффинных колонок, и, следовательно, необходимо очень строго следовать конкретным инструкциям, прилагаемым к колонкам. В целом, процедура включает в себя экстракцию образцов при помощи водного метанола, фильтрацию или центрифугирование, возможное разбавление образцов при помощи PBS или дважды дистиллированной воды, загрузку под давлением (возможно, предварительно промытую) колонку, промывку колонки при помощи двойной дистиллированной воды и элюирование афлатоксина В₁ с при помощи метанола или ацетонитрила.

6.3.1 Пропустите фильтрат через колонку (самотеком) при скорости потока около 1 капля/сек (примерно 3 мл/мин). Не допускайте, чтобы скорость потока превышала значение 5 мл/мин.

6.3.2 Промойте колонку при помощи примерно 20 мл дважды дистиллированной воды (5.8), примененной в двух частях объемом около 10 мл каждая при скорости потока, равной 3 мл/мин, и высушите, применив легкий вакуум в течение 5-10 секунд, или пропустите воздух через иммуноаффинную колонку с помощью шприца в течение 10 секунд.

6.3.3 Элюируйте афлатоксин В₁ в два этапа:

Добавьте 0,50 мл метанола к колонке и пропустите его через нее самотеком. Соберите элюат в мерную колбу объемом 5 мл (4.7). Подождите 1 минуту и добавьте вторую часть метанола объемом 1,25 мл. Соберите большую часть примененного раствора элюента путем пропускания воздуха через него, после того как большая часть раствора прошла через колонку самотеком.

Вариант А (рекомендуемый)

ПРИМЕЧАНИЕ: Этот вариант рекомендуется, но требует применения соответствующего флуоресцентного детектора и системы ввода проб. Вариант Б применяется только в случае, когда сигнал детектора является относительно слабым для проведения анализа в соответствии с вариантом А.

6.3.4 Соберите элюат в мерную колбу объемом 5 мл (4.7).

6.3.5 Заполните колбу до отметки добавлением дважды дистиллированной

воды и хорошо взболтайте. Если раствор является прозрачным, то он может использоваться непосредственно для ВЭЖХ-анализа. Если раствор не является прозрачным, то пропустите его через фильтр (0,45 мкм) (4.14) перед ВЭЖХ-вводом.

ПРИМЕЧАНИЕ: Ввод проб посредством полной калиброванной петли гарантирует максимальную точность. Рекомендуется (в зависимости от системы ввода проб, например, шприц или автоматический пробоотборник) взять объем образца, в 3 раза превышающий размер петли, и ввести, по крайней мере, 2/3 этого объема в клапан, чтобы убедиться в том, что средняя часть остается в петле. Таким образом, петля промывается вводимым растворителем; одновременно достаточное количество растворителя остается в клапане.

Вариант Б (только если применим)

ПРИМЕЧАНИЕ: Если сигнал детектора является очень низким, чтобы гарантировать необходимый уровень Относительного стандартного отклонения (RSD), то дополнительный этап испарения может быть включен для обеспечения необходимого уровня RSD (10% от множественной инъекции ($n = 10$) эталонного раствора афлатоксина В₁ в концентрации, эквивалентной уровню содержания примесей 1 нг/г).

6.3.6 Соберите афлатоксин, содержащий элюент метанола, из иммуноаффинной колонки в промытый кислотой стеклянный пузырек.

6.3.7 Выпарьте элюент досуха под легким потоком азота при температуре 40 °С.

6.3.8 Повторно растворите афлатоксин в водном растворе метанола (35%). Используйте точно такой же объем для выпаренных остатков образца, какой вы будете использовать для выпаренного калибровочного раствора. Объем для повторного растворения (конечный объем) будет зависеть от размера вашей инъекционной петли. Используйте режим полной калиброванной петли для ввода проб, как это описано в варианте А.

6.4 Пост-колоночная дериватизация

При использовании РВРВ закрепите смешивающую Т-образную трубку и реакционную трубку, упомянутые в п. 4.11, а затем применяйте их, используя следующие параметры:

Скорость потока: 1 мл/мин (подвижная фаза 5.12)

0,30 мл/мин (реагент 5.14)

При использовании электрохимически образованного брома (ячейка КОBRA) следуйте инструкциям по настройке ячейки, предоставляемым производителем, и применяйте, используя следующие параметры:

Скорость потока: 1 мл/мин (подвижная фаза 4.13)

Ток: 100 мкА

6.5 Калибровочная кривая

Калибровочная кривая должна быть подготовлена с использованием описанных рабочих калибровочных растворов (5.17). Эти растворы охватывают диапазон 0.5-5.5 мкг/кг для афлатоксина В₁. Сформируйте калибровочную кривую до проведения анализа в соответствии с таблицей (5.17) и проверьте график на линейность. Линейную регрессию необходимо осуществить с использованием научного калькулятора или статистической программы.

ПРИМЕЧАНИЕ: В случае, если содержание афлатоксина В₁ в образце находится за пределами калибровочного диапазона, то должна быть подготовлена соответствующая калибровочная кривая. Как вариант, инъекционный раствор для проведения ВЭЖХ-анализа может быть разбавлен до такого содержания афлатоксина В₁, который бы соответствовал установленной калибровочной кривой.

6.6 Спайковые процедуры для анализа восстановления

Для анализа восстановления, добавьте эталонный раствор афлатоксина к исходному весу материала, не содержащему афлатоксин. Спайковый уровень должен находиться в пределах калибровочного диапазона (предпочтительно в середине диапазона). Будьте осторожны, чтобы не добавить более 2 мл спайкового растворителя (раствор должен характеризоваться надлежащей концентрацией афлатоксина В₁), и чтобы последующее испарение происходило в темноте и длилось 0,5-2 часа.

7. Расчеты

Нанесите сигнал в качестве оси X (высота или площадь), а концентрацию афлатоксина В₁ [нг/мл] в качестве оси Y на основе калибровочного раствора (п. 6.5). Нарисуйте калибровочную кривую и рассчитайте значения наклона (*a*) и точки пересечения (*b*) с помощью линейной регрессии.

$$y = ax + b$$

Используя полученную функцию, рассчитайте концентрацию афлатоксина В₁ в анализируемом растворе.

Расчет концентрации афлатоксина В₁ в введенных растворах, полученный с помощью линейной регрессии из калибровочной кривой (функции):

$$\rho_{smp} = a \cdot A_{smp} + b$$

$$\omega_{conta} = \frac{\rho_{smp} \cdot V_S \cdot V_E \cdot V_D}{m \cdot V_{AE} \cdot V_{A/AC}}$$

$$\omega_{conta} = \frac{\rho_{smp} \cdot 100 \cdot V_E}{m}$$

где:

- m* = образец материала, взятого для анализа [г] - (50 г),
- V_S* = растворитель, используемый для экстракции [мл] - (250 мл),
- V_{AE}* = аликвота, полученная из экстракта [мл] - (5 мл),
- V_D* = объем, достигаемый после разбавления при помощи PBS (воды) [мл] - (100 мл),
- V_{A/AC}* = аликвота, используемая для иммуноаффинной очистки [мл] - (50 мл),

- V_E = конечный объем, достигнутый после элюирования из иммуноаффинной колонки [мл]
- ρ_{smp} = концентрация афлатоксина, рассчитанная посредством линейной регрессии [нг/мл]
- ω_{conta} = примесь афлатоксина В1 [мг/кг] в образце материала, и
- A_{smp} = площадь или высота пика афлатоксина, полученная из анализируемого раствора [единиц].

Имейте в виду, что в отношении образцов и эталонных растворов необходимо вводить один и тот же объем для обеспечения соответствия формуле.

8. Контроль качества

- 8.1 Точность
- 8.2 Значение восстановления спайкового образца (б.б) должно составлять от 60 до 120%, в противном случае серия должна быть повторена. Данный рабочий контроль должен анализироваться с каждым набором и сравниваться с пределами на установленном контрольном графике.
- 8.3 Прецизионность
- 8.4 Вводите калибровочный эталон среднего значения в качестве проверки после примерно каждых 5 образцов для оценки изменений пиковой площади. Площадь не должна изменяться более чем на 10% от стандартной пиковой площади в калибровочной кривой. Проверьте это также для AFB₁, AFB₂, AFG₁ и AFG₂, если они также анализируются.

9. Примечания

- 9.1 Относительно загрузочной способности иммуноаффинных колонок обратитесь к спецификациям производителя.
- 9.2 Перед применением процедуры ВЭЖХ образцы могут быть проверены на содержание афлатоксинов при помощи различных тестовых наборов. Несколько ELISA-тестов имеются в продаже.
- 9.3 Протокол испытаний должен содержать следующие данные:
- информацию, необходимую для идентификации образца (вид образца, происхождение образца, обозначение);
 - ссылку на этот метод;
 - дата и тип процедуры отбора образцов (если она известна);
 - дата получения образца;
 - дату проведения испытания;
 - результаты испытаний и единицы, в которых они были выражены;
 - скорость восстановления рабочего контрольного образца (8);
 - примечание касательно того, откорректированы ли результаты с учетом восстановления; и
 - отдельные моменты, наблюдавшиеся в ходе испытаний; операции, не указанные в методе или приведенные как необязательные, но которые, возможно, повлияли на результаты.

10. Полезные ссылки

АОАС 2005.08. 2008 г. *Определение содержания афлатоксинов в кукурузе, сыром арахисе и арахисовом масле методом жидкостной хроматографии с пост-колоночной фотохимической дериватизацией, Раздел No. 49.2.18A.* Гейтерсберг, Мэриленд, США

АОС. 2005 г. *Анализ афлатоксинов с помощью пост-колоночной фотохимической дериватизации ВЭЖХ, рекомендуемая практика Аа 11-05.* Шампейн, США

EN 17375. 2006 г. *Корма для животных – Определение содержания афлатоксина В₁, Международная организация по стандартизации.* Женева, Швейцария.

ФУМОНИЗИНЫ – МЕТОД ВЭЖХ=

1. Принцип

Фумонизины В₁ и В₂ (FB₁, FB₂) экстрагируются из образца корма при помощи водного метанола. Экстракт очищают с использованием иммуноаффинных колонок. Аналиты разделяются посредством обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) и обнаруживаются посредством их флуоресценции после пре- или пост-колоночной дериватизации с о-фталевым альдегидом (ОФА).

2. Область применения

Этот метод является наиболее подходящим для анализа фумонизинов в целых зернах и комбикормах для животных. Предел количественного определения должен составлять не менее 3 мг/кг на количество фумонизинов, но в зависимости от оборудования может достигать 0,5 мг/кг и более низких пределов количественного определения для каждого фумонизина.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

- 4.1 Мельница.
- 4.2 Барабанный миксер.
- 4.3 Вортекс-миксер.
- 4.4 Лабораторный встряхиватель.
- 4.5 Сосуды объемом 250 мл с навинчивающимися крышками.
- 4.6 Мерные цилиндры объемом 5, 50, 1000 и 2000 мл.
- 4.7 Мерные пипетки (класс А) объемом 2, 10 и 50 мл.
- 4.8 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.9 Фильтр из стекловолокна, без связующих элементов, с размером пор около 2 мкм.

- 4.10 Фильтр-воронка соответствующего размера.
- 4.11 Флаконы автоматического пробоотборника соответствующего размера с крышками.
- 4.12 Емкости подходящего размера для иммуноаффинных колонок, с адаптером для подключения к верхней части иммуноаффинных колонок.
- 4.13 Мерные колбы (класс А) объемом 2, 5, 10 и 20.
- 4.14 Газонепроницаемые стеклянные шприцы и/или пипетки с объемным регулированием, способные точно выдавать объемы: 5, 50, 125, 160 и 500 мкл и 1 мл.
- 4.15 Опорная стойка соответствующего размера для иммуноаффинных колонок.
- 4.16 Приборы для ВЭЖХ, включающие следующие:
- 4.16.1 Система подачи растворителей, способная генерировать двоичный градиент с достаточной точностью при требуемом давлении, например, насос серии Agilent 1200.
- 4.16.2 Автоматический пробоотборник, способный обеспечивать ввод достаточных объемов инъекционного раствора с достаточным уровнем повторяемости и служащий для пост-колоночной дериватизации, позволяющей смешивать реагент и образец раствора перед вводом образца, например, ALS серии Agilent 1200.
- 4.16.3 Хроматографическая колонка: любая колонка, который обеспечивает симметричное пиковое значение (множитель пиковой асимметрии $0,9 < A_s < 1,4$ при 10% от полной высоты), достаточный уровень удержания ($k > 2$) и разрешения ($R_s > 1$) для FB_1 и FB_2 , например, Agilent Zorbax SB-C18 4,6 x 150 мм, 3,5 мкм.
- 4.16.4 Флуоресцентный детектор: способный обеспечить необходимые длины волн возбуждения и излучения и оснащенный проточной ячейкой соответствующего размера, например, FLD серии Agilent 1200 или Waters 474.
- 4.16.5 Система пост-колоночной дериватизации (не требуется, если используется пре-колоночная дериватизация): промышленное или самостоятельно-собранное устройство; в случае самостоятельно-собранного устройства требуются следующие элементы:
- Насос для реагентов, способный обеспечить доставку постоянного потока дериватизационного реагента без пульсации при требуемом давлении;
 - РЕЕК-трубка с наружным диаметром, требуемым используемой ВЭЖХ-системой, и различными внутренними диаметрами, например, 1/16» НД (наружный диаметр), 0,04», 0,02» ВД, 0,01» ВД или 0,005» ВД, и
 - Т-образный смеситель: небольшой внутренний объем РЕЕК (полиэфиркетон), например, VICI JR-9000-0665.
- 4.17 Нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм.

5. Реагенты

Все растворы готовятся с использованием растворителей ВЭЖХ-класса и химически чистых материалов, если не указано иное. Необходимо применять только дважды

дистиллированную воду или воду как минимум 2-й степени чистоты, как это определено в стандарте EN ISO 3696.

5.1 Дважды дистиллированная или деминерализованная вода.

5.2 Метанол.

5.3 Ацетонитрил.

5.4 Хлорид калия (KCl).

5.5 Хлорид натрия (NaCl).

5.6 Динатрия гидрофосфата додекагидрат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

5.7 Динатрия тетрабората декагидрат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$).

