Службен весник на Република Македонија

Број 151 | 30 ноември 2012, петок | година LXIX

www.slvesnik.com.mk | contact@slvesnik.com.mk

СОДРЖИНА

		Стр.
3661.	**Указ** за отповикување од должноста вонреден и ополномоштен амбасадор на Република Македонија во Чешката Република.......................	2
3662.	**Уредба** за методологијата за утврдување на критериуми за распределба на блок дотации за јавните установи за социјална заштита - домови за стари лица за 2013 година..	2
3663.	**Правилник** за начинот и постапката за земање примероци, начин и методи на вршење на лабораториски анализи на храната за животни (*)......................	3
3664.	**Правилник** за организацијата, работата, начинот на одлучување, методологијата за акредитација и евалуација, стандардите за акредитација и евалуација, како и други прашања во врска со работата на одборот за акредитација и евалуација на високото образование	163
	Огласен дел......................................	1-12

ПРЕТСЕДАТЕЛ НА РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

3661.

Врз основа на член 84, алинеја втора од Уставот на Република Македонија („Службен весник на Република Македонија“ бр. 52/91), донесувам

У К А З
ЗА ОТПОВИКУВАЊЕ ОД ДОЛЖНОСТА ВОНРЕДЕН И ОПОЛНОМОШТЕН АМБАСАДОР НА РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА ВО ЧЕШКАТА РЕПУБЛИКА

I

Г. Игор Илиевски се отповикува од должноста вонреден и ополномоштен амбасадор на Република Македонија во Чешката Република, со седиште во Прага.

II

Министерот за надворешни работи ќе го изврши овој указ.

III

Овој указ влегува во сила со денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија“.

Указ бр. 122
29 ноември 2012 година
Скопје

Претседател
на Република Македонија,
д-р **Ѓорге Иванов,** с.р.

ВЛАДА НА РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

3662.

Врз основа на член 12 став 2 од Законот за финансирање на единиците на локалната самоуправа (“Службен весник на Република Македонија” бр. 61/04, 96/04, 67/07, 156/09 и 47/11), Владата на Република Македонија, на седницата одржана на 24.11.2012 година, донесе

У Р Е Д Б А
ЗА МЕТОДОЛОГИЈАТА ЗА УТВРДУВАЊЕ НА КРИТЕРИУМИ ЗА РАСПРЕДЕЛБА НА БЛОК ДОТАЦИИ ЗА ЈАВНИТЕ УСТАНОВИ ЗА СОЦИЈАЛНА ЗАШТИТА - ДОМОВИ ЗА СТАРИ ЛИЦА ЗА 2013 ГОДИНА

Член 1

Со оваа уредба се пропишува методологијата за утврдување на критериуми за распределба на блок дотациите од Буџетот на Република Македонија за 2013 година за јавните установи за социјална заштита - домови за стари лица, по општини кои ги исполниле условите за пристап до блок дотациите за финансирање на пренесените надлежности.

Член 2

Согласно Буџетот на Република Македонија за 2013 година во Раздел 15.001 – Министерство за труд и социјална политика, програма А, потпрограма А2 – Пренесување на надлежностите на ЕЛС, ќе се врши финансирање за дејноста социјална заштита-домови за стари лица.

Член 3

Распределбата на блок дотации се врши според следните критериуми:

- основна сума по корисник за сместување во општински јавни установи за стари лица согласно состојбата на корисникот, подвижен или неподвижен и партиципацијата на корисникот во услугата, со вкалкулирани трошоци за греење за 2 (два) месеца повеќе од останатите општински јавни установи за стари лица каде што периодот на греење значително е подолг од периодот на греење во останатите општини;
- бројот на сместени лица (корисници на социјална услуга) во општински јавни установи за стари лица;
- број на вработени во општински јавни установи за стари лица.

Член 4

Распределбата на блок дотации се врши според следната формула:

BD i социјална заштита = OS i x Коефициент i

OS i = T x Br i

BD i социјална заштита – претставува блок дотација за сместување на стари лица во општинските јавни установи за стари лица, по општина;

OS i – претставува основна сума по корисник годишно за сместување на стари лица во општинските јавни установи за стари лица, по општина;

T – претставува трошок (цена) по корисник годишно за сместување на стари лица во општинските јавни установи за стари лица, по општина. Трошокот (цената) по корисник е утврдена во зависност од состојбата на корисникот (подвижен или неподвижен корисник) и партиципација на корисникот во трошоците на услугата.

Br i – претставува фактички број на социјални корисници во општинските јавни установи за стари лица, по општина;

Коефициент i – преставува коефициент според бројот на вработени во општинските јавни установи за стари лица, по општина.

Член 5

Средствата за блок дотации за јавните установи за социјална заштита - домови за стари лица, се насочуваат во општините каде што е седиштето на установата, од Буџетот на Република Македонија преку Министерството за труд и социјална политика, месечно или во динамика договорена со Министерството за финансии.

Член 6

Оваа уредба влегува во сила осмиот ден од денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија", а ќе се применува од 1 јануари 2013 година.

Бр. 41-8655/1
24 ноември 2012 година
Скопје

Заменик на претседателот
на Владата на Република
Македонија,
м-р **Владимир Пешевски,** с.р.

АГЕНЦИЈА ЗА ХРАНА И ВЕТЕРИНАРСТВО

3663.

Врз основа на член 44 став (4) точка 14 од Законот за безбедност на храната („Службен весник на Република Македонија" бр. 157/10, 53/11 и 1/12), директорот на Агенција за храна и ветеринарство донесе

ПРАВИЛНИК ЗА НАЧИНОТ И ПОСТАПКАТА ЗА ЗЕМАЊЕ ПРИМЕРОЦИ, НАЧИН И МЕТОДИ НА ВРШЕЊЕ НА ЛАБОРАТОРИСКИ АНАЛИЗИ НА ХРАНАТА ЗА ЖИВОТНИ (*)

Член 1

Со овој правилник се пропишува начинот и постапката за земање примероци, начин и методи на вршење на лабораториски анализи на храната за животни.

Член 2

Начинот на земањето примероци заради спроведување на службените контроли на храна за животни, во поглед на определување на конституентите, адитивите и непожелни супстанци, со исклучок на резидуи од пестициди и микроорганизми, се врши согласно методите дадени во Прилог 1 кој е составен дел на овој правилник.

Член 3

Подготовката на примероците за анализа и презентација на резултатите се врши согласно методите кои се дадени во Прилог 2 кој е составен дел на овој правилник.

Член 4

(1) Лабораториските анализи за службени контроли на храна за животни се вршат со користење на методите дадени во Прилозите 3, 4, 5, 6 и 7 кои се составни делови на овој правилник.

(2) Методите на анализа за контрола на составот на суровините на храната за животни и крмните смеси се дадени во Прилог 3 на овој правилник.

(3) Методите на анализа за контрола на нивото на одобрени адитиви во храната за животни се дадени во Прилог 4 на овој правилник.

(4) Методите на анализа за контрола на непожелни супстанции во храната за животни се дадени во Прилог 5 на овој правилник.

(5) Методи за анализа за определување на состојките од животинско потекло, за официјална контрола на храна за животни се дадени во Прилог 6 на овој правилник.

Член 5

Методите на пресметување на енергетската вредност на храна за живина се дадени во Прилог 7 на овој правилник.

Член 6

Методите на анализа за контрола на недозволено присуство во храната за животни на адитиви кои повеќе не се одобрени и се користат за потврдни цели се дадени во Прилог 8 кој е составен дел на овој правилник.

Член 8

Овој правилник влегува во сила осмиот ден од денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија", а ќе отпочне да се применува од 1 јануари 2013 година.

Бр. 21-2265/5
29 октомври 2012 година
Скопје

Директор,
Дејан Рунтевски, с.р.

(*) Со овој правилник се врши усогласување со Регулативата на Комисијата (ЕК) 152/2009 со која се пропишуваат начините на земање мостри и анализи за целите на службените контроли на храна за животни; ЦЕЛЕКС бр. 32009R0152

Прилог 1

Методи на земање на примероци

1. Предмет

Примероците наменети за официјални контроли на храна за животни се земаат согласно методите наведени во овој Прилог . Земените примероците се сметаат за репрезентативен дел од делот земен примерок.

2. Персонал задолжен за земање примероци

Примероците се земаат од страна на лица кои се овластени за таа цел од страна на Агенцијата за храна и ветеринарство (во понатамошниот текст: Агенцијата).

3. Дефиниции

'Дел земен за примерок': количество на производ кој сочинува единица и има карактеристики кои се претпоставува дека се униформни;

'Поединечен примерок': количество земено од едно место на делот земен за примерок;

'Збирен примерок': збир на поединечни примероци земени од истиот дел земен за примерок;

'Редуциран примерок': помал, репрезентативен, дел на збирниот примерок, и

'Конечен примерок': дел од редуцираниот примерок или на хомогенизиран збирен примерок.

4. Инструменти

4.1. Инструментите за земање примероци треба да се направени од материјали кои не можат да ги контаминираат производите од кои се земаат примероците.

4.2. Инструменти за земање примероци од цврста храна за животни.

4.2.1. Рачно земање примероци

4.2.1.1. Лопатка со рамно дно и вертикални страни.

4.2.1.2. Сонда со долг прорез или комори. Димензиите на сондата треба да бидат соодветни на карактеристиките на делот земен за примерок (длабочина на садот, дименизиите на вреќата итн.) и на големината на честиците на храната за животни.

4.2.2. Механичко земање примероци
Може да се користи одобрен механички уред за земање примероци од храна за животни.

4.2.3. Апарат за разделување

Може да се користи апарат наменет за разделување на примерокот на приближно исти делови, како и за земање поединечни примероци и за подготовка на редуцирани и конечни примероци.

5. Квантитативни барања

5.А.	Поврзано со контролата на супстанции или производи кои се еднакво распределени во храната за животни.	
5.А.1	**Дел земен за примерок** Големината на делот земен за примерокот треба да е таква што од секој од нејзините составни делови може да се земе примерок.	
5.А.2.	**Поединечни примероци**	
5.А.2.1.	Кабаста храна за животни	Минимален број на поединечни примероци:
5.А.2.1.1.	Делови земени за примероци кои не надминуваат 2,5 тони	седум
5.А.2.1.2.	Делови земени за примероци кои надминуваат 2,5 тони	√ 20 пати бројот на тони кои го сочинуваат делот земен за примерок(*), до најмногу 40 поединечни примероци
5.А.2.2.	Пакувана храна за животни:	Минимален број на пакувања од кои ќе се земат примероци(**):
5.А.2.2.1.	Пакувања потешки од 1 кг:	
5.А.2.2.1.1.	Делови земени за примероци од еден до четири пакувања	Сите пакувања
5.А.2.2.1.2	Делови земени за примероци од 5 до 16 пакувања	четири
5.А.2.2.1.3.	Делови земени за примероци од повеќе од 16 пакувања	√ број на пакувања кои го сочинуваат делот земен за примерок(*), до најмногу 20 пакувања
5.А.2.2.2.	Пакувања кои не надминуваат 1 кг	четири
5.А.2.3.	Течна или полутечна храна за животни :	минимален број на контејнери од кои ќе биде земен примерок (**):
5.А.2.3.1.	Садови од повеќе од еден литар:	
5.А.2.3.1.1.	Делови земени за примерок од еден до четири садови	сите садови
5.А.2.3.1.2.	Делови земени за примерок од 5 до 16 садови	четири
5.А.2.3.1.3.	Делови земени за примерок од повеќе од 16 садови	√ број на садови кои го сочинуваат делот земен за примерок(*), до најмногу 20 садови
5.А.2.3.2.	Садови кои не надминуваат еден литар	четири
5.А.2.4.	Храна за животни во блокови или минерали за лижење	Минимален број на блокови или грутки за лижење за примерок (**): еден блок или грутка за лижење по дел земен за примерок од 25 единици до

		максимум четири блокови или грутки за лижење
5.A.3.	**Збирен примерок** Потребна е еден единствен збирен примерок од делот земен за примерок. Вкупниот број на поединечни примероци кои го сочинуваат збирниот примерок не треба да е помалку од следното:	
5.A.3.1.	Храна за животни во рефусна состојба	4 кг
5.A.3.2.	Пакувана храна за животни:	
5.A.3.2.1.	Пакувања од повеќе од 1 кг	4 кг
5.A.3.2.2.	Пакувања кои не надминуваат 1 кг	Тежина на содржината од четири оригинални пакувања
5.A.3.3.	Течна или полу-течна храна за животни:	
5.A.3.3.1.	Садови од повеќе од еден литар	Четири литри
5.A.3.3.2.	Садови кои не надминуваат еден литар	волумен на содржината на четири оригинални садови
5.A.3.4.	Храна за животни во блокови или минерали за лижење:	
5.A.3.4.1.	Секој тежи повеќе од 1 кг	4 кг
5.A.3.4.2.	Секој не тежи повеќе од 1 кг	Тежина на четири оригинални блокови или грутки за лижење
5.A.4.	**Конечни примероци** Збирниот примерок го дава конечниот примерок со редуцирање, кога е потребно. Потребна е анализа на барем еден конечен примерок. Количината во крајниот примерок не треба да биде помалку од:	
	Цврста храна за животни	500 г
	Течна или полутечна храна за животни	500 мл
5.B.	Во поглед на контролата на непожелни супстанци или производи кои е можно да се присутни во нееднакви количества во храната за животни, како на пример афлатоксини, мораво рогче , рицинус, кроталарија во храната за животни (***)	
5.B.1.	**Дел земен за примерок** : види 5.A.1.	
5.B.2.	**Поединечни примероци**	
5.B.2.1.	Храна за животни во рефусна состојба: види 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Пакувана храна :	минимален број на пакувања за примерок:
5.B.2.2.1.	Делови земени за примероци од едно до четири пакувања	сите пакувања
5.B.2.2.2.	Делови земени за примероци од 5 до 16 пакувања	четири
5.B.2.2.3.	Делови земени за примероци од повеќе од 16 пакувања	√ број на пакувања кои сочинуваат дел за примерок(*), до најмногу 40 пакувања
5.B.3.	**Збирни примероци** Бројот на збирни примероци варира според големината на делот земен за примерок. Максималниот број на збирни примероци по дел земен за примерок е даден подолу. Вкупната тежина на поединечни примероци кои го сочинуваат секој збирен примерок не	

	треба да биде помалку од 4 кг.	
5.В.3.1.	Храна за животни во рефусна состојба	
	Тежина на дел земен за примерок во метрички тони:	Минимален број на збирни примероци по дел земен за примерок:
	До 1	1
	Повеќе од 1 и до 10	2
	Повеќе од 10 и до 40	3
	Повеќе од 40	4
5.В.3.2.	Пакувана храна за животни	
	Големина на делови за примерок според број на пакувања:	Минимален број на збирни примероци по дел земен за примерок:
	1 до 16	1
	17 до 200	2
	201 до 800	3
	Повеќе од 800	4
5.В.4.	**Конечни примероци** Секој збирен примерок ги дава конечните примероци преку редукција. Потребна е анализа на барем еден конечен примерок *на збирен примерок*. Тежината на конечниот примерок за анализа не треба да е помалку од 500 г.	

(*) Кога добиениот број е дропка, треба се заокружи на следниот цел број.
(**) За пакувања или садови чија содржина не надминува 1 кг. или еден литар или блокови или грутки за лижење кои не тежат повеќе од 1 кг. секое, поединечниот примерок ќе биде содржината на едно оригинално пакување или сад, еден блок или една лижалка.
(***) Методите дадени за 5.А да се употребат за контрола на афлатоксини, мораво рогче, рицинус, кроталарија во целосна и дополнителна храна за животни.

6. Упатства за земање, подготовка и пакување на примероци

6.1. Општо

Примероците треба да се земат и подготват колку е можно побрзо земајќи ги во превид неопходните мерки на претпазливост со цел да се осигура дека производот не е променет ниту контаминиран. Инструментите, како и површините и садовите наменети за примероци треба да се чисти и суви.

6.2. Поединечни примероци

6.2.А. При контролата на супстанците од производите рамномерно измешани во храната за животни

Поединечните примероци треба да се земат по случаен избор во целиот дел земен за примерок и мора да се со приближно еднаква големина.

6.2.А.1. Храна за животни во рефусна

Се прави имагинарна поделба од делот за примерокот во број на приближно еднакви делови. Бројот на делови кои одговараат на бројот на поединечни примероци прикажан во согласност со 5.А.2 ќе биде селектиран по случаен избор и најмалку еден примерок од секој од деловите.

Кога условите дозволуваат, земањето примероци може да се изврши кога делот за примерок се преместува (утовар или истовар).

6.2.А.2. Пакувана храна за животни

По селектирањето на потребниот број на пакувања за примерок како што е прикажано во 5.А.2, дел од содржината на секое пакување се зема со сонда или лопатка. Каде што е потребно, примероците ќе се земат по поединечно празнење на пакувањата. Грутките треба да се раскршат, доколку е неопходно, со одделување и враќање во примерокот, во секој збирен примерок одделно.

6.2.А.3.Хомогени или лесно хомогенизирачка течна или полутечна –храна за животни

По селектирањето на потребниот број на садови за примерок како што е прикажано во 5.А.2, содржините треба да се хомогенизираат ако е потребно и да се земе дел од секој сад. Поединечните примероци може да се земат кога состојките се ослободени.

6.2.А.4. Нехомогенизирачка,течна или полутечна –храна за животни

По селектирањето на потребниот број на садови за примерок како што е прикажано во 5.А.2, примероците може да се земат на различни нивоа.

Примероците исти така може да се земат кога состојките се ослободени, но првите фракции ќе се отфрлат.

Во секој случај вкупното земено количество не треба да е помало од 10 литри.

6.2.А.5.Блокови храна за животни и минерали за лижење

По селектирањето на потребниот број на блокови или грутки за лижење за примерок како што е покажано во 5.А.2, треба да се земе дел од секој блок.

6.2.В. При контролата на непожелните супстанци или продукти кои е можно да се присутни нееднакво во храната, како афлатоксини, мораво рогче, рицинус, кроталарија во храната за животни.

Се прави една замислена поделба на делот за примерок во број на приближно еднакви делови, кои одговараат на бројот на збирни примероци земени за таа цел прикажани во 5.В.3. Ако бројот е поголем од еден, вкупниот број на поединечни примероци земени за таа цел во 5.В.2 ќе се распореди приближно еднакво кај различните делови. Потоа се земаат примероци од приближно иста големина ([1]) (недостасува фуснотата!!!) така што вкупниот број на примероци од секој дел не е помал од најмалку 4кг потребна количина за секој збирен примерок. Поединечните примероци земени од различни делови нема да бидат споени.

6.3. Подготовка на збирни примероци

6.3. При контрола на супстанци или производи кои се еднакво застапени во храната за животни

Поединечните примероци ќе се измешаат за да формираат еден единствен збирен примерок.

6.3.В. При контролата на непожелните супстанци или производи кои е можно да се присутни нееднакво во храната за животни, како афлатоксини, мораво рогче, рицинус, кроталарија во добиточната храна.

Поединечните примероци од секој дел од делот земен за примерок ќе се измешаат и бројот на збирни примероци за таа цел даден во 5.В.3, направени водејќи сметка да се забележи потеклото на секој збирен примерок.

6.4. Подготовка на конечните примероци

Материјалот за секој збирен примерок треба внимателно да се измеша за да се добие хомогенизиран примерок ([1]) (фуснотата недостаства!!!). Ако е потребно збирниот примерок најпрво ќе се редуцира на најмалку 2 кг или два литри (редуциран примерок) преку употреба на механички или автоматски уред за делење или преку метод на половење.

Се подготваат најмалку три конечни примероци со приближно истата количина и според квантитативните потреби од 5.А.4 или 5.В.4. Секој примерок се стави во соодветниот сад. Се преземат сите неопходни мерки на претпазливост за да се избегне било каква промена во составот на примерокт, контаминација или уништување кои може да се случат при превозот или складирањето.

6.5. Пакување на конечни примероци

Садовите или пакувањата треба да бидат запечатени и етикетирани (вкупната етикета мора да биде дел од печатот) на начин да не можат да се отворат без да се оштети печатот.

7. Евиденција за примероците

Мора да се води евиденција за секое земање примерок, со што се овозможува секој дел на примерок да биде јасно идентификуван.

8. Дестинација на примероците

За секој збирен примерок, во најкраток рок се праќа најмалку еден конечен примерок до овластената лабораторија за анализи, заедно со потребните информации за аналитичарот.

Прилог 2

Општо за методите на анализа на храната за животни

А. Подготовка на примероците за анализа

1. Намена

Постапките дадени подолу се однесуваат на подготовка за анализа на конечните примероци, испратени до лабораториите за контрола по земањето примероци во согласност со одредбите од Прилог 1 на овој правилник.

Примероците треба да се подготвени на начин со кој измерените количества, како што е дадено во методите за анализа, се хомогени и репрезентативни на конечните примероци.

2. Мерки на претпазливост

Постапката за подготовка на примероците која треба да се применува зависи од користените методи на анализа. Затоа многу е важно да се осигура дека постапката за подготовка на примероците која се применува одговара на користениот метод на анализа.

Сите потребни операции треба да се изведуваат на начин со кој се избегнува колку што е можно контаминација на примерокот или промена на неговиот состав.

Мелење, мешање или просејување треба да се врши што е можно побрзо со минимално изложување на примерокот на воздух и светло. Мелници и блендери кои значително го загреваат примерокот не треба да да се употребуваат.

Рачното мелење се препорачува за храна за животни која е особено чувствителна на топлина. Треба исто така да се внимава самиот апарат да не претставува извор на контаминација на елементи во траги.

Доколку подготовката не може да се изведе без значителни промени во количеството на влага во составот на примерокот, количеството на влага треба да се одреди пред и по подготовката со користење на методите прикажани во дел А од Прилог 3 од овој правилник.

3. Постапка

Примерокот се дели на соодветни под-примероци за анализа и референтни примероци со користење на соодветни техники за поделба како поделба со лопатка, стационарно или ротационо делење. Не се препорачува поделба со конусен делител и половење бидејќи може да даде под-примероци со голема грешка во поделбата. Референтниот примерок треба да се чува во соодветен чист и сув сад, опремен со херметички затворач и да се подготват под-примероците за анализа на најмалку 100g како што е посочено подолу.

3.1. Храна за животни која може да се сомеле

Освена ако не е поинаку назначено во методите за анализа, треба да се просее целиот примерок низ сито со квадратна мрежа од окца со страни од

1mm (во согласност со препораката ISO R565), а потоа да се измеле ако е потребно. Прекумерно мелењетреба да се избегнува.

Просејаниот примерок треба да се измеша и да се собере во погоден чист, сув сад со херметички затварач и повторно да се измеша, веднаш пред мерењето на количината за анализа.

3.2. **Храна која може да се сомеле по сушењето**

Освен поинаку специфицирано во методите за анализа, примерокот треба да се исуши за да се намали содржината на влага до ниво од 8% до 12%, според прелиминарната постапка за сушење опишана во точка 4.3. од методот за определување на влага спомената во дел А од Прилог 3 на овој правилник а потоа треба да се продолжи како што е наведено во дел 3.1.

3.3. **Течна или полу-течна храна**

Примерокот треба да се собере во пригоден чист и сув сад, опремен со херметички затварач. Количината за анализа треба да се измеша целосно веднаш пред мерењето на тежината.

3.4. **Друга храна за животни**

Примероците кои не може да се подготват според една од горенаведените постапки треба да се третираат со која било постапка со која се постигнува измерените количини за анализа да бидат хомогени и репрезентативни на конечните примероци.

4. **Складирање на примероците**

Примероците треба да се чуваат на температура која нема да го измени нивниот состав. Примероците наменети за анализа на витамини или супстанци кои се особено чувствителни на светлина треба да се чуваат во садови со кафеаво стакло.

Б. **Одредби кои се однесуваат на реагенсите и уредите користени во методите на анализа**

(1) Освен ако не е поинаку назначено во методите на анализа, сите аналитички реагенси (АР) треба да се аналитички чисти. Кога се врши анализа на трага, чистотата на реагенсите мора да се провери со слепа проба. Во зависност од добиените резултати, може да е потребно дополнително прочистување на реагенсите.

(2) Секоја операција која се однесува на подготовка на раствори, разредување, испирање или миење, наведени во методите на анализа, без индикација за природата на растворувачот или разредувачот кои се употребени, значи дека треба да се користи вода. Како општо правило, водата треба да е деминерализирана или дестилирана. Во одредени случаи, кои се наведени во методите на анализа, водата треба да се подложи на посебни постапки на прочистување.

(3) Во однос на опремата која обично се наоѓа во лаборатории за контрола, само оние инструменти и апарати кои се посебни или имаат специфичен начин на употреба треба да се наведени во методите на анализа. Тие мора да бидат чисти, особено кога треба да се утврдат многу мали количества на супстанции.

В. Примена на методи на анализа и изразување на резултатите

1. **Постапка на екстракција**

Неколку методи имаат утврдена постапка на екстракција. Како општо правило, може да се применат и други постапки на екстракција различни од постапките наведена во методите под услов користената постапка на екстракција да има докажано еднаква ефикасност на екстракција за анализираната матрица како постапката наведена во методот.

2. **Постапка на чистење**

Неколку методи имаат утврдена постапка на чистење. Како општо правило, може да се применат и други постапки на чистење различни од постапките наведени во методите под услов докажано да резултираат со еквивалентни аналитички резултати за анализираната матрица како постапката наведена во методот.

3. **Известување на методот на анализа**

За определување на секоја супстанца во храната за животни утврден е единствен метод на анализа. Кога неколку методи се дадени, мора да се наведе методот кој се користи од страна на контролната лабораторија во извештајот на анализа.

4. **Број на одредувања**

Резултатот даден во извештајот на анализа треба да биде просечна вредност добиена од најмалку две одредувања, извршени на одделни делови на примерокот и на задоволителната повторливост.

Во случај на анализа на несакани супстанци, ако резултатот од првото одредување е значително (> 50%) понизок од спецификацијата која треба да се контролира, не се неопходни дополнителни одредувања, под услов да се применуваат соодветни постапки за контрола на квалитет.

Во случај на контрола на декларирана содржина на супстанца или состојка, ако резултатот од првото одредување ја потврдува декларираната содржина, односно аналитички резултат спаѓа во рамките на прифатливиот спектар на варијација на декларираната содржина, не се неопходни дополнителни одредувања, под услов да се применуваат постапки со соодветен квалитет.

Во некои случаи прифатливиот спектар на варијации е дефиниран во законската регулатива, како што е пропишано во Правилник за системите и процедурите кои треба да ги воведат операторите со храна за животни, како и начинот на означување и идентификација на храната која ќе биде ставена во промет за спроведување и обезбедување на следливоста на храната за животни, услови за начинот на декларирање, минималните информации кои се напишани на пакувањето, контејнерот, етикетата или придружниот документ, начинот на опишување на крмните смеси како и условите за ставање во промет на крмни смеси.

5. **Известување за аналитички резултат**

Аналитичкиот резултат се изразува на начин утврден во методот на анализа преку соодветен број на значајни показатели и се корегира доколку е потребно, во однос на содржина на влага на конечниот примерок пред подготовката.

6. **Мерење на несигурност и стапка на обновување во случај на анализа на несакани супстанции**

Што се однесува до несакани супстанции во рамките на Правилник за листа на непожелни супстанции во храната за животни и максимално дозволено ниво како и критичните точки за спроведување на истражување за идентификација на изворот и причините за пречекорување на максимално дозволеното ниво, вклучувајќи диоксини и полихрорирани бифенили кои се слични на диоксини, производ наменет за храна за животни ќе се смета дека не е во согласност со утврдената максимална содржина, ако аналитички резултат ја надминува максимална содржина земајќи ги во предвид несигурноста на проширените мерења и корекција на утврдената количина. Со цел да се процени усогласеноста, анализираната концентрација се користи откако е коригирана за утврдената количина и со одземање на несигурноста на проширеното мерење. Оваа постапка се применува само во случаите каде што методот на анализа овозможува проценка на несигурноста при мерењето и корекција на утврденото количество (на пример, не е можно во случај на микроскопска анализа).

Аналитичкиот резултат терба да бидат изразени така да (досега се користи метод на анализа кој овозможува да се процени несигурноста при мерење и стапка на утврдено количество):
(а) се корегиран за утврденото количество, нивото на утврдување да биде наведено. Исправката на утврденото количество не е потребна во случај на стапка на обновување кој изнесува помеѓу 90% и 110%;
(б) како " x +/- U ", при што x е аналитички резултат а U е неизвесност на проширено мерење, со користење на фактор на покриеност 2 која дава ниво на доверба од околу 95%.
Во случаи кога резултатот од анализата е значително (> 50%) понизок од спецификацијата кој треба да се контролира, и под услов на соодветен квалитет на применетите постапки, а анализата служи само со цел проверка на усогласеноста со законските одредби, аналитичките резултати може да се објават без корекција на утврденото количество, а известувањето за стапката на утврдување и несигурноста на мерењето може да се изостави.

ПРИЛОГ 3

Методи на анализа за контрола на составот на суровините на храната за животни и крмните смеси

А. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВЛАГА

1. Цел и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди содржина на влага во храна за животни. Во случај на храна за животни која содржи испарливи супстанции, како што се органски киселини, треба да се забележи дека, исто така, значително количество на испарливи супстанции се утврдуваат заедно со содржината на влага.

Овој метод не се однесува на анализа на производи од млеко кои се користат како суровина за храна за животни, анализа на минерални материи и смеси составени претежно од минерални супстанции, анализа на животински и растителни масти и масла или анализа на маслодајни семиња и плодови.

2. Начело

Примерокот се суши под одредени услови кои се разликуваат во зависност од природата на храната за животни. Загубата во тежина се утврдува со мерење. Неопходно е да се изврши претходно сушење во случај кога се работи за цврста храна за животни која има висока содржина на влага.

3. Апаратура

3.1. Мелница од материјал кој не апсорбира влага и кој е лесен за чистење, овозможува брзо раздробување, дури и без прекумерно загревање, колку што е можно спречува контакт со надворешниот воздух и ги задоволува барањата од точките 4.1.1 и 4.1.2 на овој Дел (на пример, микро-мелници со чекан или на водено ладење, склопувачки конусни мелници, ниско-обртни мелници или мелници со запчаници).

3.2. Аналитичка вага, со точност до 1 mg.

3.3. Суви садови од нерѓосувачки метал или од стакло со капаци кои обезбедуваат херметичко затворање; работна површина која овозможува тест-примерокот да се распореди на приближно 0,3 gr./cm^2.

3.4. Изотермична печка (± 2°C) со електрично греење правилно вентилирана и која овозможува брзо регулање на температурата.

3.5. Прилагодлива електрична вакуум печка опремена со пумпа за масло и или механизам за внес на топол сув воздух или агенс за сушење (на пример, калциум оксид).

3.6. Ексикатор со дебела метална или порцеланска перфорирана плоча која содржи ефикасен агенс за сушење.

4. Постапка

N.B. Постапките опишани во овој Дел треба да се спроведат веднаш по отворањето на пакувањата со примероци. Анализа треба да се изврши најмалку два пати едно по друго.

4.1. Подготовка

4.1.1. Храна за животни поинаква со исклучок на храната за животни од точките 4.1.2 и 4.1.3 на овој Дел

Се зема најмалку 50 gr. од примерокот. Доколку е потребно, се крши или дели на начин со кој се избегнува било каква промена во содржината на влага (види 6).

4.1.2. Житни растенија и зрна од житни растенија

Се зема најмалку 50 gr. од примерокот. Се дроби на честички од кои најмалку 50% ќе можат да поминат преку сито со мрежа со ширина од 0,5 mm, а на сито со кружна мрежа од 1mm нема да остане повеќе од 10% од честиците.

Вентилација мора да биде таква што, кога примероците од вообичаената количина на пченица колку што може да собере, се суши во период од два часа, резултатите се разликуваат за помалку од 0,15%, од оние добиени по четири часа сушење.

4.1.3. Течна или кашаста храна за животни, храна за животни во најголем дел составена од масла и масти.

Се земаат околу 25 gr. од примерокот, со прецизност од приближно 10 mg., се додадава соодветно количество дехидриран песок измерен со прецизност од 10 mg. и се меша додека не се добие хомогена смеса.

4.2. Сушење

4.2.1. Храна за животни со исклучок на храната за животни од точките 4.2.2 и 4.2.3 на овој Дел.

Сад со капак (точка 3.3 од овој Дел) се мери со прецизност од 1 mg. Во измерениот сад се мерат 5 gr. од примерокот, измерен со прецизност од 1 mg., и подеднакво се распределува. Садот, без неговиот капак, се става во печка претходно загреана на темература од 103°C.

Со цел да се спречи температурата во печката премногу да се намали, садот треба да се стави колку е можно побрзо. Се остава да се исуши во времетраење од четири часа пресметајќи од моментот кога температурата на печката ќе се врати на 103°C. Капакот повторно се става на садот, истиот се вади од рерната, се остава во ексикаторот (точка 3.6 од овој Дел) да се излади во времетраење од 30 до 45 минути и се мери со прецизност од 1 mg.

Во случај на храна за животни во најголем дел составена од масла и масти, истата треба да се суши во рерна дополнителни 30 минути на температура од 130°C. Разликата меѓу двете мерења не смее да надминува 0,1% од влагата.

4.2.2. Житни растенија, брашно, зрна од житни растенија и мелени здрна

Сад со капак (точка 3.3 од овој Дел) се мери со прецизност од 0,5 mg. Во измерениот сад, со прецизност од 1 mg., се мери околу 5 gr. издробен примерок и рамномерно се распростанува. Садот, без неговиот капак, се става во претходно загреана печка на температура од 130°C. За да се спречи температурата во печката премногу да се намали, садот треба да се стави колку е можно побрзо. Истиот треба да се суши два часа пресметајќи од моментот кога температурата во печката се вратила на температура од 130°C. Капакот се враќа на садот, истиот се вади од рерната, се остава во ексикаторот (точка 3.6 од овој Дел) да се излади 30 до 45 минути и се мери со прецизност до 1 mg.

4.2.3. Крмни смеси кои содржат повеќе од 4% сахароза или лактоза: суровини на храна за животни како рогач, хидролизирани житни производи, семки од слад, суви парчиња

репка, растворливи компоненти на риби и шеќери; крмни смеси кои содржат повеќе од 25% минерални соли, вклучувајќи и вода од процес на кристализација.

Сад со капак (точка 3.3 од овој Дел) се мери со прецизност од 0,5 mg. Во измерениот сад, со точност од 1 mg., се мери околу 5 gr. од примерокот и се подеднакво се распоредува. Садот, без неговиот капак, се става во вакуум печка (точка 3.5 од овој Дел) претходно загреана на температура помеѓу 80°C и 85°C. Со цел да се спречи температурата во печката премногу да се намали, садот треба да се внесе колку е можно побрзо.

Треба да се постигне притисок од 100 Torr и да се остави да се суши четири часа на овој притисок, или со помош на бран од жешок, сув воздух или со користење на агенс за сушење (околу 300 gr. за 20 примероци). Во вториот случај, вакуум пумпата се исклучува кога пропишаниот притисок е постигнат. Времето на сушење се пресметува од моментот кога температурата во печката се враќа на 80°C до 85°C. Притисокот во печката треба внимателно да се изедначи со атмосферскиот притисок. Се отвара печката, се враќа капакот на садот, истиот се вади од печката, се остава во ексикаторот (точка 3.6 од овој Дел) да се излади 30 до 45 минути и се мери со прецизност од 1 mg. Се суши дополнителни 30 минути во вакуум печка на температура од 80°C до 85°C и повторно се мери. Разликата помеѓу двете мерења не треба да надмине 0,1 % од влагата.

4.3. Прелиминарно сушење

4.3.1. Храна за животни, со исклучок на храна за животни од точка 4.3.2 на овој Дел

Храна за животни во цврста состојба која има голема содржина на влага што го отежнува дробењето треба претходно да биде исушење на следниов начин:

Се мерат 50 gr *неиздробен* примерок со точност од 10 mg. (компресирана или агломерирана храна за животни може да биде грубо поделена, доколку е потребно) и се ставаат во соодветен сад (на пример, од 20 × 12 cm алуминиумска чинија со 0,5 cm раб). Се остава да се исуши во печка на температура од 60°C до 70°C сè додека содржината на влага не се намали помеѓу 8% и 12%. Садот се вади од печка, се остава непокриен во лабораторијата да се излади во времетраење од еден час и се мери со прецизност до 10 mg. Се дроби веднаш како што е наведено во точка 4.1.1 од овој Дел и се суши како што е наведено во точките 4.2.1 или 4.2.3 на овој Дел, во согласност со природата на храната за животни.

4.3.2. Житни растенија

Зрно со содржина на влага над 17% треба претходно да се исуши на следниов начин:

Се мерат 50 gr несомлено жито со прецизност до 10 mg. и се става во соодветен сад (на пример, од 20 × 12 cm алуминиумска чинија со 0,5 cm раб). Садот се остава да се исуши во времетраење од 5-7 минути во печка на температура од 130°C. Потоа садот треба да се извади од печката, се остава во лабораторијата непокриен да се излади во времетраење од два часа и се мери со точност од 10 mg. Се меле веднаш како што е наведено во точка 4.1.2 на овој Дел и се суши како што е наведено во точка 4.2.2 на овој Дел.

5. Пресметување на резултати

Содржината на влага (X), како процент на примерокот, се пресметува со помош на следнаве формули:

5.1. Сушење без претходно сушење

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

каде што:
m = почетна тежина, во грами, на тест примерок,
m_0 = тежина, во грами, на сув тест примерок.

5.2. Сушење со претходно сушење

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

каде што:
m = почетна тежина, во грами, на тест примерок,
m_1 = тежина, во грами, на тест примерок по претходно сушење,
m_2 = тежина, во грами, на тест примерок по дробење или мелење,
m_0 = тежина, во грами, на сув тест примерок.

5.3. Повторливост
Разликата меѓу резултатите од две паралелни одредувања врз ист примерок не смее да надминува 0,2% од апсолутната вредност на влага.

6. Забелешка
Доколу е потребно мелење за кое е докажано дека ја менува содржината на влага на производот, резултатите од анализата на состојките на храната за животни треба да се корегираат врз основа на содржината на влага на примерокот во првобитната состојба.

Б. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВЛАГА ВО МАСТИ И МАСЛА ОД ЖИВОТИНСКО И РАСТИТЕЛНО ПОТЕКЛО

1. Цел и предмет на уредување
Овој метод овозможува да се утврди содржината на вода и испарливи супстанции во масти и масла од животинско и растително потекло.

2. Начело
Примерокот треба да суши на температура од 103°C се додека не постигнуве постојана тежина (разликата во тежината помеѓу две последователни мерења треба да биде помала или еднаква на 1 mg.). Разликата во тежината се утврдува со мерење.

3. Опрема
3.1. Сад со рамно дно, направен од материјал отпорен на корозија, со дијаметар од 8-9 cm во и висина од околу 3 cm.

3.2. Термометар со зајакнат резервоар и проширена комора во горниот дел, баждарен (калибриран) од околу 80°C до најмалку 110°C, и со должина од околу 10 cm.

3.3. Песочна бања или електрична жешка чинија/плоча.

3.4. Ексикатор, кој содржи ефикасен агенс за сушење.

3.5. Аналитичка вага.

4. Постапка

Се мери околу 20 gr. хомогенизиран примерок, со прецизност од 1 mg., и се става во сув измерен сад (точка 3.1 од овој Дел) кој содржи термометар (точка 3.2 од овој Дел). Се загрева со песочна бања или жешка чинија/плоча (точка 3.3 од овој Дел), со постојано мешање со термометар, при што за приближно 7 минути треба да се постигне температураод 90°C.

Доводот на топлина треба да се намали, и притоа да се следи фреквенцијата со која на дното од садот се појавуваат меурчиња. Температурата не смее да надмине 105°C. Треба да се продолжи со мешањето, гребејќи по дното на садот, се додека не престанат да се создаваат меурчиња.

Со цел да се обезбеди целосна елиминација на влага, се загрева неколку пати на температура од 103°C ± 2°C, а помеѓу загревањата треба да се лади на температура од 93°C. Потоа садот треба да се стави во ексикаторот (точка 3.4 од овој Дел) за да се излади до собна температура и потоа се мери. Оваа постапка се повторува сè додека губењето во тежината помеѓу две последователни мерења не престане да надминува 2 mg.

Забелешка: зголемувањето на тежината на примерокот по повторното греење покажува оксидацијата на мастите, и во тој случај се пресметува резултатот од мерењето направено веднаш пред тежина да почне да се зголемува.

5. Пресметување на резултатите

Содржината на влага (X), искажана како процент на примерокот, е претставена со следната формула:

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

каде што:

m = тежина, во грами, на тест примерок,

m_1 = тежина, во грами, на садот со неговата содржина пред загревањето,

m_2 = тежина, во грами, на садот со неговата содржина по загревањето.

Резултати помали од 0,05% треба да се евидентираат/документираат како „помалку од 0,05%".

Повторливост

Разликата во влага меѓу резултатите од две паралелни одредувања спроведени на ист примерок не смее да надмине 0,05%, во апсолутна вредност.

B. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СОДРЖИНАТА НА СУРОВИ ПРОТЕИНИ

1. Цел и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди содржина на суров протеини во храната за животни врз основа на содржина на азот, утврдено според методот *Kjeldahl.*

2. Начело

Примерокот се третира во сулфурната киселина во присуство на катализатор. Киселинскиот раствор станува алкален со раствор на натриум хидроксид. Амонијакот се дестилира и се собира во измерена количина на сулфурна киселина, вишокот се титрира со стандарден раствор на натриум хидроксид.

Алтернативно, ослободениот амонијак се дестилира во вишок на борна киселина, проследено со титрација со солна киселина или сулфурна киселина.

3. Реагенси

3.1. Калиум сулфат.

3.2. Катализатор: бакар (II) оксид CuO или бакар (II) сулфат пентахидрат, $CuSO_4$ $5H_2O$.

3.3. Гранулиран цинк.

3.4. Сулфурна киселина, ρ20 = 1,84 гр. / ml.

3.5. Сулфурна киселина, стандарден волуметриски раствор, c(H2SO4) = 0,25 mol/l.

3.6. Сулфурна киселина, стандарден волуметриски раствор, c(H_2SO_4) = 0,10 mol/l.

3.7. Сулфурна киселина, стандарден волуметриски раствор, c(H_2SO_4) = 0,05 mol/l.

3.8. Индикатор метилно црвенило; 300 mg. метилно црвенило се раствара во 100 ml етанол, σ = 95% -96% (v / v).

3,9. Натриум хидроксид (може да се користи техничкиот) β = 40 gr./100 ml (m / v: 40%).

3.10. Натриум хидроксид, стандарден волуметриски раствор c(NaOH) = 0,25 mol/l.

3.11. Натриум хидроксид, стандарден волуметриски раствор c(NaOH) = 0,10 mol/l.

3.12. Гранулирана пемза, измиена во солна киселина и запалена.

3.13. Ацетанилид (m.p. = 114ºC, N-содржини = 10,36%).

3.14. Сахароза (без азот).

3.15. Борна киселина (H_3BO_3).

3.16. Индикатор метилно црвенило - раствор: се раствара 100 mg. метилно црвенило во 100 ml етанол или метанол.

3.17. Бромокрезол зеленило - раствор: растворете 100 mg. бромокрезол зеленило во 100 ml етанол или метанол.

3.18. Раствор на борна киселина (10 gr./l до 40 gr./l во зависност од апаратот кој се користи).

Во случај кога се применува колориметриско одредување на крајни точки, индикатор метилно црвенило и бромокрезол зеленило треба да се додадат на растворите со борна киселина. Доколку се подготви 1 литар раствор на борна киселина, пред прилагодување на количината треба да се додадат 7 ml индикатор метилно црвенило - раствор (точка 3.16 од овој Дел) и 10 ml бромокрезол зелен раствор (точка 3.17од овој Дел).

Зависно од водата која се користи, pH вредноста на растворот на борна киселина може да се разликува од серија во серија. Често е потребно усогласување со мала количина на алкали за да се добие позитивна слепа проба.

Забелешка: Обично е доволно да се додадат околу 3 ml до 4 ml на NaOH (3.11) во 1 литар борна киселина(10 gr/l). Растворот треба да се чува на собна температура и за време на складирањето да биде заштитен од извори на светлина и испарување на амонијак.

3.19. Стандарден волуметриски раствор на хлороводородна киселина c(HCl) = 0,10 mol/l.