5.8 Карбонат натрия (Na_2CO_3).

5.9 Борная кислота (H_3BO_3).

5.10 Сульфат калия (K_2SO_4).

5.11 N-ацетил-L-цистеин (NAC).

5.12 о-фталевый альдегид (OPA).

5.13 β-меркаптоэтанол (BME).

5.14 Муравьиная кислота (98-100%).

5.15 Концентрат фосфатного буферного раствора (PBS)

Растворите следующие компоненты в 1800 мл дважды дистиллированной воды (5.1):

4 г KCl (5.4)

160 г NaCl (5.5)

72 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (5.6)

Откорректируйте уровень pH до 7.4 с помощью 10-молярной (10 M) HCl и доведите объем до 2000 мл добавлением дистиллированной воды.

5.16 PBS, готовый к применению: разведите 100 мл концентрата PBS (5.15) до объема 1000 мл добавлением дважды дистиллированной воды (5.1) или используйте PBS-таблетку, например, Sigma P4417 (одна таблетка, растворенная в 200 мл дважды дистиллированной воды (5.1), дает 0,01 M фосфатного буфера, 0,0027 M хлорида калия и 0,137 M хлорида натрия, pH 7,4 при температуре 25 °C).

5.17 Разбавитель: смешайте метанол (5.2) и дважды дистиллированную воду (5.1) в соотношении 1:1 (в объемном отношении).

5.18 Экстрагирующий растворитель: смешайте метанол (5.2) и PBS (5.16) в соотношении 1:1 (в объемном отношении).

5.19 Реакционный буфер для пост- и пре-колоночной дериватизации

5.19.1 Пост-колоночная дериватизация: 0,006 M OPA, 0,006 M NAC, 0,384 M карбоната натрия, 0,216 M борной кислоты и 0,108 M сульфата калия

- Растворите 40,7 г карбоната натрия (5.8), 13,4 г борной кислоты (5.9) и 18,8 г сульфата калия (5.10) в 1 литре дистиллированной воды (5.1);
- Взбалтывайте в течение 10 минут;
- Добавьте 800 мг OPA (5.12) к 1 литру вышеуказанного раствора;
- Добавьте 1 г NAC (5.11) к 1 литру вышеуказанного раствора;
- Взбалтывайте в течение 10 минут;
- Поместите в ультразвуковую водяную ванну на 15 минут.
- Взбалтывайте в течение 10 минут; и

- Поместите в ультразвуковую водяную ванну на 15 минут. Отфильтруйте раствор через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (4.17).

ПРИМЕЧАНИЕ:

- Правильное растворение ОРА имеет очень важное значение.
- Реакционный буфер не должен быть изменен в течение последовательности ВЭЖХ-измерений
- Подготавливайте свежий раствор для каждой последовательности ВЭЖХ-измерений.

5.19.2 Пре-колоночная дериватизация: 0,1 М ОРА, 0,24 М ВМЕ, 0,08 М динатрия тетрабората, 16,7%-ный метанол

- Растворите 40 мг ОРА (5.12) в 1 мл метанола (5.2);
- Перемешайте до полного растворения;
- Добавьте 5 мл 0,1 М раствора динатрия тетрабората декагидрата (3,8 г/100 мл; 5.7);
- Тщательно перемешайте;
- Добавьте 50 мкл ВМЕ (5.13) и
- Тщательно перемешайте.
- В качестве альтернативы может быть использован реагент фталдиальдегида (Sigma-Aldrich P0532)

5.20 Маточный раствор FB₁ и FB₂: сертифицированный раствор Фумонизина FB₁ и FB₂ из примерно 50 мкг/мл каждого в соответствующем растворителе. Возьмите точные концентрации из инструкций.

5.21 Разбавленный маточный раствор FB₁ и FB₂ для калибровки: Добавьте 160 мкл маточного раствора FB₁ и FB₂ (5.20) в мерную колбу объемом 2 мл (4.13). Доведите объем до 2 мл добавлением растворителя (5.17). В результате получим 2,0 мл 12,5-кратного разведения раствора 5.20.

ПРИМЕЧАНИЕ: Указанные выше растворы (5.20, 5.21) могут быть также подготовлены гравиметрическим методом посредством точного взвешивания сухого вещества и растворителя, используемого для его растворения.

5.22 Калибровочные растворы: Из разбавленных маточных растворов (5.21) подготовьте 5 уровней калибровочных растворов путем добавления необходимых объемов разбавленного маточного раствора, указанных в таблице 4, в мерную колбу (4.13) указанного объема, и доведите объем до отметки добавлением разбавителя (5.17).

Рассчитайте концентрации FB₁ и FB₂ для различных уровней калибровки путем деления сертифицированной или рассчитанной концентрации маточного раствора (5.20) на значение конечного разведения, указанное в Таблице 4. Если вы наблюдаете насыщение сигнала детектора на самом высоком уровне калибровки, то разведите 250 мкл разбавленного маточного раствора (5.21) в 2 мл, для достижения окончательного уровня разведения, равного 100.

Эти уровни калибровки носят рекомендательный характер и могут быть скорректированы в соответствии с индивидуальными потребностями.

5.23 Иммуноаффинные колонки. Иммуноаффинные колонки должны включать в себя неподвижную фазу с иммобилизованными моноклональными антите-

ТАБЛИЦА 4
Стандартные концентрации фумонизина

№ калибранта	Разбавленный маточный раствор (5.21) [мкл]	Мерная колба (4.13) [мл]	Конечное разведение маточного раствора (5.20)
1	50	20.0	5000
2	125	10.0	1000
3	125	5.0	500
4	500	2.0	50
5	1000	2.0	25

лами, специфичными к, по крайней мере, FB₁ и FB₂. Чтобы быть пригодными для этого метода, они должны соответствовать требованиям, указанным ниже: В аликвоту экстракта, свободного от фумонизина репрезентативного кормового материала, вводится FB₁ и FB₂ при 920 (высокий уровень) или 110 (низкий уровень) нг/мл для суммы обоих. Затем растворите 5 мл этого спайкового экстракта до общего объема в 50 мл (см. 6.2).

В соответствии с процедурами, описанными в пп. 6.3 и 6.4, получим ожидаемые концентрации во вводимых растворах на уровне 460 или 55 нг/мл для суммы FB₁ и FB₂.

После измерения этих растворов наблюдаемые концентрации FB₁ и FB₂ могут быть рассчитаны по формулам 1 и 2 (приведенным в разделе 7). Разделив сумму наблюдаемых концентраций FB₁ и FB₂ на ожидаемые концентрации, мы получим значения выхода из иммуноаффинных колонок. Эти выходы должны быть равны $99 \pm 18\%$ (U, k = 2) при высоком уровне и $118 \pm 18\%$ (U, k = 2) при низком уровне.

Вышеуказанный колоночный анализ необходимо выполнить для каждого уровня на, по крайней мере, трех случайно выбранных колонках каждой новой партии иммуноаффинных колонок, которые будут использованы. Если проанализированная партия не соответствует вышеуказанным требованиям, то необходимо взять новую партию или откорректировать условия, описанные в п. 6.3, таким образом, что требования были выполнены (инструкции пользователя, прилагаемые к колонкам, могут являться хорошей отправной точкой в этом плане).

Любые изменения в процедуре очистки потребуют повторной проверки этапа очистки и всех последующих этапов (хроматография).

6. Метод

6.1 Экстракция FB₁ и FB₂

6.1.1 Отмерьте 20 г анализируемого образца в достаточно большой контейнер с крышкой, например, флакон объемом 250 мл (5.5).

6.1.2 Добавьте 200 мл экстракционного растворителя (4.18), закройте колбу и энергично встряхните рукой с тем, чтобы вещество рассредоточилось равномерно.

- 6.1.3 Положите его на встряхиватель (5.4) на 120 минут. Выберите такую скорость, которая позволит хорошо смешать вещество и не приведет к собиранию вещества в верхней части колбы.
 - 6.1.4 Позвольте экстрагированному образцу отстояться после встряхивания.
 - 6.1.5 Возьмите 5 мл экстракта (6.1.4) и разбавьте его при помощи PBS (4.16) до достижения общего объема в 50 мл и перемешайте.
 - 6.1.6 Подготовьте фильтр-воронку (5.10) с фильтром из стекловолокна (5.9).
 - 6.1.7 Отфильтруйте разбавленный супернатант экстрагированного образца в новой колбе (5.5).
 - 6.1.8 Разбавленный отфильтрованный экстракт можно хранить при температуре 4-10 °C в течение ночи.
 - 6.1.9 В случае вещества с содержанием примесей более 10000 мкг/кг (см. п.8), возьмите 10 мл сохраненного разбавленного отфильтрованного экстракта и разбавьте вновь посредством PBS (4.16) до достижения общего объема в 50 мл и перемешайте.
- 6.2 Очистка
- 6.2.1 Возьмите по одной иммуноаффинной колонке (IAC, 4.23) на экстракт.
 - 6.2.2 Установите емкость (5.12), не выливайте хранящийся раствор из колонки.
 - 6.2.3 Добавьте в емкость 25 мл отфильтрованного разбавленного экстракта (6.1).
 - 6.2.4 Откройте выход колонки.
 - 6.2.5 Обеспечьте медленное прохождение всего вещества через колонку. Скорость потока должна составлять от одной до двух капель в секунду.
 - 6.2.6 После полного прохождения всего экстракта через колонку, промойте иммуноаффинную колонку при помощи 10 мл PBS (4.16).
 - 6.2.7 Пропустите воздух через иммуноаффинную колонку (например, используя правильно подобранный большой шприц) для того, чтобы исключить избыточный PBS.
 - 6.2.8 Поместите мерную колбу объемом 5 мл (5.13) или мерный цилиндр объемом 5 мл (5.6) под иммуноаффинной колонкой и добавьте 5 x 500 мкл метанола (4.2) к иммуноаффинной колонке (добавляйте следующую аликвоту только после того, как предыдущая полностью прошла через колонку).
 - 6.2.9 Соберите весь элюент в мерную колбу (5.13) или мерный цилиндр (5.6).
 - 6.2.10 Добавьте 2 мл дважды дистиллированной воды (4.1) к иммуноаффинной колонке после того, как весь метанол (4.2) прошел через колонку.
 - 6.2.11 Продолжайте собирать элюент в ту же мерную колбу или мерный цилиндр.
 - 6.2.12 Осторожно пропустите воздух через колонку для того, чтобы собрать большую часть использованной воды (4.1).
- 6.3 Анализируемый раствор
- 6.3.1 В случае пре-колоночной дериватизации: доведите объем мерной колбы или мерного цилиндра до 5 мл добавлением дважды дистиллированной воды (4.1).

ТАБЛИЦА 5
Градиентные настройки (ВЭЖХ) с использованием пре-колоночной дериватизации

Время [мин]	В [%]
0	69.5
14	79
14.01	100
17.01	100
17.02	69.5
20	69.5

6.3.2 В случае пост-колоночной дериватизации: добавьте 5 мкл муравьиной кислоты (4.14) и доведите объем мерной колбы или мерного цилиндра до 5 мл добавлением дважды дистиллированной воды (4.1).

6.3.3 Смешайте содержимое мерной колбы или мерного цилиндра и переместите аликвоту во флакон автоматического пробоотборника (5.11).

6.3.4 Этот анализируемый раствор можно хранить при температуре 4-10 °C в течение 2 дней.

6.4 Спайковая процедура

Для определения значения восстановления введите в свободный от фумонизина репрезентативный кормовой материал маточный раствор FB₁ и FB₂ (4.20) или соответствующее разведение. Спайковый уровень должен находиться в пределах калибровочного диапазона (предпочтительно в середине диапазона). Концентрация используемого раствора должна быть такой, чтобы добавлялось не более 2 мл. Позвольте спайковому образцу отстояться в течение 30 минут, чтобы добиться испарения растворителя.

6.5 Условия эксплуатации ВЭЖХ

Условия эксплуатации, описанные ниже, хорошо применимы к оборудованию, перечисленному в п. 4.16. Вполне возможно, что вам придется внести коррективы, если вы используете различное оборудование для получения соответствующих значений разрешения и удержания (4.16.3). Эти корректировки могут касаться программы инжектора (впрыскивателя), объема впрыска, процента органического модификатора в изократическом или градиентном режиме, скорости потока и/или температуры колонки.

6.5.1 Пре-колоночная дериватизация

Используя оборудование, указанное в п. 4.16, удовлетворительные результаты могут быть получены при следующих условиях.

- Программа инжектора автоматического пробоотборника;
- Всосите 20 мкл пре-колоночного реакционного буфера (5.19.2);
- Всосите 40 мкл анализируемого раствора (6,4);
- Всосите 20 мкл пре-колоночного реакционного буфера (5.19.2);

- Смешайте 20 раз; и
- Введите все.

Вышесказанное можно проделать вручную (корректируя общий объем при сохранении относительных объемов при необходимости), если будет гарантировано, что раствор вводится в течение 3 минут после смешивания. Важно также, что период времени между смешиванием и вводом вещества является одинаковым для всех анализируемых и калибровочных растворов.

- Вводимый объем: 80 мкл
- Температура колонки: 40 °C
- Поток: 1,0 мл / мин
- Флуоресцентный детектор: длина волны λ возбуждения: 335 нм; длина волны λ излучения: 440 нм (проверьте, используя спектр длин волн для используемого флуоресцентного детектора).
- Подвижная фаза: А: 0,5% муравьиной кислоты (5.14) в дважды дистиллированной воде (5.1)
- В: 0,5% муравьиной кислоты (5.14) в метаноле (5.2)
- Градиентные настройки (объем задержки HPLC 0,8 мл), см. Таблицу 5: Приборы с различными объемами задержки градиента будут нуждаться в корректировке градиента для достижения аналогичного разделения. Целью является достижение кажущегося коэффициента ёмкости (k) при элюции для $FV_1 > 3$.

6.5.2 Пост-колоночная дериватизация

Инструкции для самостоятельно-собранных систем:

Путь потока в хроматографическую колонку (4.16.3) остается неизменным по сравнению с обычным функционированием. Выход колонки подключен к одному из внешних портов смесителя в форме Т (4.16.5.3). Трубка от колонки до Т-образного смесителя должна быть как можно короче.

Другой внешний порт Т-образного смесителя подключен к выходу насоса (4.16.5.1), обеспечивающего доставку потока реагента. Это соединение должно быть изготовлено из длинного куска ID PEEK трубки диаметром 0,005» (4.16.5.2) с тем, чтобы достаточное обратное давление создавалось для должной работы насоса для реагентов. Крайне важно, чтобы поток реагента доставлялся без пульсации. Небольшая пульсация может быть минимизирована путем введения большого успокаивающего объема между насосом и PEEK-трубкой, создающей обратное давление. Большие ID PEEK трубки могут служить этой цели. Оставшийся центральный порт Т-образного смесителя соединен через петлю реагента с флуоресцентным детектором.

Длина и, следовательно, объем, этой петли реагента представляет собой баланс между сохранением разрешения хроматографической колонки (короткий) и достижением полной реакции (длинный). Внутренний диаметр менее важен. Если выбрано слишком малое значение, то будет

ТАБЛИЦА 6
Градиентные настройки с
использованием пост-колоночной
дериватизации

Время [мин]	В [%]
0	34
13	34
13.01	95
16	95
16.01	34
19	34

создано избыточное обратное давление. Удовлетворительные результаты были достигнуты с длиной 2,5 м ID PEEK трубки диаметром 0,02». Используя оборудование, указанное в п. 4.16, удовлетворительные результаты могут быть получены при следующих условиях.

- Вводимый объем: 50 мкл
- Температура колонки: 45 °C
- Поток: 1,2 мл/мин (подвижная фаза); 0,45 мл/мин (пост-колоночный реагент; 5.19.1).
- Флуоресцентный детектор: длина волны λ возбуждения: 335 нм; длина волны λ излучения: 440 нм (проверьте, используя спектр длин волн для используемого флуоресцентного детектора).
- Подвижная фаза: А: 0,1% муравьиной кислоты (5.14) в дважды дистиллированной воде (5.1)
В: 0,1% муравьиной кислоты (5.14) в ацетонитриле (5.3)

Это разделение изократично, но чтобы избежать накопления матричных компонентов включен шаг, состоящий из 95% В. Доля органических модификаторов должна быть скорректирована таким образом, чтобы коэффициент емкости (k) для FV_1 был > 2 .

- 6.6 Определение фумонизинов в анализируемых растворах
Введите аликвоты анализируемых растворов (6.4) в ВЭЖХ при тех же условиях, которые использовались для калибровочных растворов (5.22).
- 6.7 Состав серии (последовательности) измерений
Всегда начинайте серию измерений с пустой пробы реагента для проверки системы. Далее введите калибровочные растворы. Перед вводом первого анализируемого раствора необходимо ввести пустую пробу реагента, чтобы убедиться в том, что не происходит переноса аналитов. Анализируемые растворы необходимо анализировать в двух повторностях, и повторные запуски калибровочных растворов необходимо осуществлять через равные интервалы. Частота этих калибровочных запусков зависит от стабильности вашей хроматографической системы.

6.8 Калибровка

Нанесите сигналы (пиковую площадь или высоту) всех измеренных калибровочных растворов и соответствующие концентрации для FB₁ и, отдельно, для FB₂. Не используйте средние значения множественных инъекций. С помощью линейной регрессии оцените уклон и пересечение каждой из двух калибровочных функций (FB₁ и FB₂). Проверьте пересечение на значимость и линейность (например, график остаточных величин по сравнению с графиком аппроксимированных значений).

6.9 Определение пиковых значений

Определите пиковые значения Фумонизина В₁ и В₂ в анализируемом растворе путем сравнения времен удерживания с аналогичными показателями ближайшего калибровочного раствора в серии. Сигнал (пиковая площадь или высота) FB₁ и FB₂ в анализируемом растворе должен находиться в пределах калибровочного диапазона. Если сигнал FB₁ и/или FB₂ в анализируемом растворе превышает самые высокие сигналы калибровочных растворов, то анализируемый раствор следует разбавить растворителем (5.17), чтобы привести его к калибровочному диапазону и повторно проанализировать. Коэффициент разбавления должен быть учтен во всех последующих расчетах.

7. Расчеты

Используя оценочные значения уклонов и пересечений (если они значительны, в противном случае необходимо использовать ноль) от линейной регрессии (6.9), вычислите концентрации FB₁ (C_{FB1}) и FB₂ (C_{FB2}) в анализируемых растворах (6.4), исходя из среднего значения сигнала повторяющихся инъекций следующим образом:

$$C_{FB1} = \frac{\overline{\text{сигнал}}_{FB1} - \text{пересечение}_{FB1}}{\text{уклон}_{FB1}} \text{ [нг/мл]} \quad (1)$$

$$C_{FB2} = \frac{\overline{\text{сигнал}}_{FB2} - \text{пересечение}_{FB2}}{\text{уклон}_{FB2}} \text{ [нг/мл]} \quad (2)$$

Если анализируемый раствор был разбавлен из-за наличия сигнала выше калибровочного диапазона (6.10), то умножьте C_{FB1} и C_{FB2} на коэффициент разбавления.

Для расчета массовой доли (w_{SMP}) аналитов в исходных материалах используйте следующее уравнение:

$$w_{SMP} = \frac{c \cdot V_5 \cdot V_3 \cdot V_1}{V_4 \cdot V_2 \cdot m_{SMP}} \text{ [нг/г или мкг/кг]} \quad (3)$$

где:

c = рассчитанная концентрация FB1 (1) или FB2 (2), возможно, с поправкой на разбавление CFB1 и CFB2,

- m_{SMP} = вес анализируемого материала, используемого для экстракции (20 г),
 V_1 = общий объем экстрагирующего растворителя (200 мл),
 V_2 = объем аликвоты отфильтрованного сырого экстракта, используемого для разбавления (5 мл),
 V_3 = общий объем разбавленного отфильтрованного сырого экстракта (50 мл),
 V_4 = объем аликвоты разбавленного отфильтрованного сырого экстракта, примененного к иммуноаффинной колонке IAC (25 мл), и
 V_5 = общий объем анализируемого раствора (5 мл).

Если вес анализируемого материала и описанные здесь объемы сохранены такими же, то приведенное выше уравнение (3) может быть упрощено следующим образом:

$$w_{SMP} = c \cdot 20 \text{ [мг/кг]} \quad (4)$$

В случае, если результат уравнения (4) больше, чем 10000 мкг/кг или, если известно заранее, что уровень содержания примесей может превысить это значение, то осуществите очистку соответствующего разбавленного отфильтрованного экстракта (6.1) посредством дополнительного разбавления (дополнительный коэффициент разбавления $50/10 = 5$). Упрощенное уравнение принимает следующий вид:

$$w_{SMP} = c \cdot 20 \cdot 5 = c \cdot 100 \text{ [мг/кг]} \quad (5)$$

Проведите вышеуказанные расчеты для FB₁ и FB₂. Сумма обоих значений затем будет рассчитываться следующим образом:

$$w_{SMP} = w_{SMP, FB1} + w_{SMP, FB2} \text{ [мг/кг]} \quad (6)$$

8. Контроль качества

8.1 Точность

Значение восстановления спайкового образца (6.4) должно составлять от 60 до 120%, в противном случае серия должна быть повторена. Данный рабочий контроль должен анализироваться с каждым набором и сравниваться с пределами на установленном контрольном графике.

8.2 Прецизионность

Вводите калибровочный эталон среднего значения в качестве проверки после примерно каждых 5 образцов для оценки изменений пиковой площади. Площадь не должна изменяться более чем на 10% от стандартной пиковой площади в калибровочной кривой. Проведите это для всех фумонизинов, FB₁ и FB₂.

9. Примечания

- 9.1 Посредством применения этого метода также можно определить фумонизин B₃ (FB₃).
- 9.2 Относительно загрузочной способности иммуноаффинных колонок обрати-

тес к спецификациям производителя.

- 9.3 Перед применением процедуры ВЭЖХ образцы могут быть проверены на содержание фумонизинов при помощи различных тестовых наборов. Несколько ELISA-тестов имеются в продаже (см. список ссылок в методе афлатоксина). Обратитесь к описаниям производителя по продукту и методу.
- 9.4 Протокол испытаний должен содержать следующие данные:
- информацию, необходимую для идентификации образца (вид образца, происхождение образца, обозначение);
 - ссылку на этот метод;
 - дата и тип процедуры отбора образцов (если она известна);
 - дата получения образца;
 - дату проведения испытания;
 - результаты испытаний и единицы, в которых они были выражены;
 - скорость восстановления рабочего контрольного образца (8);
 - примечание касательно того, откорректированы ли результаты с учетом восстановления; и
 - отдельные моменты, наблюдавшиеся в ходе испытаний; операции, не указанные в методе или приведенные как необязательные, но которые, возможно, повлияли на результаты.

10. Полезные ссылки

EN 16006. 2011 г. *Корма для животных – Определение суммы Фумонизина В1 и В2 в комбикормах с иммуноаффинной очисткой и ОФ-ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией после пре- и пост-колоночной дериватизации.* Женева, Швейцария.

Регламент Комиссии (ЕС). 2006 г. № 401/2006 от 23 февраля 2006 года. *Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за уровнем микотоксинов в пищевых продуктах.* Официальный журнал Европейского Союза, 2006 г. 49 (L70), стр. 12-34.

АОАС. 2000 г. Природные яды. Фумонизин В1, В2 и В3 в кукурузе. Официальные методы анализа. Метод 995.15. Ассоциация химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе. Гейтерсберг, Мэриленд, США.

ЗЕАРАЛЕНОН (ZON) – МЕТОД ВЭЖХ

1. Принцип

Зеараленон извлекается из образца при помощи водного метанола. Экстракт разбавляют фосфатным буферным раствором, и зеараленон отделяется на иммуноаффинной колонке, содержащей антитела, специфичные для зеараленона. Анализируемое вещество количественно определяется посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентной детекцией (ФЛД).

2. Область применения

Этот метод применяется для определения содержания зеараленона в кормах для животных при концентрации от 30 до 3000 мкг/кг.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

Стандартное лабораторное оборудование и, в частности, следующее:

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 1,0 мг.
- 4.2 Горизонтальный или вертикальный встряхиватель.
- 4.3 Гомогенизатор / высокоскоростной блендер.
- 4.4 Вортекс-миксер, или его эквивалент.
- 4.5 pH-метр.
- 4.6 Мельница (решета разных размеров).
- 4.7 Барабанный миксер.
- 4.8 Стеклоянные флаконы различных размеров.
- 4.9 Градуированные пипетки объемом 5 мл и 50 мл.
- 4.10 Градуированные цилиндры с/без пробок объемом 5 мл и 250 мл.
- 4.11 Мерные колбы объемом 3 мл, 5 мл и 10 мл.
- 4.12 Сосуд емкостью 250 мл.
- 4.13 Колбы с конической или заворачивающейся крышкой объемом 100 мл и от 250 мл до 500 мл.
- 4.14 Стеклоянные воронки соответствующего размера.
- 4.15 Сложенные фильтры из целлюлозы (размер пор около 30 мкм) для стеклоянных воронок (4.14).
- 4.16 Диски для фильтра из несвязанного стекловолокна (размер пор <2 мкм) соответствующего размера для системы вакуумной фильтрации растворителя (4.22).
- 4.17 Пипетки или газонепроницаемые стеклоянные шприцы объемом 100 мкл, 500 мкл и 1 мл.
- 4.18 Вакуумный коллектор или автоматизированная вакуумная система SPE, способная вместить иммуноаффинные колонки.
- 4.19 Емкости подходящего объема с креплениями для удержания иммуноаффинных колонок.
- 4.20 Пластиковые шприцы, 5 мл.
- 4.21 Вакуумный насос, способный создавать достаточный вакуум для системы вакуумной фильтрации растворителей (4.22).
- 4.22 Система вакуумной фильтрации растворителя, оснащенная фильтром из стекловолокна (4.16).
- 4.23 Устройство шприцевого фильтрования ВЭЖХ, из полиамида (нейлона) с размером пор 0,45 мкм.
- 4.24 Ультразвуковая ванна.
- 4.25 ВЭЖХ-аппарат, состоящий из следующих компонентов:
 - 4.25.1 Система впрыска, ручная или с автоматическим пробоотборником, с замкнутым контуром, подходящая для инъекций объемом от 100 до 300 мкл.

- 4.25.2 Насос изократический, без пульсации, способный поддерживать объемный расход на уровне от 0,5 до 1,5 мл/мин.
 - 4.25.3 Аналитическая обращенно-фазная ВЭЖХ колонка; как правило, подходят все RP-колонки, которые позволяют в достаточной мере отделить зеараленон от других интерферирующих компонентов, к примеру подходящими были признаны Phenomenex Octadecylsilane (ODS)3-Prodigy (внутренний диаметр 150 мм x 4,6 мм), с размером частиц 5 мкм, размером пор 250 Å (25 нм), или Spherisorb Octadecylsilane (ODS)2-Excel (внутренний диаметр 250 мм x 4,6 мм), с размером частиц 5 мкм, с размером пор 250 Å (25 нм).
 - 4.25.4 Пре-колонка (опциональна), подходящая для используемой аналитической колонки.
 - 4.25.5 Флуоресцентный детектор, оснащенный измерительной ячейкой и пригодный для измерений при длине волны возбуждения 274 нм и длины волны излучения 446 нм.
 - 4.25.6 Система данных, интегратор данных или компьютерная рабочая станция.
- 4.26 УФ-спектрофотометр для контроля за концентрацией маточного раствора (5.15).

5. Реагенты

В ходе анализа, если не указано иное, необходимо использовать только реагенты признанной аналитической степени чистоты и только дважды дистиллированную воду или воду 1-й степени чистоты, как это определено в стандарте EN ISO 3696 (1995 г.). Растворители должны быть класса ВЭЖХ.

5.1 Ацетонитрил.

5.2 Метанол, технического класса.

5.3 Метанол, класс ВЭЖХ.

5.4 Хлорид натрия.

5.5 Динатрия гидроортофосфат.

5.6 Дигидрофосфат калия.

5.7 Хлористый калий.

5.8 Соляная кислота (32%).

5.9 Фосфатный буферный раствор (PBS).