Забелешка: Може да се користат и други концентрации на волуметриски раствори (точки 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 и 3.19 од овој Дел), доколку истото се зема во предвид при пресметувањата. Концентрациите секогаш треба да бидат изразени со четири децимални места.

4. Опрема

Апарат погоден за вршење на разградување, дестилација и титрација во согласност со постапката *Kjeldahl*.

5. Постапка

5.1. Разградување

1 gr. од примерокот се мери со прецизност до 0,001 gr. и примерокот се префрла во колба на апаратот за разградување.

Се додаваат 15 gr. калиум сулфат (3.1), со соодветно количество на катализатор (точка 3.2 на овој Дел) (0,3 до 0,4 gr. бакар (II) оксид или 0,9 до 1,2 gr. бакар (II) сулфат пентахидрат) , 25 ml сулфурна киселина (3.4) и ако е потребно, неколку гранули од пемза (точка 3.12 од овој Дел) и се мешаат.

Колбата се загрева умерено, доколку е потребно таа треба повремено да се врти се додека масата не се јаглениса и исчезне пената, а потоа поинтензивно се загрева сè додека течноста не почне постојано да врие. Загревањето е соодветно доколку киселината која врие кондензира на ѕидот од садот. Треба да се спречи преголемо загревање на страните и лепење на органските честички на страните.

Откако растворот ќе стане јасен и ќе добие светло зелена боја, треба да се продолжи со варењето уште два часа, а потоа треба да се остави да се излади.

5.2. Дестилација

Внимателно треба да се додаде доволно количество вода со цел да се обезбеди целосно разложување на сулфатите. Треба да се дозволи да се излади и потоа да се додадат неколку гранули цинк (точка 3.3 од овој Дел), ако е потребно. Се продолжува согласно точките 5.2.1 или 5.2.2 од овој Дел.

5.2.1. Дестилација во сулфурна киселина

Во колбата за собирање од апаратот за дестилација се става точно измерена количина на 25 ml сулфурна киселина (точка 3.5 од овој Дел) или (точка 3.7 од овој Дел) во зависност од претпоставената содржина на азот. Се додаваат неколку капки на метил црвен индикатор (точка 3.8 од овој Дел).

Колба од апаратот за разградување се поврзува со кондензаторот на апаратот за дестилација и крајот на кондензаторот се потопува во течноста која се наоѓа во колбата за собирање, на длабочина од најмалку 1 cm (точка 8.3 од овој Дел). Во колба од апаратор за разградување полека се додава 100 ml раствор на натриум хидроксид (точка 3.9 од овој Дел) без притоа да се предизвика загуба на амонијак (точка 8.1 од овој Дел).

Колбата се загрева се до завршување на дестилацијата на амонијакот.

5.2.2. Дестилација во борна киселина

Кога рачно се изведува титрацијата на содржината на амонијак, се применува постапката наведена подолу. Кога единицата за дестилација е целосно автоматизирана да опфати дестилација на содржината на амонијак во дестилатот, се следат упатствата за работа од производителот на единицата за дестилација.

Колба за собирање која содржи 25 ml до 30 ml раствор од борна киселина (3.18) се става под отворот на кондензаторот на начин на кој носечката цевка е под површината на вишокот на растворот од борна киселина. Единицата за дестилација се прилагодува да распредели 50 ml раствор од натриум хидроксид (3.9). Со единицата за дестилација се ракува во согласност со упатствата од производителот и амонијакот кој се ослободува со додавање на раствор од натриум хидроксид се дестилира. Дестилатот се собира во борната киселина која прима раствор. Износот на дестилатот (времето на дестилација со пареа) зависи од износот на азот во примерокот. Се следат упатствата од производителот.

Напомена: Во полуавтоматска единица за дестилација, додавањето на вишок на натриум хидроксид и дестилацијата со пареа се изведуваат автоматски.

5.3. Титрација

Се продолжува во согласност со 5.3.1 или 5.3.2.

5.3.1. Сулфурна киселина

Вишокот на сулфурна киселина се титрира во колбата за собирање со раствор од натриум хидроксид (3.10 или 3.11) во зависност од концентрацијата на сулфурна киселина која се употребува, додека да се постигне крајна точка.

5.3.2. Борна киселина

Содржината на колбата за собирање се титрира со стандарден волуметричен раствор од хлороводородна киселина (3.19) или со стандарден волуметричен раствор од сулфурна киселина (3.6) со употреба на бирета и се чита употребениот износ на употребен титрант.

Кога се применува колориметрична детекција на крајната точка, крајната точка се постигнува на првата трага од розова боја во содржините. Исчитувањето на биретата се проценува со прецизност од 0,05 ml. Осветлена магнетска плочка за мешање или фотометричен детектор може да помогне во визуелизацијата на крајната точка.

Ова може да се направи автоматски со употреба на дестилатор на пареа со автоматска титрација.

Се следат упатствата од производителот за ракување со определениот дестилатор или дестилатор/титратор.

Напомена: Кога се употребува автоматски систем за титрација , титрацијата започнува непосредно по започнувањето на дестилацијата и се употребува раствор од борна киселина од 1 % (3.18).

Кога се употребува целосно автоматска единица за дестилација, автоматската титрација на амонијакот може исто така да се изведе со детекција на крајната точка со употреба на потенциометричен pH систем.

Во овој случај, се употребува автоматски титратор со pH-мерач. pH-мерачот се калибрира соодветно во опсег од pH 4 до pH 7 следејќи ги вообичаените лабораториски постапки за pH-калибрирање.

Крајната точка на pH од титрацијата се постигнува на pH 4,6, со што е најстрмната точка во кривата на титрација (точка на инфлекција).

5.4. Бланко испитување

За да се потврди дека реагенсите не содржат азот, се спроведува бланко испитување (разложување, дестилација и титрација) со употреба на 1 g сахароза (3.14) наместо примерокот.

6. Пресметување на резултатите

Пресметувањата се изведуваат во согласност со 6.1 или 6.2.

6.1. Пресметување за тритрација во согласност со 5.3.1

Содржината на суровиот протеин, изразена како процент по тежина, се пресметува во согласност со следната формула:

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

при што:

V_o =е волуменот (ml) од NaOH (3.10 или 3.11) употребен во бланко испитувањето,

V_1 =е волуменот (ml) од NaOH (3.10 или 3.11) употребен во титрацијата на примерокот,

c =е концентрацијата (mol/l) на натриум хидроксид (3.10 или 3.11),

m =е тежината (g) на примерокот.

6.2. Пресметување за тритрација во согласност со 5.3.2

6.2.1. Титрација со хлороводородна киселина

Содржината на суровиот протеин, изразена како процент по тежина, се пресметува во согласност со следната формула:

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

при што:

m =е тежината (g) на делот кој се испитува,

c =е концентрацијата (mol/l) на стандардниот волуметричен раствор на хлороводородна киселина (3.19),

V_0 =е волуменот (во ml) на хлороводородна киселина кој се употребува за бланко испитувањето,

V_1 =е волуменот (во ml) на хлороводородна киселина кој е употребен за делот кој се испитува,

6.2.2. Титрација со сулфурна киселина

Содржината на суровиот протеин, изразена како процент по тежина, се пресметува во согласност со следната формула:

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

при што:

m =е тежината (g) на делот кој се испитува,

c =е концентрацијата (mol/l) на стандардниот волуметричен раствор на сулфурна киселина (3.6),

V_0 =е волуменот (во ml) на сулфурна киселина (3.6) кој се употребува за бланко испитувањето,

V_1 =е волуменот (во ml) на сулфурна киселина (3.6) кој се употребува за делот за испитување.

7. Проверка на методот

7.1. Повторливост

Разликата помеѓу резултатите на двете паралелни определувања кои се спроведени на истиот примерок не смее да надминува:

— 0,2 % во апсолутна вредност, за содржина на суров протеин помала од 20 %,

— 1,0 % релативна на повисоката вредност, за содржина на суров протеин од 20 % до 40 %,

— 0,4 % во апсолутна вредност, за содржина на суров протеин поголема од 40 %.

7.2. Прецизност

Спроведете ја анализата (разложувањето, дестилацијата и титрацијата) на 1,5 до 2,0 g ацетанилид (3.13) во присуство на 1 g сахароза (3.14); 1 g ацетанилид троши 14,80 ml сулфурна киселина (3.5). Обновувањето мора да биде најмалку 99 %.

8. Согледувања

8.1. Апаратурата може да биде рачна, полуавтоматска или автоматска. Ако апаратурата бара префрлување помеѓу фазите на разложување и дестилација, ова префрлување мора да се изведе без загуба. Ако колбата од апаратурата за дестилација не е со инка, натриум хидроксидот се додава веднаш пред да се поврзе колбата со кондензаторот, истурајќи ја течноста полека по едната страна.

8.2. Ако разложената материја се стврдне, повторно се започнува определувањето со употреба на поголем износ на сулфурна киселина (3.4) од оној кој е наведен погоре.

8.3. За производите со ниска содржина на азот, волуменот на сулфурна киселина (3.7) кој треба да се стави во колбата за собирање може да се намали, ако е потребно, до 10 или 15 ml и да се дополни до 25 ml со вода.

8.4. За рутинска анализа, можат да се применат алтернативни методи на анализа за определување на суров протеин, но Кјелдаловата метода опишана во овој Дел В е референтниот метод. Еднаквоста на резултатите кои се добиени со алтернативен метод (пр. ДУМАС) во споредба со референтниот метод мораат да се прикажат за секоја матрица поединечно. Бидејќи резултатите добиени со алтернативен метод, дури и после проверката на еднаквоста, можат да отстапуваат малку од резултатите кои се

добиени со референтниот метод, потребно е да се наведе во аналитичкиот извештај методот за анализа кој се употребува за определување на суровиот протеин.

Г. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА УРЕА

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се определи содржината на уреа во храната за животни.

2. Начело

Примерокот се закачува во вода со агенс за разбистрување. Суспнезијата се филтрира. Содржината на уреа́ на филтратот се определува по додавање на 4-диметиламинобензалдехид (4-DMAB) со мерење на оптичката густина на бранова должина од 420 nm.

3. Реагенси

3.1. Раствор од 4-диметиламинобензалдехид: се раствораат 1,6 g од 4-DMAB во 100 ml од 96 % етанол и се додава 10 ml хлороводородна киселина (ρ_{20} 1,19 g/ml). Овој реагенс трае максимален период од две недели.

3.2. Раствор Карез I: во вода се раствора 21,9 g цинк ацетат, $Zn(CH_3COO)_2\,2H_2O$ и 3 g глацијална оцетна киселина. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.3. Раствор Карез II: се разтвора во вода 10,6 g калиум фероцијанид, $K_4\,Fe\,(CN)_6\,3H_2O$. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.4. Активен јаглерод кој не апсорбира уреа (да се провери).

3.5. Уреа, 0,1 % раствор (т/в).

4. Апаратура

4.1. Мешалка (центрифуга): приближно 35 до 40 вртежи по минута.

4.2. Епрувети: 160 × 16 mm со затки од брусено стакло.

4.3. Спектрофотометар.

5. Постапка

5.1. Анализа на примерок

Се мерат 2 g од примерокот со прецизност од mg и се ставаат со 1g активен јаглерод (3.4) во волуметрична колба од 500 ml. Се додава 400 ml вода и 5 ml раствор Карез I (3.2), се меша околу 30 секунди и се додава 5 ml раствор Карез II (3.3). Се меша 30 минути во мешалката. Се дополнува со вода, се протресува и се филтрира.

Се отстранува 5 ml од проѕирните безбојни филтрати, се ставаат епруветите со затки од брусено стакло, се додава 5 ml раствор од 4-DMAB (3.1) и се промешува. Епруветите се ставаат во водна бања на 20 оС (+/- 4 оС). По 15 минути се мери оптичката густина на растворот-примерок со спектрофотометар на 420 nm. Се споредува со раствор од бланко испитувањето на реагенсите.

5.2. Калибрациска крива

Се отстрануваат волумените 1, 2, 4, 5 и 10 ml од растворот на уреа (3.5), се ставаат во 100 ml волуметрични колби и волуменот се дополнува со вода. Се отстранува 5 ml од секој раствор, се додава 5 ml раствор 4-DMAB (3.1) кон секој од нив, хомогенизирајте и се мери оптичката густина како што е прикажано погоре во споредба со контролниот раствор кој содржи 5 ml 4-DMAB и 5 ml вода која не содржи уреа. Се подготвува калибрациската крива.

6. Пресметување на резултатите

Се утврдува износот на уреа во примерокот со употреба на калибрациска крива.
Резултатот се изразува како процент од примерокот.

7. Согледувања

7.1. Во случајот на содржина на уреа која надминува 3 %, резултатот се намалува до 1 g или се разредува првичниот раствор за да нема повеќе од 50 mg уреа во 500 ml.

7.2. Во случајот на мала содржина на уреа, се зголемува примерокот сè додека филтратот е проѕирен и безбоен.

7.3. Ако примерокот содржи едноставни соединенија на азот, како што се амино-кислеини, оптичката густина се мери на 435 nm.

Д. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ИСПАРЛИВИ АЗОТНИ БАЗИ

I. СО МИКРОДИФУЗИЈА

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди содржината на испарливи азотни бази, изразени како амонијак, во храната за животни.

2. Начело

Примерокот се екстрахира со вода и растворот се избиструва и филтрира. Испарливите азотни бази се извлекуваат со микродифузија со употреба на раствор од калиум карбонат, собран во раствор на борна киселина и титриран со сулфурна киселина.

3. Реагенси

3.1. 20 %, (т/в) раствор од трихлорооцетна киселина.

3.2. Индикатор: се раствораат 33 mg зелен бромокрезол и 65 mg метил црвено во 100 ml од 95 %-96 % (в/в) етанол.

3.3. Раствор од борна киселина: во 1 литар градуирана колба се раствораат 10 g борна киселина во 200 ml од 95 %-96% (в/в) етанол и 700 ml вода. Се додаваат 10 ml индикатор (3.2). Се промешува и, ако е потребно, се прилагодува бојата на растворот до светло црвена со додавање на раствор од натриум хидроксид. 1 ml од овој раствор одговара на максимум 300 µg NH_3.

3.4. Раствор од заситен калиум карбонат: се раствораат 100 g калиум карбонат во 100 ml вода што врие. Се остава да се излади, се филтрира.

3.5. Сулфурна киселина 0,01 mol/литар.

4. Апаратура

4.1. Мешалка (центрифуга): приближно 35 до 40 вртежи по минута.

4.2. Стаклени или пластични садови на Конвеј (видете дијаграм).

4.3. Градуирани микробирети на 1/100 ml.

5. Постапка

Се мери примерок од 10 g со прецизност од 1 mg и се става со 100 ml вода во градуирана колба од 200 ml. Се меша 30 минути во мешалката. Се додава 50 ml раствор од трихлороацетична киселина (3.1), волуменот се дополнува со вода, силно се протресува и се филтрира низ набран филтер.

Со употреба на пипета, се внесува 1 ml раствор од борна киселина (3.3) во централниот дел од садот на Конвеј и 1 ml од филтратот-примерок во круната на садот. Делумно се покрива со подмачкан капак. Се капнува 1 ml раствор од заситен калиум карбонат (3.4) брзо во круната и се затвора капакот за садот да не пропушта воздух. Садот внимателно се превртува во хоризонтална рамнина за да се измешаат двата реагенси. Оставете да се инкубира или во рок од најмалку четири часа на собна температура или во рок од еден час на 40°C.

Со употреба на микробирета (4.3), се титрираат испарливите основи во растворот од борна киселина со сулфурна киселина (3.5).

Се спроведува бланко испитување со употреба на истата постапка, но без да се анализира примерокот.

6. Пресметување на резултатите

1 ml H_2SO_4 0,01 mol/литар одговара на 0,34 mg амонијак.

Резултатот се изразува како процент од примерокот.

Повторливост

Разликата помеѓу резултатите на двете паралелни определувања кои се спроведени на истиот примерок не смее да надминува:

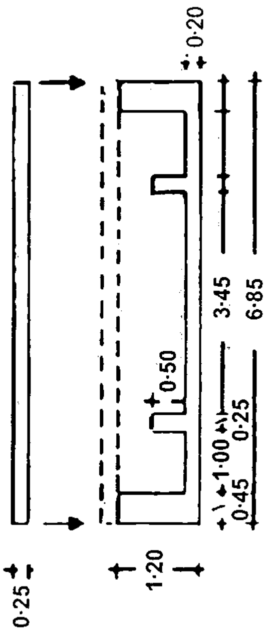
— 10 %, во релативна вредност, за содржина на амонијак помала од 1,0 %,
— 0,1 %, во апсолутна вредност, за содржина на амонијак од 1,0 % или повеќе.
—

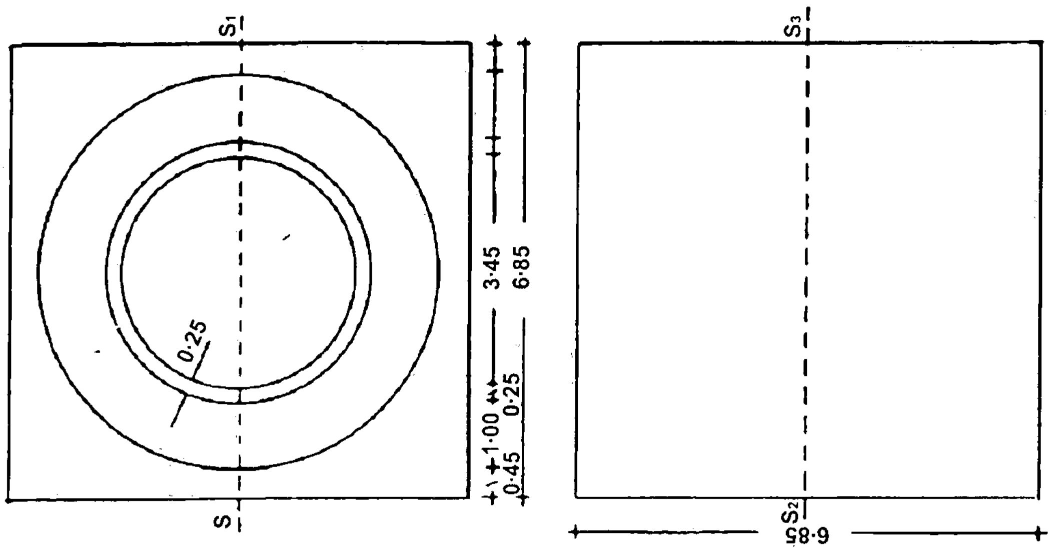
7. Согледување

Ако содржината на амонијак од примерокот надминува 0,6 %, се разредува почетниот филтрат.

САД НА КОНВЕЛ

Размер 1:1





II. СО ДЕСТИЛАЦИЈА

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди содржината на испарливи азотни бази, изразени како амонијак, во рибино брашно кое практично не содржи уреа. Се применува единствено на содржина од амонијак помала од 0,25 %.

2. Начело

Примерокот се екстрахира со вода и растворот се избиструва и филтрира. Испарливите азотни бази се извлекуваат на точка на вриење со додавање на магнезиум оксид и се собрани во посебна количина од сулфурна киселина, од кои вишокот се титрира со раствор од натриум хидроксид.

3. Реагенси

3.1. Трихлорацетична киселина, раствор 20 % (т/в).

3.2. Магнезиум оксид.

3.3. Емулзија која не се пени (пр. силикон).

3.4. Сулфурна киселина 0,05 mol/литар.

3.5. Раствор од натриум хидроксид 0,1 mol/литар.

3.6. Раствор на црвен метил 0,3 % во 95 %-96 % (в/в) етанол.

4. Апаратура

4.1. Мешалка (центрифуга): приближно 35 до 40 вртежи по минута.

4.2. Апаратура за дестилација од видот Кјелдал.

5. Постапка

Се мерат 10 g од примерокот со прецизност од 1 mg и се ставаат со 100 ml вода во градуирана колба од 200 ml. Се меша 30 минути во мешалката. Се додаваат 50 ml раствор од трихлороацетична киселина (3.1), волуменот се дополнува со вода, силно се протресува и се филтрира низ набран филтер.

Се зема количина на чист филтрат соодветен на дозволената содржина на испарливи азотни бази (100 ml е вообичаено соодветно). Се разредува до 200 ml и седодава 2 g магнезиум оксид (3.2) и неколку капки емулзија која не се пени (3.3). Растворот мора да е алкален на лакмусова хартија; во спротивно, се додава малку магнезиум оксид (3.2). Се продолжува во согласност со 5.2 и 5.3 од методот за анализа за определување на содржината на суров протеин (Дел В од овој анекс).

Се спроведува бланко испитување со употреба на истата постапка, но без да се анализира примерокот.

6. Пресметување на резултатите

1 ml H_2SO_4 0,05 mol/литар одговара на 1,7 mg амонијак.

Резултатот се изразува како процент од примерокот.

Повторливост
Разликата помеѓу резултатите на двете паралелни определувања кои се спроведени на истиот примерок не надминува, во релативна вредност, 10 % од амонијакот.

Ѓ. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АМИНО КИСЕЛИНИ (ОСВЕН ТРИПТОФАН)

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод го овозможува определувањето на слободни (синтетички и природни) и вкупни (со пептидна врска и слободни) аминокиселини во храната за животни, со употреба на анализатор на аминокиселини. Се применува на следните аминокиселини: цистеин, метионин, лизин, треонин, аланин, аргинин, аспарагинска киселина, глутаминска киселина, глицин, хистидин, изолеуцин, леуцин, фенилаланин, пролин, серин, тирозин и валин.
Методот не прави разлика помеѓу солите на аминокиселините и не може да разграничи помеѓу D и L формите на аминокиселините. Истиот не важи за определување на триптофан или хидроксилни аналози на аминокиселините.

2. Начело

2.1 Слободни аминокиселини

Слободните аминокиселини се екстрахираат со разредена хлороводородна киселина. Коекстрахираните макромолекули на азот се таложат со сулфосалицилна киселина и се отстрануваат со филтрација. Филтрираниот раствор се прилагодува на pH 2,20. Аминокиселините се одделуваат со хроматографија на размена на јони и се утврдува со реакција со нинхидрин со фотометрична детекција на 570 nm.

2.2. Вкупно аминокиселини

Избраната постапка зависи од аминокислеините кои се испитуваат. Цистеинот и метионинот мораат да се оксидираат до цистеинска киселина и метионин сулфон соодветно пред хидролизата. Тирозинот мора да се утврди во хидролизати на неоксидирани примероци. Сите други аминокиселини кои се наведени во став 1 можат да се утврдат или во оксидиран или во неоксидиран примерок.
Оксидацијата се изведува на 0оC со смеса од пермравја киселина и фенол. Вишок реагенс за оксидирање се разградува со натирум дисулфит. Оксидираниот или неоксидираниот примерок се хидролизира со хлороводородна киселина (3.20) за 23 часа. Хидролизатот се прилагодува до pH 2,20. Аминокиселините се одделуваат со хроматографија на размена на јони и се определуваат со реакција со нинхидрин со употреба на фотометрична детекција на 570 nm (440 nm за пролин).

3. Реагенси

Мора да се употребува двојно дестилирана вода или вода со еднаков квалитет (кондуктивитет < 10 µS).

3.1. Водородпероксид, w (w/w) = 30 %.

3.2. Мравја киселина, w (w/w) = 98 %-100 %.

3.3. Фенол.

3.4. Содиум дисулфит.

3.5. Содиум хидроксид.

3.6. Дихидрат на 5-Сулфосалицилна киселина.

3.7. Хлороводородна киселина, густина приближно 1,18 g/ml.

3.8. дихидрат на три-натриум цитрат.

3.9. 2,2'-Тиодиетанол (тиодигликол).

3.10. Натриум хлорид.

3.11. Нинхидрин.

3.12. Лесен петролеум, опсег на вриење 40-60 °C.

3.13. Норлеуцин или друго соединение соодветно за употреба како внатрешен стандард.

3.14. Гас на азот (< 10 ppm кислород).

3.15. 1-Октанол.

3.16. Аминокиселини.

3.16.1. Стандардни супстанции наведени под став 1. Чисти соединенија кои не содржат вода од кристализација. Се суши под вакуум над P_2O_5 или H_2SO_4 во рок од 1 недела пред употреба.

3.16.2. Цистеинска киселина.

3.16.3. Метионин сулфон.

3.17. Раствор од натриум хидроксид, c = 7,5 mol/l:
Се раствораат 300 g NaOH (3.5) во вода и се дополнува до 1 литар.

3.18. Раствор од натриум хидроксид, c = 1 mol/l:
Се раствораат 40 g NaOH (3.5) во вода и се дополнува до 1 литар.

3.19. Раствор од мравја киселина и фенол:
Се машаат 889 g мравја киселина (3.2) со 111 g вода и се додаваат 4,73 g фенол (3.3).

3.20. Смеса за хидролиза, c = 6 mol HCl/l која содржи 1 g фенол/l:
Се додава 1 g фенол (3.3) до 492 ml HCl (3.7) и се дополнува до 1 литар со вода.

3.21. Смеса за екстракцијата, c = 0,1 mol HCl/l која содржи 2 % тиодигликол: Се зема 8,2 ml HCl (3.7), се разредува со приближно 900 ml вода, се додава 20 ml тиодигликол

3.22. 5-Сулфосалицилна киселина, ß = 6 %:
Се раствораат 60 g 5-сулфосалицилна киселина (3.6) во вода и се дополнува 1 l со вода.

3.23. Оксидациска мешавина (пермравја киселина – фенол):
Се промешуваат 0,5 ml водороден пероксид (3.1) со 4,5 ml раствор од мравја киселина-фенол (3.19) во мала мензура. Се инкубира на 20-30 оС во рок од 1 час со цел да се создаде мравја киселина, потоа се лади во бања со замрзната вода (15 мин.) пред да се додаде во примерокот.

Внимание: Да се избегнува контакт со кожата и да се носи заштитна облека.

3.24. Пуфер од цитрат, c = 0,2 mol Na^+/l, pH 2,20:

Се раствораат 19,61 g натриум цитрат (3.8), 5 ml тиодикликол (3.9), 1 g фенол (3.3) и 16,50 ml HCl (3.7) во приближно 800 ml вода. pH вредноста се прилагодува на 2,20. Се дополнува до 1 l со вода.

3.25. Елуциски пуфери, подготвени во согласност со условите за анализаторот кој се употребува (4.9).

3.26. Реагенс на нинхидрин, подготвен во согласност со условите за анализаторот кој се употребува (4.9).

3.27. Стандардни раствори од аминокиселини. Овие раствори се чуваат под 5 °C.

3.27.1. Основен стандарден раствор од аминокиселини (3.16.1).
C = 2,5 µmol/ml од секој во хлороводородна киселина.
Може да се набават и готови.

3.27.2. Основен стандарден раствор од цистеинскаа киселина и метионин сулфон, c = 1,25 µmol/ml.
Се раствораат 0,2115 g цистеинска киселина (3.16.2) и 0,2265 g метионин сулфон (3.16.3) во пуфер од цитрат (3.24) во 1 литар градуирана колба и се дополнува со пуфер од цитрат до ознаката. Се чува под 5 оC не повеќе од 12 месеци. Овој раствор не се употребува ако основниот стандарден раствор (3.27.1) содржи цистеинска киселина и метионин сулфат.

3.27.3. 3.27.3. Основен стандарден раствор на внатрешниот стандард, пр. норлеуцин, c = 20 µmol/ml.
Се раствораат 0,6560 g норлеуцин (3.13) во пуфер од цитрат (3.24) во градуирана колба и се дополнува со пуфер од цитрат до 250 ml. Се чува под 5 оC не повеќе од 6 месеци.

3.27.4. Калибрациски раствор од стандардни аминокиселини за употреба со хидролизати, c = 5 nmol/50 µl цистеинска киселина и метионин сулфон и c = 10 nmol/50 µl од другите аминокиселини. Се раствораат 2,2 g натриум хлорид (3.10) во мензура од 100 ml со 30 ml пуфер (3.24). Се додаваат 4,00 ml основен стандарден раствор на аминокиселини (3.27.1), 4,00 ml основен стандарден раствор од цистеинска киселина и метионин сулфон (3.27.2) и 0,50 ml основен стандарден раствор од внатрешен стандард (3.27.3) ако се употребува. pH вредноста се прилагодува на 2,20 со натриум хидроксид (3.18).
Се пренесува количествено до 50 ml градуирана колба и се дополнува до ознаката со пуфер од цитрат (3.24) и се промешува.
Се чува под 5 оC не повеќе од 3 месеци.
Видете исто така согледување 9.1.

3.27.5. Калибрациски раствор на стандардни аминокиселини за употреба со хидролизати подготвени во согласност со став 5.3.3.1 и за употреба со екстракти (5.2).
Калибрацискиот раствор се подготвува во согласност со 3.27.4, но без натриум хлорид.
Се чува под 5 °C не повеќе од 3 месеци.

4. Апаратура

4.1. 100 или 250 ml колба со округло дно со рефлуксивен кондензатор.

4.2. 100 ml боросиликатно стаклено шише со капаче со навој со гумена/тефлонска облога (пр.

Дуран, Шот) за употреба во печката.

4.3. Печка со дополнителна вентилација и термостат со точност поголема од ± 2 °C.

4.4. pH-метар (три децимални места).

4.5. Филтер со мембрана (0,22 μm).

4.6. Центрифуга.

4.7. Ротирачки вакуумски испарувач.

4.8. Механички протресувач или магнетска мешалка.

4.9. Анализатор на аминокиселини или опрема ХПЛЦ со колона за размена на јони, уред за нинхидрин, постдериватизација на колоната и фотометричен детектор.

Колоната се полни со сулфонирани полистиренски смоли кои се способни да ги одделат аминокиселините едни од други и од другите нинхидрин-позитивните материјали. Текот во пуферот и нинхидринските линии се обезбедува со пумпи кои имаат стабилност на текот од ± 0,5 % во периодот кој ги опфаќа управувањето на стандардната калибрација и анализата на примерокот.

Со некои анализатори на аминокиселини, постапките на хидролиза можат да се употребуваат во кои хидролизатот има концентрација на натриум од c = 0,8 mol/l и ги содржи сите остатоци од мравја киселина од фазата на оксидација. Други не даваат задоволително одделување на одредени аминокиселини ако хидролизатот содржи вишок мравја киселина и/или концентрации на натриум јон. Во овој случај, волуменот на киселина се намалува со испарување до приближно 5 ml по хидролизата и пред прилагодувањето на pH. Испарувањето се изведува под вакуум на најмногу 40 °C.

5. Постапка

5.1. Подготвување на примерокот

Примерокот се мели за да помине низ сито со големина на дупчињата од 0,5 mm. Примероците кои имаат висок степен на влага мораат или да бидат исушени на воздух на температура која не надминува 50 °C или се сушат со смрзнување пред мелењето. Примероците со висока содржина на масти се екстрахираат со лесен бензин (3.12) пред мелењето.

5.2. Утврдување на слободни аминокиселини во храна за животни и предсмеси

Се мерат прецизно 0,2 mg соодветен износ (1-5 g) на подготвен примерок (5.1), во конусна колба и се додаваат 100,0 ml од смесата од екстракцијата (3.21). Смесата се протресува 60 мин. со употреба на механички протресувач или магнетска мешалка (4.8). Дозволете седиментот да се сталожи и со пипета се зема 10,0 ml од супернатантскиот раствор во мензура од 100 ml.

Се додаваат 5,0 ml раствор од сулфосалицилна киселина (3.22), со мешање и се продолжува со мешање со помош на магнетска мешалка во рок од 5 мин. Се филтрира или центрифугира супернатантот за да се отстрани секаков талог. Се ставаат 10,0 ml од растворот кој се добива во мензура од 100 ml и се рпилагодува pH до 2,20 со употреба на раствор од натриум хидроксид (3.18), се пренесува во волуметриска колба со соодветен волумен со употреба на пуфер од цитрат (3.24) и се дополнува до ознаката со пуферски раствор (3.24).

Ако се употребува внатрешен стандард, се додаваат 1,00 ml внатрешен стандард (3.27.3) за секои 100 ml конечен раствор и се дополнува до ознаката со пуферски раствор (3.24).
Се продолжува до хроматографската фаза во согласност со став 5.4.
Ако екстрактите не се испитаат истиот ден, мораат да се чуваат на температура под 5 °C.

5.3. Определување на вкупните аминокиселини

5.3.1. Оксидација

Се мери со прецизност до 0,2 mg од 0,1 до 1 g од подготвениот примерок (5.1) во:

— колба од 100 ml со округло дно (4.1) за отворена хидролиза (5.3.2.3) или,
— колба од 250 ml со округло дно (4.1) ако се бара мала концентрација на натриум (5.3.3.1) или,
— шише од 100 ml со капаче со навој (4.2), за затворена хидролиза (5.3.2.4).

Измерениот репрезентативен примерок мора да има содржина на азот од околу 10 mg и влага која не е поголема од 100 mg.
Колбата/шишето се става во бања со смрзната вода и се лади до 0 °C, се додаваат 5 ml оксидирана смеса (3.23) и се меша со употреба на стаклена спатула со свиен врв. Колбата/шишето што ја содржи спатулата со филм кој не пропушта воздух се запечатува, се става бањата со смрзната вода која го содржи запечатениот сад во фрижидер на 0 °C и се остава 16 часа. По 16 часа се вади од фрижидерот и се разложува вишокот на реагенс за оксидација со додавање на 0,84 g натриум дисулфит (3.4).
Се продолжува до 5.3.2.1.

5.3.2. Хидролиза

5.3.2.1. Хидролиза на оксидирани примероци

Кон оксидираниот примерок подготвен во согласност со 5.3.1 се додава 25 ml смеса на хидролиза (3.20) внимавајќи да се исперат сите остатоци од примерокот кои остануваат на страните од садот и спатулата.
Во зависност од постапката за хидролиза која се употребува, се продолжува во согласност со 5.3.2.3 или 5.3.2.4.

5.3.2.2. Хидролиза на неоксидирани примероци

Се мери колба или од 100 ml или од 250 ml со округло дно (4.1) или шише од 100 ml кое е со капаче со навој (4.2), со прецизност од 0,2 mg, од 0,1 до 1 g од подготвениот примерок (5.1).
Измерениот репрезентативен примерок мора да има содржина на азот од околу 10 mg.
Внимателно се додаваат 25 ml од хидролизираната смесата (3.20) и се меша со примерокот. Се продолжува во согласност со 5.3.2.3 или 5.3.2.4.

5.3.2.3. Отворена хидролиза

Се додаваат 3 стаклени топчиња кон смесата во колбата (подготвени во согласност со 5.3.2.1 или 5.3.2.2) и се врие со постојано создавање на балончиња под рефлукс во рок од 23 часа. При завршување на хидролизата, кондензаторот се измива со 5 ml пуфер од цитрат (3.24). Колбата се исклучува и се лади во смрзната бања.
Се продолжува во согласност со 5.3.3.

5.3.2.4. Затворена хидролиза

Се става шишето кое ја содржи смесата подготвена во согласност со 5.3.2.1 или 5.3.2.2 во печка (4.3) на 110 °C. Во текот на првиот час, со цел да се избегне создавање на притисок (како резултат на развој на гасни супстанции) и за да се избегне експлозија, се става капачето кое се завртува на врвот од садот. Садот не се затвора со капачето. По еден час, садот се затвора со капачето и се остава во печката (4.3) во рок од 23 часа. При завршување на хидролизата, се отстранува шишето од печката, внимателно се отвора капачето на шишето и шишето се става во бања со смрзната вода. Се остава да се излади.

Во зависност од постапката за прилагодување на pH (5.3.3), количински се пренесува содржината од шишето во мензура од 250 ml или 250 ml колба со округло дно, со употреба на пуфер од цитрат (3.24).

Се продолжува во согласност со 5.3.3.

5.3.3. Прилагодување на pH.

Во зависност од толеранцијата на анализаторот на натриум на аминокиселините (4.9) се продолжува во согласност со 5.3.3.1 или 5.3.3.2 за прилагодување на pH вредноста.

5.3.3.1. За хроматографски системи (4.9) кои бараат ниска концентрација на натриум

Се препорачува употреба на внатрешен основен стандарден раствор (3.27.3) кога се употребуваат анализаторите на аминокиселината кои бараат ниска концентрација на натриум (кога волумените на киселина треба да се намалат).

Во овој случај, се додаваат 2,00 ml внатрешен основен стандарден раствор (3.27.3) кон хидролизатот пред испарувањето.

Се додаваат 2 капки 1-октанол (3.15) кон хидроизолатот добиен во согласност со став 5.3.2.3 или 5.3.2.4.

Со употреба на испарувач (4.7) се намалува волуменот до 5-10 ml под вакуум на 40 °C. Ако волуменот случајно се намали под 5 ml, хидроизолатот мора да се опише и повторно да се започне анализата.

pH вредноста се прилагодува до 2,20 со раствор од надтриум хидроксид (3.18) и се продолжува до став 5.3.4.

5.3.3.2. За сите останати анализатори на аминокиселини (4.9)

Се земаат добиените хидролизати во согласност со 5.3.2.3 или 5.3.2.4 и делумно се неутрализираат внимателно со мешање, 17 ml раствор од натриум хидроксид (3.17), обезбедувајќи температурата да се одржува под 40 °C.

pH се прилагодува до 2,20 на собна температура со употреба на раствор од натриум хидроксид (3.17) и конечно раствор од натриум хидроксид (3.18). Се продолжува до 5.3.4.

5.3.4. Примерок раствор за хроматографија

Количински се пренесува pH прилагодениот хидролизат (5.3.3.1 или 5.3.3.2) со пуфер од цитрат (3.24) до градуирана колба од 200ml и се дополнува до ознаката со пуфер (3.24).

Ако не е употребен внатрешен стандард, се додаваат 2,00 ml внатрешен стандард (3.27.3) и се дополнува до ознаката со пуфер од цитрат (3.24). Се промешува добро.

Се продолжува до хроматографската фаза во согласност со став 5.4.

Ако примероците раствор не се испитаат истиот ден, мораат да се чуваат на температура под 5 °C.

5.4. Хроматографија

Пред хроматографијата, екстрактот (5.2) или хидролизатот (5.3.4) се сведува на собна температура. Смесата се протресува и се филтрира соодветен износ низ мембрански филтер (4.5) со големина од 0,22 μm. Бистриот раствор кој се добива подлежи на хроматографија на размена на јони, со употреба на анализатор на аминокиселини (4.9).

Вбрзигувањето може да се изведе рачно или автоматски. Важно е истата количина на раствор ± 0,5 % да се додава во колоната за анализа на стандардите и примероците, освен кога се употребува внатрешен стандард и соодносите на натриум:аминокиселини во стандардните и примероците раствори да се слични колку што е можно поизводливо.

Општо земено, динамиката на калибрација зависи од стабилноста на реагенсот на нинхидрид и од аналитичкиот систем. Стандардот или примерокот се разредува со пуфер од цитрат (3.24) за да се даде максималната област на стандардот од 30 %- 200 % на максималната област на примерокот аминокиселина.

Хроматографијата на аминокиселините малку се разликува во согласност со видот на анализаторот кој се употребува и смолата која се употребува. Избраниот систем мора да може да ги оддели аминокиселините една од друга и од нинхидрин-позитивните материјали. Во опсегот на дејствување хроматографскиот систем мора да даде линеарна реакција на промените во износите на аминокиселини кои се додаваат во колоната.

Во текот на фазата на хроматографија се применуваат соодносите помеѓу најниската и максималната област, кога се анализира еквимоларен раствор (од аминокиселините кои се утврдени). Еквимоларниот раствор мора да содржи најмалку 30% од максималниот товар на секоја аминокиселина која може јасно да се измери со систем-анализатор за аминокиселини (4.9).

За одделување на треонин-серин соодносот помеѓу најниската и максималната висина на пониските од двете аминокиселини кои се преклопуваат на хроматограмот не смее да надминува 2:10. (ако се утврдени само цистеин, метионин, треонин и лизин, недоволното одделување од граничите максимални вредности негативно ќе влијае врз утврдувањето). За сите други аминокиселини, одделувањето мора да е подобро од 1:10.

Системот мора да обезбеди дека лизинот е одделен од „лизински артефакти“ и орнитин.

6. Пресметување на резултатите

Областа на примерокот и стандардните најголеми вредности се мери за секоја поединечна аминокиселина и износот (X), во g аминокиселини по kg примерок, се пресметува како што следува:

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

Ако се употребува внатрешен стандард, помножете со: $\frac{D}{C}$

A = најголема област, хидролизат или екстракт

B = област на највисока вредност, калибрациски стандарден раствор

C = област на највисока вредност, внатрешен стандард во хидролизат или екстракт

D = област на највисока вредност, внатрешен стандард, калибрациски стандарден раствор

M = моларна тежина на аминокиселината која се утврдува

c = концентрација на стандард во μmol/ml

m = тежина на примерок (g) (коригирана до оригиналната тежина ако се суши или обезмастува)

V = ml вкупно хидролизат (5.3.4) или ml пресметан вкупен разреден волумен на екстрактот (6.1)

Цистин и цистеин се определуваат како цистеинска киселина во хидролизати на оксидиран примерок, но се пресметуваат како цистин ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol) со употреба на M 120,15 g/mol (= 0,5 x 240,30 g/mol).

Метионин се определува како метионин сулфон во хидролизати на оксидиран примерок, но се пресметува како метионин со употреба на M на метионин: 149,21 g/mol.

Додадениот слободен метионин се утврдува по екстракцијата како метионин, бидејќи се употребува пресметување на истата M вредност.

6.1. Вкупниот разреден волумен на екстракти (F) за определување на слободни аминокиселини (5.2) се пресметува како што следува:

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

V = Волумен на конечен екстракт

7. Оценување на методот

Методот е испитуван преку заемно споредување направено на меѓународно ниво во 1990 година со употреба на четири различни добиточни храни (крмни смеси за свињи, смеса за бројлери, протеински концентрат, предсмеси). Резултатите, по отстранување на исклучоците, кои ги покажуваат средните и стандардни отстапувања се прикажани во табелата подолу:

Средни вредности во g/kg

Референтен материјал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Крмни смеси за свињи	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Смеса за бројлери	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Протеински концентрат	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Предсмеса	58,42 N= 16	–	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = број на лаборатории кои учествуваат.

7.1. Повторливост

Повторливоста изразена како „во рамките на лабораториското стандардно отстапување“ на заемно споредување е прикажана во табелата подолу:

Во рамките на лабораториското стандардно отстапување (S_r) во g/kg

Референтен материјал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Крмни смеси за свињи	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Смеса за бројлери	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Протеински концентрат	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Предсмеса	1,30 N= 16	–	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = број на лаборатории кои учествуваат.

Коефициент на варијација (%) за Во рамките на лабораториското стандардно отстапување (Sr)

Референтен материјал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Крмни смеси за свињи	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Смеса за бројлери	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Протеински концентрат	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Референтен материјал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Предсмеса	2,2 n = 16	–	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = број на лаборатории кои учествуваат.

7.2 Обновливост

Резултатите за стандардно отстапување меѓу лаборатории на горенаведеното заемно споредување се прикажани во табелата подолу:

Стандардно отстапување меѓу лаборатории (S_R) во g/kg

Референтен материјал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Крмни смеси за свињи	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Смеса за бројлери	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Протеински концентрат	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Предсмеса	2,49 n = 16	–	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = број на лаборатории кои учествуваат.

Коефициент на варијација (%) за Меѓулабораториското стандардно отстапување (S_R)

Референтен материјал	Аминокиселина			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Крмни смеси за свињи	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Смеса за бројлери	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Протеински концентрат	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Предсмеса	4,3 n = 16	–	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = број на лаборатории кои учествуваат.

8. Употреба на референтни материјали

Исправната примена на методот се потврдува со правење на дупли мерења на потврдени референтни материјали кога е достапно. Се препорачува калибрацијата со потврден калибрациски раствор од аминокиселини.

9. Согледувања

9.1. Поради разликите помеѓу анализаторите на аминокиселините, конечните концентрации на калибрациските раствори на стандардните аминокиселини (видете 3.27.4 и 3.27.5) и на хидролизатите (видете 5.3.4) се земаат како насоки.

Опсегот на линеарната реакција на апаратурата треба да се провери за сите аминокиселини.

Стандардниот раствор се раствора со пуфер од цитрат за да се дадат областите со највисока вредност во средината на опсегот.

9.2. Кога се употребува течна хроматографска опрема со висока функционалност за анализирање на хидролизатот, експерименталните услови мораат да се оптимизираат во согласност со препораките на производителот.

9.3. Со примена на методот на храна за животни која содржи повеќе од 1 ’ хлорид (концентрат, минерална храна за животни, дополнителна храна), може да се случи потценување на метионин и треба да се направи посебен третам.