Растворите 8 г хлорида натрия (5.4), 1,2 г динатрия гидроортофосфата (5.5), 0,2 г дигидрофосфата калия (5.6) и 0,2 г хлористого калия (5.7) в 1 л дважды дистиллированной воде. Откорректируйте pH до уровня 7,4 с помощью соляной кислоты (5.8).

ПРИМЕЧАНИЕ: Могут быть использованы имеющиеся в продаже таблетки фосфатно-солевого буферного раствора с аналогичными свойствами.

5.10 Экстрагирующий растворитель, метанол:дважды дистиллированная вода (75:25, в объемном отношении)

Смешайте 75 объемных частей метанола (5.2) с 25 объемными частями дистиллированной воды.

- 5.11 Промывочный растворитель, метанол:PBS (15:85, в объемном отношении)
Смешайте 15 объемных частей метанола (5.3) с 85 объемными частями PBS (5.9).
- 5.12 Инъекционный растворитель для ВЭЖХ анализа, метанол:дважды дистиллированная вода (50:50, в объемном отношении)
Смешайте 50 объемных частей метанола (5.3) с 50 объемными частями дважды дистиллированной воды.
- 5.13 Подвижная фаза ВЭЖХ, метанол:дважды дистиллированная вода (75:25, в объемном отношении)
Смешайте 75 объемных частей метанола (5.3) и 25 объемных частей дважды дистиллированной воды. Хорошо перемешайте и дегазируйте.
- 5.14 Зеараленон, минимальная чистота 98%.
- 5.15 Зеараленон (ZON), маточный раствор, 10 мкг/мл
Добавьте 4,0 мл ацетонитрила (5.1) к 5 мг зеараленона (5.14) для получения эталонного раствора с концентрацией 1,25 мг/мл. Разведите 800 мкл эталонного раствора (с концентрацией 1,25 мг/мл) до объема 5,0 мл добавлением ацетонитрила (5.1) для образования эталонного раствора с концентрацией 200 мкг/мл. Разведите 250 мкл эталонного раствора (с концентрацией 200 мкг/мл) до объема 5,0 мл добавлением ацетонитрила (5.1) для получения маточного раствора с концентрацией 10 мкг/мл.
Для определения точной концентрации зафиксируйте кривую поглощения этого маточного раствора с концентрацией 10 мкг/мл, используя спектрофотометр (4.26), в диапазоне от 200 нм до 300 нм в кварцевой ячейке размером 1 см с ацетонитрилом (5.1) в качестве эталона. Определите показатель поглощения второго максимума при $L = 274$ нм. Рассчитайте массовую концентрацию зеараленона, ρ_{ZON} , в мкг на мл, используя следующее уравнение:

$$\rho_{ZON} = \frac{A_{max} \cdot M \cdot 100}{\kappa \cdot d}$$

где:

- A_{max} = показатель поглощения, определяемый на втором максимуме кривой поглощения (274 нм);
 M = молярная масса зеараленона ($M = 318,4$ г/моль);
 κ = молярный коэффициент поглощения зеараленона (1262 м²/моль);
 d = длина оптического пути кварцевой ячейки в см (1 см).

Храните эталонные растворы при температуре ниже -18 °C.

- 5.16 Спайковый раствор ZON
Калиброванный маточный раствор (см. 5.15). Этот раствор остается стабильным в течение 2 месяцев, если хранится при температуре ниже -18 °C.
- 5.17 Рабочий раствор ZON
Поместите аликвоту калиброванного базового раствора (5.15), эквивалентного 10 мкг ZON, в мерную колбу (4.11). Добавьте ацетонитрила (5.1), чтобы довести общий объем до 5 мл. Это и будет рабочим раствором с концентраци-

ей 2 мкг/мл. Данный раствор остается стабильным в течение 2 месяцев, если хранится при температуре ниже 18 °С.

5.18 Калибровочные растворы ZON для ВЭЖХ

Подготовьте 5 калибровочных растворов для ВЭЖХ в отдельных мерных колбах объемом 10 мл (4.11), отмерив пипеткой объемы, указанные в таблице 7. Доведите объем каждого эталона до 10 мл с помощью ВЭЖХ инъекций растворителя (5.12).

5.19 Иммуноаффинные очистительные колонки ZON

Иммуноаффинные колонки содержат антитела, образующиеся на фоне зеараленона. Колонка должна обладать емкостью не менее 1500 нг зеараленона и должна обеспечивать восстановление на уровне не менее 70% при применении 75 нг зеараленона в 10 мл промывочного растворителя (5.11).

6. Метод

6.1 Подготовка образца

Важно, чтобы лаборатория получала образец, который действительно является репрезентативным, не был поврежден или изменен во время транспортировки или хранения. Образцы должны быть мелкого помола и тщательно перемешаны, с использованием мельницы (4.6) и барабанного миксера (4.7) или посредством иного процесса, который обеспечивает полную гомогенизацию до отбора проб образца для анализа. Во всех случаях, если образец был заморожен, полностью разморозьте его перед отбором проб образца. Прежде чем взять аналитическую пробу образца, тщательно перемешайте образец.

6.2 Экстракция (извлечение)

6.2.1 Отмерьте 20 г (с точностью до 2 знаков после запятой) пробы образца в колбу объемом от 250 мл до 500 мл с завинчивающейся крышкой (4.13).

6.2.2 Добавьте 150 мл экстракционного растворителя (5.10).

6.2.3 Быстро перемешайте вручную до получения однородной суспензии, затем либо встряхивайте в течение 1 часа во встряхивателе (4.2), либо поместите в ультразвуковую ванну на 15 минут (4.24).

6.2.4 Встряхивайте во встряхивателе (4.2) еще в течение 15 минут.

6.2.5 Профильтруйте экстракт через сложенный бумажный фильтр (4.15) и соберите экстракт в колбу объемом 100 мл с завинчивающейся крышкой (4.13).

ТАБЛИЦА 7

Калибровочные концентрации ZON

Калибровочный раствор	Объем рабочего раствора ZON (5.17) [мкл]	Концентрация ZON [нг/мл]
1	50	10
2	250	50
3	450	90
4	650	130
5	850	170

- 6.2.6 Переместите ровно 30 мл (или 3 мл в случае, если результаты превышают 500 мкг/кг) отфильтрованного экстракта в мерный цилиндр с пробкой объемом 250 мл (4.10). Разбавьте экстракт в цилиндре добавлением PBS (5.9) до отметки, равной объему в 150 мл.
- 6.2.7 Перемешайте и отфильтруйте примерно 20 мл этого разбавленного экстракта через фильтр из стекловолокна (4.16) в стеклянный сосуд, применив слабый вакуум (4.22). Не используйте слишком сильный вакуум в начале процесса фильтрации, так как это может привести к помутнению фильтруемых экстрактов после фильтрации.
- 6.2.8 Удалите первые 20 мл и профильтруйте еще примерно 70 мл для целей анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ: Немедленно переходите к процедуре очистки иммуноаффинной колонки (6.3).

- 6.3 Очистка иммуноаффинной колонки
 - 6.3.1 Соедините иммуноаффинную колонку (5.19) с вакуумным коллектором (4.18) и прикрепите емкость (4.19) к верхней части иммуноаффинной колонки.
 - 6.3.2 Предварительно обработайте иммуноаффинную колонку (5.19) с помощью 20 мл PBS (5.9), используя скорость потока, равную 3-5 мл/мин.
 - 6.3.3 Отмерьте пипеткой 50 мл отфильтрованного и разбавленного образца экстракта (6.2) в емкость.
 - 6.3.4 Пропускайте экстракт через колонку (самотеком) при постоянной скорости потока до тех пор, пока не пройдет весь экстракт, и последняя часть растворителя не достигнет фритты колонки. Скорость потока должна составлять 1-2 капли/сек.
 - 6.3.5 После того, как экстракт пройдет через колонку, промойте колонку с помощью 5 мл промывочного растворителя (5.11) затем 15 мл дважды дистиллированной воды при скорости потока в 1-2 капли/сек.
 - 6.3.6 Удалите остатки воды из колонки, пропустив 3 мл воздуха или азота через колонку (в течение 1-2 секунд). Отделите весь элюент на этой стадии процедуры очистки.
- 6.4 Подготовка эталонного раствора для анализа ВЭЖХ
 - 6.4.1 Поместите мерный цилиндр объемом 5 мл (4.10) или мерную колбу объемом 3 мл (4.11) в колонку и пропустите 0,75 мл метанола (5.3) через колонку, собирая элюент.
 - 6.4.2 После того, как последние капли метанола пройдут через колонку, оставьте метанол на колонке в течение примерно 1 минуты.
 - 6.4.3 Добавьте еще 0,75 мл метанола (5.3) и продолжайте собирать элюент.
 - 6.4.4 Осторожно пропустите воздух через колонку с целью сбора остаточного метанола.
 - 6.4.5 Дополните мерный цилиндр/мерную колбу до отметки 3 мл добавлением дважды дистиллированной воды и перемешайте. После смешивания снова проверьте объем и при необходимости отрегулируйте.

6.4.6 В случае помутнения образцов отфильтруйте анализируемый раствор посредством устройства шприцевого фильтрования ВЭЖХ (4.23) при помощи пластикового шприца (4.20) перед его введением.

6.4.7 *ПРИМЕЧАНИЕ:* Как вариант, могут быть выполнены вручную процедуры, описанные для иммуноаффинной очистки (6.3) и элюирования (6.4), вместе с блоком автоматической подготовки проб, при условии, что объемы и скорости потока остаются неизменными.

6.5 Калибровка

Подготавливайте калибровочный график в начале каждого дня анализа, используя калибровочные растворы ZON (5.18). Устанавливайте калибровочную кривую до анализа анализируемых образцов путем нанесения на график концентрации ZON [нг/мл] (ось X) по отношению к пиковому сигналу в качестве площади или высоты (ось Y), определите наклон и возможную точку пересечения с линейной регрессией, и проверьте на линейность с использованием соответствующих диагностических методов.

6.6 Определение и идентификация зеараленона в анализируемом растворе

6.6.1 Введите аликвоты анализируемых растворов (6.4) в ВЭЖХ с использованием тех же условий, которые применялись для приготовления калибровочного графика.

6.6.2 Определите пиковое значение зеараленона в анализируемом растворе путем сравнения его времени отставания со временем отставания ближайшего калибровочного раствора ВЭЖХ (5.18), вводимого в рамках серии анализов ВЭЖХ.

6.6.3 Концентрация зеараленона в анализируемом растворе должна находиться в пределах калибровочного диапазона. Если уровень зеараленона в растворе превышает концентрацию самого высокого калибровочного раствора, то анализируемый раствор следует разбавить растворителем ВЭЖХ, чтобы привести его в соответствие с калибровочным диапазоном, и повторно проанализировать. Коэффициент разбавления должен быть учтен во всех последующих расчетах.

6.7 Условия эксплуатации ВЭЖХ

При использовании колонки, указанной в п. 5.25.3, и подвижной фазы, указанной в п. 5.13, уместными были признаны следующие параметры:

- Скорость потока, подвижная фаза (колонка): от 0,7 до 1,0 мл/мин
- Флуоресцентная детекция, длина волны излучения: от 446 до 450 нм
- Флуоресцентная детекция, длина волны возбуждения: от 274 до 275 нм
- Объем впрыска: от 100 до 300 мкл

7. Расчеты

Определите по калибровочному графику массовую концентрацию (в нг/мл) зеараленона в аликвоте анализируемого раствора, введенного в колонку ВЭЖХ. Рассчитайте массовую долю зеараленона, ω_{ZON} в нг/г или мкг/кг до одного знака после запятой по формуле, представленной ниже:

$$\omega_{ZON} = C_{ZON} \cdot \frac{V_5}{V_4} \cdot \frac{V_3}{V_2} \cdot \frac{V_1}{m_s}$$

где:

C_{ZON} = массовая концентрация ZON, определенная из калибровки (6.5);

V_5 = объем анализируемого раствора (3,0 мл; 6.4.5);

V_4 = объем аликвоты разбавленного экстракта, применяемый к иммуноаффинной колонке (50 мл; 6.3.3);

V_3 = общий объем разбавленного отфильтрованного экстракта (150 мл; 6.2.6);

V_2 = объем аликвоты экстракта, используемого для разбавления (30 мл или 3 мл; 6.2.6);

V_1 = общий объем экстракционного раствора (150 мл; 6.2.2), и

m_s = масса извлеченного образца (20,00 г, 6.2.1).

Данное уравнение можно упростить, если были использованы заданные значения массы и объема:

$$\omega_{ZON} = C_{ZON} \cdot 2.25 \quad \text{(было разведено 30 мл экстракта)}$$

Если представленный выше расчет приводит к значению выше 500 мкг/кг, то необходимо подготовить новый раствор из 3 мл образца экстракта (см. раздел 6.2). Упрощенное уравнение в этом случае будет выглядеть следующим образом:

$$\omega_{ZON} = C_{ZON} \cdot 2.25 \quad \text{(было разведено 3 мл экстракта)}$$

8. Контроль качества

8.1. Точность

Для определения уровня восстановления добавьте свободный от зеараленона репрезентативный материал к спайковому раствору ZON (5.16). Спайковый уровень должен находиться в пределах калибровочного диапазона (предпочтительно в середине диапазона). Концентрация используемого раствора должна быть такой, чтобы добавлялось не более 2 мл. Позвольте спайковому образцу отстояться в течение 30 минут, чтобы добиться испарения растворителя. Уровень восстановления должен составлять от 60 до 120%, в противном случае серия должна быть повторена. Данный рабочий контроль должен анализироваться с каждым набором и сравниваться с пределами на установленном контрольном графике.

8.2. Прецизионность

Вводите калибровочный эталон среднего значения в качестве проверки после примерно каждые 5 образцов для оценки изменений пиковой площади. Площадь не должна изменяться более чем на 10% от стандартной пиковой площади в калибровочной кривой.