Е. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ТРИПТОФАН

1. Намена и предмет на уредување

Методот го овозможува определувањето на вкупниот и слободен триптофан во храната за животни. Тој не прави разлика помеѓу D- и L- форми.

2. Начело

За определување на вкупниот триптофан, примерокот се хидролизира во алкални услови со заситен раствор на бариум хидроксид и загреан до 110°C во период од 20 часа. По хидролизата се додава внатрешен стандард.

За определување на слободен триптофан, примерокот се екстрахира во услови на блага киселина во присуство на внатрешен стандард.

Триптофанот и внатрешниот стандард во хидролизатот или во екстрактот се утврдуваат со ХПЛЦ со флуоресцентна детекција.

3. **Реагенси**

3.1. Треба да се употребува двојно дестилирана вода или вода со еднаков квалитет (кондуктивитет <10μS/cm)

3.2. Стандардна супстанција: триптофан (чистота/содржина ≥ 99 %) сушена во вакуум под фосфорен пентоксид.

3.3. Внатрешна стандардна супстанција: α-метил-триптофан (чистота/содржина ≥ 99 %), сушена во вакуум над фосфорен пентоксид.

3.4. Бариум хидроксид окта-хидрат (треба да се внимава прекумерно да не се изложи $Ba(OH)_2$ 8 H_2O на воздух за да се избегне создавање на $BaCO_3$, што може да го наруши утврдувањето) видете согледување 9.3).

3.5. Содиум хидроксид.

3.6. Орто-фосфорна киселина, w (w/w) = 85 %.

3.7. Хлороводородна киселина, ρ_{20} 1,19 g/ml.

3.8. Метанол, еквивалентен на ХПЛЦ .

3.9. Лесен бензин, опсег на вриење 40-60 °C.

3.10. Раствор од натриум хидроксид, c = 1 mol/l:
Се раствораат 40,0 g NaOH (3.5) во вода и се дополнува до 1 литар со вода (3.1).

3.11. Хлороводородна киселина, c = 6 mol/l:
Се земаат 492 ml HCl (3.7) и се дополнува до 1 литар со вода.

3.12. Хлороводородна киселина, c = 1 mol/l:
Се земаат 82 ml HCl (3.7) и се дополнува до 1 литар со вода.

3.13. Хлороводородна киселина, c = 0,1 mol/l:
Се земаат 8,2 ml HCl (3.7) и се дополнува до 1 литар со вода.

3.14. Орто-фосфорна киселина, c = 0,5 mol/l:
Се земаат 34 ml орто-фосфорна киселина (3.6) и се дополнува до 1 литар со вода (3.1).

3.15. Концентриран раствор од триптофан (3.2), c = 2,50 μmol/ml:
Во 500 ml волуметриска колба се раствораат 0,2553 g триптофан (3.2) во хлороводородна киселина (3.13) и се дополнува до ознаката со хлороводордна киселина (3.13). Се чува на – 18 оС максимум во рок од 4 недели.

3.16. Концентриран раствор од внатрешен стандард, c = 2,50 μmol/ml:
Во 500 ml волуметриска колба се раствораат 0,2553 g α-метил-триптофан (3.2) во хлороводородна киселина (3.13) и се дополнува до ознаката со хлороводордна киселина (3.13). Се чува на – 18 оС максимум во рок од 4 недели.

3.17. Калибрациски основен раствор од триптофан и внатрешен стандард:
Се зема 2,00 ml концентриран раствор од триптофан (3.15) и 2,00 ml концентриран раствор од внатрешен стандард (α-метил-триптофан) (3.16). Се разредува со вода (3.1) и метанол (3.8) до

приближно истиот волумен и до приближно истата концентрација на метанол (10 %-30 %) како конечен хидролизат.
Овој раствор мора да се подготвки свеж пред употреба.
Да се заштити од директна сончева светлина во текот на подготовката.

3.18. Оцетна киселина

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

3.20. Етаноламин w (w/w) > 98 %.

3.21. Раствор од 1 g 1,1,1-трихлоро-2-метил-2-пропанол (3.19) во 100 ml метанол (3.8).

3.22. Мобилна фаза за ХПЛЦ: 3,00 g оцетна киселина (3.18) + 900 ml вода (3.1) + 50,0 ml раствор (3.21) од 1,1,1-трихлоро-2-метил-2-пропанол (3.19) во метанол (3.8) (1g/100ml). Да се прилагоди pH до 5,00 со употреба на етаноламин (3.20). Да се дополни до 1 000 ml со вода (3.1).

4. Апаратура

4.1. HPCL опрема со спектрофлуорометричен детектор.

4.2. Колона за течна хроматографија, 125 mm x 4 mm, C_{18}, 3 μm пакување или еквивалентно.

4.3. pH-мерач.

4.4. Полипропиленска колба, капацитет 125 ml, со широк врат и затка на завртување.

4.5. Филтер со мембрана, 0,45 μm.

4.6. Автоклава, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.

4.7. Механички протресувач или магнетска мешалка.

4.8. Вортекс мешалка.

5. Постапка

5.1. Подготовка на примероците

Примерокот се меле за да помине низ сито со големина од 0,5 mm. Примероците кои имаат висок степен на влага мораат или да бидат исушени на воздух на температура која не надминува 50°C или се сушат со смрзнување пред мелењето. Примероците со висока содржина на масти се екстрахираат со лесен бензин (3.9) пред мелењето.

5.2. Утврдување на слободен триптофан (екстракт)

Се мери прецизно 1 mg соодветен износ (1-5 g) на подготвен примерок (5.1), во конусна колба. Се додаваат 100,0 ml хлороводородна киселина, (3.13) и 5,00 ml концентриран раствор од внатрешен стандард (3.16). Се протресува или се меша 60 мин. со употреба на механички протресувач или магнетска мешалка (4.7). Дозволете седиментот да се сталожи и со пипета се зема 10,0 ml од супернатантскиот раствор во мензура. Се додаваат 5 ml орто-фосфорна киселина = (3.14). Се прилагува ја pH вредноста на 3 со употреба на натриум хидроксид (3.10). Се додава доволно метанол (3.8) за да добиете концентрација помеѓу 10 % и 30 % на метанол во конечниот волумен. Се пренесува до волуметричната колба соодветен волумен и се разредува со вода до волумен кој е

потребен за хроматографија (приближно истиот волумен како и калибрацискиот основен раствор (3.17)).

Се филтрираат неколку ml од растворот преку 0,45 μm филтер со мембрана (4.5) пред вбризгување во ХПЛЦ колоната. Се продолжува до хроматографската фаза во согласност со став 5.4.

Стандардниот раствор и екстрактите се заштитуваат од директна сончева светлина. Ако не е возможно да се анализираат екстрактите истиот ден, екстрактите можат да се чуваат на 5 °C максимум во рок од три дена.

5.3. Определување на вкупниот триптофан (хидролизат)

Со прецизност се мерат до 0,2 mg од 0,1 до 1 g од подготвениот примерок (5.1) во пропиленска колба (4.4). Измерениот дел-примерок мора да има содржина на азот од околу 10 mg. Се додаваат 8,4 g бариум хидроксид окта-хидрат (3.4) и 10 ml вода. Се меша во вортекс мешалка (4.8) или магнетска мешалка (4.7). Магнетот се остава покриен со тефлон во смесата. Ѕидовите од садот се мијат со 4 ml вода. Затката со навој се става и колбата се затвора лабаво. Се пренесува во аутоклавата (4.6) со вода која врие и пареа во рок од 30-60 минути. Аутоклавата се затвора и се аутоклавира на 110 (± 2) °C во рок од 20 часа.

Пред да ја отворите аутоклавата, температурата се намалува до малку под 100°C. За да се избегне кристализирање на Ba(OH)2 · 8 H2O, се додаваат 30 ml вода која е на собна температура во топлата смеса. Се протресува или се промешува нежно. Се додаваат 2,00 ml концентриран раствор од внатрешен стандард(α-метил-триптофан) (3.16). Садовите се ладат на бања со вода/мраз во рок од 15 минути.

Потоа, се додаваат 5 ml орто-фосфорна киселина (3.14). Садот се чува во бања за ладење и се неутрализира со HCl (3.11) додека се меша и pH се прилагодува до 3,0 со употреба на HCl (3.12). Се додава доволно метанол за да се добие концентрација помеѓу 10 % и 30 % на метанол во конечниот волумен. Се пренесува до волуметричната колба соодветен волумен и се разредува со вода до дефинираниот волумен кој е потребен за хроматографија (на пример 100 ml). Додавањето на метанол не предизвикува таложење.

Се филтрираат неколку ml од растворот преку 0,45 μm филтер со мембрана (4.5) пред вбризгување во ХПЛЦ колоната. Се продолжува до хроматографската фаза во согласност со став 5.4.

Основниот раствор и хидролизатите се заштитуваат од директна сончева светлина. Ако не е возможно да се анализираат хидролизатите истиот ден, тие можат да се чуваат на 5°C максимум во рок од три дена.

5.4. HPLC определување

Следните услови за изократска елуција се нудат за упатства; можат да се употребат и други услови доколку истите даваат еднакви резултати (видете согледувања 9.1 и 9.2):

Колона за течна хроматографија (4.2):	125 mm x 4 mm, C_{18}, 3 μm пакување или еквивалентно.
Температура на колоната:	Собна температура

Мобилна фаза (3.22):	3,00 g оцетна киселина (3.18) + 900 ml вода (3.1) + 50,0 ml раствор (3.21) од 1,1,1-трихлоро-2-метил-2-пропанол (3.19) во метанол (3.8) (1/100). pH се прилагодува до 5,00 со употреба на етаноламин (3.20). Се дополнува до 1 000 ml со вода (3.1)
Стапка на проток:	1 ml/мин.
Вкупно времетраење:	околу 34 мин.
Детекција на бранова должина:	ексцитација: 280 nm, емисија: 356 nm.
Волумен на вбризгување	20 μl

6. **Пресметување на резултатите**

Износот на триптофан (X), во g по 100 g примерок, се пресметува како што следува:

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

A = област со највисока вредност на внатрешен стандард, калибрациски стандарден раствор (3.17)

B = област со највисока вредност на триптофан, екстракт (5.2) или хидролизат (5.3)

V_1 = волумен во ml (2 ml) на концентриран раствор од триптофан (3.15) додаден во калибрацискиот раствор (3.17)

c = концентрација во ml {imol/ml (= 2,50) на концентриран раствор од триптофан (3.15) додаден во калибрацискиот раствор (3.17)

V_2 = волумен во ml на концентриран раствор на внатрешен стандард (3.16) додаден при екстракција (5.2) (= 5,00 ml) или во хидролизатот (5.3) (= 2,00 ml)

C = област со највисока вредност на внатрешен стандард, екстракт (5.2) или хидролизат (5.3)

D = област со највисока вредност на триптофан, калибрациски стандарден раствор (3.17)

V_3 = волумен во ml (2,00 ml) на концентриран раствор од внатрешен стандард (3.16) додаден во калибрацискиот стандарден раствор (3.17)

m = тежина на примерок во g (коригирана до оригиналната тежина ако се суши и/или обезмастува)

M = моларна тежина на триптофан (= 204,23 g/mol)

7. **Повторливост**

Разликата помеѓу резултатите на двете паралелни определувања кои се спроведени на истиот примерок не смее да надмине 10 % релативно на највисокиот резултат.

8. **Резултати од меѓулабораториското истражување**

Беше организирано меѓулабораториско истражување во рамките на ЕЗ (четвро меѓулабораториско истражување) во кое беа анализирани три примероци од12 лаборатории за да се потврди методот за хидролиза. Дупли (5) анализи беа спроведени на секој примерок. Резултатите се дадени во следната табела:

	Примерок 1 Храна за свињи	Примерок 2 Храна за свињи дополнета со L-триптофан	Примерок 3 Концентрат храна за свињи
L	12	12	12
n	50	55	50
Средна вредност [g/kg]	2,42	3,40	4,22
sr [g/kg]	0.05	0.05	0.08
r [g/kg]	0.14	0.14	0.22
CV_r [%]	1.9	1.6	1.9
SR [g/kg]	0.15	0.20	0.09
R [g/kg]	0.42	0.56	0.25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = број на лаборатории кои поднесуваат резултати

n = број на прифатени поединечни резултати за елиминирање на грешки (идентификувани со тест за исклучување по Кохран-Диксон).

sr =стандардно отстапување на повторливоста

SR = стандардно отстапување на обновливоста

r = повторливост

R = обновливост

CV_r = коефициент на варијација на повторливоста, %

CV_R =коефициент на варијација на обновливоста, %

Беше организирано друго меѓулабораториско истражување во рамките на ЕЗ (трето меѓулабораториско истражување) во кое беа анализирани два примероци од 12 лаборатории за да се потврди методот за екстракција на слободен триптофан. Дупли (5) анализи беа спроведени на секој примерок. Резултатите се дадени во следната табела:

	Примерок 4 Смеса од пченица и соја	Примерок 5 Смеса од пченица и соја (= примерок 4) со додаден триптофан (0,457g/kg1)
L	12	12
n	55	60
Средна вредност [g/kg]	0,391	0,931
sr [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
SR [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L = број на лаборатории кои поднесуваат резултати

n = број на прифатени поединечни резултати за елиминирање на грешките (идентификувани со тест за исклучување по Кохран-Диксон).

sr = стандардно отстапување на повторливоста

SR = стандардно отстапување на обновливоста
r = повторливост
R = обновливост
CVr = коефициент на варијација на повторливоста, %
CVR = коефициент на варијација на обновливоста, %

Беше спроведено друго меѓулабораториско истражување во рамките на ЕЗ во кое беа анализирани четири примероци од 7 лаборатории со цел потврдување на триптофан за хидролиза. Резултатите се дадени подолу. Дупли (5) анализи беа спроведени на секој примерок.

	Примерок 1 Крмни смеси за свињи (CRM 117)	Примерок 2 Рибино брашно со ниско ниво на масти (CRM 118)	Примерок 3 Соино брашно (CRM 119)	Примерок 4 Обрано млеко во прав (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Средна вредност [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
sr [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
SR [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L =број на лаборатории кои поднесуваат резултати
n =број на прифатени поединечни резултати за елиминирање на грешките (идентификувани со тест за исклучување по Кохран-Диксон).
sr =стандардно отстапување на повторливоста
SR =стандардно отстапување на обновливоста
r =повторливост
R =обновливост
CVr =коефициент на варијација на повторливоста, %
CVR =коефициент на варијација на обновливоста, %

9. Согледувања

9.1. Следејќи посебни хроатографски услови може да се даде подобро одделување помеѓу триптофанот и α-метил-триптофан.
Изократска елуција проследена со чистење на колоната по градиент:

Колона за течна хроматографија:	125 mm x 4 mm, C_{18}, 5 μm пакување или еквивалентно.
Температура на колоната:	32°C
Мобилна фаза:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4/метанол, 95+5 (V+V).

Б: метанол

Програма на градиент:	0 мин.	100 % А	0%Б
	15 мин.	100 % А	0%Б
	17 мин.	60 N = %	40 N = %В
	19 мин.	60 N = %	40 N = %В
	21 мин.	100 % А	0%Б
	33 мин.	100 % А	0%Б
Стапка на проток:	1,2 ml/мин.		

Вкупно времетраење: прибл. 33

9.2. Хроматографијата ќе се разликува во согласност со видот на ХПЛЦ и материјалот за пакување на колоната кој се употребува. Избраниот систем мора да може да даде основно одделување помеѓу триптофанот и внатрешниот стандард. Исто така, важно е производите од деградацијата да се добро одделени од триптофанот и од внатрешниот стандард. Се изведува постапка со хидролизати без внатрешен стандард за да се провери дали има примеси на основата под внатрешниот стандард. Важно е времетраењето на постапката да е доволно долго за елуција на сите производи за деградација, затоа што во спротивно доцните елуциски највисоки вредности можат да се помешаат со последователните хроматографски постапки.

Во опсегот на операцијата, хроматографскиот систем дава линеарна реакција. Линеарната реакција се мери со постојана (нормалната) концентрација на внатрешен стандард и различни концентрации на триптофан. Важно е големината на триптофанот и внатрешните стандардни максимални вредности да се во рамките на опсегот на HPLC/флуоресцентниот систем. Ако триптофанот и/или внатрешните стандардни максимални вредности се премногу мали или премногу големи, анализата се повторува со друга големина на примерокот и/или променет конечен волумен.

9.3. Бариум хидроксид

Како старее, бариум хидроксидот станува потежок за растворање. Ова резултира со небистар раствор за HPLC определување, кој може да произведе пониски резултати за триптофан.

Ж. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СУРОВИ МАСЛА И МАСТИ

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод е за определување на сурови масла и масти во храната за животни. Не ги опфаќа анализата на маслодајните семиња и маслодајни плодови.

Употребата на двете постапки опишани подолу зависи од природата и составот на храната за животни и причината за спроведување на анализата.

1.1. Постапка А – Сурови масла и масти погодни за директна екстракција

Овој метод се применува на материјалите за храна за животни од растително потекло, освен оние кои се вклучени во рамките на обемот на Постапка Б.

1.2. Постапка Б – Вкупно сурови масла и масти

Овој метод се применува на материјалите за храна за животните од животинско потекло и на сите мешани храни. Треба да се употребува за сите материјали од кои маслата и мастите не можат целосно да се екстрахираат без претходна хидролиза (пр. глутен, квасец, протеини од компир и производи кои подлежат на процеси како што се е извлекување, лупење и загревање).

1.3. Интерпретација/толкување на резултатите

Во сите случаи каде со употреба на Постапка Б се добива поголем резултат отколку со употреба на Постапка А, резултатот кој се добива со Постапка Б се прифаќа како вистинска вредност.

2. Начело

2.1. Постапка А

Примерокот се екстрахира со лесен бензин. Растворувачот се дестилира и остатоците се сушат и мерат.

2.2. Постапка Б

Примерокот се преработува под топлина со хлороводородна киселина. Смесата се лади и филтрира. Остатокот се мие и се суши и се става на определување во согласност со Постапка А.

3. Реагенси

3.1. Лесен бензин, опсег на вриење: 40 до 60°C. Бромската вредност мора да е помала од 1 и остатокот на испарувањето помало од 2 mg/100 ml.

3.2. Натриум сулфат, анхидрид.

3.3. Хлороводородна киселина, c = 3 mol/l

3.4. Средство за филтрирање, пр. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. Апаратура

4.1. Апаратура за екстракција. Ако е со сифон (Soxhlet апаратура), стапката на рефлукс е таква која создава околу 10 вртежи на час; ако не е сифонска, стапката на рефлкс е околу 10 ml по минута.

4.2. Екстракциска глиза, без материја која е растворлива со лесен бензин и кои имаат порозност доследна на условите од точка 4.1.

4.3. Печката за сушење, или вакуумска печка на 75 ± 3 °C или воздушна печка на 100 ± 3 °C.

5. Постапка

5.1. Постапка А (видете точка 8.1)

Се мерат 5 g од примерокот со прецизност од 1 mg, се пренесува во екстракциска глиза (4.2) и се покрива со памучен тампон кој не содржи масти.

Глизата се става во екстрактор (4.1) и екстрахирајте во рок од пест часа со лесен бензин (3.1). Екстрактот од лесен бензин се собира во сува, измерена колба која содржи делови од вулкански камен ([1]).

Растворот се дестилира. Остатокот се суши чувајќи ја колбата час и пол во печката за сушење (4.3). Се остава да се излади во сушалка и се мери. Повторно се суши во рок од 30 минути за да се осигура дека тежината на маслата и мастите останува постојана (загубата на тежина помеѓу две последователни мерења мора да е помала или еднаква на 1 mg).

5.2. Постапка Б

Се мерат 2,5 g од примерокот со прецизност од 1 mg (видете точка 8.2), се става во мензура од 400 ml или конусна колба од 300 ml и се додава 100 ml хлороводородна киселина (3.3) и делови од вулкански камен. Мензурата се покрива со саатно стакло или се става на конусната колба рефлуктирачки кондензатор. Смесата се доведува до точка на благо вриење на тивок оган или топла плоча и се чува така во рок од еден час. Да не се дозволи производот да се залепи на ѕидовите од садот.

Се лади и се додава количина од средството за филтрирање (3.4) доволна за да спречи загуба на масло и масти во текот на филтрацијата. Се филтрира низ навлажнета, безмасна, дупла филтер-хартија. Остатокот се измива во ладна вода додека да се добие неутрален филтрат. Да се провери дали филтратот не содржи масла или масти. Нивното присуство укажува дека примерокот мора да се екстрахира со лесен бензин, со употреба на Постапката А, пред хидролизата.

Дуплата филтер-хартија која го содржи остатокот се става на саатно стакло и се суши во рок од час и пол во воздушна печка (4.3) на 100 ± 3 °C.

Дуплата филтер-хартија која го содржи сувиот остаток се става во екстракциската глиза (4.2) и се покрива со тампон кој не содржи масти. Глизата се става во екстрактор (4.1) и се продолжува како што е наведено во вториот и третиот став од точка 5.1.

6. Изразување на резултат

Тежината на остатокот се прикажува како процент од примерокот.

7. Повторливост

Разликата помеѓу резултатите на двете паралелни определувања кои се спроведени на истиот примерок од истиот аналитичар не смее да надминува:

- 0,2 % во апсолутна вредност, за содржина на сурови масла и масти помала од 5 %,
- 4,0 % релативна на поголемиот резултат за содржина од 5 % до 10 %,
- 0,4 %, во апсолутна вредност, за содржина над 10 %.

8. Согледувања

8.1. За производи со голема содржина на масла и масти, кои потешко се мелат или се непогодни за добивање на хомоген намален примерок за испитување, се постапува како што следува:

[1] Кога маслото или маста треба да подлежи последователно испитување за квалитет, заменете ги деловите ид вулкански камен со стаклени топчиња.

Се мерат 20 g од примерокот со прецизност од 1 mg и се меша со 10 g или повеќе анхидриден натриум сулфат (3.2). Се екстрахира со лесен бензин (3.1) како што е наведено во точка 5.1. Добиениот екстракт се дополнува до 500 ml со лесен бензин (3.1) и се меша. Се зема 50 ml од растворот и се става во мала, сува, измерена колба која содржи делови од вулкански камен. Растворувачот се дестилира, суши и се постапува како што е наведено во последниот став од точка 5.1.

Растворувачот се отстранува од остатокот од екстрактот кој е останат во глизата, остатокот се меле до големина од 1 mm, се враќа во екстракциската глиза (не се додава натриум сулфат) и се постапува како што е наведено во вториот и третиот став од точка 5.1.

Содржината на масла и масти се пресметува како процент од примерокот со употреба на следната формула:

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

при што:

m_1 =тежина во грамови на остатокот по првата екстракција (аликвотен дел од екстрактот)

m_2 =тежина во грамови на остатокот по втората екстракција.

8.2. За производи кои имаат мало количество на масла и масти примерокот за испитување може да се зголеми до 5 g.

8.3. Храна за домашни миленици која содржи висока содржина на вода може да треба да се измеша со анхидриден натриум сулфат пред хидролизата и екстракцијата по постапката Б.

8.4. Во сатв 5.2 може да е поефикасно да се употребува топла вода наместо ладна, за да се измие остатокот по филтрацијата.

8.5. Времето на сушење од 1,5 ч. може да треба да се зголеми за некои храни за животни. Прекумерното сушење се избегнува бидејќи може да доведе до ниски резултати. Може исто така да се употреби микробранова печка.

8.6. Пред-екстракцијата со постапка А пред хидролизата и повторната екстракција со постапка Б се препорачува ако содржината на необработени масла и масти е поголема од 15 %. До одреден степен, ова зависи од природата на храната за животни и природата на маслото/маста во храната за животни.

3. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СИРОВИ ВЛАКНА

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврдат органските супстанции кои не содржат масти во храната за животни кои се нерастворливи во киселина и алкален медиум и вообичаено се опишуваат како сирови влакна.

2. Начело

Примерокот, обезмастен каде што е потребно, се третира последователно со раствори за варење од сулфурна киселина и калиум хидроксид со точно определени концентрации. Остатокот се одделува со филтрација на филтер од синтерувано стакло измиен, исушен, измерен и пепелосан во рамките на опсег од 475 до 500°C. Загубата на тежина како резултат на

пепелосувањето соодветствува со сировото влакно кое е присутно во примерокот за испитување.

3. Реагенси

3.1. Сукфурна киселина, c = 0,13 mol/l.

3.2. Агенс против пенење (пр. n-октанол).

3.3. Средство за филтрирање (Целит 545 или еквивалент), загреано на 500 °C во рок од четири часа (8.6).

3.4. Ацетон.

3.5. Опсег на вриење на лесен бензин 40 до 60 °C.

3.6. Хлороводородна киселина, c = 0,5 mol/l.

3.7. Раствор од калиум хидроксид, c = 0,23 mol/l.

4. Апаратура

4.1. Единицата за загревање за разложување со сулфурна киселина и раствор од калиум хидроксид, опремена со поддршка за лонецот со филтер (4.2) и обезбедена со излезна цевка со славина на излезот за течност и вакуум, по можност со компресиран воздух. Пред употреба секој ден, претходно единицата се загрева со вода која врие во рок од пет минути.

4.2. Стаклен лонец со филтер со наместена филтер-плоча од синтерувано стакло со големина на порите од 40-90 μm. Пред првата употреба, се загрева до 500 °C во рок од неколку минути и се лади (8.6).

4.3. Цилиндар со најмалку 270 ml со рефлуксивен кондензатор, соодветен за вриење.

4.4. Печка за сушење со термостат.

4.5. Печка на жар со термостат.

4.6. Единица за екстракција која се состои од плоча за поддршка за лонецот со филтер (4.2) и со цевка за одвод со славина до излезот за вакуум и течност.

4.7. Прстени за поврзување за склопување на единицата за загревање (4.1), лонец (4.2) и цилиндер (4.3) и за поврзување на единицата за ладна екстракција (4.6) и лонец.

5. Постапка

Се мери 1 g од подготвениот примерок со прецизност од 1 mg и се става го во лонецот (4.2), (видете согледувања 8.1, 8.2 и 8.3) и се додава 1 g од средството за филтрирање (3.3).

Единицата за загревање (4.1) и лонецот со филтер (4.2) се склопуваат, потоа се прикачува цилиндарот (4.3) на лонецот. Се истураат 150 ml сулфурна киселина што врие (3.1) во склопениот цилиндар и лонецот и по потреба се додаваат неколку капки агенс против пенење (3.2).

Течноста се доведува до точка на вриење во рок од 5 ± 2 и се врие на силен оган точно 30 минути.

Славината се отвора во цевката за одвод (4.1) и под вакуум, се филтрира сулфурната киселина низ лонецот со филтер и остатокот се мие со три последователни серии од 30 ml вода што врие, осигурувајќи дека остатокот се филтрира сув по секое миење.

Излезната славина се затвора и се истураат 150 ml раствор од калиум хидроксид кој врие (3.7) во склопениот цилиндер и лонецот и се додаваат неколку капки агенс против пенење (3.2). Течноста се доведува до точка на вриење во рок од 5 ± 2 и се врие на силен оган точно 30 минути. Се филтрира и се повторува постапката на миење која се употребува за фазата на сулфурна киселина.

По конечното миење и сушење, лонецот и неговата содржина се исклучуваат и повторно се поврзува на единицата за ладна екстракција (4.6). Се применува вакуум и се мие остатокот во лонецот со три последователни серии на ацетон од 25 ml (3.4), осигурувајќи дека остатокот се филтрира сув по секое миење.

Лонецот се суши до постојана тежина во печката на 130°C. По секое сушење, се лади во сушалката и брзо се мери. Лонецот се става во печка на жар и се пепелосува до постојана тежина (загубата во тежина помеѓу две последователни мерења мора да е помала или еднаква на 2 mg) на 475°C до 500°C најмалку 30 минути.

По секое загревање, најпрво се лади во печката, а потоа во сушалката пред мерење.

Се спроведува бланко испитување без примерокот. Загубата на тежина која е резултат на пепелосувањето не смее да надмине 4 mg.

6. Пресметување на резултатите

Содржината на сировото влакно како процент од примерокот се дава со равенката:

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

при што:

m =тежина на примерокот во g,

m_0 =загуба во тежина по пепелосувањето во текот на определувањето, во g,

m_1 =загуба во тежина по пепелосувањето во текот на празното испитување, во g.

7. Повторливост

Разликата помеѓу две паралелни определувања спроведени на истиот примерок не смее да надмине:

— 0,6 % во апсолутна вредност, за содржина на сирово влакно помала од 10 %,

— 6 % релативно на повисокиот резултат, за содржина на сирово влакно еднаква или поголема од 10 %.

8. Согледувања

8.1. Храна за животни која содржи повеќе од 10% необработени масти мора да се обезмасти пред анализата со лесен бензин (3.5). Лонецот со филтер (4.2) и неговата содржина се поврзуваат со единицата за екстракција (4.6) и се применува вакуум и остатокот се мие со три последователни серии од 30 ml лесен бензин, осигурувајќи дека остатокот е сув. Лонецот и неговата содржина се поврзуваат со единицата за загревање (4.1) и се продолжува како што е наведено во 5.

8.2. Храната за животни која содржи масти кои не можат директно да се екстрахираат со

лесен бензин (3.5) мора да се обезмасти како што е прикажано во 8.1 и да се обезмасти уште еднаш по вриење со киселина. По вриењето со киселина и последователното миење лонецот и неговата содржина се поврзуваат со единицата за ладна екстракција (4.6) и се мие три пати со ацетон од 30 ml проследено со три дополнителни миења со делови од 30 ml лесен бензин. Се филтрира под вакуум додека да се исуши и анализата се продолжува како што е наведено во 5, почнувајќи со третман со калиум хидроксид.

8.3. Ако храната за животни содржи над 5% јаглероди, изразени како калциум карбонат, лонецот (4.2) се поврзува со измерениот примерок со единицата за загревање (4.1). Примерокот се мие три пати со хлороводородна киселина од 30 ml (3.6). По секое додавање примерокот се остава да отстои околу една минута пред филтрирањето. Се мие уште еднаш со 30 ml вода и потоа се продолжува како што е опишано во 5.

8.4. Ако се употребува апаратура во облик на држач (неколку лонци прикачени на истата единица за загревање) не смеат да се спроведат две поединечни определувања на истиот примерок за анализа во истите серии.

8.5. Ако по вриењето тешко е да се филтрираат киселинските и базните раствори, се употребува компресиран воздух низ цевката за одвод на единицата за загревање и потоа се продолжува со филтрирање.

8.6. Температурата за пепелосувањето не е повисока од 500 °C за да се прошири рокот на траење на стаклените лонци со филтер. Мора да се внимава да се избегне прекумерен термален шок во текот на циклусите на загревање и ладење.

S. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ШЕЌЕР

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод дава можност да се определи содржината на редуктивни шеќери и вкупни шеќери по инверзија, изразени како гликоза или каде што е погодно сахароза, со фактор на преобразување 0,95. Тоа се применува кај мешаната храна за животни. За друга храна за животни се предвидени посебни методи. Каде што е потребно, лактозата треба да се мери одделно и да се земе предвид при пресметување на резултатите.

2. Начело

Шеќерите се екстрахираат во растворен етанол; растворот се избиструва со раствори Карез I и II. По отстранување на етанолот, количините пред и по инверзија се определуваат по Луф-Шорл метод.

3. Реагенси

3.1. 40 % етанол (в/в) густина: 0,948 g/ml на 20 ºC, неутрализиран кон фенолфталеин.

3.2. Раствор Карез I: се раствора во вода 2,79 g цинкацетат $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ и 3 g глацијална оцетна киселина. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.3. Раствор Карез II: се раствора во вода 10,6 g калиумфероцијанид $K_4Fe(CN_6) \times 3H_2O$. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.4. 0,1 % раствор (т/в) од метилоранж.

3.5. Хлороводородна киселина 4 mol/литар.

3.6. Хлороводородна киселина 0,1 mol/литар.

3.7. Раствор од натриум хидроксид 0,1 mol/литар.

3.8. Луф-Шорл реагенс:

Со внимателно мешање, растворот на лимонска киселина (3.8.2) се става во раствор на натриумкарбонат (3.8.3). Се додава раствор на бакарсулфат (3.8.1) и се дополнува со вода до 1 литар. Се остава да стои една ноќ и се филтрира.

Се проверува нормалноста на така добиениот реагенс (Cu 0,05 mol/литар; Na_2 CO_3 1 mol/литар), видете (5.4) последен став. Вредноста на pH на растворот треба да биде приближно 9,4.

3.8.1. Раствор на бакарсулфат: се раствора 25 g бакарсулфат, $CuSO_4$ $5H_2O$, кој не содржи железо, во 100 ml вода.

3.8.2. Раствор на лимонска киселина: се раствора 50 g лимонска киселина a.p. $C_6H_3O_7 . H_2O$ во 50 ml вода.

3.8.3. Раствор на натриумкарбонат: се раствора 143,8 g безводен натриумкарбонат во околу 300 ml топла вода. Оставете да се излади.

3.9. Раствор на натриумтиосулфат 0,1 mol/литар.

3.10. Раствор на скроб: смеса од 5 g растворлив скроб во 30 ml вода се додава во 1 литар вода што врие. Се остава да врие три минути, се остава да се лади и ако е потребно, се додава 10 mg живинјодид како конзерванс.

3.11. Сулфурна киселина 3 mol/литар.

3.12. 30 % раствор (т/в) на калиумјодид.

3.13. Гранулиран високопорозен вулкански камен, се врие во хлороводородна киселина, се мие со вода и се суши.

3.14. 3-метилбутан-1-о1.

4. Апаратура

Мешалка (центрифуга): приближно 35 до 40 вртежи по минута.

5. Постапка

5.1. Екстракција на примерок

Се мери 2,5 g од мострата со точност до mg и се става во волуметриска колба од 250 ml. Се додава 200 ml етанол (3.1) и се меша во мешалка еден час. Се додава 5 ml раствор на Карез I (3.2) и се меша од прилика 30 секунди. Се додава 5 ml раствор на Карез II (3.3) и повторно се меша една минута. Се дополнува до ознаката со етанол (3.1), се хомогенизира и се филтрира. Се зема 200 ml од филтратот и се испарува приближно до половина волумен за да се отстрани поголем дел од етанолот. Остатокот од испарувањето се префрла количински во 200 ml волуметриска колба со помош на топла вода, се лади, се дополнува со вода до ознаката, се хомогенизира и ако е потребно се филтрира. Овој раствор ќе се употреби за определување на содржината на редуктивните шеќери и по инверзија, на вкупните шеќери.

5.2. Определување на редуктивни шеќери

Со помош на пипета, се зема најмногу 25 ml раствор кој содржи помалку од 60 mg редуктивни шеќери изразени како гликоза. Ако е потребно, се дополнува до 25 ml со дестилирана вода и се определува содржината на редуктивните шеќери по Луф-Шорл метод. Резултатот се изразува како процентуална содржина на гликозата во примерокот.

5.3. Определување на општите шеќери по инверзија

Со помош на пипета се зема 50 ml раствор и се префрла во 100 ml волуметриска колба. Се додаваат неколку капки раствор на метилоранж (3.4), а потоа внимателно и со постојано мешање се додава хлороводородна киселина (3.5) додека течноста да добие силно црвена боја. Се додава 15 ml хлороводородна киселина (3.6), колбата се потопува во бања со вода што врие и се остава во неа триесет минути. Се лади брзо на околу 20ºC и се додава 15 ml раствор на натриумхидроксид (3.7). Се дополнува со вода до 100 ml и се хомогенизира. Се одзема најмногу 25 ml раствор кој содржи помалку од 60 mg редуктивни шеќери изразени како гликоза. Ако е потребно, се дополнува до 25 ml со дестилирана вода и се определува содржината на редуктивните шеќери по Луф-Шорл метод. Резултатот се изразува како процент на гликоза или каде што е погодно, сахароза, преку множење со фактор 0,95.

5.4. Титрација по Луф-Шорл метод

Со пипета се зема 25 ml Луф-Шорлов реагенс (3.8) и се префрла во Ерленмаерова колба од 300 ml; се додава точно 25 ml избистрен раствор на шеќер. Се зема 2 гранули високопорозен вулкански камен (3.13), се загрева, се меша на рака додека се загрева на отворен пламен со средна височина така што течноста врие околу две минути. Ерленмаеровата колба се поставува веднаш на жичена мрежа обложена со азбест, која има отвор со дијаметар од околу 6 см под која е запален пламен. Пламенот се регулира така што се загрева само дното на Ерленмаеровата колба. На Ерленмаеровата колба се наместува рефлуксивенкондензатор. Врие точно десет минути. Веднаш се лади во студена вода и потоа околу пет минути се титрира како што следува:

Се додава 10 ml раствор на калиумјодид (3.12) и веднаш потоа (внимателно, затоа што постои ризик од обилно формирање на пена), се додава 25 ml сулфурна киселина (3.11). Се титрира со раствор на натриумтиосулфат (3.9) додека не се појави темножолта боја, се додава индикатор на скроб (3.10) и се завршува титрацијата.

Истата титрација се извршува со точно измерена смеса од 25 ml Луф-Шорлов реагенс (3.8) и 25 ml вода, по додавање на 10 ml раствор на калиумјодид (3.12) и 25 ml сулфурна киселина (3.11) без вриење.

6. Пресметување на резултатите

Со помош на табелата се определува износот на гликоза во mg, кој одговара на разликата помеѓу вредностите на двете титрации, изразени во mg натриумтиосулфат 0,1 mol/литар. Изразете го резултатот како процент од примерокот.

7. Посебни постапки

7.1. Во случај на храна за животни која содржи многу меласа и други кои не се особено хомогени, се измерува 20g и се става во 500ml вода во волуметриска колба од 1 литар. Се меша еден час во мешалката. Се избиструва со реагенси на Карез I (3.2) и II (3.3) како што е наведено во 5.1, меѓутоа овој пат се употребуваат четирикратни количини од секој реагенс. Се дополнува до ознаката со 80 % етанол (в/в).

Се хомогенизира и се филтрира. Етанолот се отстранува како што е опишано во 5.1. Доколку нема декстринизиран скроб, се дополнува до ознаката со дестилирана вода.

7.2. Во случај на меласа и чиста храна за животни кои се богати со шеќер и скоро не содржат скроб (рогачи, сушени ленти од репка и сл.), се мери 5 g, се става во волуметриска колба од 250ml, се додава 200 ml дестилирана и се меша во мешалка еден час или повеќе, ако е потребно. Се избиструва со реагенс Карез I (3.2) и II (3.3) како што е опишано во 5.1. Се дополнува до ознаката со ладна вода, се хомогенизира и се филтрира. За да се определи количината на општите шеќери, се продолжува како што е опишано во 5.3.

8. Согледувања

8.1. За да се избегне создавање на пена, се препорачува да се додаде (независно од волуменот) приближно 1 ml 3-метилбутан-1-ol (3.14) пред да се зоврие со Луф-Шорлов реагенс.

8.2. Разликата помеѓу содржината на општите шеќери по инверзија, изразена како гликоза и содржината на редуктивните шеќери, изразена како гликоза, се множи со 0,95 и се добива процентот на содржината на сахароза.

8.3. За да се определи содржината на редуктивните шеќери, освен лактоза, може да се употребат два метода:

8.3.1. За приближно пресметување, содржината на лактоза се множи по 0,675 утврдена по друг метод за анализа и се одзема резултатот добиен од содржината на редуктивните шеќери.

8.3.2. За точно пресметување на редуктивните шеќери, освен лактоза, за двете крајни определувања треба да се употреби ист примерок. Една од анализите се врши врз дел на растворот добиен според 5.1, а другата на дел од растворот добиен за време на определувањето на лактоза по метод утврден за таа цел (по ферментирање на другите видови шеќер и избистрување).
Во двата случаја, количината на присутниот шеќер се определува по Луф-Шорл метод и се пресметува во mg гликоза. Една од вредностите се одзема од другата и разликата се изразува како процент од примерокот.

Пример:

Двата волумена земени за секое определување, одговараат на примерок од 250 mg.
Во првиот случај се троши 17 ml раствор на натриумтрисулфат 0,1 mol/литар, соодветен на 44,2 mg гликоза; во вториот, 11 ml соодветен на 27,6 mg гликоза.
Разликата е 16,6 mg гликоза.
Содржината на редуктивните шеќери (освен лактоза) се пресметува како гликоза, е според тоа:

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

Табела на вредностите за 25 ml Луф-Шорлов реагенс

ml $Na_2 S_2 O_3$ 0,1 N, две минути греење, десет минути вриење

$Na_2 S_2 O_3$ 0,1 mol/литар	Гликоза, инвертна фруктоза C6 H12 O6		Лактоза C12 H22 O11		Малтоза C12 H22 O11		$Na_2 S_2 O_3$ 0,1 mol/литар
ml	mg	разлика	mg	разлика	mg	разлика	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4.8	2.4	7.3	3.7	7.8	3.9	2
3	7.2	2.5	11.0	3.7	11.7	3.9	3
4	9.7	2.5	14.7	3.7	15.6	4.0	4
5	12.2	2.5	18.4	3.7	19.6	3.9	5
6	14.7	2.5	22.1	3.7	23.5	4.0	6
7	17.2	2.6	25.8	3.7	27.5	4.0	7
8	19.8	2.6	29.5	3.7	31.5	4.0	8
9	22.4	2.6	33.2	3.8	35.5	4.0	9
10	25.0	2.6	37.0	3.8	39.5	4.0	10
11	27.6	2.7	40.8	3.8	43.5	4.0	11
12	30.3	2.7	44.6	3.8	47.5	4.1	12
13	33.0	2.7	48.4	3.8	51.6	4.1	13
14	35.7	2.8	52.2	3.8	55.7	4.1	14
15	38.5	2.8	56.0	3.9	59.8	4.1	15
16	41.3	2.9	59.9	3.9	63.9	4.1	16
17	44.2	2.9	63.8	3.9	68.0	4.2	17
18	47.1	2.9	67.7	4.0	72.2	4.3	18
19	50.0	3.0	71.7	4.0	76.5	4.4	19
20	53.0	3.0	75.7	4.1	80.9	4.5	20
21	56.0	3.1	79.8	4.1	85.4	4.6	21
22	59.1	3.1	83.9	4.1	90.0	4.6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

И. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЛАКТОЗА

1. Намена и предмет на уредување

Методот дава можност да се определи содржината на лактоза во добиточните храни кои содржат повеќе од 0,5% лактоза.

2. Начело

Шеќерите се раствораат во вода. Растворот се ферментира со квасец *Saccharomyces cerevisiae* кој не влијае врз лактозата. По избистрување и филтрација содржината на лактозата во филтратот се определува по Луф-Шорл метод.

3. Реагенси

3.1. Суспензија на *Saccharomyces cerevisiae:* се суспендираат 25g свеж квасец во 100ml вода. Суспензијата може да се чува најмногу една недела во ладилник.

3.2. Раствор Карез I: се раствора во вода 21,9g цинкацетат $Zn (CH_3 COO)_2 2H_2O$ и 3 g глацијална оцетна киселина. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.3. Раствор Карез II: се раствора во вода 10,6g калиумфероцијанид $K_4Fe (CN)_6 3H_2O$. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.4. Луф-Шорл реагенс:

Со внимателно мешање, растворот на лимонска киселина (3.4.2) се става во раствор на натриумкарбонат (3.4.3). Се додава раствор на бакарсулфат (3.4.1) и се дополнува со вода до 1 литар. Се остава да стои една ноќ и се филтрира. Се проверува нормалноста на така добиениот реагенс (Cu 0,1 mol/литар; Na_2 CO_3 1 mol/литар). Вредноста на pH на растворот треба да биде приближно 9,4.

3.4.1. Раствор на бакарсулфат: се раствора 25 g бакарсулфат, $CuSO_4$ $5H_2O$, кој не содржи железо, во 100 ml вода.

3.4.2. Раствор на лимонска киселина: се раствора 50 g лимонска киселина C6H3O7 · H2O во 50 ml вода.

3.4.3. Раствор на натриумкарбонат: се раствора 143,8 g безводен натриумкарбонат во околу 300 ml топла вода. Се остава да се излади.

3.5. Гранулиран високопорозен вулкански камен, се врие во хлороводородна киселина, се мие со вода и се суши.

3.6. 30 % раствор (т/в) на калиумјодид.

3.7. Сулфурна киселина 3 mol/литар.

3.8. Раствор на натриумтиосулфат 0,1 mol/литар.

3.9. Раствор на скроб: смеса од 5 g растворлив скроб во 30 ml вода се додава во 1 литар вода што врие. Се остава да врие три минути, се остава да се лади и ако е потребно, се додава 10 mg живинјодид како конзерванс.