9. Примечания

- 9.1 Относительно загрузочной способности иммуноаффинных колонок обратиться к спецификациям производителя.
- 9.2 Перед применением процедуры ВЭЖХ образцы могут быть проверены на содержание ZON при помощи различных тестовых наборов. Несколько ELISA-тестов имеются в продаже (см. список ссылок в методе афлатоксина). Обратиться к описаниям производителя по продукту и методу
- 9.3 Протокол испытаний должен содержать следующие данные:
- информацию, необходимую для идентификации образца (вид образца, происхождение образца, обозначение);
 - ссылку на этот метод;
 - дата и тип процедуры отбора образцов (если она известна);
 - дата получения образца;
 - дату проведения испытания;
 - результаты испытаний и единицы, в которых они были выражены;
 - скорость восстановления рабочего контрольного образца (8);
 - примечание касательно того, откорректированы ли результаты с учетом восстановления; и
 - отдельные моменты, наблюдавшиеся в ходе испытаний;
 - операции, не указанные в методе или приведенные как необязательные, но которые, возможно, повлияли на результаты.

10. Полезные ссылки

- Arranz, I., Mischke, C., Stroka, J., Sizoo, E., Van Egmond, H. & Neugebauer, M.** 2007 г. Метод жидкостной хроматографии для количественного определения зеараленона в детском питании и кормах для животных: Межлабораторные исследования; *J. AOAC Int.* 90 (6): 1598-1609.
- Регламент Комиссии (ЕС) № 401/2006.** 23 февраля 2006 года. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за уровнем микотоксинов в пищевых продуктах. *ABl. L 70 из 9.3.2006*, стр. 12-34.
- EN 15792:2009.** 2009 г. *Корма для животных – Определение содержания зеараленона в кормах для животных – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией и очисткой иммуноаффинных колонок.* Брюссель, Бельгия.

ДЕОКСИНИВАЛЕНОЛ (DON) – МЕТОД ВЭЖХ

1. Принцип

Деоксиниваленол (DON) извлекают из материала, используя дважды дистиллированную воду. Водный экстракт очищают с помощью иммуноаффинной колонки для удаления примесей из образца. Впоследствии содержание DON количественно определяется с помощью метода ВЭЖХ с УФ-обнаружением.

2. Область применения

Этот метод применяется для определения содержания DON в комбикормах для животных при концентрации от 150 мкг/кг до 4000 мкг/кг.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

Стандартное лабораторное оборудование и, в частности, следующее:

- 4.1 Аналитические весы с точностью до 0,001 г для взвешивания образца, и с точностью до 0,01 мг для гравиметрической подготовки маточного раствора DON.
- 4.2 Гомогенизатор / высокоскоростной блендер.
- 4.3 Лабораторный встряхиватель
- 4.4 Вортекс-миксер, или его эквивалент.
- 4.5 Мельница (решета разных размеров).
- 4.6 Барабанный миксер.
- 4.7 Колбы с завинчивающейся крышкой объемом 250 мл и 500 мл.
- 4.8 Воронки соответствующего размера.
- 4.9 Фильтр целлюлозный, с размером пор 30 мкм,.
- 4.10 Фильтр из несвязанного стекловолокно с размером пор 2 мкм.
- 4.11 Мерные колбы объемом 2 мл, 5 мл и 10 мл.
- 4.12 Градуированные пипетки объемом 1 мл и 5 мл.
- 4.13 Регулируемые пипетки или газонепроницаемые стеклянные шприцы объемом 100 мкл и 1 мл.
- 4.14 ВЭЖХ-система, включающая в себя:
 - 4.14.1 Насос, способный, по крайней мере, генерировать бинарные градиенты, с отсутствием пульсации, с потоком, подходящим для аналитической колонки.
 - 4.14.2 Аналитическая колонка. Подходит любая колонка, позволяющая обеспечить достаточное отделение дезоксиниваленола от других интерферирующих компонентов. К примерам таких относятся: Phenomenex Octadecylsilane (ODS)3-Prodigy (внутренний диаметр 15 см x 4,6 мм), с размером частиц 5 мкм, размером пор 100 Å, Octadecyl (C18) (внутренний диаметр 250 мм x 4,6 мм), с размером частиц 3 мкм, с размером пор 80 Å, Octadecyl (C18) (внутренний диаметр 250 мм x 4,6 мм), с размером частиц 5 мкм, с размером пор 180 Å.
 - 4.14.3 Пре-колонка (опциональна), подходящая для используемой аналитической колонки.
 - 4.14.4 Автоматический пробоотборник, способный обеспечить введение соответствующих объемов с достаточной степенью воспроизводимости.
 - 4.14.5 УФ-детектор, способный измерять при 220 нм
 - 4.14.6 Система сбора данных.

- 4.15 УФ-спектрофотометр для контроля за концентрацией маточного раствора DON.
- 4.16 Емкости соответствующего размера с адаптерами для иммуноаффинных колонок.
- 4.17 Стеклообразные флаконы соответствующих размеров для автоматического пробоотборника (4.14.4), но с минимальным объемом 2,0 мл.
- 4.18 Устройство шприцевого фильтрования, из полиамида (нейлона) с размером пор 0,45 мкм.
- 4.19 Испаритель, способный поддерживать температуру 50 °С с устойчивым потоком воздуха или азота.

5. Реагенты

В ходе анализа, если не указано иное, необходимо использовать только реагенты признанной аналитической степени чистоты и только дважды дистиллированную воду или воду 1-й степени чистоты, как это определено в стандарте EN ISO 3696.

5.1 Ацетонитрил.

5.2 Деоксиниваленол (DON), с минимальной степенью чистоты 97%.

5.3 Метанол.

5.4 Ледяная уксусная кислота.

5.5 Подвижная ВЭЖХ-фаза

Смешайте 15 объемных частей метанола (5.3) с 84,9 объемными частями дважды дистиллированной воды и 0,1 объемными частями ледяной уксусной кислоты (5.4). Точное количество используемого метанола и потребность в использовании уксусной кислоты, зависят от колонки ВЭЖХ, выбранной для анализа; показатели должны быть скорректированы, при необходимости. Дегазируйте раствор перед использованием.

5.6 Промывочный растворитель

Смешайте метанол (5.3) и дважды дистиллированную воду (1:1, в объемном отношении).

5.7 Маточный раствор DON: 250 мкг дезоксиниваленола на мл ацетонитрила

Добавьте 4,0 мл ацетонитрила (5.1) к 5 мг DON (5.2) для получения раствора с концентрацией 1,25 мг/мл. Разведите 1 мл раствора с концентрацией 1,25 мг/мл до объема 5,0 мл добавлением ацетонитрила для образования маточного раствора с концентрацией 250 мкг/мл. Разведите 200 мкл маточного раствора с концентрацией 250 мкг/мл в мерной колбе объемом 2 мл (4.11) добавлением ацетонитрила для получения разбавленного раствора с концентрацией 25 мкг/мл.

Для определения точной концентрации зафиксируйте кривую поглощения этого разбавленного маточного раствора с концентрацией 25 мкг/мл, используя спектрофотометр (4.15), в диапазоне от 200 нм до 270 нм в кварцевой ячейке размером 1 см с ацетонитрилом (5.1) в качестве эталона. Определите показатель поглощения при 220 нм. Рассчитайте массовую концентрацию дезоксиниваленола, ρ_{DON} , в мкг на мл, используя следующее уравнение:

$$\rho_{DON} (\approx 25 \text{ мкг/мл}) = \frac{A_{\max} \cdot M \cdot 100}{\kappa \cdot d}$$

где:

A_{\max} = показатель поглощения, определяемый на максимуме кривой поглощения (220 нм);

M = молярная масса дезоксиниваленола ($M = 296,3$ г/моль);

κ = молярный коэффициент поглощения дезоксиниваленола в ацетонитриле (681 м²/моль);

d = длина оптического пути кварцевой ячейки в см (1 см).

Вычислите точную концентрацию маточного раствора с концентрацией 250 мкг/мл можно при помощи следующего уравнения:

$$\rho_{DON} (\approx 250 \text{ мкг/мл}) = \rho_{DON} (\approx 25 \text{ мкг/мл}) \cdot 10$$

Маточный раствор можно хранить в темном месте в течение 3 месяцев при температуре от 44 до 8 °С или как минимум 6 месяцев при температуре ниже -18 °С.

5.8 Спайковый раствор DON

Возьмите пипеткой аликвоту калибровочного маточного раствора DON (5.7), эквивалентную 500 мкг DON, в мерную колбу объемом 5 мл (4.11). Доведите объем до отметки добавлением ацетонитрила (5.1). В результате получится спайковый раствор с концентрацией 100 мкг/мл.

5.9 Рабочий раствор DON

Возьмите пипеткой аликвоту калибровочного разбавленного рабочего раствора DON (5.7), эквивалентную 50 мкг DON, в мерную колбу объемом 5 мл (4.11). Доведите объем до отметки добавлением ацетонитрила (5.1). В результате получится рабочий раствор DON с концентрацией 10 мкг/мл.

5.10 Калибровочные растворы DON

Калибровочные растворы подготавливаются из рабочего раствора DON с концентрацией 10 мкг/мл (5.9). Например, добавьте объемы рабочего раствора DON с концентрацией 10 мкг/мл (5.9), приведенные в Таблице 8 ниже, в мерные колбы объемом 10 мл (4.11). Заполните колбы до отметки добавлением подвижной фазы (5.5). Отклонения допускаются до тех пор, пока низший уровень находится выше предела обнаружения, а самый высокий уровень не приводит к зашкаливанию сигнала детектора, и между ними существуют еще, по крайней мере, два равноудаленных уровня.

5.11 Иммуноаффинные очистительные колонки DON

Иммуноаффинные колонки содержат антитела, образующиеся на фоне DON. Колонка должна обладать емкостью не менее 2500 нг DON и должна обеспечивать восстановление на уровне не менее 70% при применении 25 нг DON к 1-2 мл дважды дистиллированной воды (в зависимости от инструкции производителя).

ТАБЛИЦА 8
Калибровочные концентрации дезоксиниваленола

Калибровочный раствор	Объем рабочего раствора DON (5.9) [мкл]	Концентрация DON [нг/мл]
1	450	450
2	375	375
3	300	300
4	225	225
5	150	150
6	75	75

6. Метод

6.1 Подготовка образцов

Важно, чтобы лаборатория получала образец, который действительно является репрезентативным, не был поврежден или изменен во время транспортировки или хранения. Образцы должны быть мелкого помола и тщательно перемешаны, с использованием мельницы (4.5) и барабанного миксера (4.6) или посредством иного процесса, который обеспечивает полную гомогенизацию до отбора проб образца для анализа. Если образец был заморожен, полностью разморозьте его перед отбором проб образца. Прежде чем взять аналитическую пробу образца, тщательно перемешайте образец.

6.2 Экстракция (извлечение)

6.2.1 Отмерьте 25 г пробы образца в колбу с завинчивающейся крышкой объемом 250 мл или 500 мл (4.7).

6.2.2 Добавьте 200 мл дважды дистиллированной или деионизированной воды, закройте крышкой и встряхивайте в течение 1 часа во встряхивателе (4.3).

6.2.3 Подготовьте воронку (4.8) с фильтровальной бумагой (4.9) и отфильтруйте извлеченный образец в чистую колбу объемом 250 мл или 500 мл с завинчивающейся крышкой (4.7).

6.3 Очистка иммуноаффинной колонки

6.3.1 Прикрепите емкость (4.16) к иммуноаффинной колонке и добавьте 8 мл деионизированной или дистиллированной воды.

6.3.2 Переместите 2 мл отфильтрованного экстракта (см. выше; 0,5 мл в случае аналитических результатов выше 4000 мкг/кг) в емкость (4.16). Обеспечьте медленное прохождение раствора через колонку самотеком со скоростью 1-2 капли/сек.

6.3.3 После полного прохождения всего экстракта через иммуноаффинную колонку, пропустите через колонку 5 мл деионизированной воды.

6.3.4 Удалите остатки жидкости, пропустив азот или воздух через колонку в течение 5 секунд. Удалите весь элюент на этой стадии процедуры очистки.

6.3.5 Поместите пробирку автоматического пробоотборника ВЭЖХ (4.17) под колонку и пропустите 0,5 мл метанола (5.3) через колонку самотеком,

соберите элюент. После того, как последние капли метанола прошли через колонку, оставьте метанол на колонке в течение примерно 1 минуты.

- 6.3.6 Добавьте еще 1 мл метанола (5.3) и продолжайте собирать элюент. Осторожно пропустите азот или воздух через колонку с целью сбора остатка элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Как вариант, могут быть выполнены вручную процедуры, описанные для иммуноаффинной очистки (6.3) и элюирования (6.4), вместе с блоком автоматической подготовки проб, при условии, что объемы и скорости потока остаются неизменными.

6.4 Подготовка эталонного раствора для анализа ВЭЖХ

- 6.4.1 Поместите пробирку с элюентом в испаритель (4.19) и осторожно выпаривайте досуха под действием азота или воздуха при температуре примерно 50 °С.
- 6.4.2 Сразу же после этого охладите пробирку ВЭЖХ до комнатной температуры и восстановите остаток с помощью 0,50 мл подвижной фазы ВЭЖХ (5.5).
- 6.4.3 Тщательно перемешайте при помощи вортекс-миксера (4.4) в течение не менее 30 секунд для того, чтобы обеспечить повторно полное растворение остатка. В случае помутнения отфильтруйте анализируемый раствор через устройство шприцевого фильтрования (4.18).

6.5 Калибровка

Подготавливайте калибровочный график в начале каждого дня анализа, вводя калибровочные растворы (5.10) в различных приемлемых концентрациях в хроматограф. Устанавливайте калибровочную кривую до анализа анализируемых образцов путем нанесения на график концентрации DON [нг/мл] (ось X) по отношению к пиковому сигналу в качестве площади или высоты (ось Y), определите наклон и возможную точку пересечения с линейной регрессией, и проверьте график с использованием соответствующих диагностических методов.

6.6 Определение и идентификация дезоксиниваленола в анализируемом растворе

- 6.6.1 Введите аликвоты анализируемых растворов в хроматограф с использованием тех же условий, которые применялись для приготовления калибровочного графика.
- 6.6.2 Определите пиковое значение DON в анализируемом растворе путем сравнения его времени отставания со временем отставания ближайшего калибровочного раствора ВЭЖХ (5.10), вводимого в рамках серии анализов ВЭЖХ.
- 6.6.3 Концентрация дезоксиниваленола в анализируемом растворе должна находиться в пределах калибровочного диапазона. Если уровень дезоксиниваленола в растворе превышает концентрацию самого высокого калибровочного раствора, то анализируемый раствор следует разбавить при помощи подвижной фазы ВЭЖХ, чтобы привести его в соответствие с калибровочным диапазоном, и повторно проанализировать. Коэффициент разбавления должен быть учтен во всех последующих расчетах.

ТАБЛИЦА 9
ВЭЖХ-градиент

Время [мин]	Канал А [%]	Канал В [%]
от 0 до 15	100	0
от 15 до 25	0	100
от 25 до 35	100	0

6.7 Условия эксплуатации ВЭЖХ

Используя оборудование, указанное в п. 4.14, следующие условия были определены как обеспечивающие надлежащее отделение:

Объем впрыска: 100-300 мкл

Длина волны УФ-обнаружения: 220 нм

Скорость потока подвижной фазы (колонка): 1,0 мл/мин

Если ВЭЖХ насос обеспечивает доставку подвижной фазы (5.5) через канал А и промывочного растворителя (5.6) через канал В, то градиентный профиль будет выглядеть следующим образом:

ПРИМЕЧАНИЕ: Также приемлемыми альтернативами являются подвижные фазы, подготовленные при помощи ацетонитрила и дважды дистиллированной или деминерализованной воды. Подобные подвижные фазы могут быть использованы при условии достижения достаточного уровня отделения.

7. Расчеты

Определите по калибровочному графику массовую концентрацию (в нг/мл) дезоксиниваленола в анализируемом растворе, введенном в колонку ВЭЖХ. Рассчитайте массовую долю дезоксиниваленола, ω_{DON} в нг/г или мкг/кг до одного знака после запятой по формуле, представленной ниже:

$$\omega_{DON} = C_{DON} \cdot \frac{V_3}{V_2} \cdot \frac{V_1}{m_s}$$

где:

C_{DON} = массовая концентрация дезоксиниваленола, определенная при помощи калибровки (6.5);

V_3 = объем анализируемого раствора (0,5 мл; 6.4.2);

V_2 = объем аликвоты экстракта, используемого для очистки (2,0 мл или 0,5 мл; 6.2.2);

V_1 = общий объем экстракционного раствора (200 мл; 6.2.2), и

m_s = масса извлеченной пробы образца (25 г, 6.2.1).

Данное уравнение можно упростить, если были использованы заданные значения массы и объема:

$$\omega_{DON} = C_{DON} \cdot 2 \quad (\text{было очищено 2 мл экстракта})$$

Если представленный выше расчет приводит к значению выше 500 мкг/кг, то необходимо подготовить новый очищающий раствор из 0,5 мл образца экстракта (см. раздел 6.3). Упрощенное уравнение в этом случае будет выглядеть следующим образом:

$$\omega_{DON} = C_{DON} \cdot 8 \quad (\text{было очищено 2 мл экстракта})$$

8. Контроль качества

8.1 Точность

Для определения уровня восстановления добавьте свободный от дезоксиниваленола репрезентативный материал к спайковому раствору (5.8). Спайковый уровень должен находиться в пределах калибровочного диапазона (предпочтительно в середине диапазона). Концентрация используемого раствора должна быть такой, чтобы добавлялось не более 2 мл. Позвольте спайковому образцу отстояться в течение как минимум 30 минут, чтобы добиться испарения растворителя. Уровень восстановления должен составлять от 60 до 120%, в противном случае серия должна быть повторена. Данный рабочий контроль должен анализироваться с каждым набором и сравниваться с пределами на установленном контрольном графике.

8.2 Прецизионность

Вводите калибровочный эталон среднего значения в качестве проверки после примерно каждых 5 образцов для оценки изменений пиковой площади. Площадь не должна изменяться более чем на 10% от стандартной пиковой площади в калибровочной кривой.

9. Примечания

- 9.1 Относительно загрузочной способности иммуноаффинных колонок обратитесь к спецификациям производителя.
- 9.2 Перед применением процедуры ВЭЖХ образцы могут быть проверены на содержание DON при помощи различных тестовых наборов. Несколько ELISA-тестов имеются в продаже (см. список ссылок в методе афлатоксина). Обратитесь к описаниям производителя по продукту и методу
- 9.3 Протокол испытаний должен содержать следующие данные:
 - информацию, необходимую для идентификации образца (вид образца, происхождение образца, обозначение);
 - ссылку на этот метод;
 - дата и тип процедуры отбора образцов (если она известна);
 - дата получения образца;
 - дату проведения испытания;
 - результаты испытаний и единицы, в которых они были выражены;
 - скорость восстановления рабочего контрольного образца (8);
 - примечание касательно того, откорректированы ли результаты с учетом восстановления; и

- отдельные моменты, наблюдавшиеся в ходе испытаний;
- операции, не указанные в методе или приведенные как необязательные, но которые, возможно, повлияли на результаты.

10. Полезные ссылки

Регламент Комиссии (ЕС) № 401/2006. 23 февраля 2006 года. Установление методов взятия образцов и анализа для официального контроля за уровнем микотоксинов в пищевых продуктах. *ABl. L 70 из 9.3.2006*, стр. 12-34.

EN 15791. 2009 г. *Корма для животных – Определение содержания дезоксиниваленола в кормах для животных – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с очисткой иммуноаффинных колонок.* Брюссель, Бельгия.

Stroka, J., Derbyshire, M., Mischke, C., Ambrosio, M., Kroeger, K., Arranz, I., Sizoo, E. & Van Egmond, H. 2006 г. Метод жидкостной хроматографии для количественного определения дезоксиниваленола в детском питании и кормах для животных: Межлабораторные исследования; *J. AOAC Int.* 89 (4): 1012-1020.

УСВОЯЕМОСТЬ СУХОГО ВЕЩЕСТВА – АНАЛИЗ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ

1. Принцип

Усвояемость корма жвачными животными имитируется в лабораторных условиях в два этапа. Во-первых, образец, взвешенный в тестовой пробирке, инкубируют при помощи буферной рубцовой жидкости в течение 48 часов с целью удаления усваиваемых углеводов. После центрифугирования и фильтрации кормовой осадок затем инкубируют при помощи пепсина в соляной кислоте в течение еще 48 часов, чтобы растворить усваиваемый белок. После фильтрации осадок высушивают, озоляют и взвешивают. Наконец значение усвояемости *в лабораторных условиях* превращают в значение усвояемости *в естественных условиях* посредством применения эталонных образцов с известной *естественной* усвояемостью, применяемой к каждой серии образцов. Метод основан на исследовании Тилли и Терри (1963) (см. примечание 9.3).

2. Область применения

Метод определения уровня усвояемости *в лабораторных условиях* с использованием рубцовой жидкости применяется только для кормов жвачных животных.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Оборудование

4.1 Термос.

4.2 Весы с точностью до 0,1 г.

- 4.3 Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.
- 4.4 Центрифужные пробирки (пластиковые) объемом 75 мл, снабженные резиновым стопором и предохранительным газоспускным клапаном, с градуированной отметкой в 50 мл.
- 4.5 Центрифуга.
- 4.6 Водяная ванна с термостатом, способная поддерживать температуру 39 ± 1 °С.
- 4.7 Устройство для перемешивания (мешалка).
- 4.8 Коллекторы для центрифужных пробирок.
- 4.9 Фильтрующие тигли или фильтровальная бумага.
- 4.10 Сушильный шкаф, способный поддерживать температуру на уровне 103 ± 2 °С.
- 4.11 Муфельная печь, способная поддерживать температуру на уровне 550 ± 20 °С.
- 4.12 Эксикатор.
- 4.13 pH-метр.

5. Реагенты

- 5.1 Сульфат аммония, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 5.2 Дигидрат хлорида кальция, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.
- 5.3 Углекислый газ CO_2 .
- 5.4 Додекагидрат динатрийгидрофосфата, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$.
- 5.5 Соляная кислота 1 N.
- 5.6 Гексагидрат хлорида магния, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.
- 5.7 Пепсин (свиной желудок, 766 ед/мг).
- 5.8 Хлористый калий, KCl.
- 5.9 Безводный карбонат натрия, Na_2CO_3 .
- 5.10 Хлорид натрия, NaCl
- 5.11 Гидрокарбонат натрия, NaHCO_3

6. Метод

Процедуру предпочтительно проводить в соответствии с фиксированным графиком, например:

Пятница

- 6.1 Взвесьте в центрифужной пробирке (4.4) примерно 0,5 г образца с точностью до 0,1 мг (W1).
В каждой серии опытов применяйте 4 пустые пробы (центрифужные пробирки без образца) и эталонные образцы.
- 6.2 Подготовьте минеральные растворы:
Раствор А: растворите 46,5 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (5.4), 49,0 г NaHCO_3 (5.11), 2,35 г NaCl (5.10) и 2,85 г KCl (5.8) в дистиллированной воде и доведите до отметки 1 л добавлением дистиллированной воды.
Раствор В: растворите 12,81 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (5.6) в 100 мл дистиллированной воды.
Раствор С: растворите 5,30 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (5.2) в 100 мл дистиллированной воде объемом.

Понедельник, начиная примерно с 08:00

- 6.3 Подготовьте буферный раствор: на 80-90 образцов: смешайте 800 мл раствора А, 8 мл раствора В, 8 мл раствора С и 12,8 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5.1), доведите до отметки 4 литра добавлением дистиллированной воды. Насытите раствор при помощи CO_2 (5.3) до уровня pH, равного 6,9, (проконтролируйте это значение в течение примерно 15 минут при помощи pH-метра (4.13)), перемешивая и нагревая раствор в водяной ванне до температуры 39 ± 1 °C (4.6).
- 6.4 Примерно в 08:00 возьмите не менее 1,5 литра рубцовой жидкости у коровы с наложенной фистулой или 2-х овец с наложенными фистулами посредством всасывания и соберите ее в термос (4.1) (предварительно нагретый водой и насыщенный газом CO_2). Сразу же передайте в лабораторию и отфильтруйте через двойной слой ситовой ткани (см. примечание 9.3).
- 6.5 Добавьте 1 литр отфильтрованной рубцовой жидкости в буферный раствор (6.3) перемешивая и насыщая газом CO_2 (примерно в течение 5 минут) всю смесь.
- 6.6 Добавьте по 50 мл буферной рубцовой жидкости в каждую центрифужную пробирку, насытите газом CO_2 , закройте пробирку резиновой пробкой и клапаном и инкубируйте в водяной ванне при температуре 39 ± 1 °C в течение 48 часов.
- 6.7 Вручную встряхивайте пробирки примерно в 13:00 и 17:00 часов.

Вторник

- 6.8 Встряхивайте пробирки примерно в 08:00, 13:00 и 17:00 часов.
В среду начинайте примерно в 08:00 часов.
- 6.9 Подготовьте раствор пепсина: растворите 10 г пепсина (5.7) в 5 литрах воды, добавьте 250 мл 1-молярной HCl (5.5) и согрейте в водяной ванне до температуры 39 ± 1 °C (температуру контролируйте при помощи термометра).
- 6.10 Добавьте 5 мл 10%-ного раствора Na_2CO_3 (5.9) в каждую пробирку и центрифугируйте (4.5) при 5000 g в течение 3 минут (придерживаясь той же последовательности пробирок, что и в начале инкубации). Обеспечьте одну и ту же последовательность пробирок для всех процедур.
- 6.11 Профильтруйте супернатант через нейлоновую марлю под вакуумом и добавьте остаток обратно в пробирку путем опрыскивания раствором пепсина. Добавьте еще раствор пепсина, чтобы довести общий объем до отметки 50 мл, указанной на пробирках.
- 6.12 Закройте пробирку резиновой пробкой и клапаном и поместите в водяную ванну при температуре 39 ± 1 °C на 48 часов для инкубации.
- 6.13 Вручную встряхивайте пробирки примерно в 13:00 и 17:00 часов.

Четверг

- 6.14 Встряхивайте пробирки примерно в 08:00, 13:00 и 17:00 часов.
- 6.15 Поместите фильтрующие тигли (4.9) в муфельную печь при температуре 550 ± 20 °C (4.11) на 2 часа, дайте им остыть в эксикаторе (4.12) в течение примерно 2 часов, взвесьте с точностью до 0,1 мг (W2) и положите обратно в эксикатор.

Пятница

- 6.16 Переместите содержимое пробирки в количественном измерении в тигель и отфильтруйте под вакуумом.
- 6.17 Сушите тигли в печи при температуре 103 ± 2 °C (начав около 12:00 часов) до наступления полуночи; отрегулируйте таймер таким образом, чтобы печь начала сушить снова в понедельник в 02:00 часа утра.

Понедельник, начиная примерно в 08:00 часов

- 6.18 Поместите тигли в эксикатор на 2 часа, взвесьте тигель, содержащий остаток, с точностью до 0,1 мг (W3). Прочистите то же самое и для пустых проб.
- 6.19 Поместите тигли в муфельную печь при температуре 550 ± 20 °C на 3 часа, дайте им остыть в эксикаторе в течение примерно 2 часов, взвесьте с точностью до 0,1 мг (W4). Прочистите то же самое и для пустых проб.

7. Расчеты

Рассчитайте процент усвояемости сухого вещества (% DC от DM) следующим образом:

$$DC \text{ от DM (\%)} = [(W1 \times DM\%) - (W3 - W2) - B_{DM}] / (W1 \times DM\%),$$

где:

DC от DM = усвояемость сухого вещества,

W1 = вес образца в граммах,

DM = содержание сухого вещества (DM) в образце,

W3 = вес тигля плюс остаток после сушки в граммах,

W2 = вес сухого тигля в граммах, и

B_{DM} = средний вес сухого вещества в пустых пробах.

$$DC \text{ от OM (\%)} = [(W1 \times OM\%) - (W4 - W2) - B_{OM}] / (W1 \times OM\%)$$

где:

DC от OM = усвояемость органического вещества,

W1 = вес образца в граммах,

OM = содержание органического вещества (OM) в образце,

W4 = вес тигля плюс остаток после озоления в граммах,

W2 = вес сухого тигля в граммах, и

B_{OM} = средний вес органического вещества в пустых пробах.

Наконец, полученные значения усвояемости образцов преобразуются в значения усвояемости в естественных условиях с помощью уравнения линейной регрессии: $DC_{COR} = DC \times b + a$.