4. Апаратура

Водена бања со термостат поставен на 38-40 ^{0}C.

5. Постапка

Се мери 1 g од примерокот со точност до mg и се става во волуметриска колба од 100 ml. Се додава 25 до 30 ml вода. Колбата се става во бања со вода што врие за 30 минути и потоа се лади до околу 35 ºC. Се додава 5 ml од суспензија од квасец (3.1) и се хомогенизира. Колбата се остава да стои два часа во бањата со вода, на температура од 38 до 40 ºC. Се лади до околу 20 ºC.

Се додава 2,5 ml раствор Карез I (3.2) и се меша триесет секунди, потоа се додава 2,5 ml раствор Карез II (3.3) и повторно се меша триесет секунди. Се дополнува со вода до 100 ml, се меша и се филтрира. Со помош на пипета се зема дел од филтратот, не повеќе од 25 ml по можност со содржина од 40 до 80 mg лактоза и се префрла во Ерленмаерова колба од 300 ml. Ако е потребно, се дополнува со вода до 25 ml.

Се прави бланко тест на истиот начин со 5 ml суспензија на квасец (3.1). Содржината на лактоза се определува во согласност со Луф-Шорл метод, како што следува: се зема точно 25 ml реагенс Луф-Шорл (3.4) и две гранули високопорозен вулкански камен (3.5). Се меша на рака додека се загрева на отворен пламен со средна височина така што течноста врие околу две минути. Ерленмаеровата колба се поставува веднаш на жичена мрежа обложена со азбест, која има отвор со дијаметар од околу 6 cm под која е запален пламен. Пламенот се регулира така што се загрева само дното на Ерленмаеровата колба. На Ерленмаеровата

колба се наместува рефлуксивен кондензатор. Врие точно десет минути. Веднаш се лади во студена вода и потоа околу пет минути се титрира како што следува:

Се додава 10 ml раствор на калиумјодид (3.6) и веднаш потоа (внимателно, затоа што постои ризик од обилно формирање на пена), се додава 25 ml сулфурна киселина (3.7). Се титрира со раствор на натриумтиосулфат (3.8) додека не се појави темножолта боја, се додава индикатор на скроб (3.9) и се завршува титрацијата.

Истата титрација се извршува со точно измерена смеса од 25 ml Луф-Шорлов реагенс (3.4) и 25 ml вода, по додавање на 10 ml раствор на калиумјодид (3.6) и 25 ml сулфурна киселина (3.7) без вриење.

6. Пресметување на резултатите

Од приложената табела, се утврдува количината на лактоза во mg, која одговара на разликата меѓу резултатите од двете титрации, изразено во ml натриумтиосулфат 0,1 mol/литар.

Резултатот се изразува како делови од безводна лактоза како процент од мострата.

7. Согледување

За производи кои содржат повеќе од 40% ферментиран шеќер, се употребува повеќе од 5 ml суспензија на квасец (3.1).

Табела на вредностите за 25 ml Луф-Шорлов реагенс

ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 N, две минути греење, десет минути вриење

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/литар	Гликоза, инвертна фруктоза C6 H12 O6		Лактоза C12 H22 O11		Малтоза C12 H22 O11		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/литар
ml	mg	разлика	mg	разлика	mg	разлика	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4.8	2.4	7.3	3.7	7.8	3.9	2
3	7.2	2.5	11.0	3.7	11.7	3.9	3
4	9.7	2.5	14.7	3.7	15.6	4.0	4
5	12.2	2.5	18.4	3.7	19.6	3.9	5
6	14.7	2.5	22.1	3.7	23.5	4.0	6
7	17.2	2.6	25.8	3.7	27.5	4.0	7
8	19.8	2.6	29.5	3.7	31.5	4.0	8
9	22.4	2.6	33.2	3.8	35.5	4.0	9
10	25.0	2.6	37.0	3.8	39.5	4.0	10
11	27.6	2.7	40.8	3.8	43.5	4.0	11
12	30.3	2.7	44.6	3.8	47.5	4.1	12
13	33.0	2.7	48.4	3.8	51.6	4.1	13
14	35.7	2.8	52.2	3.8	55.7	4.1	14
15	38.5	2.8	56.0	3.9	59.8	4.1	15
16	41.3	2.9	59.9	3.9	63.9	4.1	16
17	44.2	2.9	63.8	3.9	68.0	4.2	17
18	47.1	2.9	67.7	4.0	72.2	4.3	18
19	50.0	3.0	71.7	4.0	76.5	4.4	19
20	53.0	3.0	75.7	4.1	80.9	4.5	20
21	56.0	3.1	79.8	4.1	85.4	4.6	21
22	59.1	3.1	83.9	4.1	90.0	4.6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

Ј. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СКРОБ

ПОЛАРИМЕТРИСКИ МЕТОД

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди нивото на скроб и на производи од разградувањето на скроб со високо молекуларна тежина во храната за животни заради проверка на усогласеноста со одредената енергетска вредност.

2. Начело

Методот вклучува две определувања. При првото определување, примерокот се третира со разредена хлороводородна киселина. По бистрење и' филтрирање, со полариметрија се мери оптичката ротација на растворот.

При второто, примерокот се екстрахира со 40 % етанол. По киселење на филтратот со хлороводородна киселина, бистрење и филтрирање, се мери оптичката ротацијата, како во првото определување.

Разликата помеѓу двете мерења се множи со познат коефициент и се добива содржината на скроб во примерокот.

3. Реагенси

3.1. Хлороводородна киселина, раствор 25 % (т/т) густина: 1,126 g/ml.

3.2. Хлороводородна киселина, раствор 1,13 % (т/в)
Концентрацијата треба да се провери преку титрација, со користење на раствор на натриум хидроксид 0,1 mol/l, во 0,1% (т/в) метил црвено во 94% (в/в) етанол. За неутрализација на 10 ml се потребни 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Carrez раствор I: 21,9 g цинк ацетат $Zn(CH_3COO)_2\ 2H_2O$ и 3 g глацијална оцетна киселина се раствораат во вода. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.4. Carrez раствор II: 10,6 g калиумфероцијанид $K_4\ Fe(CN)_6\ 3H_2O$ се раствораат во вода. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.5. Етанол, раствор 40 % (в/в), густина: 0,948 g/ml на 20 °C.

4. Апаратура

4.1. 250 ml Ерленмаерова колба со стандарден врат од брусено стакло и со рефлуксивен кондензатор.

4.2. Полариметар или сахариметар.

5. Постапка

5.1. Подготовка на примерок
Примерокот се ситни до многу мали честички за да може целиот да помине низ мрежесто сито со отвори од 0,5 mm.

5.2. Определување на вкупната оптичка ротација (P или S) (види согледување 7.1)
Се мерат 2,5 g од иситнетиот примерок со прецизност до mg и се ставаат во градуирана колба од 100 ml. Се додаваат 25 ml хлороводородна киселина (3.2), се

протресува за примерокот рамномерно да се распредели и се додаваат уште 25 ml хлороводородна киселина (3.2). Колбата се потопува во водена бања што врие и првите три минути силно и непрекинато се протресува за да се спречи создавањето на агломерати. Количеството вода во водената бања мора да биде доволно за да може при поставување на колбата таа да остане на точка на вриење. Во текот на протресувањето колбата не смее да се вади од бањата. По точно 15 min колбата се вади од водената бања, се додаваат 30 ml ладна вода и веднаш се лади до 20 °C.

Се додава 5 ml Carrez раствор I (3.3) и се протресува околу 30 секунди. Потоа се додава 5 ml Carrez раствор II (3.4) и повторно се протресува околу 30 секунди. Се дополнува со вода до ознаката, се меша и се филтрира. Ако филтратот не е потполно бистар (што ретко се случува), определувањето се повторува со употреба на поголема количина Carrez раствор I и II, на пример 10 ml.

Со полариметар или сахариметар се мери оптичката ротација на растворот во епруветата од 200 mm.

5.3. Определување на оптичката ротација (P' или S') на супстанциите растворливи во 40 % етанол

Се мерат 5 g од примерокот со прецизност до mg, се поставуваат во градуирана колба од 100 ml и се додаваат 80 ml етанол (3.5) (види согледување 7.2). Колбата се остава да отстои 1 час на собна температура; за тоа време таа силно се протресува шест пати, така што примерокот за испитување целосно е измешан со етанол. Се дополнува со етанол до ознаката (3.5), се меша и се филтрира.

Со пипета се пренесуваат 50 ml од филтратот (што одговара на 2,5 g од примерокот) и се ставаат во Ерленмаерова колба од 250 ml, се додаваат 2,1 ml хлороводородна киселина (3.1) и силно се протресува. Рефлуксивниот кондензатор се монтира на Ерленмаеровата колба и таа се потопува во водена бања што врие. По точно 15 минути Ерленмаеровата колба се вади од водената бања, содржината се префрла во градуирана колба од 100 ml, се исплакнува со ладна вода и се лади до 20 °C.

Содржината се бистри со Carrez раствор I (3.3) и II (3.4), се дополнува со вода до ознаката, се промешува, филтрира и се мери оптичката ротација, како што е наведено во вториот и третиот став од 5.2.

6. Пресметување на резултатите

Содржината на скроб (%) се пресметува како што следува:

6.1. Мерење со полариметар

$$\text{Содржина на скроб } \% = \frac{2000\,(P-P')}{[\alpha]^{20°}/D}$$

P = Вкупната оптичка ротација во степени

P' = Оптичката ротација во степени на супстанциите растворливи во 40 % (V/V) етанол

$[\alpha]^{20°}/D$ = Специфична оптичка ротација на чист скроб. Нумеричките вредности кои обично се прифатени за овој фактор се следниве:

+ 185,9°: скроб од ориз

+ 185,7°: скроб од компир

+ 184,6°: скроб од пченка

+ 182,7°: скроб од пченица

+ 181,5°: скроб од јачмен

+ 181,3°: скроб од овес

+ 184,0°: други видови скроб и смеси од скроб во сложена храна за животни

6.2. Мерење со сахариметар

$$\text{Содржина на скроб (5\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]20°/D} \times \frac{(2N \times 0{,}665) \times (S\text{-}S')}{100} - \frac{26{,}6N \times (S\text{-}S')}{[\alpha]20°/D}$$

S = Вкупната оптичка ротација во степени на сахариметарот

S' = Оптичката ротација во степени на сахариметарот на супстанциите растворливи во 40 % (в/в) етанол

N = тежина (во g) на сахароза во 100 ml вода која предизвикува оптичка ротација од 100 степени на сахариметарот, измерени со користење на епрувета од 200 mm

16,29 g за француски сахариметри

26,00 g за германски сахариметри

20,00 g за мешани сахариметри.

$[\alpha]^{20°}/D$ = Специфична оптичка ротација на чист скроб

6.3. Повторливост

Разликата во резултатите од две паралелни определувања, спроведени врз ист примерок не треба да надминува 0,4 како апсолутна вредност за содржина на скроб пониска од 40 % и 1% како релативна вредност за содржина на скроб еднаква или поголема од 40 %.

7. Согледувања

7.1. Ако примерокот содржи повеќе од 6 % карбонати, пресметани како калциум карбонат, тие треба да се уништат со обработка со точно одредена количина разредена сулфурна киселина пред определувањето на вкупната оптичка ротација.

7.2. Во случај на производи со висока содржина на лактоза, како серум од млеко во прав или обрано млеко во прав, по додавање на 80 ml етанол (3.5), се постапува како што е наведено подолу. Рефлуксивниот кондензатор се монтира на колбата и таа се држи потопена 30 минути во водена бања на 50°C. Се остава да се олади и се продолжува со анализата како што е наведено во 5.3.

7.3. Познато е дека следниве суровини за храна за животни, кога се присутни во

значителни количини во храната за животни, предизвикаат пречки при определување на содржината на скроб со полариметриски метод, што би можело да доведе до неточни резултати:

— производи од (шеќерна) репка, како пулпа од (шеќерна) репка, меласа од (шеќерна) репка, меласна пулпа од (шеќерна) репка, талог при дестилација на (шеќерна) репка, (шеќерна) репка;

— пулпа од агруми,

— ленено семе; експелер од ленено семе; екстрахирано ленено семе,

— семе од маслена репка; експелер од семе од маслена репка; лушпи од семе од маслена репка,

— сончогледово семе; екстрахирано сончогледово семе; сончогледово семе, делумно излупено, екстрахирано,

— експелер од копра, екстрахирана копра,

— пулпа од компир,

— сув квасец,

— производи богати со инулин (на пр. резанки и брашно од кркушки),

— џимиринки.

К. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СУРОВА ПЕПЕЛ

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се определи содржината на сурова пепел во храната за животни.

2. Начело

Примерокот се согорува до форма на пепел на 550°C, остатокот се мери.

3. Реагенси

Амониум нитрат, раствор 20 % (т/в).

4. Апаратура

4.1. Решо.

4.2. Електрична муфолна печка со термостат.

4.3. Огноотпорни садови за пепел направени од кварц, порцелан или платина, правоаголни (околу 60 × 40 × 25 mm) или кружни (дијаметар: 60 до 75 mm, висина: 20 до 40 mm).

5. Постапка

Се мерат 5 g од примерокот со прецизност до mg (2,5 во случај на производи кои имаат својство да набабруваат) и се ставаат во огноотпорен сад за пепел кој претходно е загреан до 550 оС, оладен и тариран. Огноотпорниот сад за пепел се става на решо и постепено се

загрева сè додека супстанцијата не се карбонизира. Се согорува до форма на пепел во согласност со 5.1 или 5.2.

5.1. Огноотпорниот сад се става во калибрирана муфолна печка загреана на 550ºC. Се чува на таа температура додека се добие бела, светло сива или црвеникава пепел за која се смета дека не содржи јагленови честички. Огноотпорниот сад се става во ексикатор, се остава да се излади и се мери веднаш.

5.2. Огноотпорниот сад се става во калибрирана муфолна печка загреана на 550ºC. Се согорува до форма на пепел 3 часа. Огноотпорниот сад се става во ексикатор, се остава да се излади и се мери веднаш. Повторно се согорува до форма на пепел 30 минути за да се обезбеди дека тежината на пепелта останува константна (загубата на тежина помеѓу две последователни мерења треба да биде помала или еднаква на 1 mg).

6. Пресметување на резултатите

Тежината на остатоците се мери со одземање на тарата.

Резултатите се изразуваат како процентен дел од примерокот.

7. Согледувања

7.1. Пепелта од *супстанциите кои тешко се согоруваат* треба да подлежи на првично согорување најмалку три часа, да се излади и потоа да се додадат неколку капки од 20% раствор на амониум нитрат или вода (внимателно, за да се избегне распрскување на пепелта или создавањето на грутки). По сушењето во печка, се продолжува со калцинирање. Активноста се повторува онолку пати колку што е потребно до постигнување на целосно согорување до форма на пепел.

7.2. Во случај на *супстанции отпорни на обработката* опишана во 7.1, се постапува како што следува: по тричасовното согорување, пепелта се става во топла вода и се филтрира низ мал филтер кој не содржи пепел. Филтерот и неговата содржина се согоруваат во оригиналот огноотпорен сад. Филтратот се става во изладен огноотпорен сад, се испарува додека да се исуши, се согорува до форма на пепел и се мери.

7.3. Кај *масла и масти*, се мери примерок од точно 25 g во огноотпорен сад со соодветна големина. Супстанција се карбонизира со како палење на лента од филтер-хартија која не содржи пепел. По горењето се навлажнува со што е можно помалку вода. Се суши и се согорува до форма на пепел како што е опишано во 5.

Л. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ПЕПЕЛ КОЈ НЕ Е РАСТВОРЛИВ ВО ХЛОРОВОДОРОДНА КИСЕЛИНА

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се определи нивото на минерални супстанции во храната за животни кои не се растворливи во хлороводородна киселина. Можат да се користат два метода, во зависност од природата на примерокот.

1.1. *Метод А:* се применува кај органски суровини во храна за животни и кај голем дел од сложената храна за животни.

1.1. *Метод Б:* се применува кај минерални соединенија и смеси и кај сложена храна за животни чија содржина во супстанциите нерастворливи во хлороводородна киселина е поголема од 1%, како што е определено со метод А.

2. Начело

2.1. Метод А: примерокот се согорува, пепелта се остава да врие во хлороводородна киселина и нерастворливиот остаток се филтрира и се мери.

2.2. Метод Б: примерокот се обработува со хлороводородна киселина. Растворот се филтрира, остатокот се согорува и добиената пепел се обработува во согласност со методот А.

3. Реагенси

3.1. Хлороводородна киселина, 3 mol/l.

3.2. Трихлороацетна киселина, раствор 20 % (т/в).

3.3. Трихлороацетна киселина, раствор 1 % (т/в).

4. Апаратура

4.1. Решо.

4.2. Електрична муфолна печка со термостат.

4.3. Огноотпорни садови за пепел направени од кварц, порцелан или платина, правоаголни (околу 60 × 40 × 25 mm) или кружни (дијаметар: 60 до 75 mm, висина: 20 до 40 mm).

5. Постапка

5.1. Метод А

Примерокот се согорува според опишаниот метод за определување на сурова пепел. Може да се користи и пепелта добиена при наведената анализа.

Пепелта се става во мензура со капацитет од 250 до 400 ml, користејќи 75 ml хлороводородна киселина (3.1). Полека се доведува до точка на вриење и се остава 15 минути да врие умерено. Топлиот раствор се филтрира преку филтер-хартија која не содржи пепел и остатокот се мие со топла вода сè додека не исчезне киселата реакција. Филтерот со остатокот се суши и се согорува до форма на пепел во тариран огноотпорен сад на температура од 550°C до 700°C. Се лади во ексикатор и се мери.

5.2. Метод Б

Се мерат 5 g од примерокот со прецизност во mg и се ставаат во мензура со капацитет од 250 до 400 ml. Потоа се додаваат 25 ml вода и 25 ml хлороводородна киселина (3.1), се промешува и се чека да престане пенењето. Се додаваат уште 50 ml хлороводородна киселина (3.1). Се чека додека потполно не престане испуштањето на гас, по што мензурата се става во водена бања што врие и се држи таму триесет минути или повеќе, доколку е потребно, за целосно да се хидролизира скробот што евентуално се содржи во примерокот.

Содржината се филтрира додека е топла во филтер кој не содржи пепел и филтерот се мие со 50 ml топла вода (види согледување 7). Филтерот со остатокот се става во огноотпорен сад за пепел, се суши и се согорува на температура од 550°C до 700°C. Пепелта се става во мензура со капацитет од 250 до 400 ml, користејќи 75 ml хлороводородна киселина (3.1); се продолжува се како што е опишано во вториот потстав од 5.1.

6. Пресметување на резултатите

Тежината на остатоците се мери со одземање на тарата. Резултатите се изразуваат како процентен дел од примерокот.

7. Согледување

Ако филтрирањето е тешко, анализата се повторува, при што 50-те ml хлороводородна киселина (3.1) се заменуваат со 50 ml од 20% трихлороацетна киселина (3.2) и филтерот се мие со топол раствор од 1% трихлороацетна киселина (3.3).

Љ. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КАРБОНАТИ

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува одредување на количината на карбонати, обично изразени како калциум карбонат, во поголемиот дел храна за животни.

Сепак, во некои случаи (на пр. со железо карбонат) треба да се користи специјален метод.

2. Начело

Карбонатите се разложуваат во хлороводородна киселина; ослободениот јаглерод диоксид се собира во градуирана епрувета и неговиот обем се споредува со оној ослободен под истите услови од позната количина на калциум карбонат.

3. Реагенси

3.1. Хлороводородна киселина, густина 1,10 g/ml.

3.2. Калциум карбонат.

3.3. Сулфурна киселина, околу 0,05 mol/l, обоена со метил црвено.

4. Апаратура

Шајблер-Дитрихов апарат (види дијаграм) или еквивалентен апарат.

5. Постапка

Во согласност со содржината на карбонати во примерокот, се мери дел од примерокот како што е покажано подолу:

— 0,5 g за производи кои содржат од 50 до 100 % карбонати, изразени како калциум карбонат,

— 1 g за производи кои содржат од 40 до 50 % карбонати, изразени како калциум карбонат,

— од 2 до 3 за други производи.

Делот од примерокот се става во специјалната колба (4) на апаратот, опремена со мала епрувета од некршлив материјал која содржи 10 ml хлороводородна киселина (3.1), и колбата се поврзува со апаратот. Тристраната славина (5) се врти така што цевката (1) да е поврзана со надворешната средина. Со користење на подвижната епрувета (2) која е наполнета со обоена сулфурна киселина (3.3) и поврзана со градуираната епрувета (1), се дополнува нивото на течноста до ознаката нула. Славината (5) се врти така што да ги поврзува епруветите (1) и (3) и се проверува дали нивото е на нула.

Хлороводородна киселина (3.1) се прелива бавно врз делот од примерокот, навалувајќи ја колбата (4). Притисокот се изедначува со спуштање на епруветата (2). Колбата (4) се протресува додека целосно не престане ослободувањето на јаглерод диоксид.

Притисокот се воспоставува со враќање на течноста на исто ниво во епруветите (1) и (2). Резултатот се чита по неколку минути, кога обемот на гас ќе стане постојан.

Под истите услови се врши контролно испитување врз 0,5 g калциум карбонат (3.2).

6. Пресметување на резултатите

Содржината на карбонати, изразени како калциум карбонат, се пресметува според формулата:

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

каде што:

X = % (т/т) на карбонати во примерокот, изразени како калциум карбонат

V = ml CO_2 ослободен од делот од примерокот

V_I = ml of CO_2 ослободен од 0,5 g $CaCO_3$

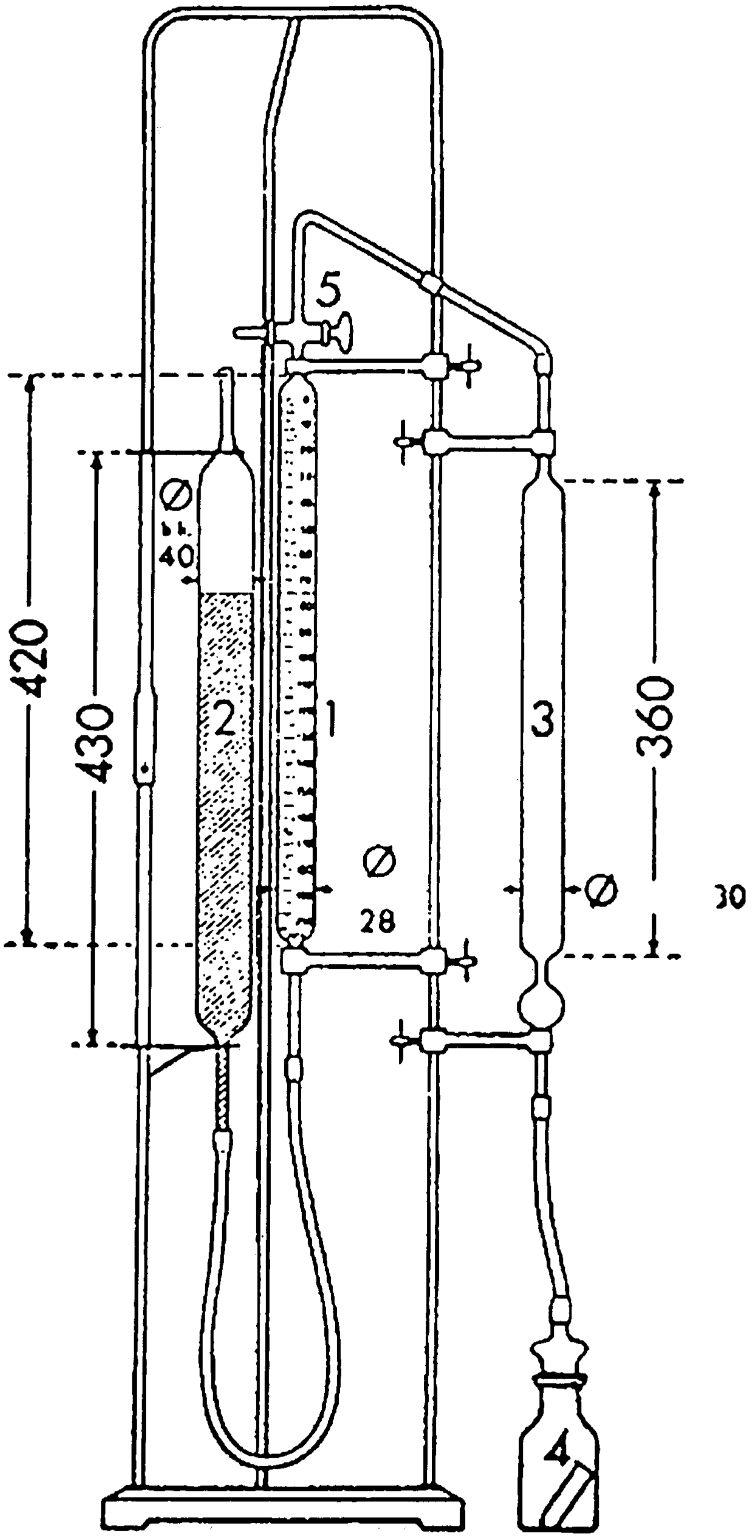
m = тежината, во грамови, на делот од примерокот.

7. Согледувања

7.1. Кога делот од примерокот тежи повеќе од 2 g, прво се ставаат 15 ml дестилирана вода во колбата (4) и се меша пред почетокот на испитувањето. Се користи истиот обем вода за контролното испитување.

7.2. Ако обемот на апаратот кој се користи има обем кој се разликува од оној на Шајблер-Дитриховиот апарат, деловите земени од примерокот и од контролната супстанција, како и пресметувањето на резултатите треба соодветно да се приспособат.

ШАЈБЛЕР-ДИТРИХОВ АПАРАТ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА $C0_2$



(измерено во mm)

М. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПЕН ФОСФОР

ФОТОМЕТРИСКИ МЕТОД

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се определи содржината на вкупен фосфор во храната за животни. Тој е особено погоден за анализа на производи со ниска содржина на фосфор. Во некои случаи (кај производи богати со фосфор) може да се користи гравиметриски метод.

2. Начело

Примерокот се минерализира со суво согорување (во случај на органска храна за животни) или со варење со киселина (во случај на минерални соединенија и течна храна за животни), а потоа се става во киселински раствор. Растворот се обработува со реагенс молибдованадат. Оптичката густина на така добиениот жолт раствор се мери со спектрофотометар на 430 nm.

3. Реагенси

3.1. Калциум карбонат.

3.2. Хлороводородна киселина, ρ_{20} = 1,10 g/ml (околу 6 mol/l)

3.3. Азотна киселина, ρ_{20} = 1,045 g/ml.

3.4. Азотна киселина, ρ_{20} = 1,38 до 1,42 g/ml.

3.5. Сулфурна киселина, ρ_{20} = 1,84 g/ml.

3.6. Реагенс молибдованадат: во градуирана колба од 1 l се мешаат 200 ml раствор на амониум хептамолибдат (3.6.1), 200 ml раствор на амониум монованадат (3.6.2) и 134 ml азотна киселина (3.4). Се дополнува со вода до ознаката.

3.6.1. Раствор на амониум хептамолибдат: во топла вода се раствораат 100 g амониум хептамолибдат $(NH_4)\ 6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$. Се додаваат 10 ml амонијак (со густина 0,91 g/ml) и се дополнува до 1 l со вода.

3.6.2. Раствор на амониум монованадат: се раствораат 2,35 g амониум монованадат NH_4VO_3 во 400 ml топла вода. Со постојано мешање, бавно се додаваат 20 ml разредена азотна киселина (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) и се дополнува до 1 l со вода.

3.7. Стандарден раствор од 1 mg фосфор на ml: се раствораат 4,387 g калиум дихидроген фосфат KH_2PO_4во вода. Се дополнува до 1 ml со вода.

4. Апаратура

4.1. Огноотпорни садови за пепел од кварц, порцелан или платина.

4.2. Електрична муфолна печка со термостат поставен на 550°C.

4.3. Кјелдалова колба од 250 ml.

4.4. Градуирани колби и прецизни пипети.

4.5. Спектрофометар.

4.6. Епрувети со дијаметар од околу 16 mm, со затка градирани до дијаметар од 14,5 mm; капацитет: 25 до 30 ml.

5. Постапка

5.1. Подготовка на растворот

Во согласност со природата на примерокот, растворот се подготвува како што е наведено во 5.1.1 или 5.1.2.

5.1.1. Вообичаена постапка

Се мери 1 g или повеќе од примерокот со прецизност до 1 mg. Примерокот за испитување се става во Кјелдалова колба, се додаваат 20 ml сулфурна киселина (3.5), се протресува со цел супстанцијата целосно да се натопи со киселина и да се спречи нејзино задржување по ѕидовите, по што се загрева и се одржува во точката на вриење за време од 10 минути. Се остава малку да се олади, се додаваат 2 ml азотна киселина (3.4), малку се загрева, се остава малку да се олади, се додава уште малку азотна киселина (3.4) и повторно се доведува до точка на вриење. Оваа постапка се повторува до добивање на безбоен раствор. Се лади, се додава малку вода, течноста се претура во градуирана колба од 500 ml, а Кјелдаловата колба се исплакнува со топла вода. Се остава да се олади, се дополнува со вода до ознаката, се хомогенизира и филтрира.

5.1.2. Примероци кои содржат органски супстанции, а не содржат калциум и магнезиум дихидроген фосфати

Се мерат околу 2,5 g од примерокот со прецизност до 1 mg во огноотпорен сад за пепел. Примерокот за испитување се промешува додека целосно не се измеша со 1 g калциум карбонат (3.1). Смесата согорува во печката на температура од 550°C до добивање на бела или сива пепел (не смета мало количество дрвен јаглен). Пепелта се префрла во мензура од 250 ml. Се додаваат 20 ml вода и хлороводородна киселина (3.2) додека не престане пенењето. Се додаваат уште 10 ml хлороводородна киселина (3.2). Мензурата се става во песочна бања и се остава содржината да се исуши преку испарување за кварцот да стане нерастворлив. Остатокот повторно се раствора во 10 ml азотна киселина (3.3) и се остава да врие 5 минути во песочна бања или на решо без да испарува до исушување. Течноста се претура во градуирана колба со волумен од 500 ml, а мензурата се исплакнува неколку пати со топла вода. Се остава да се олади, се дополнува со вода до ознаката, се хомогенизира и филтрира.

5.2. Добивање на боја и мерење на оптичка густина

Аликвотниот дел од филтратот добиен според 5.1.1 или 5.1.2 се разредува за да се добие концентрација на фосфор не повисока од 40 µg/ml. 10 ml од овој раствор се ставаат во епрувета (4.6) и се додаваат 10 ml од реагенсот

молибдованадат (3.6). Се хомогенизира и се остава да отстои најмалку 10 минути на температура од 20°C. Оптичката густина се мери во спектрофотометар на 430 nm во однос на растворот добиен со додавање на 10 ml од реагенсот молибдованадат (3.6) на 10 ml вода.

5.3. Крива за калибрирање

Од стандардниот раствор (3.7) се подготвуваат раствори кои содржат 5, 10, 20, 30 и 40 μg фосфор на ml, соодветно. Се земаат по 10 ml од секој од овие раствори и на нив се додаваат по 10 ml молибдованадат (3.6). Се хомогенизира и се остава да отстои најмалку 10 минути на температура од 20°C. Оптичката густина се мери како што е наведено во 5.2. Кривата за калибрирање се црта така што вредностите на оптичката густина се нанесуваат во однос на соодветните количини фосфор. За концентрации помеѓу 0 и 40 μg/ml кривата е линеарна.

6. Пресметување на резултатите

Количината на фосфор во примерокот за испитување се определува со помош на кривата за калибрирање.

Резултатите се изразуваат како процентен дел од примерокот.

Повторливост

Разликата во резултатите од две паралелни определувања извршени на ист примерок не треба да надминува:

— 3 % во однос на повисокиот резултат, за содржина на фосфор помала од 5 %,
— 0,15 % како апсолутна вредност, за содржина на фосфор од 5 % или повеќе.

Н. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ХЛОР ОД ХЛОРИДИ

1. Намена и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се определи содржината на хлор во хлориди кои се растворливи во вода, обично изразени како натриум хлорид. Тој се применува за секој вид храна за животни.

2. Начело

Хлоридите се раствораат во вода. Доколку производот содржи органска материја, тој подлежи на бистрење. Растворот малку се закиселува со азотна киселина, а хлоридите се таложат во форма на сребрен хлорид со помош на раствор од сребро нитрат. Вишокот сребро нитрат се титрира со раствор на амониум тиоцијанат, со Волхардов метод.

3. Реагенси

3.1. Раствор на амониум тиоцијанат 0,1 mol/l.

3.2. Раствор на сребро нитрат 0,1 mol/l.

3.3. Заситен раствор на амониум ферисулфат $(NH_4)Fe(SO_4)_2$.

3.4. Азотна киселина, густина: 1,38 g/ml.

3.5. Диетил етер.

3.6. Ацетон.

3.7. Carrez I раствор: во вода се раствораат 21,9 g цинк ацетат, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ и 3 g глацијална оцетна киселина. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.8. Carrez II раствор: во вода се раствораат 10,6 g калиумфероцијанид $K_4Fe\ Fe(CN)_6 \cdot 3H2O$. Се дополнува до 100 ml со вода.

3.9. Активен јаглен кој не содржи хлориди и не ги апсорбира.

4. Апаратура

Миксер (барабан): околу 35 до 40 вртежи во минута.

5. Постапка

5.1. Подготовка на растворот

Во согласност со природата на примерокот, растворот се подготвува како што е наведено во 5.1.1, 5.1.2 или 5.1.3.

Истовремено се врши *слепа проба* без да се анализира примерокот.

5.1.1. Примероци кои не содржат органски материи

Се мери со точност до еден mg примерок од најмногу 10 g кој не содржи повеќе од 3 g хлор во форма на хлориди. Заедно со 400 ml вода се става во волуметриска колба од 500 ml на температура од околу 20°C. Се меша триесет минути во барабан миксери, се дополнува до ознаката, се хомогенизира и се филтрира.

5.1.2. Примероци кои содржат органски материи, со исклучок на производите наведени во 5.1.3.

Се мерат околу 5 g од примерокот со точност до еден mg и тоа количество заедно со 1 g активен јаглен се става во волуметриска колба од 500 ml. Се додаваат 400 ml вода на температура од околу 20оC и 5 ml Carrez раствор I (3.7), се промешува 30 секунди и потоа се додаваат 5 ml Carrez раствор II (3.8). Се меша триесет минути во барабан миксери, се дополнува до ознаката, се хомогенизира и се филтрира.

5.1.3. Зготвена храна за животни, колачиња од лен и ленено брашно, производи богати со ленено брашно и други производи богати со слуз или со колоидни супстанции (на пример декстриниран скроб)

Растворот се подготвува како што е опишано во 5.1.2, но не се филтрира. Се претура (доколку е потребно се центрифугира), се отстрануваат 100 ml од супернатанта и се префрлаат во мерна колба од 200 ml. Се меша со ацетон (3.6) и се дополнува до ознаката со овој растворувач, се хомогенизира и се филтрира.

5.2. Титрација

Со помош на пипета, во Ерленмаерова колба се префрлаат од 25 до 100 ml од филтратот (во согласност со претпоставената содржина на хлор) добиен како што е опишано во 5.1.1, 5.1.2 или 5.1.3. Аликвотниот дел не треба да содржи повеќе од 150 mg хлор (Cl). Доколку е потребно, се разредува со вода до најмалку 50 ml, се додаваат 5 ml азотна киселина (3.4), 20 ml заситен раствор на амониум ферисулфат (3.3) и две капки раствор на амониум тиоцијанат (3.1) и се префрла со помош на бирета надополнета до ознаката нула. Со помош на бирета, растворот на сребро нитрат (3.2) се пренесува на начин на кој би се добил вишок од 5 ml. Се додаваат 5 ml диетил етер (3.5) и се промешува силно за талогот да се згусне. Вишокот сребро нитрат се титрира со раствор на амониум тиоцијанат (3.1) сè додека црвено-кафеникавата боја не се задржи една минута.

6. Пресметување на резултатите

Количината на хлор (X), изразена како процентен дел на натриум хлорид, се пресметува според следнава формула:

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

каде што:

V_1 = ml на додадениот раствор на сребро нитрат 0,1 mol/l

V_2 = ml на раствор на амониум тиоцијанат 0,1 mol/l кој се користи за титрација

m = тежина на примерокот.

Ако слепата проба покаже дека е потрошен раствор на сребро нитрат од 0,1 mol/l, оваа вредност се одзема од обемот (V_1 - V_2).

7. Согледувања

7.1. Титрацијата може да изврши и преку потенциометрија.

7.2. Во случај на производи кои се многу богати со масла и масти, прво се врши обезмастување со диетил етер или со петролеум.

Во случај на рибино брашно, титрацијата може да се изврши со помош на Моров метод.

Прилог 4

Методи на анализа за контрола на нивото на одобрени адитиви во храната за животни

А. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВИТАМИН А

1. Цел и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди нивото на витамин А (ретинол) во храната за животни и премиксите. Витамин А вклучува транс-ретинил алкохол и цис-изомери кои се утврдени со овој метод. Содржината на витамин А се изразува во интернационални единици ИЕ (IU) по килограм. Една IU одговара на активноста на 0300 μгр. на сите транс-витамин А алкохол или 0344 μгр. сите транс-витамин А ацетат или 0550 мг. сите транс-витамин А палмитат.

Границата на квантификација е 2 000 IU на витамин А /kg.

2. Начело

Примерокот е хидролизиран со раствор на етанолов калиум хидроксид и витаминот А е извлечен во лесен петролеј. Растворувачот е отстранет преку испарување и остатокот се раствора во метанол и, доколку е потребно, разреден до бараната концентрација. Содржината на витамин А се определува со обратна фаза на течна хроматографија со високи перформанси (RP-HPLC) со користење на УВ или детектор на флуоресценција. Хроматографските параметри се избрани така што не постои поделба помеѓу сите транс-витамин А алкохол и неговите цис- изомери.

3. Реагенси

3.1. Етанол, σ = 96%
3.2. Лесен петролеј, спектар на вриење 40°C-60°C
3.3. Метанол
3.4. Калиум хидроксид раствор, c = 50 g/100 ml
3.5. Раствор на натриум аскорбат, c = 10 g/100 ml (види забелешка 7.7)
3.6. Натриум сулфид, Na2S · x H2O (x = 7-9)
3.6.1. Натриум сулфид раствор, c = 0,5 mol/l во глицерол, SS = 120 g / L (за x = 9) (види забелешка 7.8)
3.7. Фенолфталеин раствор, c = 2 g/100 ml во етанол (3.1)
3.8. 2-пропанол
3.9. Мобилни фаза за HPLC: мешавина од метанол (3.3) и вода, на пример, 980 + 20 (V + V). Точниот сооднос ќе биде утврден преку карактеристиките на користената колона.
3.10. Азот, без кислород

3.11. Сите-транс-витамин А ацетат, екстра чист, со потврдена активност, на пример, 2,80 x 106 IU / g

3.11.1.Чуван раствор на сите транс-витамин А ацетат: Се мери до најблискиот 0,1 mg, 50 mg витамин А ацетат (3.11) во 100 ml градуирана колба. Се раствора во 2-пропанол (3,8) и се доаѓа до ознаката со истиот растворувач. Номиналната концентрација на овој раствор е 1 400 IU витамин А по ml. Точната содржина треба да се утврди според 5.6.3.1.

3.12. Сите-транс-витамин А палмитат, екстра чист, со потврдена активност, на пример, 1,80 x 106 IU / g

3.12.1. Чуван раствор на сите транс-витамин А палмитат: Се мери до најблискиот 0,1 mg, 80 mg витамин А палмитат (3.12) во 100 ml градуирана колба. Се раствора во 2-пропанол (3,8) и се доаѓа до ознаката со истиот растворувач. Номиналната концентрација на овој раствор е 1 400 IU витамин А на ml. Точната содржина треба да се утврди според 5.6.3.2.

3.13. 2,6-ди-терт-бутил-4-метилфенол (BHT) (види забелешка 7.5)

4. Апаратура

4.1. Вакуумски ротационен испарувач

4.2. Садови од темно стакло

4.2.1. Конусна колби или со рамно дно, 500 ml, со шлиф

4.2.2. Градуирани колби со стаклени шлифувани стопери, тесно грло, 10, 25, 100 и 500 ml

4.2.3. Конусен разделувач на инките, 1 000 ml, со стаклени шлифувани стопери

4.2.4. Крушковидни колби, 250 ml, со шлиф

4.3. Allihn кондензатор, 300 mm корисна должина, со шлифуван стаклен шлиф, со адаптер за цевката за напој со гас

4.4. Филтер-хартија со набори за фазата на поделба, со дијаметар 185 mm (на пр. Schleicher и Schuell 597 HY 1 / 2)

4.5. HPLC опрема со систем за вбризгување

4.5.1. Течна хроматографска колона, 250 mm x 4 mm, C18, 5 или 10 µm полнеж, или еквивалент (критериум за извршување: само еден врв за сите ретинол изомери под HPLC-услови)

4.5.2. УВ детектор или детектор за флуоресценција, со променлива бранова должина со прилагодување

4.6. Спектрофотометар со 10 mm кварцни ќелии

4.7. Водена бања со магнетна мешалка

4.8. Апарат за екстракција (види слика 1) се состои од:

4.8.1. Стаклен цилиндар од 1 L капацитет со стаклено шлифувано грло и затка(стопер)

4.8.2. Стаклената шлифувана влошка со странична епрувета и регулирачка епрувета што минува низ центарот. Подесливата епрувета ќе има форма на буквата U во долниот крај и излез за течност на спротивниот крај, така што горниот слој течност во цилиндерот може да се пренесе во инката за одвојување.

5. Постапка

Забелешка: Витаминот А е чувствителен на (УВ-) светлина и на оксидација. Сите операции се вршат во отсуство на светлина (со користење на садови со темно стакло, или стаклени садови заштитени со алуминиумска фолија) и кислород (се елиминира со азот).
За време на екстракција воздухот над течноста се заменува со азот (да се избегне вишокот притисок од страна со олабавување на затката од време на време).

5.1. *Подготовка на примерокот*
Се меле примерокот, така што минува на сито со 1 mm мрежа, внимавајќи да се избегне создавање на топлина. Мелењето мора да се изврши непосредно пред мерењето и сапонификацијата инаку може да има загуби на витамин А

5.2. Сапонификација
Во зависност од тежата на содржината на витамин А, до најблискиот 1 mg, 2 g до 25 g на примерокот во 500 ml конусна колба или со рамно дно (4.2.1). Се додава сукцесивно со вртење 130 ml етанол (3.1), околу 100 mg BHT (3.13), 2 ml натриум аскорбат раствор (3,5) и 2 ml натриум сулфид раствор (3,6). Се место кондензаторот (4.3) на колбата и се потопува колбата во водена бања со магнетна мешалка (4.7). Се загрева до вриење и се остава да рефлуксира 5 минути. Потоа се додава 25 ml калиум хидроксид раствор (3.4) преку кондензаторот (4.3) и се остава да рефлуксира за уште 25 мин., со мешање под бавен прилив на азот. Потоа се плакне кондензаторот со околу 20 ml вода и се лади содржината на колбата на собна температура.

5.3. Екстракција
Се пренесува со декантација сапонифициран раствор квантитативно со испирање со вкупна количина од 250 ml вода на 1 000 ml инка за одвојување (4.2.3) или на апарат за екстракција (4.8). Се плакне колбата за сапонификација сукцесивно со 25 ml етанол (3.1) и 100 ml лесен петролеј (3.2) и се пренесува течноста од плакнењето во инката за одвојување или во апаратот за екстракција. Соодносот на водата и етанолот во вака комбинираните раствори мора да биде за 2:1. Се протресува енергично 2 мин. и се остава да се смири 2 минути.

5.3.1. Екстракција со користење на инка за одвојување (4. 2. 3)

Кога слоевите се одвоени (види забелешка 7.3) се пренесува слој на лесен петролеј во друга инка за одвојување (4.2.3). Се повторува екстракцијата два пати, со 100 ml лесен петролеј (3.2) и два пати, со 50 ml лесен петролеј (3.2).

Се мијат комбинираните екстракти во инката за одвојување двапати со нежно мешање (за да се избегне формирање на емулзии) со 100 ml делови од вода, а потоа се

повторува тресењето со уште 100 ml делови од вода додека водата стане безбојна со додавање на фенолфталеин раствор (3.7) (четири пати миење е обично доволно).