Это уравнение получается посредством регрессирования опытных значений (DC_{RUN}) стандартных образцов с их эталонными значениями (DC_{REF}): $DC_{REF} = a + b DC_{RUN}$.

8. Контроль качества

В каждом опыте анализируются троекратно, по крайней мере, три контрольных образца с известным уровнем усвояемости в естественных условиях. Эти эталонные образцы должны иметь характеристики, желательно схожие с испытуемыми образцами, и должны как можно лучше охватывать диапазон усвояемости испы-

туемых образцов. Среднее значение стандартных образцов не должно отличаться более чем на 2% от эталонного значения.

Образцы должны анализироваться, по крайней мере, в двух повторностях. Разница между повторностями должна быть ниже, чем 2,5% единиц для значений усвояемости менее 60%, менее 2,0% единиц для значений усвояемости от 60 до 80% и менее 1,5% единиц для значений усвояемости более 80%.

9. Примечания

- 9.1 Рацион животных-доноров должен быть стандартизирован. В основном им предлагается раздельное питание. Рубцовую жидкость необходимо получить до утреннего кормления.
- 9.2 Описанный метод помогает измерить видимую усвояемость. Один из вариантов этого метода, заключающийся в том, что остаток корма после первого этапа обрабатывают нейтральным детергентом в течение 1 часа, представляет собой истинную усвояемость. (Van Soest и Robertson, 1985 г.).
- 9.3 Вместо рубцовой жидкости, которая подразумевает наличие и поддержание жвачных животных с наложенной фистулой, могут быть использованы коммерческие сублимированные ферментные препараты. Эти препараты могут быть чистой целлюлозой или смесью полисахаров. Некоторые из таких методов описаны (Jones и Hayward, 1975; Dowman и Collins, 1982; De Boever *и др.*, 1986). При возможности необходимо анализировать усвояемость посредством использования рубцовой жидкости.

10. Проблемы и устранение проблем

- 10.1 В течение первого этапа необходимо поддерживать анаэробные условия; необходимо тщательно насыщать растворы и пробирки при помощи CO₂, а также обеспечивать правильную работу предохранительных газовых клапанов.
- 10.2 Уровень pH должен тщательно контролироваться, а температура инокулянта должна быть приближенной к 39 °C.

11. Полезные ссылки

- De Boever, J.L., Cottyn, B.G., Buysse, F.X., Wainman, F.W. и Vanacker, J.M. 1986 г. Использование ферментативного метода для оценки усвояемости, обменной и чистой энергии комбикормов для жвачных животных. *Anim. Feed Sci. Technol.* 14: 203-214.
- Dowman, M.G. и Collins, F.C. 1982 г. Использование ферментов для оценки усвояемости кормов для животных. *J. Sci. Food Agric.* 33: 689-696.
- Jones, D.I.H. и Hayward, M.V. 1975 г. Влияние предварительной обработки травостоя пепсином на оценку усвояемости сухого вещества на основе коэффициента растворимости в грибковых целлюлозных растворах. *J. Sci. Food Agric.* 26: 711-718.
- Tilley, J.M.A. & Terry, R.A. 1963 г. Двухступенчатый метод для оценки усвояемости кормовых культур в лабораторных условиях. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18: 104-111.
- Van Soest, P.J. & Robertson, J.B. 1985 г. Анализ кормов и волокнистой пищи. *Лабораторное руководство для животноводства*. 613, Корнельский университет Итака, штат Нью-Йорк, США, 202 стр.

БИК-АНАЛИЗ

1. Принцип

Образец, представляющий химический состав материала образца, анализируют посредством БИК-спектрометрии. Спектральные данные в ближнем инфракрасном диапазоне (БИК) собираются и трансформируются в составные или параметрические концентрации по калибровочным моделям, разработанным на основе репрезентативных образцов.

2. Область применения

Описанный метод применим в отношении кормов и кормовых ингредиентов.

3. Ответственности сторон

Лаборант должен выполнять анализ в соответствии с данным методом. В обязанности лаборанта входит обеспечение строгого соблюдения всех условий, изложенных в данном методе. Любые отклонения от предписанного метода должны быть зафиксированы и доведены до руководителя.

4. Приборы ближнего инфракрасного (БИК) диапазона

БИК-приборы основаны на измерении диффузного отражения или пропускания в ближнем инфракрасном диапазоне с длинами волн в 700-2500 нм (14300-4000 см⁻¹) или его сегментах, либо при определенных длинах волн или волновых чисел. Оптический принцип может быть дисперсионным (например, дифракционные монохроматоры), интерферометрическим или нетепловым (например, светодиоды, лазерные диоды и лазеры). Прибор должен быть снабжен диагностической тестовой системой для тестирования фотометрического шума и воспроизводимости, точности длины волны/волновых чисел и прецизионности длины волны/волновых чисел (для сканирования спектрофотометров). Прибор должен измерять достаточно большой объем или поверхность образцов, чтобы исключить любое значительное влияние неоднородности, происходящей от химического состава или физических свойств анализируемого образца. Длина пути образца (толщина образца) в ходе измерения пропускания должна быть оптимизирована в соответствии с рекомендациями производителя в отношении интенсивности сигнала для получения линейности и максимального соотношения сигнал/шум. В ходе измерения отражения кварцевое стекло или другой соответствующий материал, во избежание эффекта высыхания, желательно должно покрывать взаимодействующий поверхностный слой образца.

5. Отбор образцов

Важно, чтобы лаборатория получала образец, который действительно является репрезентативным, не был поврежден или изменен во время транспортировки или хранения.

Все лабораторные образцы обычно должны содержаться в условиях, которые не приведут к изменению состава образца с момента отбора проб до момента начала процедуры.

6. Метод

6.1 Подготовка анализируемого образца

Подготовка образцов должна осуществляться таким же образом, как и подготовка валидационных образцов. Необходимо применять стандартные условия. Перед анализом образец должен быть взят таким образом, чтобы получить репрезентативную выборку анализируемого материала.

Что касается конкретных процедур, то по этому поводу см. конкретные стандарты.

6.2 Измерение

Следуйте инструкциям для конкретного БИК-прибора и соответствующих калибровок.

Подготовленные образцы должны достичь температуры, соответствующей диапазону, указанному для его валидации.

6.3 Оценка результатов

Для того, чтобы валидационные результаты были достоверными, они должны находиться в пределах диапазона используемой калибровочной модели.

Результаты, полученные на образцах, определенных в качестве спектральных выбросов, не могут считаться надежными.

7. Проверка стабильности прибора

7.1 Контрольный образец

По крайней мере один контрольный образец должен быть измерен по крайней мере один раз в день с целью проверки стабильности оборудования прибора и обнаружения неисправностей, если таковые имеются. Знание истинной концентрации аналита в контрольном образце не является необходимым. Материал образца должен быть стабильным и, насколько это возможно, схож с анализируемыми образцами. Измеряемые параметр(ы) должны быть стабильными и, насколько это возможно, идентичными или, по крайней мере, биохимически близки к образцу аналита. Эти образцы, как правило, стабильны в течение длительных периодов времени, но стабильность должна проверяться в реальных условиях. Сдвиги между контрольными образцами должны перекрываться для обеспечения непрерывного контроля.

Фиксируемые ежедневные вариации должны наноситься на контрольные карты и изучаться на предмет наличия существенных тенденций.

7.2 Диагностика прибора

Для спектрофотометров точность и прецизионность длин волн / волновых чисел должны проверяться, по крайней мере, один раз в неделю или чаще, если это рекомендовано производителем прибора, а результаты должны сопоставляться со спецификациями и требованиями. Аналогичная проверка шума, издаваемого прибором, должна также проводиться еженедельно или с интервалом, рекомендованным производителем.

8. Эксплуатационная проверка функции калибровки

БИК-методы должны проверяться постоянно на соответствие эталонным методам для обеспечения устойчивой оптимальной работы функции калибровки и соблюдения

точности измерений. Частота проверки БИК-метода должна быть достаточной для того, чтобы метод работал под постоянным контролем в отношении систематических и случайных отклонений от эталонного метода. Частота проверки зависит от количества анализируемых проб в день и скорости изменений в совокупности выборки.

Валидация должна выполняться на образцах, отобранных случайным образом из всего объема анализируемых образцов.

Возможно, придется прибегнуть к некоторым стратегиям выборки для обеспечения сбалансированного распределения образцов во всем диапазоне калибровки, например, сегментации диапазона концентраций и случайного отбора образцов для испытаний в рамках каждого сегмента, или для обеспечения того, чтобы были охвачены образцы, относящиеся к коммерчески важному диапазону.

Число образцов, используемых для текущей валидации, должно быть достаточным с точки зрения статистики для проверки эксплуатационных характеристик. Для однозначной валидации необходимо, по меньшей мере, 20 образцов (для нормального распределения дисперсии). Можно использовать результаты независимого проверочного набора для запуска текущей валидации. Для продолжения вполне достаточно иметь от 5 до 10 образцов каждую неделю, чтобы контролировать эксплуатационные характеристики должным образом. При использовании меньшего количества образцов трудно принять правильное решение в случае, если один из результатов выходит за контрольные границы.

Попытка привести результаты в соответствие с контрольными границами посредством частой корректировки калибровки не улучшит ситуацию на практике. Вместо этого необходимо пересмотреть стандартные ошибки предсказания (SEP), используя последние результаты.

Если калибровочные уравнения после периода стабильности начинают выходить из-под контроля, то калибровка должна быть обновлена. Прежде чем это сделать, необходимо провести оценку, чтобы понять, были ли вызваны изменения изменениями в эталонных анализах, непреднамеренными изменениями в условиях проведения измерений (например, вызванными появлением нового оператора), отклонением или неисправностью прибора и т.д. В некоторых случаях достаточно провести простую корректировку значения постоянного члена (смещение) в калибровочном уравнении. В других случаях может быть необходимо выполнить полную повторную процедуру калибровки, когда полный или часть основного калибровочного набора расширяется за счет включения образцов из текущей валидации и, возможно, дополнительных образцов, отобранных для этой цели.

Учитывая то, что эталонные анализы находятся в рамках статистического контроля, а условия проведения измерений и рабочие характеристики прибора остались неизменными, значительные отклонения или повышенные значения SEP могут быть связаны с изменениями в химических, биологических и физических свойствах образцов по сравнению с основным калибровочным набором.

9. Протокол испытания

В протоколе испытаний указываются:

- а) Все сведения, необходимые для полной идентификации образца;

- б) Используемый метод с ссылкой на соответствующий Международный стандарт;
- в) Все условия эксплуатации, не указанные в этом Международном стандарте или рассматриваемые как необязательные;
- г) Любые обстоятельства, которые могли повлиять на результаты;
- д) Полученные результат(ы) испытаний; и
- е) Текущие значения SEP и смещения (если они являются статистически значимыми), оцененные по итогам проведения испытания на, по крайней мере, 20 анализируемых образцах.

10. Глоссарий

Общее

Эталонный метод. Признанный и проверенный со стороны ISO, EN или какой-либо другой признанный и проверенный на международном уровне метод, который предоставляет «истинное» или «присвоенное» значение измеряемого параметра, включая погрешности измерений.

Косвенный метод. Метод, который измеряет свойства, функционально связанные с параметрами, которые должны быть определены. Полученный признак относится к «истинным» значениям, как это определено эталонным методом.

БИКС. Спектроскопия в БИК-диапазоне

БИК-спектроскопия представляет собой измерение интенсивности поглощения ближнего инфракрасного света образцом в диапазоне 700-2500 нм (14300-4000 см⁻¹). БИК-приборы используют либо часть этого диапазона, либо весь диапазон, либо область, которая, в свою очередь, включает этот диапазон (например, 400-2500 нм).

Многомерные методы калибровки затем используются для того, чтобы соотнести несколько значений показателя поглощения с составом или определенным свойством образцов.

БИО. БИК-спектроскопия отражения ближнего инфракрасного диапазона, где основные измерения касаются поглощения ближнего инфракрасного света, диффузно отраженного от поверхности образца, который должен собираться с помощью детектора, расположенного перед образцом.

БИТ. БИК-спектроскопия пропускания ближнего инфракрасного диапазона, где основные измерения касаются поглощения ближнего инфракрасного света, который прошел через образец, как, например, жидкий или твердый материал (например, мясо), а затем был собран детектором, расположенным за образцом.

БИК-сеть (сеть). Несколько приборов ближнего инфракрасного диапазона, работающих с применением одних и тех же калибровочных моделей. Приборы в сети, как правило, стандартизированы таким образом, что различия в прогнозных значениях для набора стандартных образцов сведены к минимуму.

Стандартизация (приборов). Процесс, посредством которого группа приборов ближнего инфракрасного диапазона корректируются так, чтобы они выдавали схожие значения при работе с одной и той же калибровочной моделью. Несколько методов может быть задействовано для этой цели, однако они могут быть в целом

сведены к методам пре-прогнозирования, где спектры образцов корректируются с тем, чтобы свести к минимуму различия между результатами «контрольного» прибора и каждого прибора в группе, и к методам пост-прогнозирования, где линейная регрессия используется для корректировки прогнозных значений, выдаваемых каждым прибором с тем, чтобы сделать их максимально схожими со значениями, полученными от «контрольного» прибора.

Z-значение. Критерий эффективности рассчитывается путем деления разницы между прогнозируемым БИК-значением и эталонным значением на искомое значение стандартного отклонения, например, среднеквадратическую ошибку прогнозирования (RMSEP) (см. последний раздел этой главы «Статистические выражения»).

Методы калибровки

Анализ главных компонент (PCA) – это форма представления данных в компактной форме (форма сжатия данных). Для набора образцов он работает исключительно с X (спектральными) данными и определяет главные компоненты (показатели) в соответствии с правилом, которое гласит, что каждый главный компонент (ГК) выражает максимальное изменение данных в любое время и не коррелируется с любым другим ГК. Первый ГК выражает как можно большую изменчивость исходных данных. Его воздействие затем вычитается из X-данных и полученного нового ГК, вновь выражающего как можно большую изменчивость оставшихся данных. Вы можете получить столько ГК, сколько существует либо точек в спектре, либо образцов в наборе данных, но основное воздействие в спектре, как показывает практика, концентрируется в первых нескольких ГК, и, следовательно, объем данных, который необходимо рассмотреть, резко сокращается. В результате PCA получается два новых набора переменных на каждом этапе: ГК-оценки коэффициента представляют собой ответ каждого образца на каждый ГК; ГК-нагрузки представляют собой относительную важность каждой точки данных в исходных спектрах по отношению к ГК. PCA имеет множество применений, например, в спектральной интерпретации, но наиболее широко он используется при идентификации спектральных выбросов.