Се филтрира измиениот екстракт преку сув филтер со набори за фаза поделба (4.4) да се отстрани сета заостаната вода во 500 ml градурана колба (4.2.2). Се плакне инката за одвојување и филтерот со 50 ml лесен петролеј (3.2), се доаѓа до ознаката со лесен петролеј (3,2) и се мења добро.

5.3.2. Екстракција со апарат за екстракција (4. 8)

Кога слоевите се одвоени (види забелешка 7.3) се заменува стаклената затка од цилиндарот (4.8.1) со стаклена влошка (4.8.2) и се става подесливата епрувета во долниот крај во форма на буквата U веднаш над нивото на граничната површина интерфејсот. Со примена на притисок од линијата за азот кон страничната епрувета, се пренесува горниот слој на лесен петролеј во 1 000 ml инка за одвојување (4.2.3). Се додава 100 ml лесен петролеј (3.2) во стаклениот цилиндар, се затвора и се протресува убаво. Се дозволува слоевите да се одделат и се пренесува горниот слој во инката за одвојување како претходно. Се повторува постапката со екстракција со уште 100 ml лесен петролеј (3.2), а потоа двапати со количини од 50 ml на лесен петролеј (3.2) и се додаваат слоевите лесен петролеј во инката за одвојување.

Се мијат комбинираните екстракти на лесен петролеј како што е опишано во 5.3.1 и се продолжува како што е опишано таму.

5.4. Подготовка на раствор на примерокот за HPLC

Со пипета се префрла количество на раствор на лесен петролеј (од 5.3.1 или 5.3.2) во 250 ml крушковидна колба (4.2.4). Се прави да испари растворувачот речиси до сувост на ротационен испарувач (4.1) со намален притисок на температурата на бањата која не надминува 40°C. Се враќа атмосферскиот притисок со додавање на азот (3.10) и се отстранува садот од ротациониот испарувач. Се отстранува преостанатиот растворувач со прилив на азот (3.10) и се распаѓаат остатоците веднаш во познат волумен (10-100 ml) на метанол (3.3) (концентрацијата на витамин А мора да биде во опсег од 5 IU / ml до 30 IU / ml).

5.5. Одредување преку HPLC

Витаминот А е поделен на C18 колона за обратна фаза (4.5.1) и концентрацијата се мери со помош на УВ детектор (325 nm) или детектор за флуоресценција (екситација: 325 nm, емисија: 475 nm) (4.5.2).

Се инокулира количество (на пример 20 μl) на метанолски раствор добиен во 5.4 и се елуира со мобилна фаза (3,9). Се пресметуваат значи средните врвови (области) на неколку инјекции од истиот раствор на примерокот и значи средните врвови (области) на неколку инјекции калибрациони раствори5.6.2).

HPLC услови
Може да се следат следниве упатства; други услови може да се користат под услов тие да даваат еквивалентни резултати.

Течна хроматографска колона (4.5.1):

250 mm × 4 mm, C18, 5 или 10 μm полнеж, или еквивалентно

Мобилна фаза (3.9): Мешавина од метанол (3.3) и вода на пр. 980 + 20 (v + v).

Проток: 1-2 ml / мин.

Детектор (4.5.2): УВ детектор (325 nm) или детектор за флуоресценција

(екситација: 325 nm / емисија: 475 nm)

5.6. Калибрација

5.6.1. Подготовка на стандардни работни раствори

Се зема со пипета 20 ml од витамин А ацетат чуван раствор (3.11.1) или 20 ml од витамин А палмитат чуван раствор (3.12.1) во 500 ml конусна колба или со рамно дно (4.2.1) и се хидролизира како што е опишано под 5.2, но без додавање на BHT. Потоа се извлекува со лесен петролеј (3.2) според 5.3 и се доаѓа до 500 ml со лесен петролеј (3.2). Нека испари 100 ml од овој екстракт во ротационен испарувач (види 5.4) речиси до сувост. Се отстранува преостанатиот растворувач со прилив на азот (3.10) и повторно се раствора остатокот во 10,0 ml на метанол (3.3). Номиналната концентрација на овој раствор е 560 IU витамин А мл. Точната содржина мора да биде определена според 5.6.3.3. Работниот стандарден раствор треба да биде свежо подготвен пред употреба.

Со пипета се пренесува 2,0 ml на овој работен стандарден раствор во 20 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со метанол (3.3) и се меша. Номиналната концентрација на овој разреден работен стандарден раствор е 56 IU витамин А ml.

5.6.2. Подготовка на раствор за калибрација и цртање на калибрациски графикон
Се префрла 1,0, 2,0, 5,0 и 10,0 ml од разредениот работен стандарден раствор во серија од 20 ml градуирани колби, се доаѓа до ознаката со метанол (3.3) и се меша. Номиналните концентрации на овие раствори се 2,8, 5,6, 14,0 и 28,0 IU витамин А ml.

Се инјектираат 20 μl на секој раствор за калибрација неколку пати и се утврдуваат средните врв висини (области). Користејќи ги врв висините (областите) се исцртува калибрациски графикон со оглед на резултатите од УВ контрола (5.6.3.3).

5.6.3. УВ стандардизација на стандардните раствори

5.6.3.1. Витамин А ацетат чуван раствор

Се става со пипета 2,0 ml од витамин А ацетат раствор (3.11.1) во 50 ml градуирана колба (4.2.2) и се доаѓа до ознаката со 2-пропанол (3,8). Номиналната концентрација на овој раствор е 56 IU витамин А ml. Се става со пипета 3,0 ml на овој разредена витамин А ацетат раствор во 25 ml градуирана колба и се доаѓа до ознаката со 2 -пропанол (3,8). Номиналната концентрација на овој раствор е 6,72 IU витамин А ml. Се мери УВ спектарот на овој раствор наспроти 2-пропанол (3.8) во спектрофотометар (4.6) помеѓу 300 nm и 400 nm.

Максималната екстинкција мора да биде помеѓу 325 nm и 327 nm.
Пресметување на содржината на витамин А:
IU витамин А / ml = E326 × 19,0

($E\frac{1\%}{1cm}$ за витамин А ацетат = 1 530 на 326 *nm* во 2-пропанол)

5.6.3.2. Витамин А палмитат чуван раствор

Се става со пипета 2,0 ml од витамин А палмитат чуван раствор (3.12.1) во 50 ml градуирана колба (4.2.2) и се доаѓа до ознаката со 2-пропанол (3,8). Номиналната концентрација на овој раствор е 56 IU витамин А ml.

Се става со пипета 3,0 ml од овој витамин А палмитат разреден раствор во 25 ml градуирана колба и се доаѓа до ознакатасо 2-пропанол (3,8). Номиналната концентрација на овој раствор е 6,72 IU витамин А ml. Се мери УВ спектарот на овој раствор наспроти 2-пропанол (3.8) во спектрофотометар (4.6) помеѓу 300 *nm* и 400 *nm*.

Максималната екстикција мора да биде помеѓу 325 *nm* и 327 *nm*.

Пресметување на содржината на витамин А:

IU витамин А / ml = E326 × 19,0

($E\frac{1\%}{1cm}$ за витамин А палмитат = 957 на 326 *nm* во 2-пропанол)

5.6.3.3. Витамин А работен стандарден раствор

Се става со пипета 3,0 ml неразреден витамин А работен стандарден раствор, подготвен во согласност со 5.6.1 во 50 ml градуирана колба (4.2.2) и се доаѓа до ознаката со 2-пропанол (3,8). Се става со пипета 5,0 ml на овој раствор во 25 ml градуирана колба и се доаѓа до ознаката со 2-пропанол (3,8). Номиналната концентрација на овој раствор е 6,72 IU витамин А ml. Се мери УВ спектарот на овој раствор наспроти 2-пропанол (3.8) воспектрофотометар (4.6) помеѓу 300 nm и 400 nm.

Максималната екстинкција мора да биде помеѓу 325 nm и 327 nm.
Пресметка на витамин А содржина:
IU витамин А / ml = E325 × 18,3

$$\left(E \frac{1\%}{1cm} \text{ за витамин А алкохол} = 1\,821 \text{ на } 325\ nm \text{ во 2-пропанол}\right)$$

6. Пресметување на резултатите
Од средната висина (област) на витамин А врвовите на растворот на примерокот се утврдува концентрација на раствор на примерок во IU / ml во однос на графоконот на калибрација (5.6.2).

Содржината на витамин А W во IU / кг. на примерок е даден од страна на следнава формула:

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

во која:

c= концентрација на витамин А во раствор на примерокот (5.4) во IU / ml
V_1 = волумен на раствор на примерокот (5.4) во ml
V_2 = волумен на земено количество во 5.4 во ml
m = тежина на делот за тестот во г

7. Забелешки
7.1. За примероци со ниска концентрација на витамин А може да биде корисно да се комбинираат екстракти на лесен петролеј од две сапонификации (измерена количина: 25 гр) со еден раствор на примерок за HPLC-определување.
7.2. Тежината на примерокот земен за анализа не смее да содржат повеќе од 2 г масти.
7.3. Ако фаза поделба не се случи се додава приближно 10 ml етанол (3.1) да се разбие емулзијата.
7.4. Со рибино масло и други чисти масти времето на сапонификација ќе биде продолжено од 45-60 минути.
7.5. Може да се користи наместо хидрохинон наместо BHT.
7.6. Со користење на колоната за нормална фаза е можно да се направи поделба на ретинол изомери. Но, во тој случај, висините (областите) на сите врвови на цис и транс изомери треба да се сумираат за пресметки.
7.7. Околу 150 mg аскорбинска киселина може да се користи наместо натриум аскорбат раствор.
7.8. Околу 50 mg. EDTA може да се користи наместо натриум сулфид раствор.

7.9. Во случај на анализа на витамин А во замена за млеко, посебно внимание треба да се посвети на
- сапонификација (5.2): поради количината на масти присутни во примерокот, зголемување на количината на калиум хидроксид раствор (3.4) може да биде неопходно,
- На екстракција (5.3): поради присуството на емулзии, адаптација на односот вода / етанол 2: 1 може да биде потребно.
За да се провери дали методот на анализа кој се применува генерира значајни резултати на оваа специфична матрица (замена за млеко), обновување на тестот ќе се применува на дополнителен дел за тест. Ако стапката за обновување е пониска од 80%, аналитичкиот резултат да се корегира за обновување.

8. Повторливост

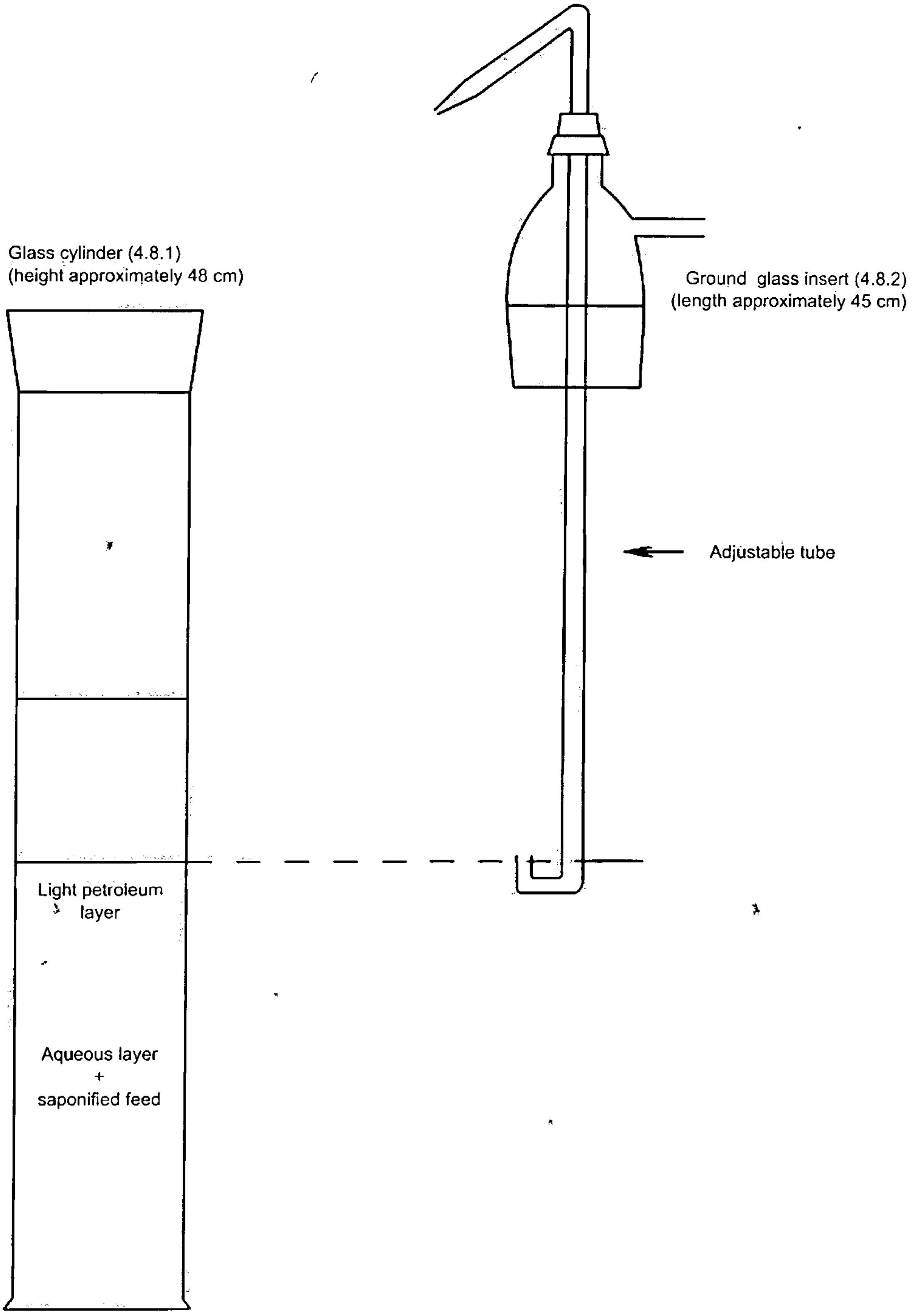
Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок не смее да надминува 15% во однос на повисок резултат.

9. Резултати од заедничка студија

	Премикс	Премикс на храна за животни	Концентрат на минерал	Протеинска храна за животни	Прасињa
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
mean "IU/kg"	17,02 x 10^6	1,21 x 10^6	537 100	151 800	18 070
Sr [IU/kg]	0,51 x 10^6	0,039 x 10^6	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	1,43 x 10^6	0,109 x 10^6	61 824	34 384	1 910
CVr[%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
SR [IU/kg]	1,36 x 10^6	0,069 x 10^6	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	3,81 x 10^6	0,193 x 10^6	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = број на лаборатории
n = број на еден вредности
CP = стандардна девијација на повторливост
CP = стандардна девијација на репродуктивноста
R = повторливост
R = репродуктивноста
CVr = коефициент на варијација на повторливост
CVR = коефициент на варијација на репродуктивноста.

Слика 1: Апаратура за екстракција (4.8)



Б. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВИТАМИН Е

1. Цел и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди нивото на витамин Д во храната за животни и премиксите. Содржината на витамин Е се изразува како mg. DL-α-токоферол ацетат за килограм. 1 mg. DL-α-токоферол ацетат одговара на 0,91 mg. DL-α-токоферол (витамин Е).
Границата на квантификација е 2 mg витамин E/kg. Ова ограничување на квантификација може да се постигне само со детектор за флуоресценција. Со УВ детектор границата на квантификација е 10 mg / kg.

2. Начело

Примерокот е хидролизиран со етанолски калиум хидроксид раствор и витаминот Е е извлечен со лесен петролеј. Растворувач е отстранет со испарување и остатокот се раствора во метанол и, доколку е потребно, се разредува до бараната концентрација. Содржината на витамин Е е определена со високо перформансна обратна фаза на течна хроматографија (RP-HPLC) со користење на флуоресцентен или UV детектор.

3. Реагенси

3.1. Етанол, σ = 96%.
3.2. Лесен петролеј, спектар на вриење $40^{0}C$-60°C.
3.3. Метанол.
3.4. Калиум хидроксид раствор, C = 50 g/100 ml.
3.5. Натриум аскорбат раствор, C = 10 g/100 ml (види 7.7 набљудувања).
3.6. Натриум сулфид, Na2S · x H2O (x = 7-9).
3.6.1. Натриум сулфид раствор, c = 0,5 mol / l во глицерол, β = 120 гр. / l. (За x = 9) (види 7.8 набљудувања)
3.7. Фенолфталеин раствор, в = 2 g/100 ml во етанол (3.1).
3.8. Мобилна фаза за HPLC: мешавина од метанол (3.3) и вода, на пример, 980 + 20 (V + V). Точниот сооднос ќе биде утврден со карактеристиките на користената колона.
3,9. Азот, без кислород.
3.10. DL-α-токоферол ацетат, екстра чист, со потврдена активност.
3.10.1. Раствор на DL-α-токоферол ацетат: Се мери до најблискиот 0,1 mg, 100 mg. DL-α-токоферол ацетат (3.10) во 100 ml градуирана колба. Се раствора во етанол (3.1) и се доаѓа до ознаката со истиот растворувач. 1 ml од овој раствор содржи 1 mg. DL-α-токоферол ацетат. (УВ контрола види 5.6.1.3; стабилизација види 7.4 забелешки).
3.11. DL-α-токоферол, екстра чист, со потврдена активност.
3.11.1. Раствор на DL-α-токоферол: Се мери до најблискиот 0,1 mg, 100 mg. DL-α-токоферол (3.10) во 100ml градуирана колба. Се раствора во етанол (3.1) и се доаѓа до

ознаката со истиот растворувач. 1 ml од овој раствор содржи 1 mg. DL-α-токоферол. (УВ контрола види 5.6.2.3; стабилизација види 7.4 набљудувања).
3.12. 2,6-ди-терт-бутил-4-метилфенон (BHT) (види 7.5 набљудувања).

4. Апаратура

4.1. Ротационен тенкослоен испарувач.
4.2. Садови од темно стакло.
4.2.1. Конусни колби или со рамно дно или, 500 ml, со шлифови.
4.2.2. Градуирана колби со шлифувани стопери, тесно грло, 10, 25, 100 и 500 ml.
4.2.3. Инки за одвојување, конусни, 1 000 ml, со стаклени стопери
4.2.4. Крушковидни колби, 250 ml, со шлифови.
4.3. Allihn кондензаторот, користена должина 300 mm, со шлифови, со адаптер за цевка за гас.
4.4. Филтер-хартија со набори за фазана сепарација, со дијаметар 185 mm (на пр Schleicher и Schuell 597 HY 1 / 2).
4.5. HPLC опрема со систем за вбризгување.
4.5.1. Течна хроматографска колона, 250 мм × 4 mm, C18, 5 или 10 μm полнеж, или еквивалентно.
4.5.2. Флуоресценција или UV детектор, со променлива подеслива бранова должина.
4.6. Спектрофотометар со 10 mm кварцни ќелии.
4.7. Водена бања со магнетна мешалка.
4.8. Апаратот за екстракција (види слика 1) се состои од:
4.8.1. Стаклен цилиндар од 1 L капацитет опремен со стаклено грло и затка.
4.8.2. Стаклена влошка опремена со странични епрувети и прилагодлива епрувета што минува низ центарот. Подесливата епрувета ќе има форма на буквата U долниот крај и излез за течност на спротивниот крај, така што горниот слој течност во цилиндарот може да се пренесе во инката за одвојување.

5. Постапка

Забелешка: Витаминот Е е чувствителен на (УВ-) светлина и на оксидација. Сите операции се вршат во отсуство на светлина (со користење на садови со темно стакло, или стаклени садови заштитени со алуминиумска фолија) и кислород (се елиминира со азот).

За време на екстракција воздухот над течноста се заменува со азот (да се избегне вишокот притисок од страна со олабавување на затката од време на време).

5.1. Подготовка на примерокот
Се меле примерокот, така што минува на сито со 1 mm мрежа, внимавајќи да се избегне создавање на топлина. Мелењето мора да се изврши непосредно пред мерењето и сапонификацијата инаку може да има загуби на витамин Е.

5.2. Сапонификација

Во зависност од тежата на содржината на витамин Е, до најблискиот 1 mg, 2 g до 25 g на примерокот во 500 ml конусна колба или со рамно дно (4.2.1). Се додава сукцесивно со вртење 130 ml етанол (3.1), околу 100 mg BHT (3.13), 2 ml натриум аскорбат раствор (3,5) и 2 ml натриум сулфид раствор (3,6). Се мести кондензаторот (4.3) на колбата и се потопува колбата во водена бања со магнетна мешалка (4.7). Се загрева до вриење и се остава да рефлуксира 5 минути. Потоа се додава 25 ml калиум хидроксид раствор(3.4) преку кондензаторот (4.3) и се остава да рефлуксира за уште 25 мин., со мешање под бавен прилив на азот. Потоа се плакне кондензаторот со околу 20 ml вода и се лади содржината на колбата на собна температура.

5.3. Екстракција

Се пренесува со декантација сапонифициран раствор квантитативно со испирање со вкупна количина од 250 ml вода на 1 000 ml инка за одвојување (4.2.3) или на апарат за екстракција (4.8). Се плакне колбата за сапонификација сукцесивно со 25 ml етанол (3.1) и 100 ml лесен петролеј (3.2) и се пренесува течноста од плакнењето во инката за одвојување или во апаратот за екстракција. Соодносот на водата и етанолот во вака комбинираните раствори мора да биде за 2:1. Се протресува енергично 2 мин. и се остава да се смири 2 минути.

5.3.1. Екстракција со користење на инка за одвојување (4. 2. 3)

Кога слоевите се одвоени (види забелешка 7.3) се пренесува слој на лесен петролеј во друга инка за одвојување (4.2.3). Се потворува екстракцијата два пати, со 100 ml лесен петролеј (3.2) и два пати, со 50 ml лесен петролеј (3.2).

Се мијат комбинираните екстракти во инката за одвојување двапати со нежно мешајќи (за да се избегне формирање на емулзии) со 100 ml делови од вода, а потоа се повторува тресењето со уште 100 ml делови од вода додека водата стане безбојна со додавање на фенолфталеин раствор (3.7) (четири пати миење е обично доволно).

Се филтрира измиениот екстракт преку сув филтер со набори за фаза поделба (4.4) да се отстрани сета заостаната вода во 500 ml градуирана колба (4.2.2). Се плакне инката за одвојување и филтерот со 50 ml лесен петролеј (3.2), се доаѓа до ознаката со лесен петролеј (3,2) и се меша добро.

5.3.2. Екстракција со апарат за екстракција (4. 8)

Кога слоевите се одвоени (види забелешка 7.3) се заменува стаклената затка од цилиндарот (4.8.1) со стаклена влошка (4.8.2) и се става подесливата епрувета во долниот крај во форма на буквата U веднаш над нивото на граничната површина интерфејсот. Со примена на притисок од линијата за азот кон страничната епрувета, се пренесува горниот слој на лесен петролеј во 1 000 ml инка за одвојување (4.2.3). Се додава 100 ml лесен петролеј (3.2) во стаклениот цилиндар, се затвора и се протресува убаво. Се дозволува слоевите да се одделат и се пренесува горниот слој во инката за одвојување како претходно. Се повторува постапката со екстракција со уште 100 ml

лесен петролеј (3.2), а потоа двапати со количини од 50 ml на лесен петролеј (3.2) и се додаваат слоевите лесен петролеј во инката за одвојување.
Се мијат комбинираните екстракти на лесен петролеј како што е опишано во 5.3.1 и се продолжува како што е опишано таму.

5.4. Подготовка на раствор на примерокот за HPLC
Со пипета се префрла количество на раствор на лесен петролеј (од 5.3.1 или 5.3.2) во 250 ml крушковидна колба (4.2.4). Се прави да испрари растворувачот речиси да сувост на роатционен испарувач (4.1) со намален притисок на температурата на бањата која не надминува 40°C. Се враќа атмосферскиот притисок со додавање на азот (3.10) и се отстранува садот од ротациониот испарувач. Се отстранува преостанатиот растворувач со прилив на азот (3.10) и се распаѓаат остатоците веднаш во познат волумен (10-100 ml) на метанол (3.3) (концентрацијата на DL-α-tocopherol мора да биде во опсег од 5 IU / ml до 30 IU / ml).

5.5. Одредување преку HPLC
Витаминот Е е поделен на C18 колона за обратна фаза (4.5.1) и концентрацијата се мери со помош на детектор за флуоресценција (екситација: 295 nm, емисија: 330 nm или УВ детектор (292 nm) (4.5.2).
Се инокулира количество (на пример 20 μl) на метанолски раствор добиен во 5.4 и се елуира со мобилна фаза (3,9). Се пресметуваат средните врвови (области) на неколку инјекции од истиот раствор на примерокот и средните врвови (области) на неколку инјекции калибрациони раствори (5.6.2).
HPLC Услови
Може да се следат следниве упатства; други услови може да се користат под услов тие да даваат еквивалентни резултати.
Течна хроматографска колона (4.5.1):
250 mm × 4 mm, C18, 5 или 10 μm полнеж, или еквивалентно
Мобилна фаза (3.8): Мешавина од метанол (3.3) и вода на пр. 980 + 20 (v + v).
Проток: 1-2 ml / мин.
Детектор (4.5.2): Детектор на флуоресценција (екситација: 295 nm / емисија: 330 nm) или УВ детектор (292 nm).

5.6. Калибрација (DL-α-токоферол ацетат или DL-α-токоферол)

5.6.1. DL-α-токоферол ацетат

5.6.1.1. Подготовка на стандардни работни раствори
Се зема со пипета 20 ml од DL-α-токоферол ацетат чуван раствор (3.10.1) во 500 ml конусна колба или со рамно дно (4.2.1) и хидролизирајте како што е опишано под 5.2. Потоа извлечете со лесен петролеј (3.2) според 5.3 и дојдете до 500 ml со лесен петролеј (3.2). Нека испари 100 ml од овој екстракт во ротационен испарувач (види 5.4) речиси да сувост. Се отстранува преостанатиот растворувач со прилив на азот (3.10) и повторно се раствора остатокот во 25,0 ml на метанол (3.3). Номиналната концентрација на овој раствор е 45,5 μg.

DL-α-токоферол по ml, еквивалентно на 50 µg. DL-α-токоферол ацетат по ml. Точната содржина мора да биде определена според 5.6.3.3. Работниот стандарден раствор треба да биде свежо подготвен пред употреба.

5.6.1.2. Подготовка на раствор за калибрација и цртање на калибрациски графикон Се префрла 1,0, 2,0, 5,0 и 10,0 ml од работен стандарден раствор во серија од 20 ml градуирани колби, се доаѓа до ознаката со метанол (3.3) и се меша. Номиналните концентрации на овие раствори се 2,5, 5,0, 10,0 и 25,0 µгр./ml DL-α-токоферол ацетат, или 2,28, 4,55, 9,10 и 22,8 µг. DL-α-токоферол. Се инјектира 20 µl на секој раствор за калибрација неколку пати и се утврдуваат средните врв висини (области). Користејќи ги врв висините (областите) се исцртува калибрациски графикон

5.6.1.3. УВ стандардизација на DL-α-токоферол ацетат чуван раствор (3.10.1.)
Се разредува 5,0 ml од DL-α-токоферол ацетат раствор (3.10.1) во 25,0 ml со етанол и се мери УВ спектарот на овој раствор наспроти етанол (3.1) во спектрофотометар (4.6) помеѓу 250 nm и 320 nm.

Максимумот на апсорпцијата ќе е на 284 nm:

E1%1 см = 43,6 на 284 nm во етанол

Во ова разредување мора да се добие вредност на екстинција од 0,84 до 0,88.

5.6.2. DL-α-токоферол стандард

5.6.2.1. Подготовка на работен стандарден раствор

Се префрла со пипета 2 ml од DL-α-токоферол раствор (3.11.1) во 50 ml градуирана колба, се раствора во метанол (3.3) и се доаѓа до ознаката со метанол. Номиналната концентрација на овој раствор е 40 mg.

DL-α-токоферол ml, што е еквивалентно на 44,0 mg. DL-α-токоферол ацетат ml. Работниот стандарден раствор мора да биде свежо подготвен пред употреба.

5.6.2.2. Подготовка на графикон за стандарден калибрациски раствор Се префрла 1,0, 2,0, 4,0 и 10,0 ml од работниот стандарден раствор во серија од 20 ml градуирана колби, се доаѓа до ознаката со метанол (3.3) и се меша. Номиналната концентрација на овие раствори е 2,0, 4,0, 8,0 и 20,0 µгр./ml DL-α-токоферол, односно 2,20, 4,40, 8,79 µгр./ml и 22,0 µg./ml DL-α-токоферол ацетат..

Се инјектира 20 µl од секој раствор за калибрација неколку пати и да се утврдат средните врв висини (области). Се користат средните врв висини (области) за изработка на графиконот.

5.6.2.3. УВ стандардизација на DL-α-токоферол чуван раствор (3. 1 1 1.)
Се разредува 2,0 ml од DL-α-токоферол раствор (3.11.1) во 25,0 ml етанол и се мери УВ спектарот на овој раствор наспроти етанол (3.1) во спектрофотометар (4.6) помеѓу 250 nm и 320 nm.

Максимум апсорпција е на 292 nm:

$$E_{1\,cm}^{1\%} = 75{,}8 \text{ на } 292 \text{ nm во етанол}$$

Во ова разредување мора да се добие вредност на екстинција од 0,6.

6. Пресметување на резултатите

Од средната висина (област) на витамин Е врвови на раствор од примерок да се утврди концентрација на раствор на примерок во µg./ml (пресметана како α-токоферол ацетат) со повикување на графиконот на калибрација (5.6.1.2 или 5.6.2.2).

Содржината на витамин Е w во mg / kg на примерок е дадена со следнава формула:

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

во кое:
c = витамин Е концентрација (како α-токоферол ацетат) на примерокот раствор (5.4) во µg / m l
V1 = волумен на примерокот раствор (5,4), во ml
V2 = волумен на количество преземени во (5.4), во ml
m = тежина на тестот дел во g

7. Забелешки

7.1. За примероци со ниска концентрација на витамин Е може да биде корисно да се комбинираат екстракти од лесен петролеј од две сапонификации (измерена количина: 25 g) на еден раствор на примерок за HPLC-определување.

7.2. Тежината на примерокот земен за анализа не смее да содржи повеќе од 2 g масти.

7.3. Ако фазата поделба (сепарација) не се случи додадете приближно 10 ml етанол (3.1) за да се разбие емулзијата.

7.4. По спектрофотомеричко мерење на DL-α-токоферол ацетат или DL-α-токоферол раствор според 5.6.1.3 или 5.6.2.3 соодветно додадете околу 10 mg BHT (3.12) во растворот (3.10.1 или 3.10.2) и држете го растворот во фрижидер (макс. 4 недели).

7.5. Хидрохинонот може да се користи наместо BHT.

7.6. Користејќи нормална фаза на колона можна е сепарацијата на α-, β-, γ и δ-токоферол.

7.7. Околу 150 mg аскорбинска киселина може да се користи наместо натриум акорбат раствор.

7,8. Околу 50 mg. EDTA може да се користи наместо натриум сулфид раствор.

7.9. Витамин Е ацетат хидролизира многу брзо под алкални услови и затоа е многу чувствителен на оксидација, особено во присуство на елементи во трагови како железо или бакар. Во случај на определување на витамин Е во премиксите на ниво повисоко од 5 000 mg / kg, деградацијата на витамин Е може да биде последица. Затоа се препорачува за потврда HPLC метод вклучувајќи ензимско варењето на Е витаминот формулација без алкална сапонификација.

8. Повторливост

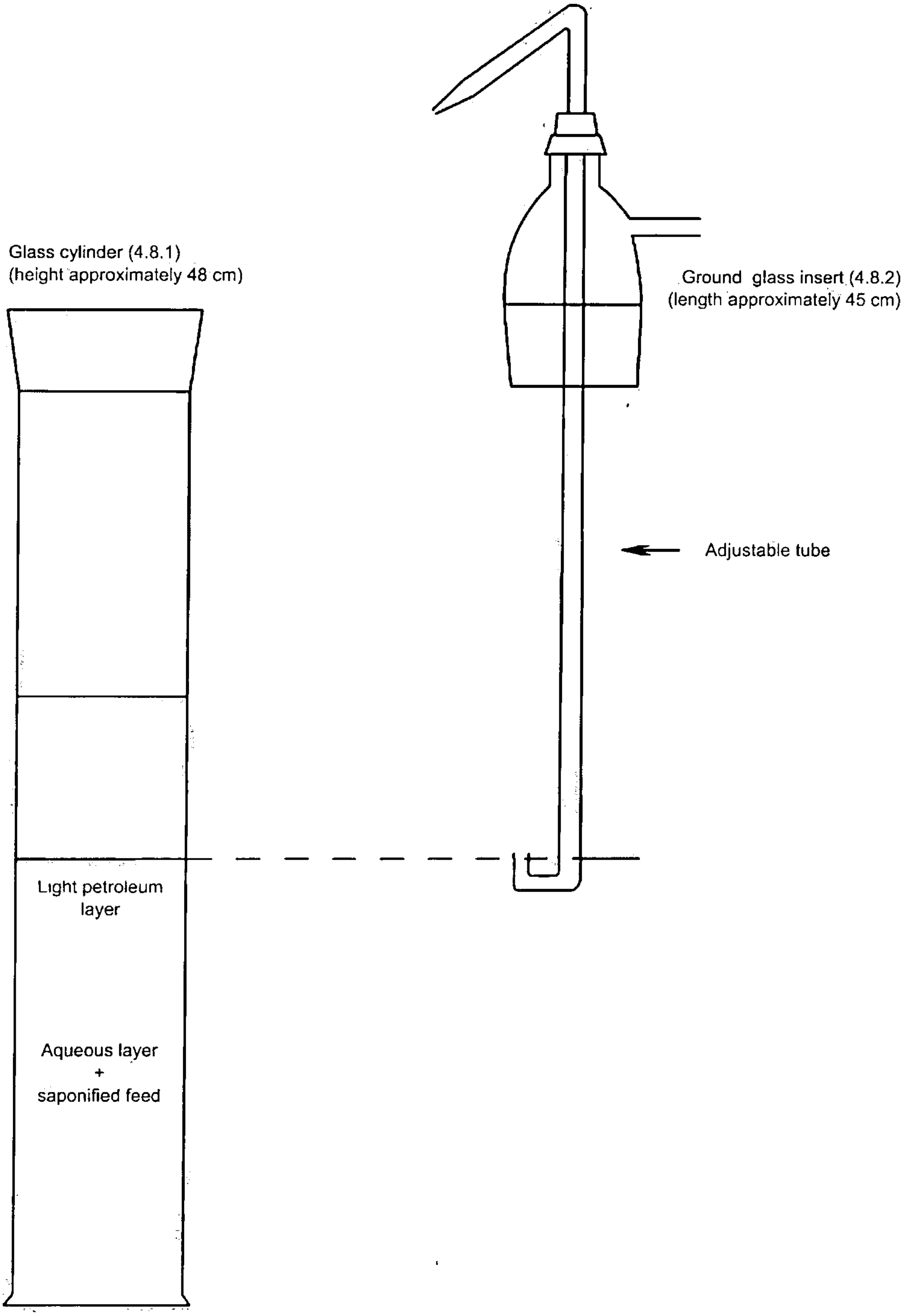
Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок не смее да надминува 15% во однос на повисок резултат.

9. Резултати од заеднички студија

	Премикс	Премикс на храна за животни	Концентрат на минерал	Протеинска храна за животни	Прасиња
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
mean "IU/kg"	17 380	1 187	926	315	61,3
Sr [IU/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [IU/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr[%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
SR [IU/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [IU/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = број на лаборатории
n = број на единечни вредности
sr = стандардна девијација на повторливост
s_R = стандардна девијација на репродуктивност
r = повторливост
R = репродуктивност
CV_r = коефициент на варијација на повторливост
CV_R = коефициент на варијација на репродуктивност

Слика 1: Апаратура за екстракција (4.8)



В. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЕЛЕМЕНТИ ВО ТРАГИ ЖЕЛЕЗО, БАКАР, МАНГАН И ЦИНК

1. Цел и предмет на уредување

Методот овозможува да се утврдат елементи во траги од железо, бакар, манган и цинк во храна. Границите на квантификација се:
- Железо (Fe): 20 mg / kg
- Бакар (Cu): 10 mg / kg
- Манган (Mn): 20 mg / kg
- Цинк (Zn): 20 mg / kg

2. Начело

Примерокот е ставен во раствор од хлороводородна киселина по уништувањето на органските материи, ако ги имало. Елементите железо, бакар, манган и цинк се определени, по соодветно разредување со атомска апсорпциона спектрометрија.

3. Реагенси

Воведни коментари

За подготовка на реагенси и аналитички раствори се користи вода без катјони за да се определи, добиена со двојна дестирана вода во боросиликатно или кварцно стакло обична или со двоен третман на јонска размена на смола.

Реагенсите мора да бидат со најмалку аналитичка чистота. Чистотата на елементот што се определува мора да се провери со слепа проба. Доколку е потребно, реагенси мора и понатаму да се прочистат.

На местото на стандардните раствори опишани подолу, може да се користат комерцијални стандардни раствори под услов да се гарантирани и биле проверени пред употреба.

3.1. Хлороводородна киселина (d: 1,19 g / ml).

3.2. Хлороводородна киселина (6 mol / l).

3.3. Хлороводородна киселина (0,5 mol / l).

3.4. Флуороводородна киселина 38% до 40% (v / v) со содржина на железо (Fe) помалку од 1 mg / l и остаток по испарување на помалку од 10 mg (сулфат) / литар.

3.5. Сулфурна киселина (d: 1,84 g / ml).

3.6. Водород пероксид (околу 100 волумени на кислород (30% од тежината)).

3.7. Стандарден железен раствор (1 000 mg Fe / ml), подготвен како што следува или достапен комерцијален еквивалентен раствор:

растворете 1 g на железна жица во 200 ml 6 mol / l хлороводородна киселина (3.2), додадете 16 ml на водород пероксид (3.6) и дојдете до 1 литар со вода.

3.7.1. Работен стандарден железен раствор (100 mg Fe / ml), подготвен со разредување еден дел од стандарден раствор (3.7) со 9 делови на вода.

3.8. Стандарден бакарен раствор (1 000 mg Cu / ml), подготвен како што следува или достапен комерцијален еквивалентен раствор:

- Се раствора 1 g на бакар во прашкаста форма во 25 ml од 6 mol / l хлороводородна киселина (3.2), додадете 5 ml на хидроген пероксид (3.6) и дојдете до еден литар со вода.

3.8.1. Работен стандарден бакарен раствор (10 mg Cu / ml), подготвен со разредување 1 дел од стандарден раствор (3.8), со 9 делови на вода и потоа се разредува 1 дел од резултатот со 9 делови на вода.

3.9. Стандарден манганов раствор (1 000 μгр. Mn / ml), подготвен како што следува или достапен комерцијален еквивалентен раствор

Раствор:
- растворете 1 g на манган во прашкаста форма во 25 ml од 6 mol / l хлороводородна киселина (3.2) и дојдете до еден литар со вода.

3.9.1. Работен стандарден манганов раствор (10 mg Mn / ml), подготвен со разредување 1 дел од стандарден раствор (3,9) со 9 делови на вода и потоа се разредува 1 дел од резултатот со 9 делови на вода.

3.10. Стандарден цинк раствор (1 000 mg Zn / ml), подготвен како што следува или достапен комерцијален еквивалентен раствор:
- се раствора 1 g на цинк во форма на лента или лист во 25 ml од 6 mol / l хлороводородна киселина (3.2) и дојдете до 1 литар со вода.

3.10.1. Работен стандарден цинк раствор (10 mg Zn / ml), подготвен со разредување 1 дел од стандарден раствор (3.10) со 9 делови на вода и потоа се разредува 1 дел од резултатот со 9 делови на вода.

3.11. Лантан хлорид: се раствораат 12 g на лантан оксид во 150 ml вода, додадете 100 ml 6 mol / l хлороводородна киселина (3.2) и дојдете до еден литар со вода.

4. Апаратура
4.1. Муфел печка со регулација на температурата и регистратор по можност.

4.2. Садови мора да се од отпорно боросиликатно стакло и се препорачува да се користи апарат кој е резервиран исклучиво за определување на елементите во траги. исклучиво за елементи во трагови определби.

4.3. Атомски апсорпционен спектрофотометар кој ги исполнува потребите на методот во врска со чувствителност и прецизност во бараниот опсег.

5. Постапка

5.1. Примероци кои содржат органски материи

5.1.1. Пепелосување и подготовка на раствор за анализа (2)

5.1.1.1. Се става 5-10 g од примерокта измерена со точност од 0,2 mg во кварцен или платински тигел (види Забелешка (б)), се суши во печка на 105ºС и се става тигелот во студена муфел печка (4.1). Се затвора печката (види Забелешка (в)) и постепено се подига температурата на 450-475 º С во период од околу 90 минути. Се одржува оваа температура за 4 до 16 часа (на пример, преку ноќ) да се отстрани јагленосувачкиот материјал и потоа се отвора печката и се остава да се излади (види Забелешка (г)).

Се навлажнува пепелта со вода и се префрла во бехерова чаша од 250 ml. Се мие тигелот со вкупно околу 5 ml на солна киселина (3.1) и се додава полека и внимателно во бехеровата чаша (може да има енергична реакција поради формирање на CO2). Се додава капка по капка хлороводородна киселина (3.1) со агитација додека престане кипењето. Се испарува до сувост, повремено мешајќи со стаклена прачка.

(1) Други методи на варењето на храната може да се користат под услов тие да имаат докажано слични резултати (како што се дигестија со микробранов притисок).
(2) Зелена сточна храна (свежа или сува) обично содржи големи количини на вегетален силициум диоксид, кој може да содржи елементи во трагови и мора да се отстрани.
За примероци на оваа храна мора да се применува следната изменета постапка. Се изведува операцијата 5.1.1.1. што се однесува до филтрацијата. Се мие филтер-хартијата која содржи нерастворливи остатоци двапати со врела вода и се става во кварцен или платиниумски тигел.

Се пали во печка муфел (4.1) на температура под 550ºС до исчезнување на сите јагленисувачки материи. Се дозволува да се излади, се додаваат неколку капки вода проследено со 10-15 ml на флуороводородна киселина (3.4) и се испарува до сувост на околу 150ºС. Ако останува силика во остатоци, повторно се раствора во неколку милилитри на флуороводородна киселина (3.4) и се испарува до сувост. Се додаваат пет капки од сулфурна киселина (3,5) и се загрева додека не исчезнат белите гасови. По додавањето на 5 ml на 6 mol / l хлороводородна киселина (3.2) и околу 30ml вода, се загрева, се филтрира растворот во 250 ml волуметриска колба и се доаѓа до ознаката со вода (HCl концентрација од околу 0,5mol / l). Се продолжува потоа со определбата од точка 5.1.2.

Следно се додава 15 ml од 6 mol/l хлороводородна киселина (3.2) на остатоци проследено со околу 120 ml вода. Се промешува со стаклена прачка, која ќе биде оставена во бехеровата чаша, и да се покрива бехеровата чаша со стакло за набљудување. Се доведува нежно до вриење и се одржува точката на вриење додека не се гледа повеќе пепел кој се раствора. Се филтрира пепелот на филтер-хартија која не содржи пепел и се собира филтратот во 250 ml волуметриски колба. Се мие бехерова чаша и се филтрира со 5 ml врела 6 mol/l хлороводородна киселина (3.2) и

двапати со врела вода. Се полни волуметриската колба до ознаката со вода (HCl концентрација за 0,5 mol / l).

5.1.1.2. Ако остатокот во филтерот е црн (јаглен), се враќа во печката и се пепелосува повторно на 450-475ºC. Ова пепелосување, за кое се потребни само неколку часа (околу 3-5 часа), е завршено кога пепелот станува бел или речиси бел. Се раствора остатокот со околу 2 ml на солна киселина (3.1), се испарува до сувост и се додава 5 ml од 6 mol / l хлороводородна киселина (3.2). Се загрева, се филтрира растворот во волуметриска колба и се доаѓа до ознаката со вода (HCl концентрација за 0,5 mol / литар.

Забелешки:

(а) При определување елементи во трагови, важно е да се предупреди на ризикот од контаминирање, особено од цинк, бакар и железо. Поради оваа причина, опремата која се користи за подготвување на примероците мора да биде ослободена од овие метали.
За да се намали општиот ризик од контаминација, се работи во атмосфера ослободена од прашина со скрупулозно чистаопрема и внимателно измиени стклени садови. Одредувањето на цинк е особено чувствитео на многу видови на контаминација, на пример, од стакло, реагенси, прашина и сл.

(б) тежината на примерокот кој треба да се пеплоса се пресметува според приближната содржината на елемент трага во храна за животни во зависност од чувствителноста на спектрофотометар кој се користи. За одредена храна со малку елементи во трагови може ќе е потребно да се започне со 10-20g примерок и да се направи конечниот раствор само до 100 ml

(в) Пепелосувањето мора да се врши во затворена печка без вбризгување на воздух или кислород.

(г) температурата е дадена од пирометарот не смее да надмине 475ºC.

5.1.2. Спектрофотометричка детекција

5.1.2.1. Подготовка на раствори за калибрација
За секој од елементите кои се определуваат, подготвени од работниот стандарден раствор даден во точките 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 и 3.10.1 опсег на калибрација на растворите, секој раствор за калибрација има концентрација на HCl 0,5 mol / l (и (во случаи на железо, манган и цинк) концентрација на лантан хлорид еквивалентно на 0,1% La (w / v).

Концентрациите на избраниот елемент во трага мора да бидат во рамките на опсегот на чувствителноста на спектрофотометар кој се користи.

Во табелите подолу е покажан, по пат на пример, составот на типичниот опсег на растворите за калибрација; сепак, во зависност, од видот и чувствителноста на

спектрофотометар кој се користи може да биде потребно да изберете други концентрации.

Железо

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml стандарден работен раствор (3.7.1) (1 ml= 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml раствор на лантанум хлорид (3.11) и со додавање на вода се достигнува до 100 ml							

Бакар

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml стандарден работен раствор (3.8.1) (1 ml= 100 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Манган

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml стандарден работен раствор (3.9.1) (1 ml= 100 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml раствор на лантанум хлорид (3.11) и со додавање на вода се достигнува до 100 ml							

Цинк

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml стандарден работен раствор (3.10.1) (1 ml= 100 µg Zn)	0	0,05	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml раствор на лантанум хлорид (3.11) и со додавање на вода се достигнува до 100 ml							

5.1.2.2. Подготовка на раствори за анализа
За определување на бакар, растворот подготвен од точка 5.1.1 нормално може да се користи директно. Ако е потребно се прави неговата концентрација во рамките на опсегот на растворите за калибрација, одредено количество може да биде пренесено со пипета во 100 ml волуметриски колба, се доаѓа до ознаката со 0,5 mol / l хлороводородна киселина (3.3).

За одредување на железо, манган и цинк, се пренесува со пипета одредено количество од растворот подготвен од точка 5.1.1 во 100 ml во волуметриски колба, се додава 10 ml лантан хлорид (3.11) и се доаѓа до ознаката со 0,5 mol / l хлороводородна киселина (3.3) (види, исто така, точка 8 "забелешка").

5.1.2.3. Слепа проба
Слепата проба мора да ги содржи сите пропишани чекори од постапката, освен дека материјалот од примерокот е испуштен. Раствор за калибрација '0 'не смее да се користи за слепа проба.

5.1.2.4. Мерење на атомската апсорпција
Се мери атомската апсорпција на растворите за калибрација и од растворот кој ќе се анализира со помош на оксидирачки воздшен ацетилен пламен во следните бранови должини:
Fe: 248,3 nm
Cu: 324,8 nm
Mn: 279,5 nm
Zn: 213,8 nm
Секое мерење се спроведува четири пати.

5.2. Минерална храна за животни
Ако примерокот не содржи органски материи, не е потребно претходно пепелосување. Се продолжува како што е опишано во точка 5.1.1.1 почнувајќи од вториот став. Испарувањето со флуороводородна киселина може да се изостави.

6. Пресметување на резултатите
Користејќи калибрациона крива, се пресметува концентрацијата на елементи во трагови на растворот кој треба да се анализира и се изразува резултатот во милиграми на елементи во трагови по килограм на примерокот (ppm).

7. Повторливост
Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок од истиот аналитичар не смее да надминува:
- 5 mg / kg, во апсолутна вредност, за содржината на елементи во трагови до 50 mg /kg,
- 10% на поголем резултат за содржината на елементи во трагови од 50 и до 100 mg / kg,

- 10 mg / kg, во апсолутна вредност, за содржината на елементи во трагови од 100 и до 200 mg / kg,
- 5% на повисок резултат за содржината на елементи во трагови над 200 mg / kg.

8. Забелешка
Присуството на големи количества на фосфати може да се меша со одредување на железо, манган и цинк.
Таквото мешање мора да се корегира со додавање на лантан хлорид (3.11). Ако, сепак, во примерокот соодносот на тежината Ca + mg / P e> 2, додавањето на лантан хлорид (3.11) во растворот за анализа и за растворите за калибрација може да се изостави.

Г. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ХАЛОФУГИНОН
DL-транс-7-бромо-6-хлоро-3-[3-(3-хидрокси-2-пиперидил)ацетонил]-хиназолин-4-(3H)-еден хидробромид.

1. Цел и предмет на уредување
Методот овозможува да се одреди нивото на халофугинон во храна. Границата на квантификација е 1 mg / kg

2. Начело
По третманот со топла вода, халофугинонот е добиен како слободна база во етил ацетат и потоа поделен како хидрохлорид во воден киселински раствор. Екстрактот е прочистен со хроматографија со јонска размена. Содржината на халофугинонот се определува со обратна фаза на високо перформансна течна хроматографија (HPLC) со користење на УВ детектор.

3. Реагенси
3.1. Ацетонитрил, со чистина за HPLC.

3.2. Смола амберлит XAD-2.

3.3. Амониум ацетат.

3.4. Етил ацетат.

3.5. Оцетна киселина, глацијална.

3.6. Халофугинон стандардна супстанција (DL-транс-7-бромо-6-хлоро-3-[3-хидрокси-2-пиперидил) ацетонил] хиназолин-4 - (3H)-еден хидробромид, E 764).

3.6.1. Халофугинон стандарден раствор, 100 µg/ m l
Се мери до најблискиот 0,1 mg, 50 mg на халофугинон (3.6) во 500 ml градуирана колба, се раствора во амониум ацетат раствор (3.18), се доаѓа до ознаката со пуфер раствор и се меша. Ова раствор е стабилен три недели на 5 оC ако се чува на темно место.

3.6.2. Раствори за калибрација

Во серија од 100 ml градуирани колби се префрла 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 6,0 ml од чуваниот стандарден раствор (3.6.1). Се доаѓа до ознаката со мобилна фаза (3.21) и се меша. Овие раствори имаат концентрации на 1,0, 2,0,3,0, 4,0 и 6,0 µg/ml на халофугинон соодветно. Овие раствори мора да биде свежо подготвени пред употреба.

3.7. Хлороводородна киселина (ρ20 околу 1,16 g / ml).

3.8. Метанол.

3,9. Сребро нитрат.

3.10. Натриум аскорбат.

3.11. Натриум карбонат.

3.12. Натриум хлорид.

3.13. EDTA (етилен-диамино-тетра-оцетна киселина, динатриум сол).

3.14. Вода, со чистина за HPLC.

3,15. Натриум карбонат раствор, c = 10 g/100 ml.

3.16. Натриум хлорид-заситен натриум карбонат раствор, c = 5g/100 ml.
Се раствора 50 g натриум карбонат (3.11) во вода, се разредува до 1 литар и се додава натриум хлорид (3.12) додека растворот не стане заситен.

3.17. Хлороводородна киселина, приближно 0,1 mol / l.
Се разредува 10 ml HCl (3.7) со вода до 1 литар.

3.18. Амониум ацетат пуфер раствор, околу 0,25 mol / l.
Се раствора 19,3 g на амониум ацетат (3.3) и 30 ml раствор на оцетна киселина (3.5) во вода (3,14) и се разредува до 1 литар.

3.19. Смола амберлит XAD-2 подготовка.
Се мие соодветна количина на амберлит (3.2) со вода се додека сите хлоридни јони се отстранети, индицирано со сребро нитрат (3.20) тест изведен во фазата на отфрлање на водата. Потоа се мие смолата со 50 ml на метанол (3.8), се отстранува метанолот и се чува смолата под свеж метанол.

3.20. Сребро нитрат раствор, околу 0,1 mol / l.
Се раствора 0,17 g на сребро нитрат (3.9) во 10 ml вода.

3.21. HPLC Мобилна фаза.
Се меша 500 ml ацетонитрил (3.1) со 300 ml на амониум ацетат пуфер раствор (3.18) и 1 200 ml вода(3.14). Се подесува pH на 4,3 со користење на оцетна киселина (3,5). Се филтрира (на пример, со ултразвук 10 минути). Ова раствор е стабилен за еден месец, доколку се чува во темница во затворен сад.

4. Апаратура
4.1. Ултразвучна бања

4.2. Ротационен тенкослоен испарувач

4.3. Центрифуга

4.4. HPLC опрема со ултравиолетов детектор со променлива бранова должина или детектор со диодна матрица.

4.4.1. Течна хроматографски колона, 300 mm x 4 mm, C18, 10 μm полнеж, или еквивалентна колона

4.5. Стаклена колона (300 мм x 10 мм) со синтеруван стаклен филтер и копче за стоп.

4.6. Филтри од стаклени влакна, со дијаметар 150 mm

4.7. Мембрански филтри, 0,45 μm

4.8. Мембрански филтри, 0,22 μm

5. Постапка

Забелешка: Халофугинонот како слободна база е нестабилен во алкални и етил ацетат раствори.
Не останува во етил ацетат повеќе од 30 минути.

5.1. Општо

5.1.1. Ќе се анализира бланко храна за животни за да се провери дека ниту халофугинонот ниту супстанции кои пречат не се присутни.

5.1.2. Тест за обновување се врши преку анализа на бланко храна за животни која е збогатена со додавање на количина на халофугинон, слична на онаа присутна во примерокот. Да се зајакне на ниво од 3 mg / kg, се додава 300 μl чуван стандарден раствор (3.6.1) на 10 g од бланко храната, се меша и се чека 10 минути пред да се продолжи со чекорот екстракција (5.2).

Забелешка: За целите на овој метод, бланко храната за животни да е слична во вид на онаа на примерокот и во анализата халофугинонот нема да се открие.

5.2. Екстракција

Се мери до најблискиот 0,1 g, 10 g од подготвениот примерок, во 200 ml епрувета за центрифуга, се додава 0,5 g натриум аскорбат (3.10), 0,5 g на EDTA (3.13) и 20 ml вода и се меша. Се става епруветата 5 минути во водена бања (80ºC). По ладење на собна температура, се додава 20 ml натриум карбонат раствор (3.15) и се меша. Се додава веднаш 100 ml на етил ацетат (3.4) и се тресе енергично со рака 15 секунди. Тогаш се става епруветата три минути во ултразвучна бања (4.1) и се олабавува затката. Се центрифугира две минути и се декантира фазата етил ацетат преку филтер со стаклени влакна (4.6), во 500 ml инка за одвојување. Се повторува екстракцијата на примерокот со вториот дел од 100 ml на етил ацетат. Се мие смесата екстракти една минута со 50 ml на натриум хлорид заситен натриум карбонат раствор (3.16) и се отфрла водениот слој.

Се екстрахира органскиот слој за 1 мин. со 50 ml на солна киселина (3.17). Се става понискиот слој киселина во 250 ml инка за одвојување. Повторно се екстрахира органскиот слој за 1,5 минути со уште 50 ml на солна киселина и се спојува со првиот екстракт. Се мие смесата со мешани киселински екстракти со вртење околу 10 секунди со 10 ml етил ацетат (3.4).

Квантитативно се префрла водениот слој во 250 ml колба со кружно дно и се отфрла органската фаза.

Се испарува сиот преостанат етил ацетат од киселинскиот раствор со користење на ротационен тенкослоен испарувач (4.2). Температурата на водата во бањата не смее да надмине 40°C. Ќе бидат отстранети под вакуум од околу 25 mbar сите остаток на етил ацетат во рок од 5 минути на 38ºC.

5.3. *Чистење*

5.3.1. Подготовка на колоната амберлит

Една XAD-2 колона е подготвена за секој екстракт на примерокот. Се префрла 10 g подготвен амберлит (3.19) стаклена колона (4.5) со метанол (3.8). Се додава малку стаклена волна на врвот на коритото со смола. Се дренира метанолот од колоната и се мие смолата со 100 ml вода, запирајќи го протокот кога течноста го достигне врвот на коритото со смола. Се дозволува колона да се изедначи 10 минути пред употреба. Никогаш не се дозволува колоната да работи сува.

5.3.2. Чистење на примерокот

Се префрла квантитативно екстракт (5.2) на врвот на подготвената колона амберлит (5.3.1) и се елуира, отфрлајќи го елуатот. Стапката на елуирање не смее да надмине 20 ml / min. Се плакне колбата со кружно дно со 20 ml солна киселина (3.17) и се искористува ова за миење на колоната со смола. Се издувува евентуално заостанатиот киселински раствор со воздух. Се исфрлаат течностите од миењето. Се додава 100 ml на метанол (3.8) во колоната и се елуира 5-10 ml, се собира елуатот во колба од 250 ml кружно дно. Се става преостанатиот метанол 10 минути за да се изедначи со смолата и се продолжува со елуирање со стапка која не надминува 20 ml / min. Собирајќи го елуатот во истата колба со кружно дно. Се испарува метанолот на ротационен тенкослоен испарувач (4.2), температурата на водената бања не смее да надминува 40°C. Се префрла остатокот квантитативно во 10 ml калибрирана колба со користење на мобилна фаза (3.21). Се доаѓа до ознаката со мобилна фаза и се меша. Едно количество се филтрира преку мембрана филтер (4.7). Се чува овој раствор за HPLC определување (5.4).

5.4. HPLC определување

5.4.1. Параметри

дадени се следните услови, други услови може да се користат под услов тие да дадат еднакви резултати.

Течна хроматографски колона (4.4.1)

HPLC Мобилна фаза (3.21)

Проток: 1,5 до 2 ml / min.

Откривање на бранова должина: 243 nm

Волумен на вбризгување: 4-10 µl.

Се проверува стабилноста на хроматографскиот систем, со инјектирање на раствор за калибрација (3.6.2) кој содржи 3,0 µg / m l неколку пати, до добивање на постојани пикови (или области) и време на задржување.

5.4.2. Графикон на калибрација
Се инјектира од секој калибрациски раствор (3.6.2) неколку пати и се мерат пиковите (областите) за секоја концентрација.

Се црта графикон на калибрација со користење на средните пикови или области на калибрациски раствори како ординати и соодветните концентрации во µg / ml како апциси.

5.4.3. Раствор на примерокот
Се инјектира екстракт од примерокот (5.3.2) неколку пати, со користење на истиот волумен како калибрациските раствори и се утврдува средната врв височина (област) на врвовите халифугинон.

6. Пресметување на резултатите
Се одредува концентрацијата на раствор на примерокот во µg/ml, од средната висина (област) на врвовите халофугинон на растворот на примерокот во однос на графиконот на калибрација (5.4.2).
Содржината на халофугинон w (mg / kg) на примерокот е даден со следнава формула:

$$x = \frac{C \times 10}{m}$$

во која:
c = концентрација на халофугинон во растворот на примерокот во µg/ml,
m = тежина на делот за тестот во грамови.

7. Валидација на резултатите
7.1. Идентитет
Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија, или со користење на детектор со диодна матрица со кој се споредуваат спектарот на екстрактот на примерокот и растворот за калибрација (3.6.2) кој содржи 6,0 µg/ml.

7.1.1. Ко-хроматографија
Еден екстракт на примерокот е збогатен со додавање на соодветна количина на раствор за калибрација (3.6.2). Количината на додаден халофугинон мора да биде слична на проценетата сума на халофугинон пронајдена во екстрактот од примерокот.

Но, висината на халофугинон врвовите треба да биде подобрена земајќи ги во предвид додадената количина и разредувањетото на екстрактот. Ширината на врвот, на половина од својата максимална висина, мора да биде во рамките на ± 10% од оригиналната ширина.

7.1.2. Детекција со диодна матрица
Резултатите се оценуваат според следниве критериуми:

(а) брановата должина на максималната апсорпција на примерокот и на стандардните спектри снимени на највисоката точка на врвот на хроматограмот, мора да бидат исти во рамките на маргината утврдена со моќта на откривање на системот за детекција. За детекцијата со диодна матрица, ова е обично во рамките на ± 2 nm;

(б) меѓу 225 и 300 nm, примерокот и стандардните спектри снимени на највисокиот врв на хроматограмот, не треба да бидат различни за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% во однос на апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на ненабљудувана точка девијацијата помеѓу два спектри надминува 15% од апсорпцијата на стандардниот аналит;

(в) меѓу 225 и 300 nm, спектрите на искачувањето, највисоката точка и паѓањето на врвот произведен од екстракт од примерокот не смее да се различни едни од други за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% од апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на сите набљудувани точки отстапувањето помеѓу спектарите не надминува 15% од апсорпцијата на спектарот на највисоката точка од врвот.

Ако еден од овие критериуми не е исполнет присуството на аналитот не е потврдено.

7.2. Повторливост
Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок не смее да надмине 0,5 mg / kg за содржини на халофугинон до 3 mg / kg

7.3. Обновување
За збогатен бланко примерок обновувањето треба да биде најмалку 80%.

8. Резултати од заеднички студија
Беше договорена колаборативна студија (1) во кои три примероци беа анализирани од осум лаборатории.

Резултати

	Примерок А (слепа проба) При прием	Примерок Б (брашно)		Примерок В (Пелети)	
		При прием	По два месеци	При прием	По два месеци
Средна вредност [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R [mg/kg]	-	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R [%]	-	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ND =недетектирано
S_R = стандардна девијација на репродуктивноста
CV_R = коефициент на варијација на репродуктивноста (%)
Rec. = Обновување (%)

Д. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА РОБЕНИДИН

1,3-bis[(4-хлоробензилиден)амино]гванидин хидрохлорид

1. Цел и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди нивото на робенидин во храната за животни. Границата на квантификација е 5 mg /kg

2. Начело

Примерокот е екстрахиран со закиселен метанол. Екстрактот се суши и одредено количество е подложено на чистење во колона со алуминиум оксид. Робенидин е елуиран од колоната со метанол, концентриран, доведен до пригоден волумен со мобилна фаза. Содржината на робенидин се определува со обратна фаза на високо-перформансна течна хроматографија (HPLC) со користење на УВ детектор.

3. Реагенси

3.1. Метанол.

3.2. Закиселен метанол.

Се префрла 4,0 ml хлороводородна киселина (ρ20 = 1,18 g / ml) во 500 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со метанол (3.1) и се меша. Растворот треба да биде свежо подготвен пред употреба.

3.3. Ацетонитрил, со чистина за HPLC.

3.4. Молекуларно сито.

Тип 3А, 8-12 мрежа за монистра (1,6-2,5mmмонистра, кристален алуминосиликат, дијаметар на порите 0,3 mm).

3.5. Алуминиум оксид кисела активност чистина I за колона хроматографија.
Се префрла 100 g алуминиум оксид во соодветен сад и додадете 2,0 ml вода. Се затвора и се тресе околу 20 минути. Се чува во добро затворен сад.

3.6. Калиум дихирдоген фосфат раствор, c = 0,025 mol / l.
Се раствора 3,40 g на калиум фосфат дихидроген во вода (HPLC чистина) во 1 000 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката и се меша.

3.7. Ди-натриум водород фосфат раствор, c = 0,025 mol / l.
Се раствора 3,55 g на безводен (или 4,45 g на дихидрат или 8,95 g на додекахидрат) ди-натриум водород фосфат во вода (еквивалент на HPLC чистина) во 1 литар градуирана колба, се доаѓа до ознаката и се меша.

3.8. HPLC мобилна фаза.
Се мешаат заедно следниве реагенси:
650 ml ацетонитрил (3.3),
250 ml вода (еквивалент на HPLC чистина),
50 ml калиум ди-водород фосфат раствор (3,6),
50 ml ди-натриум водород фосфат раствор (3,7).
Се филтрира преку 0,22 µm филтер (4.6) и се дегазира растворот, (на пример, ултразвук 10 минути).

3.9. Стандардна супстанција.
Чист робенидин: 1,3-бис [(4- хлоробензилиден) амино] гванидин - хидрохлорид.

3.9.1. Робенидин чуван стандарден раствор: 300 µg / m l
Се мери до најблискиот 0,1 mg, 30 mg робенидин стандардна супстанција (3,9). Се раствора во закиселен метанол (3.2) во 100 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со истиот растворувач и се меша. Се завиткува колбата со алуминиумска фолија се чува на темно место.

3.9.2. Робенидин интермедијарен стандарден раствор: 12 µg /ml
Се префрла 10,0 ml од чуваниот стандарден раствор (3.9.1) во 250 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со мобилна фаза (3.8) и се меша. Се витка колбата со алуминиумска фолија и да се чува на темно место.

3.9.3. Калибрациски раствори
Во серија од 50 ml калибрирани колби, се префрла 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 и 25,0 ml од интермедијарниот стандарден раствор (3.9.2). Се доаѓа до ознаката со мобилна фаза (3,8) и се меша. Овие раствори одговараат на 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 и 6,0 µg/ml на робенидин соодветно. Растворите мора да бидат свежо подготвени пред употреба.

3.10. Вода еквивалентна на HPLC чистина.

4. Апаратура

4.1. Стаклена колона.

Направена од темно стакло со копче за стоп и резервоар од околу 150 ml капацитет, внатрешен дијаметар 10 до 15 mm, должина 250 mm.

4.2. Механичка маталка или магнетна мешалка.

4.3. Ротационен тенкослоен испарувач.

4.4. HPLC опрема со ултравиолетов детектор со променлива бранова должина или детектор со диодна матрица кој работи во опсег од 250-400 nm.

4.4.1. Течна хроматографска колона: 300 mm x 4 mm, C18 10 μm полнеж или еквивалентно.

4.5. Филтер хартија со стаклени влакна (Whatman ГФ / А или еквивалент).

4.6. Мембрански филтри, 0,22 μm.

4.7. Мембрански филтри, 0,45 μm.

5. Постапка

Забелешка: Робенидинот е чувствителен на светло. Садови од темно стакло ќе се користат во сите операции.

5.1. Општо

5.1.1. Ќе се анализира бланко храна за животни за да се провери дека ниту робенидин ниту супстанции кои пречат се присутни.

5.1.2. Тест за обновување се врши со анализа на бланко храна (5.1.1), која е збогатена со додавање на количина на робенидин, слична на онаа присутна во примерокот. Се збогатува на ниво од 60 mg / kg, се префрла 3,0 ml чуван стандарден раствор (3.9.1) во 250 ml конусна колба. Се испарува растворот до ca. 0,5 ml во налив на азот. Се додава 15 g на бланко храна, се меша и се чека 10 минути пред да се продолжи со чекор екстракција (5.2).

Забелешка: За целите на овој метод, бланко храната за животни треба да е слична во вид на онаа на примерокот и при анализатата робенидинот не е откриен.

5.2. Екстракција

Се мери до најблискиот 0,01 g, околу 15 g на подготвениот примерок. Се префрла во 250 ml конусна колба и се додава 100,0 ml закиселен метанол (3.2), се затвора и тресе еден час во маталката (4.2). Се филтрира растворот преку филтер хартија со стаклени влакна (4.5) и се собира целиот филтрат во 150 ml конусна колба. Се додава 7,5 g молекуларно сито (3.4), се затвора и се тресе пет минути. Се филтрира веднаш преку филтер-хартија со стаклени влакна.

Се задржува овој раствор за чекорот прочистување (5.3).

5.3. Прочистување

5.3.1. Подготовка на алуминиумски оксид колона
Се внесува малку стаклена волна во долниот крај на стаклената колона (4.1) и се спушта надолу со помош на стаклена прачка.

Се мери од 11,0 g од подготвениот алуминиум оксид (3,5) и се префрла во колоната. Да се внимава да се сведе на минимум изложеноста на атмосферата за време на оваа фаза. Нежно се потчукнува наполнетата колона во нејзиниот долен крај за да се наталожи алуминиум оксид.

5.3.2. Прочистување на примерокот
Се пренесува во колоната со пипета 5,0 ml на екстракт од примерокот подготвен во (5.2) Се остава врвот на пипетата во близина на ѕидот на колоната и се дозволува растворот да се апсорбира во алуминиум оксидот. Се елуира робенидин од колоната со користење на 100 ml метанол (3.1), на проток од 2 до 3 ml / минута и се собира елуатот во 250 ml колба со кружно дно. Се испарува метанол раствор до сувост под намален притисок на 40 º C со помош на ротационен тенкослоен испарувач (4.3). Повторно се раствора остатокот во 3-4 ml на мобилна фаза (3,8) и се пренесува квантитативно во 10 ml градуирана колба. Се плакне колбата со неколку 1 до 2 ml количини на мобилна фаза и се пренесува течноста од миењето во градуирана колба. Се доаѓа до ознаката со истиот растворувач и се меша. Едно количество се филтрира преку 0,45 µm мембрана филтер (4.7). Се чува овој раствор за HPLC определување (5.4).

5.4. HPLC определување

5.4.1. Параметри
Може да се следат следниве услови, други услови може да се користат под услов тие да дадат еднакви резултати:

Течна хроматографска колона (4.4.1),
HPLC мобилна фаза (3,8),
Проток: 1,5 до 2 ml / минута
Детектор на бранова должина: 317 nm,
Волумен на вбризгување: 20 до 50 µl.

Се проверува стабилноста на хроматографски систем, со инјектирање на раствор за калибрација (3.9.3) кој содржи 3,6 µg/ml неколку пати, додека се постигне постојаност во пиковите и времето на задржување.

5.4.2. Графикон на калибрација
Се инјектира од секој калибрациски раствор (3.6.2) неколку пати и се мерат пиковите (областите) за секоја концентрација.
Се црта графикон на калибрација со користење на средните пикови или области на калибрациски раствори како ординати и соодветните концентрации во µg / ml како апциси.

5.4.3. Раствор на примерокот

Се инјектира екстрактот од примерокот (5.3.2) неколку пати, со користење на истиот волумен како за калибрациските раствори и се утврдува врв височината (областа) на робенидин врвовите.

6. Пресметување на резултатите

Од средната висина (област) на врвовите на робенидин на растворот на примерокот се одредува концентрацијата на растворот на примерокот во μg/ml во однос на графиконот на калибрација (5.4.2).

Содржината на робенидин W (mg/ kg) во примерокот е даден со следната формула:

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

во која:

c = концентрација на робенидин во раствор на примерокот во μg/ml,

m = тежина на дел за тестот во грамови.

7. Валидација на резултатите

7.1. Идентитет

Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија, или со користење на детектор со диодна матрица со кој спектарот на екстрактот на примерокот и растворот за калибрација (3.9.3)кој содржи 6 μg/ml се споредуваат.

7.1.1. Ко-хроматографија

Еден екстракт на примерокот е збогатен со додавање на соодветен износ на раствор за калибрација (3.9.3). Износот на додаден робенидин мора да биде сличен на проценетата сума на робенидин пронајден во екстракт на примерокот.

Но висинатата на врвот на робенидин ќе биде зголемена земајќи ја во предвид додадената количина и разредувањето на екстрактот. Ширината на врвот, на половина од неговата максимална висина, мора да биде во рамките на околу 10% од оригиналната ширина.

7.1.2. Детекција со диодна матрица

Резултатите се оценуваат според следниве критериуми:

(а) брановата должина на максималната апсорпција на примерокот и на стандардните спектри снимени на највисоката точка на врвот на хроматограмот, мора да бидат исти во рамките на маргината утврдена со моќта на откривање на системот за детекција. За детекцијата со диодна матрица, ова е обично во рамките на ± 2 nm;

(б) меѓу 250 и 400 nm, примерокот и стандардните спектри снимени на највисокиот врв на хроматограмот, не треба да бидат различни за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% во однос на апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на ненабљудувана точка девијацијата помеѓу два спектри надминува 15% од апсорпцијата на стандардниот аналит;

(в) меѓу 250 и 400 nm, спектрите на искачувањето, највисоката точка и паѓањето на врвот произведен од екстракт од примерокот не смее да се различни едни од други за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% од апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на сите набљудувани точки отстапувањето помеѓу спектарите не надминува 15% од апсорпцијата на спектарот на највисоката точка од врвот.

Ако еден од овие критериуми не е исполнет присуството на аналитот не е потврдено.

7.2. *Повторливост*
Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок не смее да надминува 10% од повисок резултат за содржина на робенидин поголема од 15 mg / kg

7.3. Обновување
За збогатената слепа проба треба да биде најмалку 85%.

8. Резултати од заедничка студија
Беше договорена колаборативна студија на ЕЗ во кои четири примероци храна за живина и зајаци, во вид на брашно или пелети беа анализирани од 12 лаборатории. Удвоени анализи беа извршени за секој примерок. Резултатите се дадени во табелата подолу:

	Живина		Зајак	
	Брашно	Пелети	Брашно	Пелети
Mean [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_R[mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R[%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Recovery [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r= стандардна девијација на повторливост,
CV_r = коефициент на варијација на повторливост,%
S_R= стандардна девијација на репродуктивноста,
CV_R = коефициент на варијација на репродуктивноста. %

Ѓ. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ДИКЛАЗУРИЛ

(+)-4-хлорфенил [2,6-дихлоро-4-(2,3,4,5-тетрахидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2-ил) фенил]-ацетонитрил.

1. Цел и предмет на уредување

Методот овозможува да се одреди нивото на диклазурил во храната за животни и премиксите. Границата на детекција е 0,1 mg / kg, граница на квантификација е 0,5 mg / kg.

2. Начело

По додавањето на внатрешен стандард, примерокот е екстрахиран со закиселен метанол. За храна за животни, количество на екстрактот се прочистува на C18 патрон за екстракција на цврста фаза. Диклазурил е елуиран од патронот со мешавина на закиселен метанол и вода. По испарувањето, остатокот се раствора во DMF / вода. За премиксите, екстрактот е испарен и остатокот се раствора во DMF / вода. Содржината на диклазурил се определува со триградиентна обратна фаза на високо-перформансна течна хроматографија (HPLC) со користење на УВ детектор.

3. Реагенси

3.1. Вода, со еквивалентна HPLC чистина

3.2. Амониум ацетат

3.3. Тетрабутиламониум водород сулфат (TBHS)

3.4. Ацетонитрил, еквивалентен на HPLC чистина

3.5. Метанол, еквивалентен на HPLC чистина

3.6. N, N-диметилформамид (DMF)

3.7. Хлороводородна киселина, ρ20 = 1,19 g / ml

3.8. Стандардна супстанција: диклазурил II-24: (+)-4-хлорофенил [2,6-дихлоро-4-(2,3,4,5-тетрахидро-3 ,5-диоксо-1, 2,4 -триазин-2-ил) фенил] ацетонитрил со гарантирана чистота, Е771

3.8.1. Диклазурил стандарден раствор, 500 μg / m l

Се мери до најблискиот 0,1 mg, 25 mg диклазурил стандардна супстанција (3.8) во 50 ml градуирана колба. Се раствора во DMF (3.6), се доаѓа до ознаката со DMF (3.6) и се меша. Се завиткува колбата со алуминиумска фолија или се употребува колба од темно стакло и се чува во фрижидер. На температура од ≤ 4 оС растворот е стабилен за 1 месец.

3.8.2. Диклазурил стандарден раствор, 50 μg / m l

Се префрла 5,00 ml на чуван стандарден раствор (3.8.1) во 50 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со DMF (3.6) и се меша. Се завиткува колбата со алуминиумска фолија или со употреба на колба од темно стакло и се чува во фрижидер. На температура од ≤ 4 оС растворот е стабилен за 1 месец.

3.9. Внатрешна стандардна супстанција: 2,6 дихлоро-α-(4-хлорофенил) -4 - (4,5 хихидро-3 ,5-диоксо-1 ,2,4-триазин-2 (3Н) -ил) α-метилбензен-ацетонитрил

3.9.1. Внатрешен стандарден раствор, 500 μгр. / m l
Се мери до најблискиот 0,1 mg 25 mg на внатрешна стандардна супстанција (3.9) во 50 ml градуирана колба. Се раствора во DMF (3.6), се доаѓа до ознаката со DMF (3.6) и се меша. Се завиткува колбата со алуминиумска фолија или со употреба на колба од темно стакло и се чува во фрижидер. На температура од ≤ 4°C растворот е стабилен за 1 месец.

3.9.2. Внатрешен стандарде раствор, 50 μгр. / m l
Се префрла 5,00 ml на внатрешниот чуван стандарден раствор (3.9.1) во 50 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со DMF (3.6) и се меша. Се завиткува колбата со алуминиумска фолија или со употреба на колба со темно стакло и се чува во фрижидер. На температура од ≤ 4°C растворот е стабилен за 1 месец.

3.9.3. Внатрешен стандарден раствор за премикси, p / 1 000 mg / ml
(p = номинална содржина на диклазурил во премикс во mg / kg)
Се мери до најблискиот 0,1 mg p/10 mg на внатрешната стандардна супстанција во 100 ml градуирана колба, се раствора во DMF (3.6) во ултразвучна бања (4.6), се доаѓа до ознаката со DMF и се меша. Се завиткува колбата со алуминиумска фолија или со употреба на колба со темно стакло и се чува во фрижидер. На температура од ≤ 4°C растворот е стабилен за 1 месец.

3.10. Калибрациски раствор, 2 μгр./ml.
Се става со пипета 2,00 ml диклазурил стандарден раствор (3.8.2) и 2,00 ml внатрешен стандарден раствор (3.9.2) во 50 ml градуирана колба. Се додава 16 ml DMF (3.6), се доаѓа до ознаката со вода и се меша. Овој раствор мора да биде подготвен свежо пред употреба.
3.11. C18 патрон за екстракција на цврста фаза, на пример, Bond Elut, големина: 1 кубик, тежина на сорбент: 100 mg.

3.12. Растворувач за екстракција: закиселен метанол.
Се става со пипета 5,0 ml хлороводородна киселина (3.7) во 1 000 ml на метанол (3,5), и се меша.

3.13. Мобилна фаза за HPLC

3.13.1. Елуент А: амониум ацетат – тетрабутиламониум водород сулфат раствор.
Се раствора 5 g амониум ацетат (3.2) и 3,4 g TBHS (3.3) во 1 000 ml вода (3.1) и се меша.

3.13.2. Елуент Б: ацетонитрил (3.4).

3.13.3.Елуент В: метанол (3,5).

4. Апаратура
4.1. Механичка маталка

4.2. Опрема за триградиент HPLC

4.2.1. Течна хроматографска колона, Хиперсил ODS, 3 μm полнеж, 100 mm x 4,6 mm, или еквивалентно

4.2.2. УВ детектор со прилагодлива променлива бранова должина или детектор со диодна матрица

4.3. Ротационен тенкослоен испарувач

4.4. Мембрана филтер, 0,45 μm

4.5. Вакуум колектор

4.6. Ултразвучна бања

5. Постапка

5.1. Општо

5.1.1. Бланко храна за животни
Ќе се анализира бланко храна за да се провери дека ниту диклазурил ниту супстанции кои пречат се присутни. Бланко храната да е слична во вид на онаа на примерокот и при анализата диклазурил или супстанции кои пречат да не се откриени.

5.1.2. Тест за обновување
Тест за обновување се врши преку анализа на бланко храна за животни која е збогатена со додавање на количина на диклазурил слична на онаа која е присутна во примерокот. Да се збогати на ниво од 1 mg / kg, се додава 0,1 ml чуван стандарден раствор (3.8.1) до 50 g на бланко храна, се меша темелно и се остава 10 мин. Мешајќи потоа неколку пати пред постапката (5.2).

Алтернативно, доколку бланко храна за животни слична во вид на онаа на примерокот не е на располагање (види 5.1.1), тест за обновување може да се врши со помош на стандарден метод на додавање. Во овој случај, примерокот кој треба да се анализира е збогатена со количина на диклазурил, слична на онаа веќе присутна во примерокот. Примерокот се анализира, заедно со незбогатен примерок и обновувањето може да се пресмета со одземање.

5.2. Екстракција

5.2.1. Храна за животни
Се мери до најблискиот 0,01 g околу 50 g на примерок. Се префрла во 500 ml конусна колба, се додава 1,00 ml внатрешен стандарден раствор (3.9.2), 200 ml растворувач за екстракција (3.12) и затворач за колбата. Се протресува смесата во маталката (4.1) во текот на ноќта. Се дозволува да се смири 10 минути. Се префрла 20 ml количество на супернатантот на соодветен стаклен сад и се разредува со 20 ml вода. Се префрла овој раствор во патрон за екстракција (3,11), и се поминува низ него со вакуум (4.5). Се мие патронот со 25 ml од мешавина на растворувач за екстракција (3.12) и вода, 65 + 35 (V + V). Се исфрлаат собраните фракции и се елуираат соединенијата со 25 ml од мешавина на растворувач за екстракција (3.12) и вода, 80 +

20 (V + V). Се испарува овој дел, само додека се постигне сувост на ротационен испарувач (4.3) на 60ºC. Се раствора остатокот во 1,0 ml DMF (3.6), се додава 1,5 ml вода (3.1) и се меша. Се филтрира преку мембрана филтер (4.4). Се продолжува со определување HPLC (5.3).

5.2.2. ПРЕМИКСИ

Се мери до најблискиот 0001 g околу 1 g на примерок. Се префрла во 500 ml конусна колба, се додава 1,00 ml внатрешен стандарден раствор (3.9.3), 200 ml растворувач за екстракција (3.12) и затворач за садот. Се протресува смесата во текот на ноќта на маталката (4.1). Се дозволува да се смири 10 минути. Се пренесува количество од 10 000 / p ml (p = номинална содржина на диклазурил во премикс во mg / kg) на супернатантот во колба со кружно дно со соодветна големина. Се испарува само да постигне сувост, под намален притисок на температура од 60ºC со помош на ротационен испарувач (4.3). Повторно се раствора остатокот во 10,0 ml DMF (3.6), се додава 15,0 ml вода (3.1) и се меша. Се продолжува со HPLC определување (5.3).

5.3. HPLC определување

5.3.1. Параметри

Треба да се следат следниве услови: Дозволено е да се користат други услови единствено доколку тие даваат еквивалентни резултати.

Колона за течна хроматографија (4.2.1)	100 mm × 4,6 mm, пакување *Hypersil ODS*, 3 µm, или еквивалентно на него	
Мобилна фаза:	Елуент А (3.13.1):	Воден раствор на амонијак ацетат и тетрабутил амонијак хидроген сулфат
	Елуент B (3.13.2):	ацетонитрил
	Елуент C (3.13.3):	метанол
Начин на проток:	– линеарен градиент – почетни услови: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) – по 10 минути протокот со градиентот во времетрраење од 30 минути до: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V) Се мие со B во времетраење од 10 минути	
Брзина на проток:	1,5-2 ml/мин.	
Инјектиран волумен:	20 µl	
Детектор на должина на бранови:	280 nm.	

Се проверува стабилноста на хроматографскиот систем, се инјектираат неколку пати со раствор за калибрација (3.10), кој содржи 2 µg/ml , додека не се постигнат постојани висини на пиковите и време на задржување.

5.3.2. Раствор за калибрација

Се инјектира 20 µl на раствор за калибрација (3.10) неколку пати и се утврдуваат средните висини на пиковите (области) на диклазурил и врвовите на внатрешниот стандард.

5.3.3. Раствор на примерокот

Се инјектира 20 µl раствор на примерокот (5.2.1 или 5.2.2) неколку пати и се утврдуваат средните висини на пиковите (области) на диклазурил и пиковите на внатрешениот стандард.

6. Пресметување на резултатите

6.1. Храна за животни

Содржината на диклазурил w (mg / kg) во примерокот е претставен со следнава формула:

$$w= \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10\ V}{m}\ [mg/kg]$$

каде што:

$h_{d,s}$ = висина на пик (област) на диклазурил во растворот на примерокот (5.2.1)

$h_{i,s}$ = висина на пик (област) на внатрешниот стандард во растворот на примерокот (5.2.1)

$h_{d,c}$ = висина на пик (област) на диклазурил во раствор за калибрација (3.10)

$h_{i,c}$ = висина на пик (област) на внатрешниот стандарден раствор за калибрација (3.10)

$c_{d,c}$ = диклазурил концентрација во раствор за калибрација во µg/ml (3,10)

m = тежина на дел за тестот во g

V = волумен на екстракт на примерокот според 5.2.1 (односно 2,5 ml)

6.2. *Премикси*

Содржината на диклазурил W (mg / kg) во примерокот е претставена со помош на следнава формула:

$$w= \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{\frac{c_{d,c} \times 0{,}02\ V \times}{p}}{m}\ [mg/kg]$$

каде што:

$h_{d,s}$ = висина на пик (област) на диклазурил во растворот на примерокот (5.2.1)

$h_{i,s}$ = висина на пик (област) на внатрешниот стандард во растворот на примерокот (5.2.1)

$h_{d,c}$ = висина на пик (област) на диклазурил во раствор за калибрација (3.10)
$h_{i,c}$ = висина на пик (област) на внатрешниот стандарден раствор за калибрација (3.10)
$c_{d,c}$ = диклазурил концентрација во раствор за калибрација во µg/ml (3,10)
m = тежина на дел за тестот во g
V = волумен на екстракт на примерокот според 5.2.1 (односно 2,5 ml)
P = номинална содржина на диклазурил во mg / kg во премикс

7. Валидација на резултатите

7.1. Идентитет

Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија, или со користење на детектор со диодна матрица со кој се споредуваат спектарот на екстрактот на примерокот (5.2.1 или 5.2.2) и растворот за калибрација (3.10).

7.1.1. Ко-хроматографија

Еден екстракт на примерокот (5.2.1 или 5.2.2) се збогатува со додавање на соодветна количина на раствор за калибрација (3.10).

Количината на додаден диклазурил треба да биде слична на износот на диклазурил пронајден во екстракт на примерокот.

Но, висината на пикот на диклазурил и на внатрешениот стандард треба да биде подобрени земајќи ги во предвид додадената количина и разредувањето на екстрактот. Ширината на пикот, на половина од својата висина, мора да биде во рамките на ± 10% од оригинална ширина на диклазурил врвот или на врвот на внатрешниот стандард на незбогатениот екстракт на примерокот.

7.1.2. Детекција со диодна матрица

Резултатите се оценуваат согласно следниве критериуми:

(а) брановата должина на максималната апсорпција на примерокот и на стандардните спектри снимени на највисоката точка на врвот на хроматограмот, треба да бидат исти во рамките на границата утврдена со моќта на откривање на системот за детекција. За детекцијата со диодна матрица, оваа вредност вообичаено се движи во рамките на ± 2 nm;

(б) меѓу 230 и 320 nm, примерокот и стандардните спектри снимени на највисокиот пик на хроматограмот, не треба да бидат различни за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% во однос на апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите највисоки вредности се присутни и кога на ненабљудувана точка девијацијата помеѓу два спектри надминува 15% од апсорпцијата на стандардниот аналит;

(в) меѓу 230 и 320 nm, спектрите на искачувањето, највисоката точка и паѓањето на врвот произведен од екстракт од примерокот не смее да се различни едни од други за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% од апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на сите набљудувани точки отстапувањето помеѓу спектарите не надминува 15% од апсорпцијата на спектарот на највисоката точка од пикот.

Ако еден од овие критериуми не е исполнет, присуството на аналитот не е потврдено.

7.2. Повторливост

Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок не смее да надминува:

- 30% во однос, на повисока вредност содржини на диклазурил од 0,5 mg /kg до 2,5 mg / kg,
- 0,75 mg / kg за содржината на диклазурил помеѓу 2,5 mg /kg и 5 mg /kg,
- 15% во однос на повисока вредност на содржината за диклазурил на повеќе од 5 mg /kg.

7.3. Обнова

За збогатените (слепи проби) примероци обновувањето треба да биде најмалку 80%.

8. Резултати од заедничка студија

Согласно спроведеното меѓулабораториско истражување, 5 примероци беа анализирани од страна на 11 лаборатории. Овие примероци составени од два премикси, еден измешан со органска матрица (О 100), а другиот со неорганска матрица (А 100). Теоретската содржина е 100 mg. диклазурил за килограм. Трите смеси за живина беа направени од 3 различни производители (NL) (L1/Z1/K1). Теоретската содржина е 1 mg. диклазурил за килограм. На лабораториите им беше наложено да се анализира секој од примероците еднаш или во два пати. (Подетални информации за оваа колаборативна студија може да се најде во весник на *AOAC International, Том 77, бр 6, 1994, стр 1359-1361*). Резултатите се дадени во следната табела.