Регрессия на главные компоненты (PCR) использует оценки коэффициента на каждом ГК в качестве регрессоров в множественной линейной регрессии по отношению к значениям Y, представляющим собой состав образцов. Поскольку каждый ГК является ортогональным по отношению к любому другому ГК, то оценки коэффициента образуют некоррелированный набор данных с более лучшими характеристиками, чем исходные спектры. Хотя можно выбрать комбинацию ГК для регрессии на основе того, насколько хорошо каждый ГК коррелирует с компонентом, представляющим интерес, большинство коммерческих программ вынуждают регрессию использовать все ГК вплоть до самых старших ГК, выбранных для модели («подход сверху вниз»). При использовании в рамках БИКС, коэффициенты регрессии в ГК-диапазоне, как правило, преобразуются обратно в модель прогнозирования с использованием всех точек данных в диапазоне длин волн.

Регрессия методом дробных наименьших квадратов (PLS) представляет собой аналитический метод, который, как и PCA, является одной из форм представления данных в компактной форме (сжатия данных). В рамках PLS, правило,

используемое для получения коэффициентов, заключается в том, что каждый коэффициент последовательно максимизирует ковариацию между данными Y и всевозможными линейными комбинациями данных X . PLS поэтому является неким балансом между дисперсией и корреляцией, причем каждый коэффициент находится под влиянием обоих этих воздействий. PLS-коэффициенты, следовательно, более напрямую связаны с изменчивостью значений Y , чем главные компоненты. PLS влечет за собой появление трех новых переменных: нагрузочные веса (которые не являются ортогональными друг к другу), нагрузки и оценки коэффициента, которые оба ортогональны. PLS-модели получают посредством регрессии PLS-оценок коэффициента по отношению к значениям Y . Как и в случае PCR, при использовании в рамках БИКС, коэффициенты регрессии в PLS-диапазоне, как правило, преобразуются обратно в модель прогнозирования с использованием всех точек данных в диапазоне длин волн.

Множественная линейная регрессия (MLR) использует комбинацию нескольких переменных X , чтобы предсказать одну переменную Y . В рамках БИКС, значения X представляют собой либо значения показателя поглощения при определенных длинах волн в ближнем инфракрасном диапазоне, либо производные переменные, как, например, PCA- или PLS-оценки.

Искусственные нейронные сети (ANN) описывают нелинейный метод моделирования, в общих чертах основанный на архитектуре биологических нейронных систем. Сеть изначально «обучается» путем предоставления ей набора данных с несколькими значениями X (спектральных или производных переменных, таких как PCA-оценки) и эталонными значениями Y . В процессе обучения архитектура сети может быть изменена, а нейронам могут назначаться весовые коэффициенты для одновременно входных и выходных данных для получения наилучших возможных прогнозов значений параметров. Нейронные сети требуют получения большого количества данных в процессе обучения.

Многомерная модель. Любая модель, где несколько значений X используется для прогнозирования одной или нескольких переменных Y .

Выбросы – это точки в любом наборе данных, которые могут быть показаны статистически как характеризующиеся значениями, которые лежат далеко за пределами области распределения. Для БИКС-данных, выбросы, как правило, классифицируются как X (спектральные) выбросы или Y (справочные или эталонные) выбросы.

X-выбросы относятся к БИК-спектру. X-выброс может являться спектральной зависимостью неисправности прибора или вытекать из типа образца, который радикально отличается от других образцов, или при прогнозировании являться типом образца, не включенным в исходный калибровочный набор.

Y-выбросы – это выбросы, связанные с ошибками в справочных данных, например, ошибка при записи данных или ошибка в значении, полученном справочной (поверочной) лабораторией.

Балансировка. Мера того, насколько далеко выборка находится от центра всей совокупности, определяемой моделью. Образцы с высоким уровнем балансировки имеют высокое влияние на модель. Уровень балансировки рассчитывается путем измерения расстояния между прогнозной точкой и центром модели.

Расстояние Махаланобиса. Расстояние в ГК-диапазоне между точкой данных и центром ГК-диапазона (см. h -значение ниже). Это нелинейное измерение. В ГК-диапазоне набор образцов обычно формирует распределение кривой формы. Эллипсоида, наилучшим образом представляющая распределение вероятностей набора, может быть оценена путем построения матрицы ковариации образцов. Расстояние Махаланобиса – это просто расстояние до контрольной точки от центра совокупности, разделенное на ширину эллипсоида в направлении контрольной точки.

h -значение. В некоторых программных продуктах расстояние Махаланобиса называется как «Глобальное h -значение», а обнаружение выбросов зависит от того, на сколько стандартных отклонений h образец отстает от центра. Вторая мера «Окрестности h » – это расстояние в ГК-диапазоне между точкой данных и ее ближайшими « n » соседями, и она указывает на то, является ли образец изолированным или находится в хорошо населенной части распределения.

Остаток. Разница между справочным значением и значением, предсказанным регрессионной моделью. Используется при расчете регрессионной статистики.

Тестовый набор. При тестировании регрессионной модели, любой набор образцов, который исключает те, которые используются для осуществления калибровки.

Независимый тестовый набор. Тестовый набор, который состоит из образцов, полученных из различных географических регионов, полученных от нового завода (в промышленном отношении) или собранных в более позднее время (например, в разное время сбора урожая), чем те, которые используются для создания и проверки регрессионной модели. Эти образцы помогают провести «истинный» анализ модели прогнозирования.

Проверочный набор. Образцы, используемые для проверки или «подтверждения» калибровки. Обычно образцы, имеющие те же характеристики, что и выбранные для калибровки. Часто альтернативные или n -е образцы (приведенные в порядке их приоритетности) выделяются для калибровочных и проверочных наборов данных из того же множества образцов.

Проверочные образцы. См. выше.

Перекрестная проверка. Способ формирования прогнозных статистических данных, где, на постоянной основе, множество образцов удаляется из калибровочной совокупности, модель рассчитывается на основе остальных образцов, а остатки рассчитываются на основе проверочного подмножества. После того, как этот процесс был запущен несколько раз, прогнозные статистические данные рассчитываются на основе всех остатков.

Полная перекрестная проверка отбрасывает один образец за раз и запускается n раз (где имеется n калибровочных образцов). Когда удаляется более широкое подмножество, то цикл перекрестной проверки, как правило, запускается по меньшей мере восемь раз, прежде чем рассчитываются статистические данные. Наконец, модель рассчитывается с использованием всех калибровочных образцов. Перекрестную проверку следует использовать с осторожностью. Во-первых, статистические данные по итогам перекрестной проверки, как правило, более оптимистичны по сравнению с теми, которые были получены для независимого тестового набора. Во-вторых, необходимо быть внимательным, если существует какое-либо

дублирование в калибровочных данных (например, тот же образец проанализирован на нескольких приборах или в разное время), чтобы всегда назначать все копии одного и того же образца одному и тому же сегменту перекрестной проверки; в противном случае мы получаем очень оптимистичные статистические данные.

Переподгонка. Добавление слишком большого количества регрессионных условий во множественную линейную регрессию. В результате, когда прогноз делается в отношении образцов, не входящих в калибровочный набор, статистические выкладки, такие как RMSEP или SEP, намного скуднее, чем ожидалось.

PLS-коэффициенты. См. PLS выше.

Оценки/графики с оценками. Графики, где оценки для одного ГК или PLS-коэффициента наносятся на график относительно оценок для другого ГК или PLS-коэффициента. Наиболее полезным является случай, когда ID образца или значения концентрации используются для идентификации каждой точки на графике. Могут быть видны закономерности в данных, которые не очевидны в исходных данных.

Статистические выражения

Смещение. Разница между средним справочным значением и средним значением, предсказанным для БИК-модели.

SEC. Для любой калибровочной модели Стандартная ошибка калибровки (SEC) представляет собой среднюю разницу между прогнозируемыми и эталонными значениями для образцов, используемых для получения модели. В этой и последующих статистических выкладках это выражение средней разницы относится к квадратному корню из суммы квадратов остаточных значений, деленному на число значений с поправкой на степени свободы, то есть предел, который охватывает 68% ошибок. Это необходимо, так как некоторые остатки положительны, а другие отрицательны.

SECV. Для калибровочной модели Стандартная ошибка перекрестной проверки (SECV) представляет собой скорректированную с учетом смещения среднюю разницу между прогнозируемыми и справочными значениями для подмножества образцов, выбранных в качестве прогнозных образцов во время процесса перекрестной проверки (см. «Перекрестная проверка» выше).

SEP. Стандартная ошибка прогнозирования (SEP) представляет собой скорректированную с учетом смещения среднюю разницу между прогнозируемыми и справочными значениями, предсказанную регрессионной моделью при применении к набору образцов, не включенных в деривацию модели.

RMSEP. Среднеквадратическая ошибка прогнозирования (RMSEP) представляет собой среднюю разницу между справочными значениями и значениями, предсказанными регрессионной моделью при применении к набору образцов, не включенных в деривацию модели. *ПРИМЕЧАНИЕ:* RMSEP включает в себя любые смещения в прогнозных данных.

RMSECV. Среднеквадратическая ошибка перекрестной проверки (RMSECV) представляет собой среднюю разницу между прогнозируемыми и справочными значениями для подмножества образцов, выбранных в качестве прогнозных образцов во время процесса перекрестной проверки (см. «Перекрестная проверка» выше). *ПРИМЕЧАНИЕ:* RMSECV включает в себя любые смещения в прогнозных данных.

Справочники ФАО «Вопросы животноводства и охраны здоровья животных»

1. Small-scale poultry production, 2004 (A, Ap, Ф)
2. Good practices for the meat industry, 2006 (A, Ap, Ф, И)
3. Preparing for highly pathogenic avian influenza, 2006 (A, Ap, И^e, Ф^e, Мк^e)
3. Revised version, 2009 (A)
4. **Наблюдение за вирусом высокопатогенного птичьего гриппа у диких птиц – коллекция образцов, взятых у здоровых, больных и погибших птиц**, 2007 (A, Ф, P, Ap, Ин, Б, Мн, И^e, К^e)
5. **Дикие птицы и птичий грипп – Введение в прикладное полевое исследование и методы отбора проб для диагностики**, 2009 (A, Ф, P, Ap, Ин, Б, И^{**})
6. Compensation programs for the sanitary emergence of HPAI-H5N1 in Latin American and the Caribbean, 2008 (A^e, И^e)
7. The AVE systems of geographic information for the assistance in the epidemiological surveillance of the avian influenza, based on risk, 2009 (A^e, И^e)
8. **Пособие по подготовке чрезвычайных планов действий на случай эпидемии африканской чумы свиней**, 2011 (A, Ф, P, Арм, Гр, И^e)
9. Good practices for the feed industry – implementing the Codex Alimentarius Code of Practice on good animal feeding, 2009 (A, Ap, K, Ф^{**}, И^{**}, П^{**})
10. Epidemiología Participativa – Métodos para la recolección de acciones y datos orientados a la inteligencia epidemiológica, 2011 (И^e)
11. Good Emergency Management Practices: The essentials, 2011 (A, Ф, И^{*})
12. Investigating the role of bats in emerging zoonoses – Balancing ecology, conservation and public health interests, 2011 (A)
13. Rearing young ruminants on milk replacers and starter feeds, 2011 (A)
14. **Обеспечение качества работы лабораторий по анализу кормов для животных**, 2013 (A, P^{**})
15. Conducting national feed assessments, 2012 (A)
16. Quality assurance for microbiology in feed analysis laboratories, 2013 (A)

Наличие: июнь 2013 года

A – английский	Б – бенгальский
Ap – арабский	Мн – монгольский
И – испанский	Арм – армянский
К – китайский	Гр – грузинский
P – русский	
Ф – французский	Многояз. – Многоязычная публикация
П – португальский	* Вышла из печати
Мк – македонский	** На стадии подготовки
Ин – индонезийский	^e Электронная публикация

Публикацию *Справочники ФАО «Вопросы животноводства и охраны здоровья животных»* можно приобрести у уполномоченных агентов по продажам ФАО или непосредственно через Группу по вопросам продаж и маркетинга по адресу:
Sales and Marketing Group, FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy.



Каждый сектор отрасли животноводства, связанные с ним услуги и благополучие одновременно животных и людей находятся в непосредственной зависимости от питания животных. Наличие точных, достоверных и воспроизводимых аналитических данных анализов необходимо для разработки правильного состава кормов. Только достоверные аналитические данные могут привести к получению значимых научных данных.

В данном документе всесторонне рассматриваются принципы надлежащей лабораторной практики, процедуры обеспечения качества и примеры стандартных операционных процедур, используемых в отдельных специализированных лабораториях. Внедрение этих практик и процедур поможет лабораториям в плане признания их компетентности, что является необходимым условием для их сертификации или аккредитации, а также будет способствовать повышению качества данных, представляемых лабораториями по анализу кормов. Кроме того, следование принципам надлежащей лабораторной практики, представленным в документе, будет способствовать повышению безопасности работников лабораторий. Документ будет полезен для специалистов лабораторий, руководителей лабораторий, студентов-исследователей и преподавателей, и есть надежда, что он позволит специалистам отрасли животноводства, включая отрасль производства аквакультур, понять важность обладания проверенными достоверными данными и связанными с ними подходами по обеспечению качества. Дополнительная польза от внедрения и принятия этих подходов будет заключаться в укреплении научно-образовательного потенциала студентов, выпускаемых научно-исследовательскими учреждениями, и улучшении торговых отношений между развивающимися и развитыми странами. Это приведет к долгосрочным выгодам и будет способствовать привлечению инвестиций в развитие кормовой промышленности и функционирование научно-исследовательских учреждений.

ISBN 978-92-5-407050-2 ISSN 1996-1766



9 789254 070502

I2441R/1/07.13