	Примерок 1 A 100	Примерок 2 O 100	Примерок 3 L 1	Примерок 4 Z 1	Примерок 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Средна вредност	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S_r [mg/kg]	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV_r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S_R [mg/kg]	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV_R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Номинална содржина (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = број на лаборатории

n = број на еден вредности

S_r = стандардна девијација на повторливост

CV_r = коефициент на варијација на повторливост

S_R = стандардна девијација на репродуктивноста

CV_R = коефициент на варијација на репродуктивноста

9. Забелешки
Претходно треба да се докаже дека реакцијата на диклазурил е линеарна во спектрите на концентрациите кои се мерат.

Е. ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЛАСАЛОЦИД НАТРИУМ
Натриумова сол на полиетер монокарбоксилна киселина произведена од Streptomyces lasaliensis

1. Цел и предмет на уредување
Методот овозможува да се одреди нивото на ласалоцид натриум во храната за животни и премиксите. Границата на откривање е 5 mg/kg, граница на квантификација е 10 mg / kg

2. Начело
Ласалоцид натриум е екстрахиран од примерокот во закиселен метанол и утврден со обратна фаза на високо перформансна течна хроматографија (HPLC) со користење на спектрофлуометриски детектор.

3. Реагенси
3.1. Калиум дихидроген фосфат (KH2PO4).
3.2. Ортофосфорна киселина, W (w / w) = 85%.
3.3. Ортофосфорна киселина, C = 20%.
Се разредува 23,5 ml ортофосфорна киселина (3.2) до 100 ml со вода.
3.4. 6-метил-2-хептиламин (1,5 диметилетилхексиламин), w (w / w) = 99%.
3.5. Метанол, еквивалентен на HPLC чистина.
3.6. Хлороводородна киселина, густина = 1,19 g / ml.
3.7. Фосфатен пуфер раствор, C = 0,01 mol / L.
Се раствора 1,36 g на KH2PO4 (3.1) во 500 ml вода (3,11), се додава 3,5 ml ортофосфорна киселина (3.2) и 10,0 ml на 6-метил-2-хептиламин (3.4). Се подесува pH на 4,0 со ортофосфорна киселина (3,3) и се разредува со 1 000 ml вода (3,11).
3.8. Закиселен метанол.
Се префрла 5,0 ml на солна киселина (3.6) во 1 000 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со метанол (3.5) и се меша. Овој раствор мора да биде подготвен свежо пред употреба.
3.9. HPLC мобилна фаза, фосфат пуфер-метанол раствор 5 + 95 (V + V).
Се меша 5 ml на фосфатен пуфер раствор (3.7) со 95 ml на метанол (3.5).
3.10. Ласалоцид натриум стандард супстанција со гарантирана чистота, C34H53O8Na (натриум сол на полиетер монокарбоксилни киселина произведено од Streptomyces lasaliensis), E763.
3.10.1. Ласалоцид натриум чуван стандарден раствор, 500 μg / m l

Се мери до најблискиот 0,1 mg, 50 mg натриум ласалоцид (3.10) во 100 ml градуирана колба, се раствора во закиселен метанол (3.8), се доаѓа до ознаката со истиот растворувач и мешајте. Овој раствор мора да биде свежо подготвен пред употреба.
3.10.2. Ласалоцид натриум интермедијален стандарден раствор, 50 µg/ m l
Со пипета се става 10,0 ml на чуван стандарден раствор (3.10.1) во 100 ml градуирана колба, се доаѓа до ознаката со закиселен метанол (3.8) и се меша. Овој раствор мора да биде подготвени свежо пред употреба.
3.10.3. Калибрациски раствор
Во серија од 50 ml градуирани колби се префрла 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 и 10,0 ml од интермедијарниот стандарден раствор (3.10.2). Се доаѓа до ознаката со закиселен метанол (3.8) и се меша. Овие раствори одговараат на 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 и 10,0 µg.. на ласалоцид натриум по ml соодветно. Овие раствори мора да бидат подготвени свежо пред употреба.
3.11. Вода, еквивалентна на HPLC чистина.

4. Апаратура
4.1. Ултразвучна бања (или вибрациона водена бања) со контрола на температурата.
4.2. Мембрански филтри, 0,45 µm.
4.3. HPLC опрема со систем за вбризгување, погоден за инјектирање волумен од 20 µl.
4.3.1. Течна хроматографски колона 125 mm x 4 mm, обратна фаза C18, 5 µm полнеж или еквивалентно.
4.3.2. Спектрофлуорометар со прилагодлива променлива бранова должина на екситација и емисија на бранови должини.

5. Постапка
5.1. Општо
5.1.1. Бланко храна за животни
За спроведување на бланко тестот (5.1.2) се анализира бланко храна со цел да се провери дека не постои присуство ниту на ласалоцид натриум ниту на интерферентни супстанции. Бланко храната за животни е слична во вид на онаа на примерокот и не се откриени ласалоцид натриум или супстанции кои пречат.

5.1.2. Тест за обновување
Тест за обновување се врши преку анализа на бланко храна која е збогатена со додавање на количина на ласалоцид натриум, слична на онаа присутна во примерокот. Да се збогати на ниво од 100 mg / kg, се префрла 10,0 ml од чуваниот стандард (3.10.1) во 250 ml конусна колба и се испарува растворот до околу 0,5 ml. Се додава 50 g на бланко храна, се меша темелно и се остава 10 минути, мешајќи повторно неколку пати пред да се продолжи со чекорот на екстракција (5.2).
Алтернативно, доколку бланко храната слична во вид на онаа на примерокот не е на располагање (види 5.1.1), тестот за обновување може да се изведе со помош на стандарден метод на додавање. Во овој случај примерокот за анализа е збогатен со количина на ласалоцид натриум слична на онаа која е веќе се присутна во

примерокот. Овој примерок се анализира заедно со незбогатениот примерок и обновувањето се пресметува со одземање.

5.2. Екстракција

5.2.1. Храна за животни

Се мери до најблискиот 0,01g, од 5 g до 10 g на примерокот во 250 ml конусна колба со затка. Се додава 100,0 ml на закиселен метанол (3.8) со пипета. Се затвора лабаво и се врти за да ги дисперзира. Се става колбата во ултразвучна бања (4.1) на околу 40ºC, 20 минути, а потоа се отстранува и лади на собна температура. Се дозволува да стои 1 час додека суспендираната материја се наталожи, потоа се филтрира едно количество преку 0,45 μm мембрана филтер (4.2) во соодветен сад. Се продолжува со определување HPLC (5.3).

5.2.2. Премикси

Се мери до најблискиот 0,001g околу 2 g несмелен премикс во 250 ml градуирана колба. Се додава 100,0 ml закиселен метанол (3,8) и се врти за да ги дисперзира. Се става колбата и содржината во ултразвучна бања (4.1) на околу 40ºC, 20 минути, а потоа се отстранува и лади на собна температура. Се разредува до ознаката со закиселен метанол (3.8) и се меша темелно. Се дозволува да стои 1 час додека суспендираните материи се наталожат, потоа се филтрира едно количество преку 0,45 μm мембрана филтер (4.2). Се разредува соодветна количина од бистриот филтрат со закиселен метанол (3.8) за да се создаде финален тест раствор кој содржи околу 4 μg/ml на ласалоцид натриум. Се продолжува со определување HPLC (5.3).

5.3. HPLC определување

5.3.1. Параметри

Следниве услови може да се следат; други услови може да се користат, под услов тие да дадат еднакви резултати:

Колона за течна хроматографија (4.3.1):	125mm x 4mm, обратна фаза C_{18}, 5μm пакување или еквивалент
Мобилна фаза (3.9):	Мешавина на раствор од фосфатен буфер (3.7) и метанол (3.5), 5+95 (V+V)
Брзина на проток:	1,2 ml/мин.
Детекција на бранова должина:	
Екситација:	310 nm
Емисија:	419 nm
Волумен на инјектирање:	20 μl

Се проверува стабилноста на хроматографскиот систем, со инјектирање на раствор за калибрација (3.10.3) кој содржи 4,0 μg/ml неколку пати, додека не се постигнат постојани пикови (или области) и време на задржување.

5.3.2. Графикон на калибрација

Се инјектира од секој раствор за калибрација (3.10.3) неколку пати се одредуваат средните врв висини (области) за секоја концентрација. Се црта графикон на калибрација со користење на средните вредности на пиковите (области), како ординати и соодветните концентрации во µg/ml како апциси.

5.3.3. Раствор на примерокот

Се инјектираат екстракти на примерокот добиени во 5.2.1 или 5.2.2 неколку пати, со користење на истиот волумен како за раствор за калибрација и се одредуваат средните пикови (области) на врвовите на ласалоцид натриум

6. Пресметување на резултатите

Од средната врв височина (област) произведена со вбризгување на раствор на примерокот (5.3.3) се одредува концентрацијата на ласалоцид натриум (µg/ml) со повикување на графиконот на калибрација.

6.1. Храна за животни

Содржината на ласалоцид натриум, w (mg / kg) во примерокот е претставена со помош на следнава формула:

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

каде што:

c = концентрација на ласалоцид натриум во раствор на примерокот (5.2.1) во µg/ml

V_1 = волумен на екстракт на примерокот според 5.2.1 во ml (т.е. 100)

m = тежина на дел за тестот во g

6.2. Премикси

Содржината на ласалоцид натриум, w (mg / kg) во примерокот е дадена од страна на следнава формула:

$$w = \frac{C \times V_1 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

каде што:

c = концентрација на ласалоцид натриум во раствор на примерокот (5.2.2) во µg/ml

V_2 = волумен на екстракт од примерокот според 5.2.2 во ml (т.е. 250)

f = фактор на разредување според 5.2.2

m = тежина на дел за тестот во гр.

7. Валидација на резултатите

7.1. Идентитет

Методите врз основа на спектрофлуорометрија се помалку подложни на пречки од оние во кои се користи УВ детекција.

Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија.

7.1.1. Ко-хроматографија

Еден екстракт на примерокот (5.2.1 или 5.2.2) е збогатен со додавање на соодветна количинабна калибрациски раствор (3.10.3). Количината на додаден ласалоцид натриум мора да биде слична на износот на ласалоцид натриум пронајден во екстракт на примерокот. Само висината на врвот на ласалоцид натриум треба да биде подобрен земајќи го во предвид износот на додаден ласалоцид натриум и разредувањето на екстрактот. Ширината на врвот, на половина височина, мора да биде во рамките на ± 10% од оригиналната ширина на врвот произведено од страна на незбогатениот екстракт на примерокот.

7.2. Повторливост

Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби спроведени на ист примерок не смее да надминува:

- 15% во однос на повисока вредност за ласалоцид натриум содржини од 30 mg / kg до 100 mg / kg,
- 15 mg / kg за ласалоцид натриум содржината од 100 mg / kg до 200 mg / kg,
- 7,5% во однос на повисока вредност за ласалоцид натриум содржината на повеќе од 200 mg / kg.

7.3. Обновување

За збогатениот (бланко) примерок на храна за животни, обновувањето треба да биде најмалку 80%. За утврдените примероци на премикси, обновувањето треба да биде најмалку 90%.

8. Резултати од заедничка студија

При спроведување на меѓулаборабораториско одредување, 2 премикси (примероци 1 и 2) и 5 видови храна за животни (примероци 3-7) беа предмет на анализа од страна на 12 лаборатории. Двојни анализи се извршени на секој примерок. Резултатите се дадени во следната табела:

	Примерок 1 Премикс за кокошки	Примерок 2 Премикс за мисирки	Примерок 3 Пелети за мисирки	Примерок 4 Зрнеста храна за кокошки	Примерок 5 Храна за мисирки	Примерок 6 Храна за живина А	Примерок 7 Храна за живина В
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Средна вредност [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Номинално количество [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Содржина назначена од страна на производител.
(**) Храна за животни подготвена во лабораторија.

(*) Содржина во декларацијата од страна на производителот.
(**) храна за животни подготвена во лабораторија.
L = број на лаборатории
n = број на еден резултати
sr = стандардна девијација на повторливост
s_R = стандардна девијација на репродуктивноста
CV_r = коефициент на варијација на повторливост,%
CVR = коефициент на варијација на репродуктивноста,%.

Прилог 5

Методи за анализа за контрола на непожелни супстанции во храната за животни

А. Определување на слободен и вкупен госипол

1. Цел и предмет на уредување

Овој метод овозможува да се утврди нивото на слободен госипол, вкупното количество на госипол и хемиски поврзаните супстанции во памучно семе, брашно од памучно семе и погача од памучно семе и во крмните смеси кои ги содржат овие фуражни суровини, каде што се присутни повеќе од 20 mg/kg на слободен госипол, вкупен госипол и хемиски поврзани супстанции.

2. Начело

Госипол се екстрахира во присуство на 3-аминопропан-1-ол, или со мешавина од пропан-2-ол и хексан, за определување на слободен госипол, или со диметилформамид, за определување на вкупниот госипол.

Госиполот се претвора од анилин во госипол-дианилин, чија оптичката густина се мери во 440 Nm.

3. Реагенси

3.1. Пропан-2-ол-хексан мешавина: се мешаат 60 делови според волумен на пропан-2-ол со 40 делови по волумен на n-хексан.

3.2. Растворувач А: Во 1 литар градуирана колба се става околу 500 ml пропан-2-ол-хексан смеса (3.1), 2 ml 3 - аминопропан-1-ол, 8 ml глацијална оцетна киселина и 50 ml вода. Се добива волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1). Овој реагенс е стабилен една недела.

3.3. Растворувач Б: со пипета се става 2 ml на 3-аминопропан-1-ол и 10 ml глацијална оцетна киселина во 100 ml градуирана колба. Се лади на собна температура и се добива волумен со N, N-диметилформамид. Овој реагенс е стабилен една недела.

3.4. Анилин: Ако оптичката густина на слепата проба надминува 0022, се дестилира анилин над цинк во прав, отфрлајќи ги првите и последните 10% фракции на дестилатот. Доколку се стави во фрижидер и се чува во кафена сталена колба со затка, овој реагенс ќе стои неколку месеци.

3.5. Стандарден госипол раствор А: 27,9 mg госипол ацетат се става во 250 ml градуирана колба. Се раствора и се добива волумен со растворувач А (3.2). Со пипета се става 50 ml од овој раствор во 250 ml градуирана колба и се добива волумен со растворувач А. Госипол концентрацијата на овој раствор е 0,02 mg / ml. Пред употребата треба да се остави да стои еден час на собна температура.

3.6. Стандарден госипол раствор Б: 27,9 mg госипол ацетат се става во 50 ml градуирана колба, Се раствора и треба да се добие волумен со растворувач Б (3.3). Концентрацијата на госипол на овој раствор е 0,5 mg / ml.
Стандардните госипол раствори А и Б ќе останат стабилни во период од 24 часа, доколку се заштитени од светлина.

4. Апаратура
4.1. Мешалка (барабан): приближно 35 r.p.m.
4.2. Спектрофотометар.

5. Постапка
5.1. Тест примерок
Количината на тест примерокот кој се користи зависи од претпоставената госипол содржинана примерокот. Подобро е да се работи со мал тест примерок и релативно големо количество на филтратот, со цел да се добие доволно госипол за да се овозможи прецизно фотометриско мерење. За определување на слободен госипол во памучно семе, брашно од памучно семе и погача од памучно семе, тест примерокот не смее да надминува 1 g; за крмни смеси, тоа може да биде 5 g. 10 ml количество дел на филтратот е погоден во повеќето случаи, кој треба да содржи 5-10 mg на госипол. За определување на вкупниот госипол, тест примерок треба да биде помеѓу 0,5 и 5 g, така што 2 ml количество на филтратот ќе содржи 4-200 μg на госипол. Анализата се врши на собна температура од околу 20ºC.

5.2. Одредување на слободен госипол
Се става тест примерокот во шлифувана 250 ml колба, дното од садот да е покриено со искршено стакло. Со користење на пипета, се додава 50 ml на растворувач А (3.2), се затвора садот и се меша еден час во миксер. Се филтрира преку сув филтер и се собира филтратот во една мала шлифувана колба. Во текот на филтрацијата, се покрива инката со саатно стакло.

Се зема со пипета идентични количества делови на филтратот кои содржат 5-100 μg. На госипол во секој од двата 25 ml градуирани колби (А и Б). Доколку е потребно, се доаѓа до 10 ml со растворувач А (3.2). Потоа се доведува содржината на колбата (А) до волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1). Овој раствор ќе се користи како референтен раствор врз основа на кој ќе се мери растворот на слепата проба.

Со пипета се става 10 ml растворувач А (3.2) во секоја од двете други 25 ml градуирана колби (В и Г). Се доведува содржината на колбата (С) до волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1). Овој раствор ќе се користи како референтен раствор врз основа на кој ќе се мери растворот на слепата проба.

2 ml анилин се додава (3.4) во секоја од колбите (Г) и (Б). Се загрева 30 минути над врела водена бања за да се развие боја. Се лади до собна температура, се добива

волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1), се хомогенизира и се остава да стои еден час.

Се одредува оптичката густина на растворот за слепата проба (Г) во споредба со референтниот раствор (В), и оптичката густина на растворот на примерокот (Б) во споредба со референтниот раствор (А), во спектрофотометар на 440 nm со користење на 1 cm стаклени ќелии.

Се одзема оптичката густина на растворот од слепата проба од тоа на растворот на примерокот (= корегирана оптичка густина).

Од оваа вредност се пресметува содржината на слободниот госипол како што е наведено во точка 6.

5.3. Одредување на вкупен госипол
Тест примерок кој содржи 1-5 mg на госипол се става во 50 ml градуирана колба и се додава 10 ml растворувач Б (3.3). Во исто време, се подготвува слепа проба, ставајќи 10 ml растворувач Б (3.3) во друга 50 ml градуирана колба. Се загреваат двете колби 30 минути на врела водена бања. Се лади до собна температура и се прави содржината на секоја колба до волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1). Се хомогенизира и остава да се смири 10 до 15 минути, а потоа се филтрира и се собираат филтратите во шлифувани колби.

Со пипета се става 2 ml филтрат на примерокот во секоја од двете 25 ml градуирани колби, и 2 ml на филтратот од слепата проба во секоја од двете други 25 ml колби. Се доведува содржината на една од колбите од секоја серија до 25 ml со пропан-2-олхексан смеса (3.1). Овие раствори ќе се користат како референтни раствори.

2 ml анилин се додаваат (3.4) во секоја од другите две колби. Се загрева 30 минути над врела водена бања за да се развие бојата. Се лади до собна температура, се доаѓа до 25 ml со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1), се хомогенизира и остава да стои еден час.
Се одредува оптичката густина како што е наведено во 5.2 за слободен госипол. Од оваа вредност се пресметува вкупната содржина на госипол како што е наведено во 6.

6. Пресметување на резултатите
Резултати може да се пресметаат или од специфичната оптичката густина (6.1), или со повикување на калибрационата крива (6.2).

6.1. Од специфичната оптичка густина
Специфичните оптички густини, под опишаните условите, се следниве:

Слободен госипол: $E \frac{1\%}{1\,cm} = 625$

Вкупно госипол: $E \quad 1\% \quad = 600$

Содржината на слободен или вкупен госипол на примерокот се пресметува со помош на следнава формула:

$$\% \text{ госипол: } \frac{E \times 1\,250}{E^{1\%}_{1cm} \times p \times a}$$

каде што:
E = корегирана оптичка густина, определена како што е наведено во 5.2,
p = тест примерок во g,
a= еднаков дел на филтратот во ml

6.2. Од калибрациона крива

6.2.1. Слободен госипол
Се подготвуваат 2 серии од пет 25 ml градуирана колби. Со пипета се пренесуваат еднакви делови од 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 ml на стандарден госипол раствор А (3.5) во секоја серија на колби. Се доаѓа до волумен со 10 ml растворувач А (3.2). Се дополнува секоја серија со 25 ml градуирана колба која содржи само 10 ml растворувач А (3.2) (слепа проба).

Се прилагодува волуменот на колбите во првата серија (вклучувајќи ја и колбата за слепата проба) до 25 ml со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1) (референтни серии).

Се додава 2 ml анилин (3.4) за секоја колба во втората серија (вклучувајќи ја и колбата за слепата проба). Се загрева 30 минути на врела вода бања за да се развие боја. Се лади до собна температура, се доаѓа до волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1), се хомогенизира и остава да стои еден час (стандардни серии).

Се одредува како што е наведено во 5.2 оптичката густина на раствори во стандарна серија во споредба со соодветни раствори во референтната серија. Се црта калибрациона крива со забележување на оптичките густина наспроти количините на госипол (во µg).

6.2.2. Вкупен госипол
Се подготвуваат шест 50 ml градуирани колби. Во првата колба се става 10 ml растворувач Б (3.3), а во другите 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 ml на стандарден госипол раствор Б (3.6), соодветно. Се прави содржината на секоја колба до 10 ml со растворувач Б (3.3). Се загрева 30 минути над врела водена бања. Се лади до собна температура, се прави волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1) и се хомогенизира.

Се става 2,0 ml на овие раствори во секоја од двете серии на шест 25 ml градуирана колби. Се прави содржината на колбите во првата серија до 25 ml со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1) (референтна серија).

Се додава 2 ml анилин (3.4) за секоја колба во втората серија. Се загрева 30 минути над врела водена бања. Се лади до собна температура, се прави волумен со пропан-2-ол-хексан смеса (3.1), се хомогенизира и остава да стои еден час (стандардна серија).

Се одредува како што е наведено во 5.2 оптичката густина на растворите во стандардната серија во споредба со соодветните раствори во референтната серија. Се црта калибрациона крива со забележување на оптичките густини наспроти количините на госипол (во µg)

6.3. Повторливост
Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби спроведени на ист примерок не смее да надминува:

- 15%, во релативна вредност на повисоко ниво, за госипол содржината на помалку од 500 ppm,
- 75 ppm, во апсолутна вредност, за содржината на не помалку од 500 ppm и не повеќе од 750 ppm,
- 10%, во релативна вредност на повисока вредност, за содржината на повеќе од 750 ppm.

(Б) Определување на нивоата на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини

I. Методи за земање примероци и толкување на аналитичките резултати

1. Цел и предмет на уредување
Примероците наменети за официјална контрола на нивото на диоксини (полихлорирани дибензо-п-диоксини (PCDD) и полихлорирани дибензофурани (PCDF)) и полихлорирани бифенили слични на диоксини (PCB) во храната за живони, ќе бидат земени во согласност со одредбите од Прилог 1 на овој правилник. Квантитативни барања во однос на контролата на супстанциите или производите рамномерно распределени храната за животни како што е предвидено во точка 5.А. на Прилог 1 мора да се применуваат.

Збирните примероци добиени на тој начин ќе се сметаат за репрезентативни за пратките или под-пратките од кои се земени. Усогласеноста со максималните нивоа утврдени во Правилник за листа на непожелни супстанции во храната за животни и максимално дозволено ниво како и критични точки за спроведување на истражување за идентификација на изворот и причините за пречекорување на максимално дозволеното ниво се утврдува врз основа на нивоа утврдени во лабораториски примероци.

2. Усогласеност на серијата или под-серијата со спецификацијата
Серијата е прифатена ако аналитичкиот резултат на една анализа не го надминува соодветното максимално ниво како што е наведено во Правилник за листа на непожелни супстанции во храната за животни и максимално дозволено ниво како и критичните точки за спроведување на истражување за идентификација на изворот и

причините за пречекорување на максимално дозволеното ниво, земајќи го во предвид мерењето на несигурноста.

Серијата не е во согласност со максимално ниво како што е утврдено во Правилник за листа на непожелни супстанции во храната за животни и максимално дозволено ниво како и критичните точки за спроведување на истражување за идентификација на изворот и причините за пречекорување на максимално дозволеното ниво горната граница н аналитичкиот резултат, потврдено со потврден тест, го надминува максималното ниво над основаното сомневање земајќи го во предвид мерењето на несигурноста.

Мерењето на несигурност може да се земе во предвид според еден од следните пристапи:
- со пресметување на проширената несигурност, со користење на фактор на покриеност 2 која дава ниво на доверба од околу 95%. Серијата не е во согласност ако измерената вредност минус U е над максимално ниво. Во случај на посебна определба на диоксини и диоксиноподобни PCB сумата од проценетата проширена несигурност на посебните аналитички резултати на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини мора да се користи за збирот на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини,
- преку воспоставување на гранично одредување (CCα). Серијата не е во согласност доколку измерената вредност е еднаква или надминува CCα.

Овие правила на толкување се применуваат за аналитички резултат добиен на примерок за официјална контрола. Ова не влијае врз правото надлежниот орган да применува национални правила за анализи за одбрамбени или арбитражни цели.

II. Подготовката на примерокот и барања за методите на анализа при официјални контроли на ниво на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини

1. Цел и поле на примена

Овие барања се применуваат за фуражни суровини и храна за животни кои се анализираат за определување на диоксини (Полихлорирани дибензо-п-диоксини (PCDD) и полихлорирани дибензофурани (PCDF)) и полихлорирани бифенили слични на диоксини.

Мониторинг за присуство на диоксини во храна за животни може со стратегијата која вклучува скрининг метод со цел да се изберат оние примероци со нивоа на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини кои се помалку од 25% подолу или надминуваат ниво на интерес. Концентрацијата на диоксин во оние примероци со значителни нивоа треба да се утврди/потврди со потврден метод.

Скрининг методи се методите кои се користат за откривање на присуство на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини на ниво на интерес. Овие

методи имаат капацитет за висока продукција на примерокот и се користи за да се селектираат голем број на потенцијално позитивни примероци. Тие се специјално дизајнирани за да се избегнат лажните негативи.

Потврдни методи се методи со кои се обезбедуваат целосни или дополнителни информации со кои се овозможува диоксините и полихлорирани бифенили слични на диоксини да бидат идентификувани и квантифицирани недвосмислено на ниво на интерес.

2. Историјат

Бидејќи еколошките и биолошките примероци (вклучувајќи примероци од фуражни суровини/храна за животни) во целина содржат сложени смеси од различни диоксин конгенери, концептот на факторите на токсична еквивалентност (TEFs) е развиена да се олесни ризикот. Овие TEFs се формирани со цел да изразат концентрации на мешавини на 2,3,7,8 - супституирани PCDDs и PCDFs и некои не-орто и моно-орто хлор супституирани PCB кои поседуваат диоксиноподобна активност во токсичните еквиваленти (TEQs) на 2,3,7,8-TCDD. Концентрациите на одделни супстанции во даден примерок се множи со нивните TEF, а потоа сумирани да се добие вкупната концентрација на полихлорирани бифенили слични на диоксини соединенија изразени во TEQs.

Единствено за целите на овој правилник, прифатените специфични граници на квантификација на индивидуалнен конгенер се концентрацијата на аналитот во екстрактот на примерокот кој произведува инструментален одговор на два различни јони да се следи со S / N (сигнал / шум) соодност од 3:1 за помалку чувствителен сигнал и исполнување на основните барања, како што е на пример, времето на задржување и соодност на изотопите според постапката за определување опишана во EPA метод 1613 ревизија Б.

3. Услови за обезбедување на квалитет кои треба да се почитуваат за подготовка на примерокот

Се применуваат општите одредби за подготовка на примероци за анализа од Прилог 2 на овој правилник.

Следниве услови треба да се во согласност со нив како дополнување:

- примероците мора да се чуваат и транспортираат во стаклени, алуминиумски, полипропиленски или полиетиленски контејнери.
Траги на хартиени честици мора да се отстранат од контејнерот за примерокот. Стакелните садови мора да се исплакнат со растворувачи претходно контролирани за присуство на диоксини.
- се изведува слепа проба со спроведување на целата аналитичка постапка без примерок.
- тежината на примерокот употребена за екстракција мора да биде доволно за да ги исполни барањата во однос на чувствителноста.

4. Услови за лаборатории

- Лабораториите треба да ја покажат ефикасноста на методот во опсег на нивото на интерес, на пример, 0,5 x, 1x и 2x нивото на интерес со прифатлив коефициент на варијација за повторената анализа. За деталини критериуми за прифаќање, види точка 5.

- Лимитот на квантификација за потврдниот метод ќе биде во опсег од околу една петтина од нивото на интерес, да за се осигура дека прифатливи коефициенти на варијации се исполнети во опсег на нивото на интерес.

- Редовни слепи контроли и експерименти со збогатување, или анализа на контролни примероци (по можност, ако е достапно, со сертифициран референтен материјал) се вршат како внатрешна контрола на мерките за квалитетот.

- Успешното учество во интерлабораториските студии со кои се проценува лабораториската работа е најдобар начин да се докаже компетентност во одредени анализи. Сепак успешното учество во интерлабораториски студии за пр. почвата или примероци од отпадни води не мора да докаже компетентност, исто така, во областа на храна или примероци храна за животни, кои претставуваат пониски нивоа на контаминација. Затоа, постојаното учество во интерлабораториски студии за определување на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини во релевантната матрица на храна за животни / храна е задолжително.

- Лабораториите акредитирани од страна на признаено тело работат во согласност со ISO Водич 58 за да се обезбеди дека применуваат потврден аналитички квалитет. Лабораториите се акредитирани во согласност со ISO/IEC/17025 стандард.

5.Услови за аналитички постапки за диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини

Основни услови за прифаќање на аналитички постапки:

- **Висока чувствителност и ниски граници на детекција.** За PCDDs и PCDF, количините кои можат да се детектираат треба да се во пикограм TEQ (10-12 гр.) опсег поради екстремната токсичност на некои од овие соединенија. За PCB се знае дека се појавуваат на повисоко ниво од PCDD и PCDF. За повеќето PCB конгенери чувствителноста во нанограм (10-9 гр.) опсег е веќе доволно. Сепак, за мерење на повеќе токсични полихлорирани бифенили слични на диоксини конгенери (особено неорто супституирани конгенери), истата чувствителност мора да биде постигната и за PCDD и PCDF.

- **Висока селективност (специфичност).** Потребна е дистинкција за PCDD, PCDF и диоксиноподобни PCB од мноштво на други, ко-екстрахирани и евентуално интерферентни соединенија присутни во концентрации до неколку редови на големина повисоки од оние на аналитите од интерес. За методите на гасна хроматографија / масена спектрометрија (ГР.С / MS), потребна е диференцијација меѓу различните конгенери, како на пример меѓу токсични (на пример 17 2,3,7,8-

алкохол PCDD и PCDF и полихлорирани бифенили слични на диоксини PCB) и други конгенери. Биолошките анализи мора да овозможат да се утврдат TEQ вредностите селективно како збир на PCDD, PCDF и полихлорирани бифенили слични на диоксини PCB.

- **Висока точност (веродостојност и прецизност).** Одредувањето ќе обезбеди валидна и сигурна проценка на вистинската концентрација во примерокот. Висока точност (точност на мерење: близината на согласност помеѓу резултат на мерењето со точната или назначена вредноста на измерената величина) е потребно за да се избегне отфрлање на резултат од анализа на примерок врз основа на недоволната сигурност на проценката на TEQ. Точноста е изразена како веродостојност (разлика меѓу средната измерена вредност на аналитот во сертифициран материјал и неговата сертифицирана вредност, изразена како процент од оваа вредност) и прецизност (RSDR, во однос стандардна девијација пресметана од резултатите добиени во услови за репродуктивност).

Скрининг методите може да се состојат од биоанализи и ГР.С / MS методи; потврдните методи се гасхроматографија со висока резолуција/масена спектрометрија со висока резолуција (HRГР.С / HRMS) методи.

Следниве критериуми треба да бидат во согласност со на вкупната TEQ вредност:

	Методи на скрининг	Потврдни методи
Стапка на лажно негативни резултати	< 1 %	
Вистинитост		- 20 % to + 20 %
Прецицност RSDR	< 30 %	< 15 %

6. Специфичните услови за методите ГР.С / MS треба да се почитуваат за целите на скрининг или за потврдни цели.

- Додавање на ^{13}C-етикетирани 2,3,7,8-хлор внатрешни PCDD / F стандарди и на ^{13}C-означени внатрешни полихлорирани бифенили слични на диоксини стандарди мора да се врши на самиот почеток или почеток на аналитичкиот метод, на пример, пред екстракција со цел да се провери аналитичката постапка. Најмалку еден конгенер за секоја од тетра до окта-хлорираните хомологни групи за PCDD / F и најмалку еден конгенер за секоја од хомологните групи за полихлорирани бифенили слични на диоксини треба да се додаде (алтернативно, барем еден конгенер за секоја масена спектрометриска селектирана јонска функција на снимање која се користи за следење на PCDD / F и полихлорирани бифенили слични на диоксини). Изборот треба да биде јасен, секако во случај на потврдни методи, на користење на сите 17 ^{13}C-етикетирани 2,3,7,8-супституирани внатрешни PCDD / F стандарди и сите 12 ^{13}C-етикетирани внатрешни полихлорирани бифенили слични на диоксини стандарди.

- Фактори на релативен одговор исто така се определуваат за оние конгенери за кои не додаден ниеден 13 C-етикетиран аналог со користење на соодветни калибрациски

раствори.
- За храна за животни од растително потекло и храна за животни од животинско потекло, кои содржат помалку од 10% масти, додавање на внатрешни стандарди е задолжително пред екстракција. За храна за животни од животинско потекло која содржи повеќе од 10% масти, внатрешни стандарди може да се додадат или пред екстракција или по екстракција на мастите. Соодветна валидација на ефикасноста на екстракцијата се врши во зависност од фазата во која внатрешните стандарди се внесени и во однос на тоа дали резултатите се заведени врз основа на производ или масти.

- Пред ГР.C/MS анализа, треба да се додадат 1 или 2 обновени (сурогат) стандард(и).
- Неопходно е да се направи контрола на обновувањето. За потврдните методи, обновувањето на индивидуалните внатрешни стандарди мора да биде во опсег од 60% до 120%. Пониски или повисоки обновувања за поединечни конгенери, особено за некои хепта и окта-хлорирани дибензидиоксини и дибензофурани, се прифатливи под услов нивниот придонес во вредноста на TEQ да не надминува 10% од вкупната TEQ вредност (врз основа на збирот на PCDD / F и диоксиноподобни PCB). За скрининг методите, обновувањето мора да биде во опсег од 30% до 140%.

- Одделувањето на диоксините од интерферентните хлорирани соединенија, како што се полихлорирани бифенили слични на диоксини и хлорирани дифенил етери се врши со соодветни хроматографски техники (по можност со флорисил, алуминиумска и / или јаглена колона).

- гасхроматографско одделување на изомери ќе биде доволно (<25% врв до врв помеѓу 1,2,3,4,7,8 -HxCDF и 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

- Одредувањето се врши во согласност со EPA Метод 1613 ревизија Б: тетра-преку окта-хлорирани диоксини и фуражни со изотопско разредување HRГР.C / HRMS или друг со еквивалентен критериум на ефикасност.

- Разликата помеѓу горното ниво и пониското ниво не смее да надмине 20% за храна за животни контаминирана со диоксин во опсегот или над максималното ниво. За храната за животни со нивоа на контаминација многу под максимално ниво, разликата може да биде во опсег од 25% -40%.

7. Скрининг методи на анализа
7.1. Вовед
Различни аналитички пристапи можат да се спроведуваат со помош на скрининг методот: чист скрининг пристап и квантитативен пристап.

Скрининг пристап
Одговорот на примероците е спореден со оној на референтен примерок на ниво на интерес. Примероците со одговор помал од референтниот се сметаат за негативни, оние со повисок одговор за позитивни. Услови:

- Бланко и референтен примерок (примероци) треба да бидат вклучени во секоја тест серија, кој е екстрахиран и тестиран истовремено под исти услови. Референтниот примерок мора да покаже јасно покачен одговор во споредба со бланко примерокот.
- Дополнителни референтни примероци од 0,5 x и 2x ниво на интерес ќе бидат вклучени за да се демонстрира соодветната ефикасност на тестот во опсегот од интерес за контрола на нивото на интерес.
- При тестирање на други матрици, соодветноста на референтните примерок (-оци) мора да биде докажано, по можност вклучувајќи примероци за кои се покажало со HRГР.C / HRMS дека содржат TEQ ниво отприлика колку тоа на референтниот примерок или друг бланко збогатен примерок на ова ниво.
- Бидејќи не се користени внатрешни стандарди во биоанализите, тестовите за повторливост се многу важни за да се добијат информации за стандардната девијација во рамките на една тест серија. Коефициентот на варијација мора да биде под 30%.
- За биоанализи, целните соединенија, можните пречки, и максималните бланко нивоа на толеранција треба да се дефинирани.

Квантитативен пристап

Квантитативниот пристап има потреба од серии на стандардно разредување, двојно или тројно чистење и мерење како и слепи проби и контроли за обновување. Резултатот може да се изрази како TEQ, а со тоа да се претпостави дека соединенијата одговорни за сигналот одговараат на принципот TEQ. Ова може да се изврши со помош на TCDD (или диоксин / фуран/ полихлорирани бифенили слични на диоксини стандардна мешавина) за да се произведе калибрациона крива да се пресмета TEQ нивото во екстрактот и на тој начин и во примерокот. Ова е потоа корегирано за нивото TEQ пресметано за слепата проба (да се смета на нечистотии од користени растворувачи и хемикалии), и обновување (сметано од нивото TEQ во контрола на квалитетот на примерок околу границата на интерес). Од суштинско значење е да се напомене дека дел од очигледната загуба при обновувањето може да се должи на влијание на матрицата и / или разлики помеѓу TEF вредности во биоанализи и официјалните TEF вредностите поставени од страна на СЗО.

7.2. Услови за методи на анализа користени за скрининг

- ГР.C / MS методи на анализа и биоанализи може да се користат за скрининг. За ГР.C / MS методите, да се користат условите дадени во точка 6. За бионализи базирани на ќелии специфичните услови се дадени во точка 7.3 , а биоанализи со комплет прибор во точка 7.4.
- Податоци за бројот на лажни позитивни и лажни-негативни резултати на големо множество на примероци подолу и над максимално ниво или ниво на акција се потребни, во споредба со содржината на TEQ како што е определено со потврден метод на анализа. Висинските лажно негативни стапки мора да

бидат под 1%. Стапката на лажно позитивни примероци да е доволно ниска употреба за скрининг алатката да може вистински да се искористи.

- Позитивните резултати треба секогаш да се потврдат со потврден метод на анализа (HRГP.C / HRMS).

Покрај тоа, примероците од широк TEQ опсег се потврдуваат со HRГP.C / HRMS (околу 2% -10% од негативните примероци). Информациите за кореспонденцијата помеѓу резултатите од биоанализите и HRГP.C / HRMS резултатите треба да бидат ставени на располагање.

7.3. Специфични услови за биоанализи базирани на клетки

- При вршење на биоанализа, секој тест бара серија на референтна концентрација на TCDD или диоксин /фуран смеса (целосна крива од доза – одговор со R2> 0,95). Сепак, за скрининг, може да се користи проширена крива на ниско ниво за анализа на примероци со ниско ниво.

- TCDD референтна концентрација (околу 3 x граница на квантификација) на образец за контрола на квалитетот ќе се користи за исходот од биоанализата во текот на постојан временски период. Алтернатива може да биде релативниот одговор на референтниот примерок во споредба со TCDD калибрациската линија, бидејќи одговорот на клетките може да зависи од многу фактори.

- Листите за контрола на квалитет (QC) за секој тип на референтен материјал ќе бидат евидентирани и проверени за да се осигура дека исходот е во согласност со наведените упатства.

- Особено за квантитативни пресметки, индукцијата на разредувањето на примерокот кој се употребува мора да биде во рамките на линеарниот дел од кривата на одговорот. Примероци над линеарен дел од крива на одговорот мора да се разредат и повторно да се тестираат.

ПОради тоа, најмалку 3 или повеќе разредувања истовремено се препорачува да се тестираат.

- Процентуалната стандардна девијација не треба да биде над 15% во тројно одредување за секое разредување на примерокот и не повисока од 30% за време на три независни експерименти.

- Границата на детекција може да се постави како 3x стандардната девијација на бланко растворувач или одговорот на позадината. Друг пристап е да се примени одговор што е над позадината (индукција фактор 5x на бланко чист растворувач) пресметано од калибрационата крива на денот. Границата на квантификација може да се постави како 5 до 6x стандардната девијација на бланко растворувач или на одговорот на позадината или да се применува одговор кој е јасно над позадината (индукција фактор 10x растворувач) пресметан од калибрационата крива на тој ден.

7.4. Посебни услови за биоанализи со китови

- Треба да се обезбеди дека биоанализите со китови имаат доволно чувствителност и сигурност за да се применат на храна за животни.
- При подготовка на примерокот и спроведување на анализите треба да се следат упатствата на производителот.
- Тест китовите не треба да се користат по истекот на нивниот датум на употреба.
- Не смеат да се користат материјали или компоненти наменети за употреба со други китови.
- Тест китовите се чуваат во рамките на одредните температурни граници на чување и се користат при утврдената температура за работа.
- Границата на детекција на имуноанализите се утврдува како збир на средната вредност и 3x стандардната девијација, врз основа на 10 повторени анализи на слепа проба, да бидат поделени од вредноста на наклонот во равенката за линеарна регресија.
- Референтни стандарди треба да се користат за испитување во лабораторијата да се осигура дека одговорите кон стандардот се во рамките на еден прифатлив опсег.

8. Известување за резултатите

Во рамките на можностите на аналитичката постапка, аналитичките резултати треба да ги содржат нивоата на индивидуални PCDD/F и PCB конгенери и аналитичките резултати треба да бидат пренесени како ниски, високи и средни со цел да се вклучат максимум на информации во известувањето за резултатите и со тоа да се овозможи толкување на резултатите според специфичните услови.

Извештајот, исто така, треба да ја вклучува и содржината на липиди на примерокот и методот што се користи за екстракција на липидите.

Обновувањата на индивидуалните внатрешни стандарди мора да бидат достапни во случај обновувањата да се надвор од опсегот наведен во точка 6, во случај да максималното ниво е надминато и во други случаи по барање.

Бидејќи несигурноста на мерењето е земена во предвид при одлучувањето за усогласеноста на примерокот, овој параметар, исто така, ќе биде ставен на располагање. Така, аналитичките резултати како x + / - У при што x е аналитички резултат и U е проширен мерење несигурност користење на покриеност фактор од 2 која дава ниво на доверба од околу 95%. Во случај на посебна определба на диоксини и диоксин-како-ПХБ збирот на проценетата прошири несигурност на посебни аналитички резултати на диоксини и полихлорирани бифенили слични на диоксини - треба да се се користи за збирот на диоксини и диоксиноподобни PCBs.

Доколку сеземе во предвид несигурноста на мерењето со примена на CCα (како што е опишано во I.2 на овој дел Б), треба да се достави известување за овој параметар.

Прилог 6

Методи за анализа за определување на состојките од животинско потекло за целите на официјална контрола на храна за животни

Услови за микроскопско откривање, идентификација или проценка на составни делови од животинско потекло во храната за животни

1. Цел и предмет на уредување
Овие услови треба да се користат во случај кога откривањето на состојки од животинско потекло (дефинирани како производи од преработка на трупови и делови од трупови на цицачи, живина и риба) во храната за животни се врши со помош на микроскопско испитување во рамките на координираната инспекциска програма во областа на исхраната на животните во согласност со Законот за безбедност на храна. Доколку методите од овој Прилог се користат при спроведување на сите официјални тестови, вториот тест, исто така, може да се спроведе со користење на варијанта или алтернативнен метод, со цел да се подобри откривањето на одредени видови состојки од животинско потекло или подобро да се определи потеклото на состојкитее од животинско потекло. Исто така, една варијанта на протоколот може да се користи при испитување на одредени состојки од животинско потекло како што се плазма или коски во лој (види точка 9), под услов овие анализи да се прават дополнително на анализите предвидени во координирана инспекциска програма.

2. Чувствителност
Во зависност од природата на состојките од животинско потекло, многу мали количини (<0,1%) во храната за животни може да се откријат.

3. Начело
За идентификација се користи репрезентативен примерок, земен во согласност со одредбите пропишани во Прилог 1 од овој правилник, кој подлежел на соодветна подготовка. Следниов протокол е соодветен за ракување со храна за животни со ниска содржина на влага. Храната за животни со количина на влага повисока од 14% треба да се суши (кондензира) пред да се ракува со неа. Специјалната храна за животни или суровини на храната за животни (на пример, масти, масла) имаат потреба од посебен третман (види точка 9). Состојките од животинско потекло се идентификуваат врз основа на типични, микроскопски препознатливи карактеристики (односно мускулните влакна и други честички месо, 'рскавица, коски, рог, коса, влакна, крв, пердуви, лушпи од јајца, рибини коски, крлушки). Идентификација треба да да се направи и на дел од сито (6.1) и концентрираниот талог (6.2) на примерокот.

4. Реагенси

4.1. Фиксатор

4.1.1. Хлорал хидрат (воден, 60% w / v)

4.1.2. Луга (NaOH 2,5% w / v или KOH 2,5% w / v) за фракции од сито

4.1.3. Парафинско масло или глицерол (вискозитет: 68-81) за микроскопски набљудувања во талогот

4.2. Агенси за испирање

4.2.1. Алкохол, 96%

4.2.2. Ацетон

4.3. Концентратор

4.3.1. Тетрахлороетилен (густина 1,62)

4.4. Реагенси за боење

4.4.1. Раствор на јод/калиум јодид (се раствараат 2 gr. калиум јодид во 100 ml вода и се додава 1 gr. јод, при често тресење)

4.4.2. Ализарин црвен (се разредува 2,5 ml 1M хлороводородна киселина во 100 ml вода и на овој раствор се додават 200 mg. ализарин црвен)

4.4.3. Цистински реагенс (2 gr. оловен ацетат, 10 gr. NaOH/100 ml H2O)

4.4.4. Раствор на јод/калиум јодид (растворен во 70% етанол)

4.5. Реагенс за белење

4.5.1 Раствор на комерцијален натриум хипохлорид (9,6% активен хлор)

5. Опрема и прибор

5.1. Аналитичка вага (точност од 0,01 gr., освен за концентриран талог: 0,001 gr.).

5.2. Материјал за мелење (мелница или аван, особено за храна која содржи> 15% масти на анализа).

5.3. Сито со квадратна мрежа со ширина од максимум 0,50 mm.

5.4. Инка за одвојување или чаша за седиментирање со конусно дно за наталожување.

5.5. Стереомикроскоп (минимум 40 'зголемување).

5.6. Сложен микроскоп (минимум 400 "зголемување), со преносна или поларизирана светлина.

5.7. Стандардни лабораториски стаклени садови.

Сета опрема треба да биде темелно исчистена. Инките за одвојување и стаклените садови треба да се измијат во машина за миење.

Ситата треба да се исчистат со помош на четка со тврди влакна.

6. Постапка

Пелетите можат да бидат претходно просејани доколку двете фракции се анализираат како посебен примерок.

Најмалку 50 gr. од примерокот треба да се третира (се меле внимателно со помош на соодветна опрема за мелење 5.2) доколку е неопходно со цел да се постигне соодветна структура). Два репрезентативни дела се земаат од измелениот материјал, еден за сито (најмалку 5 gr.) (6.1) и еден за концентрираниот талог (најмалку 5 гр.) (6,2).

За целите на идентификацијата дополнително може да се примени и боење со реагенси за боење (6.3).

Со цел да се укаже на природата на протеините од животинско потекло и потеклото на честичките, може да се користи систем за поддршка во одлучувањето како ARIES, и референтните примероци може да се документираат.

6.1. Идентификација на состојки од животинско потекло во фракции од сито

Најмалку 5 gr. од примерокот е сее низ сито (5.3) во две фракции

Фракцијата(иите) од сито со големи честички (или репрезентативен дел од фракцијата) се става како тенок слој на соодветна основа и систематски се набљудува под стереомикроскоп (5.5) со различни степени на зголемување за состојките од животинско потекло.

Слајдовите направени со фракцијата(иите) со мали честички треба систематски да се гледаат под сложениот микроскоп (5.6) со различни степени на зголемување за состојки од животинско потекло.

6.2. Идентификација на состојки од животинско потекло од концентриран талог

Најмалку 5 gr. (со точност до 0,01 gr.) од примерокот се пренесува во инка за одвојување или чаша со конусно дно и се третира со најмалку 50 ml тетрахлоретилен (4.3.1). Смесата треба постојано да се протресува или меша.

- Доколку се користи затворена инка за одвојување, талогот треба да се остави да стои доволно време (најмалку 3 минути) пред да се одвои. Протресувањето треба да се повтори и седиментот да се остави да стои повторно во времетраење од најмалку 3 минути. Талогот повторно треба да се одвои.

- Доколку се користи отворена чаша, седиментот треба да отстои најмалку 5 минути пред да се одвои талогот.

Целиот талог треба да се исуши, а потоа да се измери (со точност до 0,001 gr.). Во случај доколку е потребно да се направи проценка, потребно е да се направи мерење. Доколку талогот се состои од многу големи честички, истиот може да се просее низ

сито (5.3) во две фракции. Исушениот талог се испитува за состојки од коски со помош на стереомикроскоп (5.5) и сложен микроскоп (5.6).

6.3. Употреба на фиксатори и реагенси за боење.

Микроскопската идентификација на состојките од животинско потекло може да биде поддржана со употреба на посебни фиксатори и реагенси за боење.

Хлорал хидрат (4.1.1): со помош на внимателно загревање, клеткочните структури може да се видат појасно бидејќи зрната скроб желатинираат и се отстрануваат несаканите клеточни содржини.

Луга (4.1.2): или натриум хидроксид или калиум хидроксид ги расчистува состојките на храната за животни, помагајќи да се откријат на мускулните влакна, влакна и други кератински структури.

Парафинско масло и глицерол (4.1.3): коскените состојки може добро да се идентификуваат со фиксатор бидејќи повеќето празнини се полнат со воздух и наликуваат на црни дупки околу 5-15 µm.

Раствор на јод/калиум јодид (4.4.1): Се користи за откривање на скроб (сино-виолетова боја) и протеини (жолто-портокалова боја). Доколку е потребно, растворите може да се разредат ако е потребно.

Ализарин црвен раствор (4.4.2): црвена/розева обоеност на коските, рибините коски и крлушките. Пред сушењето на талогот (види дел 6.2), вкупниот талог се пренесува во стакелена епрувета и се плакне двапати со околу 5 ml алкохол (4.2.1) (секој пат треба да се користи вортекс, растворувач треба да се остави да стои една минута и потоа се истура). Пред да се користи овој реагенс за боење, седиментот треба да се избели со додавање на најмалку 1 ml натриум хипохлорит раствор (4.5.1). Реакцијата треба да се остави да продолжи во времетраење од 10 минути. Епруветата се полни со вода, талогот треба да се остави 2-3 минути се смири, а водата и суспендираните честички треба да се истурат надвор. Талогот треба да се исплакне уште два пати со околу 10 ml вода (треба да се користи вортекс, да се остави да се смири, и секој пат се истура вода). Се додаваат 2 до 10 или повеќе капки (во зависност од количината на остатоците) од ализарин црвен раствор. Смесата треба да се потресе и реакцијата треба да се случи по неколку секунди. Обоениот талог се плакне два пати со околу 5 ml алкохол (4.2.1) проследено со едно плакнење со ацетон (4.2.2) (секој пат треба да се користи вортекс, растворувачот треба да се остави да стои една минута и потоа да се истури). Потоа талог е подготвен за сушење.

Цистински реагенс: (4.4.3): при внимателно греење, состојките кои содржат цистин (влакна, пердуви, итн) треба да добијат црно-кафена боја.

6.4. Испитување на храна која можеби содржи рибино брашно

Најмалку еден слајд треба да се испита од тенката фракција од ситото и од тенката фракција од талогот под сложениот микроскоп (види дел 6.1 и 6.2).

Во случај кога етикетата покажува дека состојките вклучуваат рибино брашно, или ако постои сомнеж за присуство на рибино брашно или истото е откриено за време на почетното испитување, треба да се испитаат најмалку два дополнителни слајдови на тенката фракција од ситото и од тенката фракција од талогот под сложениот микроскоп.

7. Пресметка и евалуација

Надлежниот орган треба да обезбеди дека постапките опишани во оваа точка се користат при спроведување на официјални анализи со цел да се направи проценка на количината (а не само од присуството) на состојки од животинско потекло.

Пресметката може да се направи само доколку состојките од животинско потекло содржат коски.

Деловите од коски од копнените топлокрвни видови (т.е. цицачи и птици) може да се разликуваат од различни видови на коски од риба на микроскопски слајд според карактеристичните коскени празнини. Процентот на состојки од животинско потекло во материјалот од примерокот се проценува земајќи ги во предвид:

- проценетата пропорција (тежина%) од делови од коски во концентриран талог, и
- пропорцијата (тежина%) на коска во состојки од животинско потекло.

Проценката треба да се заснова на најмалку три (доколку е можно) слајдови и најмалку пет полиња по слајд. Во крмните смеси, концентрираниот седимент треба да содржи не само коски од копнени животни и делови од коски од риба, туку и други честички со голема карактеристична тежина, на пример, минерали, песок, скаменети растителни делови и слично.

7.1. Проценета вредност на процентот на коскени фрагменти

% Копнени коскени фрагменти = (S × c)/W

% Коски од риби и делови од крлушки = (S × d)/W

(S = талог тежина (mg.) c = фактор на корекција (%) за проценетиот дел на коските од копнените животински во талогот, d = фактор на корекција (%) за проценет дел на коски од риби и делови од крлушки во талогот, W = тежината на материјалот земен за примерокот за седиментација (мг.)).

7.2. Проценета вредност на состојки од животинско потекло

Пропорцијата на коски во производи од животинско потекло може да варира во голема мера. (Процентот на коските во случај на коскено брашно може да се движи од

50% -60%, а во случај на месно брашно може да се движи од 20% -30%, а во случај на брашно од рибина коска и крлушки содржината може да варира во зависност од категоријата и потеклото на рибиното брашно, обично помеѓу 10-20%).

Доколку е познат видот на брашното од животинско потекло кое е присутно во примерокот, можно е да се направи проценка на составот:

Проценета содржина на состојките на производи од животинско потекло од копнени животни (%) = (S × c)/(W × f) × 100

Проценета содржина на состојките на производи од риба (%) = (S × d)/(W × f) × 100

(S = тежина на талог (mg.) c = фактор на корекција (%) за проценет дел на состојки од коски од копнени животни во талог, d = фактор на корекција (%) за проценет дел на коски од риби и делови од крлушки во талог, f = фактор на корекција за пропорцијата на коските во испитаните состојки од животинско потекло во примерокот, W = тежината на материјалот на примерокот за седиментација (mg.)).

8. Изразување на резултат од испитувањето

Извештајот треба да содржи најмалку податоци за присуството на состојки добиени од копнени животни и од рибино брашно. Различните случаи треба да се евидентираат на следниот начин:

8.1. Во однос на присуството на состојки добиени од копнени животни:

- иако се користел микроскоп, во доставените примероци не биле пронајдени состојки кои потекнуваат од копнени животни, или
- бил користен микроскоп, и во доставените примероци се пронајдени состојки добиени од копнени животни.

8.2. Во однос на присуството на рибино брашно:

- иако се користел микроскоп, во доставените примероци не биле пронајдени состојки кои произлегувале од риба, или
- бил користен микроскоп, и во доставените примероци се пронајдени состојки добиени од риба.

Во случај да се пронајдени состојки добиени од риба или копнени животни, во извештајот за резултатот на испитувањето, ако е потребно, може дополнително да се посочи проценката за износот на откриените состојки (x%, <0,1%, 0,1-0,5%, 0,5 - 5% или> 5%), допрецизирање на видот на копнени животни, ако е можно, и на идентификувани состојки од животинско потекло (мускулни влакна, 'рскавица, коски, рог, коса, влакна, пердуви, крв, лушпи од јајца, рибини коски, крлушки).

Во случај кога се прави проценка на количината на состојки од животинско потекло, треба да се спомене и факторот на корекција f кој се користи.

Во случај кога се идентификувани коскени состојки кои потекнуваат од копнени животни, извештајот треба даа содржи дополнителна клаузула:

"Неможе да се исклучи можност дека горенаведените состојки се добиени од цицачи".

Оваа дополнителна клаузула не е потребна во случај кога деловите од коски кои потекнуваат од копнени животни се евидентирани како коски од живина или цицачи.

9. Незадолжителен протокол за анализа на маст или масло

Следниот протоколот може да се користи за анализа на масти и масло:

- Доколку маста е во цврста состојба, таа треба да се загрее, на пример во микробранова печка, се додека истата не добие течна состојба.
- Со помош на пипета, 40 ml од маста треба да се префрли од дното на примерокот во епруветата за центрифугирање.
- Треба да се центрифугира во времетраење од 10 минути со 4 000 вртежи во минута.
- Доколку маста е цврста по центрифугирањето, уште еднаш треба да се загрее во печка се додека не премине во течна состојба. Центрифугирањето треба да се повтори во времетраење од 5 минути со 4 000 вртежи во минута.
- Со помош на мала лажица или шпатула, една половина од истурените нечистотии се префрла во мали Петри садови или микроскопски слајд за микроскопска идентификација на можната содржина на состојки од животинско потекло (месо влакна, пердуви, коскени фрагменти, ...). Парафинско масло или глицерол се препорачува како фиксатор за микроскопија.
- Преостанатите нечистотии се користат за седиментација како што е опишано во точка 6.2.

Прилог 7

Метод на пресметување на енергетската вредност на храна за живина

1. Метод на пресметување и изразување на енергетската вредност

Енергетската вредност на крмните смеси за живина треба да се пресметува во согласност со формулата наведена подолу врз основа на проценките на одредени аналитички компоненти на храната за животни. Оваа вредност се изразува во мегаџули (MJ) на метаболизирачка енергија (МЕ), корегирана за азот, по килограм на смеси:

MJ / кг МЕ = 0,1551 ×% суров протеини + 0,3431 ×% сурова маст + 0,1669 ×% скроб + 0,1301 ×% вкупно шеќер (изразен како сахароза).

2. Применувана толерантност на декларираните вредности

Доколку при спроведување на официјалната инспекција се открие несовпаѓање (зголемена или намалена енергетска вредност на храна за животни) помеѓу резултатот од инспекцијата и декларираната енергетска вредност, се дозволува минимум толеранција од 0,4 MJ / кг. на МЕ.

3. Изразување на резултати

По примената на горе споменатата формула, една децимала треба да се додаде на добиениот резултат.

4. Земање примероци и методи на анализа

Земање примероци од крмните смеси и утврдувањето на содржината на аналитички компоненти наведени во методот на пресметување мора да се врши во согласност со правилата на ЕЗ за земање примероци методи и методи на анализа на официјална контрола на храна за животни, соодветно.

Треба да се применува следново:

- за утврдување на содржина на сурова маст: постапка Б од методот за определување на сурови масла и масти, утврдени во Дел Ж од Прилог 3 на овој правилник.
- за утврдување на содржина на скроб: полариметриски метод, утврден во Дел Ј на Прилог 3 на овој правилник.

Прилог 8

Методи на анализа за контрола на недозволено присуство на адитиви во храната за животни кои повеќе не се одобрени

Важна забелешка:

Со цел да се открие недозволено присуство на адитиви во храната за животни кои не се одобрени, може да се користат по чувствителни методи отколку методите кои се дадени во овој прилог.

Методите на анализи кои се наведени во овој прилог треба да се користат при потврдување на наодите.

А. Утврдување на метил бензокват

7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone

1. Предмет

Оваа метода овозможува да се одреди нивото на метил бензокват во храната за животни. Граница на осетливост на методо е 1mg/kg.

2. Општи податиоци

Метил бензокватот се екстархира од примерокот со раствор на метанолска метансулфонова киселина. Екстрактот е прочистен со дихлорметан, со хроматографија размена на јони, а потоа повторно со дихлорметан. Содржината на метил бензокват се утврдува со обратно-фазна течна хроматографија со високи перформанси (HPLC) со УВ детектор.

3. Реагенси

3.1. Дихлорметан

3.2. Метанол, еквивалентно чист за HPLC

3.3. Мобилна фаза за HPLC

Мешавина од метанол (3.2) и вода (еквивалентно чист за HPLC) 75 + 25 (v + v).
Се филтрира преку 0,22 µm филтер (4.5) од растворот се отстрануваат гасовите (на пример со ултразвук 10 минути).

3.4. Раствор на метансулфонова киселина, c = 2%
Се разредува 20,0 ml метансулфонова киселина до 1 000 ml со метанол (3.2).

3.5. Хлороводородна киселина, c = 10%
Се рствараат 100 ml хлороводородна киселина (ρ_{20} 1,18 gr/ml) до 1 000 ml со вода.

3.6. Катјонска размена во смола *Amberlite* CG-120 (Na), мрежа со големина на отвори 100 - 200

Пред употребата смолата треба да се третира. Се спојува 100 gr смола со 500 ml хлороводородна киселина (3,5) се загрева на жешка плоча се додека не почне да врие,

постојано мешајќи. Потоа треба да се олади и се отстранува киселината. Се филтрира со помош на филтер хартија под вакуум. Смолата се мие два пати со 500 ml вода и потоа со 250 ml метанол (3.2).

Смолата се плакне со дополнителни 250 ml метанол и се суши со пропуштање воздух низ филтерот. Исушената смола се чува во затворено шише.

3.7. Стандардна супстанца: чист метил бензокват (*7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone*)

3.7.1. Метил бензокват стандрден раствор за складирање, 500 μgr/ml
Се мерат 50 мг. на стандардна супстанција (3.7) со прецизност од 0,1 mg, се раствора во метансулфонова киселина (3.4) во градуирана колба од 100 ml, се дополнува до мерата за 100 ml и се се меша.

3.7.2. Метил бензокватен интермедијарен стандарден раствор, 50 μgr/ml
Се префрлаат 5,0 ml метил бензокват стандардниот раствор за складирање (3.7.1) во градуирана колба од 50 ml, се дополнува до мерата за 50 ml со метанол (3.2) и се меша.

3.7.3. Раствори за калибрирање
Се префрлаат 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 5,0 ml метил бензокватен интермедијарен стандарден раствор (3.7.2) во серија на градуирани колби од 25ml. Се дополнува до мерата од 25 ml мобилна фаза (3.3) и се меша. Овие раствори имаат концентрации од 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 μg/ml метил бензокват, соодветно. Овие раствори треба да бидат подготвени непосредно пред употребата.

4. Апаратура

4.1. Лабораториски шејкер

4.2. Ротационен тенкослоен евапоратор

4.3. Стаклена колона (250mm × 15mm) опремена со стоп копче и резервоар со капацитет од приближно 200ml.

4.4. HPLC опрема со ултравиолетов детектор со променлива бранова должина или детектор со низа на диоди

4.4.1. Течна хроматографска колона: 300mm× 4mm, C_{18}, пакување од 10μm или еквивалент

4.5. Мембрански филтри, 0,22 μm

4.6. Мембрански филтри, 0,45 μm

5. Постапка

5.1. Општо

5.1.1. Ќе се направи слепа проба на храна за животни со цел да се потврди дека нема присуство на метил бензокват ниту мешовити супстанции.

5.1.2. Тест за обновување се врши преку анализа на слепа проба на храна за животнит која е збогатена со додавање на количина на метил бензокват, слична на онаа присутна во примерокот. Да се збогати на ниво од 15 mg/kg, се додаваат 600 µl на стандарден раствор за складирање (3.7.1) на 20 g. на слепата проба на храната за животни, се меша и се чека 10 минути пред да продолжите со чекор екстракција (5.2).

Забелешка за целите на овој метод, слепата проба на храната за животни треба да биде од вид сличен на оној на примерокот и метил бензокватот не смее да биде откриен при анализата.

5.2. Екстракција

Со точност од 0,01g се мерат околу 20 g на подготвениот примерок и се префрла во 250ml конусна колба. Се додаваат 100,0 ml метансулфонова киселина (3.4) и тресете механички (4.1) 30 минути. Растворот се филтрира преку филтер-хартија при што филтратот се користи за разделувањесо постапката на течност- течност наведена во (5.3).

5.3. Течност - течност развојување
Во лабораториска инка од 500 ml која содржи 100 ml на хлороводородна киселина (3.5) се одаваат 25,0 ml од филтратот добиен со постапката од точка (5.2). Во инката се додаваат 100 ml дихлорметан (3.1) и се протрессува во време од една минута. Откако слоевите ќе се одделат се претура понискиот (дихлорметан) слој во колба со кружно дно од 500 ml. Екстракцијата со водената фаза се повторува со две дополнителни количества на дихлорметан од по 40 ml и се комбинира со првиот екстракт во колбата со кружно дно. Со ротационен евапоратор се врши евапорација на дихлорметан се додека не се исуши (4.2) во услови на намален притисок и на температура од 40ºC. Остатокот се раствора во 20 до 25 ml метанол (3.2), се затвора садот и се остава за хроматографска со размена на јонска (5.4).

5.4. Хроматографија со размена на јони

5.4.1. Подготовка на колона за размена на катјони

Чеп од стаклена волна се става на долниот крај на стаклената колона (4.3). Се пдготвува суспензија од 5,0 g. на третирана смола со катјонска размена (3.6) со 50 ml на хипохлороводна киселина (3,5) се истура во стаклената колона и оставете да се смири.
Вишокот киселина се истура само се до нивно на површината на смолата и се мие колоната со вода сè додека водата од промивањето на стане неутрални на лакмус. Се префрлат 50 ml на метанол (3.2) во колоната и се остава да се исцеди нивото на површината на смолата.

5.4.2 Хроматографија во колона
Со помош на пипета, внимателно во колоната се префрла екстрактот добиен со постапката наведена во (5.3). Се промива колбата со кружно дно со две количества од

по 5 до 10 ml метанол (3.2) при што течноста од промивањето се пренесува во колоната. Со екстрактот се полива површината на смолата и се промива колоната со 50 ml метанол, при што треба да се внимава протокот на течност да не надминува 5 ml во минута. Водата од промиањето се исфрла.
Метил бенозатот од колоната се раствара со 150 ml метансулфатна киселина (3.4) а елуентот од колоната се собира во конусна колба од 250 ml.

5.5. Течност - течност раздвојување
Префрлете го елуентот добиен со постапката наведена во (5.4.2) во лабораториска инка за раздвојување од 1l. Се промива конусната колба со 5 до 10 ml метанол (3.2) и се комбинира течноста од миењето со содржината на лабораторикста инката за раздвојување. Се додаваат 300 ml раствор на хлороводородна киселина (3.5) и 130 ml дихлорметан (3.1). Се протресува 1 минута и се остава фазите да се разделат. Понискиот слој на (дихлорметан) се префрла во колба со кружно дно од 500 ml. Естракцијта на водената фаза се повторува со две дополнителни количества на дихлорметан од по 70 ml при што екстрактот се комбинира со првиот екстракт од колбата со кружно дно.
Екстрактот на дихлорметан се евапорира до целосно испарување со ротационен испарувач (4.2) во услови на намален притисок и температура од 40ºC. Остатокот се раствора во колба со околу 5 ml на метанол (3.2) по што растворот се пренесува квантитативно во градуирана колба од 10 ml. Колба со кружно дно се промива два пати со 1-2 ml на метанол и се префрла во градуирана колба. До ознаката се додава метанол и се меша. Една доза се филтрира преку мембрана филтер (4.6). Добиениот раствор се складира за HPLC-детекција (5.6).

5.6. HPLC детекција
5.6.1. Параметри
Следниве услови се дадени како насока при шти може да се користат и други услови доколку со нив се постигнуваат еквивалентни резултати:
- Течна хроматографска колона (4.4.1),
- HPLC мобилна фаза: мешавина на метанол - вода(3.3),
- Проток: 1 до 1,5 ml/минута
- Детекција на бранова должина: 265 nm,
- Волумен на вбризгување: 20 до 50 µl.
Се проверува стабилноста на хроматографскиот систем, со неколкукратно вбризгување на раствор за калибрација (3.7.3) кој содржи 4 µg/ml, додека не се постигнат константни пикови или области и време на задржување.

5.6.2. Графикон на калибрација
Секој калибрациски раствор (3.7.3) се вбризгува неколку пати и се мерат пиковите (областите) за секоја концентрација. Графикон на калибрација се црта со користење на вредностите на средните пикови или области на калибрациските раствори како ординати и соодветните концентрации во µg/ml како апсциси.

5.6.3. Раствор на примерокот

Екстракт од примерокот (5.5.) се врбризгува неколку пати, со користење на истиот волумен кој е косистен за калибрациските раствори при што се утврдува вредноста на средниот пик (област) од пиковите на метил бензокват.

6. Пресметување на резултатите

Концентрацијата на растворот на примерокот се одредува во µg/ml, во однос на вредноста на средниот пик (област) на метил бензокват во растворот на примерокот во однос на графиконот на калибрација (5.6.2).

Содржината на метил бензокват w (mg/kg) на примерокот е даден со следнава формула:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

во која:

c = концентрација на метил бензокват во растворот на примерокот во µg/ml,

m = тежина на користената доза во тестот во грамови.

7. **Валидација на резултатите**

7.1. Идентитет

Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија, или со користење на детектор со диодна матрица со кој се споредуваат спектарот на екстрактот на примерокот и растворот за калибрација (3.6.2) кој содржи 10 µg/ml.

7.1.1. Ко-хроматографија

Еден екстракт на примерокот се збогатува со додавање на соодветна количина на раствор за калибрација (3.7.2). Количината на додаден метил бензокват мора да биде слична на проценетото колчество сума на метил бензокват пронајдена во екстрактот од примерокот.

Само највисоката вредност на метил бензокват треба да биде збогатена земајќи ги во предвид додадената количина и разредувањетото на екстрактот. Ширината на пикот на половина од својата максимална висина треба да биде приближно 10% од оригиналната ширина.

7.1.2. Детекција со диодна матрица

Резултатите се оценуваат согласно следните критериуми:

(а) брановата должина на максималната апсорпција на примерокот и на стандардните спектри снимени на врвот пикот на хроматограмот, треба да бидат исти во рамките на маргината утврдена со моќта на откривање на системот за детекција. За детекцијата со диодна матрица, ова е обично во рамките на 2 nm;

(б) меѓу 220 и 350 nm, примерокот и стандардните спектри снимени на највисокиот врв на пикот на хроматограмот, не треба да бидат различни за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% во однос на апсорпцијата.

Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на ненабљудувана точка девијацијата помеѓу два спектри надминува 15% од апсорпцијата на стандардниот аналит;

(в) меѓу 220 и 350 nm, спектрите на искачувањето, највисоката точка и паѓањето на пикот произведен од екстракт од примерокот не смее да се различни едни од други за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% од апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на сите набљудувани точки отстапувањето помеѓу спектарите не надминува 15% од апсорпцијата на спектарот на највисоката точка од врвот.

Ако еден од овие критериуми не е исполнет, присуството на аналитот не е потврдено.

7.2. Повторливост

Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок не смее да надмине 10 % во однос на повисок резултат за содржини на метил бенозокват помеѓу 4-20 mg/kg.

7.3. Обновување

За збогатен примерок земен за слепа проба, обновувањето треба да биде најмалку 90%.

8. Резултати од заеднички студија

Пет примероци беа анализирани од 10 лаборатории. Двојни анализи беа направени за секој примерок.

	Слепа проба	Брашно 1	Пелета 1	Брашно 2	Пелета 2
Средна вредност [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	-	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	-	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	-	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R [%]	-	8,90	11,10	10,10	11,50
обновување	-	92,00	93,00	92,00	89,00

ND =недетектирано

s_r = стандардна девијација на повторливост

CV_r = коефициент на варијација на повторливост (%)

s_R = стандардна девијација на повторна изводливост

CV_R= коефициент на варијација на повторна изводливост %

Б. УТВРДУВАЊЕ НА ОЛАКВИНДОКС

2-[N-2'-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxaline-N1,N4-dioxid

1. Предмет
Овој метод овозможува да се одреди нивото на олаквиндокс во храната за животни. Границата на кватификација е 5 mg/kg.

2. Општи податоци
Примерокот е добиен со раствор на вода и метанол. Содржината на олаквиндокс се определува со обратно-фазна течна хроматографија со високи перформанси (HPLC) со УВ детектор.

3. Реагенси
3.1. Метанол.

3.2. Метанол, еквивалентно чист за HPLC.

3.3. Вода, еквивалентно чиста за HPLC чистина.

3.4. Мобилна фаза за HPLC.
Вода (3.3)-метанол (3.2) мешавина, 900 100 (V + V).

3.5. Стандардна супстанција: чист олаквиндокс *2-[N-2'-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxaline-N1,N4-dioxid*, E 851.

3.5.1. Стандареден раствор на олаквиндокс складирање 250 μg/ml
Се точност од 0,1 mg се мерат 50 mg. на олаквиндокс (3.5) во градуирана колба од 200 ml и се додаваат 190 ml вода.

Потоа колбата се става да одстои 20 минути во ултразвучна бања (4.1). По третман во ултразвучната бања растворот се остана да се олади до собна температура, се додава вода до ознаката и се меша. Колбата се завиткува со алуминиумска фолија и се чува во фрижидер. Овој раствор треба да биде свежо подготвен секој месец.

3.5.2. Олаквиндокс интермедијаден стандарден раствор, 25 μg/ml
Префрлете 10,0 ml стандарден раствор за складирање (3.5.1) во градуирана колба од 100 ml, се додава до ознаката мобилна фаза (3.4) и се меша. Колбата се завиткува во алуминиумска фолија и се чува во фрижидер. Овој раствор треба да се подготвува секој ден.

3.5.3. Калибрациски раствори
Во серија во градуирани колби од 50 ml се префрлаат 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 и 20,0 ml од интермедијарниот стандарден раствор (3.5.2). Се дополнува со моблна фаза до ознаката (3.4) и се меша. Колбите се завиткуваат со алуминиумска фолија.

Овие раствори кореспондираат со 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 и 10,0 mg. на олаквиндокс во ml.

Овие раствори треба да се подготвуваат секој ден.

4. Апаратура

4.1. Ултразвучна бања

4.2. Механичка мешалка

4.3. HPLC опрема со ултравиолетов детектор со променлива бранова должина и детектор со диодна матрица

4.3.1. Течна хроматографска колона, 250 mm × 4 mm, C18, 10 µm пакување, или еквивалентно

4.4. Мембрански филтри, 0,45 µm

5. Постапка

Забелешка: Олаквиндоксот е чувствителен на светлина. Сите постапки се спроведуваат со пригушена светлина или треба да се употребат садови од темно стакло.

5.1. Општо

5.1.1. Примеороците од храна за животни земени за слепи проби се анализираат со цел да се потврди дека нема присуство на олаквиндокс ниту интерферентни супстанции.

5.1.2. Тест за обновување се врши преку анализа на слепа проба на храна за животни која е збогатена со додавање на количина на олаквиндокс, слична на онаа присутна во примерокот. Да се збогати на ниво од 50 mg/kg, се додаваат 10,0 ml од стандарден раствор за складирање (3.5.1) во конусна колба од 250 ml и се евапорира растворот до 0,5 ml. Се додаваат 50 g од примерокот на храна за животни земена за слепи проби, темелно се меша и се остава 10 минути и се меша неколку пати пред да продолжите со чекор екстракција (5.2).

Забелешка: За целите на овој метод примерокот на слепата проба од храната за животни треба да е сличен на анализираниот примерок а присуство на олаквиндокс не треба да се открие.

5.2. Екстракција

Со точност од 0,01 g се мерат околу 50 gr. на примерокт. Префрлете во конусна колба od 1 000 ml се додаваат 100 ml на метанол (3.1) и се ставете колбата 5 минути во ултразвучна бања (4.1). Се додаваат 410 ml вода и остава во ултразвучна бања уште 15 минути. Колбата се зема од ултразвучната бања, се протресува 30 минути во мешалка (4.2) и се филтрира преку преклопен филтер. 10,0 ml од филтратот се префрлаат во градуирана колба од 20 ml ,се доадава вода до ознаката и се меша. Една доза се филтрира преку мембрана филтер (4.4). (Види 9. Набљудување) и се продолжува со HPLC определување (5.3).

5.3. HPLC определување

5.3.1. Параметри:

Следниве услови се дадени како насока при шти може да се користат и други услови доколку со нив се постигнуваат еквивалентни резултати:

Аналитичка колона (4.3.1)	
Мобилна фаза (3.4):	вода (3.3)-метанол (3.2) мешавина, 900 + 100 (V + V)
Проток:	1,5-2 ml /минута
Детекција на бранова должина:	380 nm
Волумен на вбризгување:	20 µl -100 µl

Се проверува стабилноста на хроматографскиот систем, неколку пати се вбризгува раствор за калибрација (3.5.3) кој содржи 2,5 µg/ml, се додека не се достигнат константни вредности за пиковите и се постигне времето на задржување.

5.3.2. Графикон на калибрација

Од секој калибрациски раствор (3.6.2) се вбризгува неколку пати и мерат вредностите на пиковите (области) за секоја концентрација.

Графикон на калибрација се црта со користење на вредностите на средните пикови или области на калибрациски раствори како ординати и соодветните концентрации во µg/ml како апсциси.

5.3.3. Раствор на примерокот

Екстракт од примерокот (5.3.2) се вбризгува неколку пати, со користење на истиот волумен кој е користен за калибрациските раствори при што се утврдува вредноста на средниот пик на олаквиндокс.

6. Пресметување на резултатите

Од средната вредност на пикот (областа) на олаквиндокс од растворот на примерокот се одредува концентрацијата на раствор на примерокот во µg/ml во однос на графиконот на калибрација (5.3.2).

Содржината на олаквиндокс w (mg/kg.) на примерокот се пресметува со следната формула:

$$w = \frac{c x 1000}{M}$$

во која:

c = концентрација на олаквиндокс во растворот на примерокот (5.2.) во µg./ml,

m = тежина на дозата кој се користи во тестот изразена во грами (5.2.)

7. Валидација на резултати

7.1. Идентитет

Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија, или со користење на детектор со диодна матрица со кој се споредуваат спектарот на екстрактот на примерокот (5.2) и растворот за калибрација (3.5.3) кој содржи 5,0 μg/ml.

7.1.1. Ко-хроматографија

Екстракт на примерокот (5.2.) се збогатува со додавање на соодветна количество на раствор за калибрација (3.5.3). Количеството на додаден олаквиндокс треба да биде слична на количеството на олаквиндокс пронајдено во екстрактот на примерокот.

Само највисоката вредност на олаквиндокс треба да биде збогатена земајќи ги во предвид додадената количина и разредувањетото на екстрактот. Ширината на пикот на половина од својата максимална висина треба да биде приблишно ± 10% од оригиналната ширина на пикот на олаквиндокс од незбогатениот екстракт од примерокот.

7.1.2. Детекција со диодна матрица

Резултатите се оценуваат согласно следните критериуми:

(а) брановата должина на максималната апсорпција на примерокот и на стандардните спектри снимени на врвот на пикот на хроматограмот, треба да бидат исти во рамките на маргината утврдена со моќта на откривање на системот за детекција. За детекцијата со диодна матрица, ова е обично во рамките на ± 2 nm;

(б) меѓу 220 и 400 nm, примерокот и стандардните спектри снимени на највисокиот врв на пикот на хроматограмот, не треба да бидат различни за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% во однос на апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на ненабљудувана точка девијацијата помеѓу два спектри надминува 15% од апсорпцијата на стандардниот аналит;

(в) меѓу 220 и 400 nm, спектрите на искачувањето, највисоката точка и паѓањето на пикот произведен од екстракт од примерокот не смее да се различни едни од други за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% од апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на сите набљудувани точки отстапувањето помеѓу спектарите не надминува 15% од апсорпцијата на спектарот на највисоката точка од врвот.

Ако еден од овие критериуми не е исполнет се смета дека присуството на аналитот не е потврдено.

7.2. Повторливост

Разликата меѓу резултатите од две паралелни определби изведени на ист примерок не смее да надмине 15% во однос на повисокиот резултат на содржини на олаквиндокс помеѓу 10 и 200 mg/kg.

7.3. Обновување
За збогатен примерок земен за слепа проба, обновувањето треба да биде најмалку 90%.

8. Резултати од заеднички студија
При спроведување на колаборативна студија во ЕУ во која беа вклучени четири примероци храна за прасиња вклучувајќи и една слепа проба од храна за животни во која беа вклучени 13 лаборатории. Добиените резултатите се презентирани во следната табела:

	Примерок 1	Примерок 2	Примерок 3	Примерок 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
среднавредност [mg/kg]	-	14,6	48,0	95,4
S_r [mg/kg]	-	0,82	2,05	6,36
S_R [mg/kg]	-	1,62	4,28	8,42
CV_r [%]	-	5,6	4,3	6,7
CV_R [%]	-	11,1	8,9	8,8
Номинална содржина [mg/kg]	-	15	50	100
обновување %	-	97,3	96,0	95,4

L = број на лаборатории
n = број на единечни вредности
S_r = стандардна девијација на повторливост
S_R = стандардна девијација на повторно изводливост
CV_r = коефициент на варијација на повторливоста (%)
CV_R = коефициент на варијација на повторна изводливост (%)

9. Забелешка
Иако методот не е потврден за храна за животни која содржи повеќе од 100 mg/kg. олаквиндокс, можно е да се добијат задоволителни резултати со земање на помали тежини на примерок и/или разредување на екстракт (5.2) да се постигне концентрација во рамките на опсег на графикон на калибрација (5.3.2).

В. УТВРДУВАЊЕ НА АМПРОЛИУМ

1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridinium shlorid hydrochloride

1. Предмет

Овој метод овозможува да се одреди нивото на ампролиум во храната за животни и премиксите. Границата на детекција е 1 mg/kg, граница на квантификација е 5 mg/kg.

2. Општи податоци

Примерокот добиен со раствор на вода и метанол. По разредување со мобилна фаза и мембранска филтрација содржината на ампролиум се определува со течна хроматографија со размена на катјони со високи перформанси (HPLC) со користење на УВ детектор.

3. Реагенси

3.1. Метанол.

3.2. Ацетонитрил, еквивалентно чист за HPLC.

3.3. Вода, еквивалентно чиста за HPLC.

3.4. Натриум дихидроген фосфат раствор, c = 0,1 mol/l.
Се раствораат 13,80 g. на натриум фосфат дихидроген монохидрат во вода (3.3) во градуирана колба од 1 000 ml и до ознаката се дополнува со вода (3.3) и се меша.

3.5. Натриум перхлорат раствор, c = 1,6 mol/l.
Се раствораат 224,74 g. на натриум перхлорат монохидрат во вода (3.3) во градуирана колба од 1000 ml и до ознаката се дополнува со вода (3.3) и се меша.

3.6. Мобилна фаза за HPLC (види забелешка 9.1).
Се меша ацетонитрил (3.2), раствор на натриум фосфат дихидроген (3,4) и раствор на натриум перхлорат (3,5), 450+450+100 (v + v + v). Пред да се користи филтерот (0,22 µm мембрана филтер (4.3)) растворот се ослободува од гасови (на пример, во ултразвучна бања (4.4) најмалку 15 минути).

3.7. Стандардна супстанција: чист ампролиум, *1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridinium shlorid hydrochloride*, Е 750 (види 9.2).

3.7.1. Ампролиум стандарден раствор за складирање, 500 µg/ml
Со точност од 0,1 mg се мерат 50 mg. на ампролиум (3.7) во градуирана колба од 100 ml, се раствараат во 80 ml метанол (3.1) и се ставаат во колбата 10 минути во ултразвучна бања (4.4). По ултразвучниот третман растворот се остава да се излади на собна температура, се додава до ознаката вода и се меша. На температура од ≤ 4°C растворот е стабилен 1 месец.

3.7.2. Ампролиум интермедијарен раствор, 50 µg/ml

Со пипета се ставаат 5,0 ml од стандардниот раствор за складирање (3.7.1) во градуирана колба 50 ml, до ознаката се додава растворувач за екстракција (3,8) и се меша. На температура од ≤ 4°C растворот е стабилен 1 месец.

3.7.3. Калибрациски раствори
Се префрлаат 0,5, 1,0 и 2,0 ml од интермедијарниот стандарден раствор (3.7.2) во серија од градуирана колби од 50 ml. До ознаката се додава мобилна фаза (3.6) и се меша. Овие раствори кореспондираат на 0,5, 1,0 и 2,0 µg. на ампролиум на ml. Овие раствори мора да бидат подготвени непосредно пред употреба.

3.8. Растворувач за екстракција.
Мешавина метанол (3.1)-вода 2 +1 (v + v).

4. Апаратура

4.1. HPLC опрема со систем за вбризгување, погоден за вбризгување на количини од 100 µl.

4.1.1. Колона за течна хроматографија 125 mm × 4 mm, размена на катјони Nucleosil 10 SA, пакување од 5 или 10 µm или еквивалентно.
4.1.2. УВ детектор со прилагодлива променлива бранова должина или детектор со диодна матрица.

4.2. Мембрана филтер, тефлонски материјал, 0,45 µm.

4.3. Мембрана филтер, 0,22 µm.

4.4. Ултразвучна бања.

4.5. Механичка маталка или магнетна мешалка.

5. Постапка

5.1. Општо

5.1.1. Храна за животни за слепа проба
За извршување на тест за обновање (5.1.2) треба да се анализира храна за животни за слепа проба за да се провери дека не се присутни ниту, ампролиум ниту интерферентни супстанции. Храната за животни од која се земаат примероци за слепа проба е од сличен вид на онаа на примерокот при што не смее да бидат откриени ампролиум или интерферентни супстанции.

5.1.2. Тест за обновување
Тест за обновување се врши преку анализа на храната за животни од која се земаат примероци за слепи проби која е збогатена со додавање на количинана ампролиум, слична на онаа присутна во примерокот. За да се збогати на ниво од 100 mg/kg, се пренесуваат 10,0 ml од стандарден раствор за складирање (3.7.1) во конусна колба од 250 ml и растворот се испарува до 0,5 ml.

Се додаваат 50 g. на храната за животни од која се земаат примероци за слепа проба, се мешаат темелно и се остават 10 минути при шо се мешаат неколку пати пред да се продолжат на чекорот на екстракција (5.2).

Алтернативно, доколку храна за животни од која се земаат примероци за слепа проба со сличен вид на онаа на примерокот не е на располагање (види 5.1.1), тестот за обновување може да се врши со помош на стандарднен метод на додавање. Во овој случај, примерокот кој треба да се анализира се збогатува со количина на амполиум слична на онаа која веќе е присутна во примерокот. Овој примерок е анализиран заедно со незбогатен примерок и обновувањето може да се пресмета со одземање.

5.2. Екстракција

5.2.1. Премикси (со содржина <1% амполиум) и храна за животни

Со точност од 0,01 g, се мерат 50-40 g на примерокот во зависност од содржината на амполиум во конусна колба од 500 ml и се додадваат 200 ml растворувач за екстракција (3,8). Колбата се става во ултразвучна бања да отстои 15 минути (4.4). Колбата се отстранува од бањата и се тресете 1 час во маталка или магнетна мешалка (4.5). Се разредува количество на екстракт со мобилна фаза (3.6) количество на 0,5-2 μg/ml на ампориум и се меша (види забелешка 9.3). 5-10 ml на овој разреден раствор се фитрира низ мембрана филтер (4.2), по што се пристапува кон постапката на HPLC детекцијата (5.3).

5.2.2. Премикси (со содржина ≥ 1% амполиум)

Со точност од 0001 g, се мерат 1-4 gr. на премикс во зависност од содржината на амполиум во конусна колба од 500 ml и се додаваат 200 ml растворувач за екстракција (3,8). Колбата се става во ултразвучна бања да отстои 15 минути (4.4). Колбата се отстранува од бања и тресете 1 час на маталка или магнетна мешалка(4.5). Се разредува количество на екстракт со мобилна фаза (3.6) до коичество од 0,5-2 μg/ml на амполиум и се меша (види забелешка 9.3). 5-10 ml на овој разреден раствор се филтрира низ филтер мембрана (4.2) по што се пристапува кон постапката на HPLC детекцијатац (5.3).

5.3. HPLC детекција

5.3.1. Параметри:

Следниве услови се дадени како насока при што може да се користат и други услови доколку со нив се постигнуваат еквивалентни резултати:

Течна хроматографска колона (4.1.1):	125 mm × 4 mm, катјонска размена Nucleosil 10 SA, пакување од 5 или 10 μm, или еквивалентно
Мобилна фаза (3.6):	Мешавина од ацетонитрил (3.2), раствор на натриум фосфат дихидроген (3,4) и раствор на натриум перхлорат (3,5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Проток:	0,7-1 ml/минута

Бранова должина на детекција: 264 nm
Волумен на вбризгување: 100 µl

Се проверува стабилноста на хроматографскиот систем, се вбризгуваат неколку пати раствор за калибрација (3.7.3) кој содржи 1,0 µg/ml, додека не се постигнат постојани пикови и време на задржување.

5.3.2. Графикон на калибрација
Секој калибрациски раствор (3.7.3) се вбризгува неколку пати и се мерат пиковите (областите) за секоја концентрација. Графикон на калибрација се црта со користење на вредностите на средните пикови или области на калибрациските раствори како ординати и соодветните концентрации во µg/ml како апциси.

5.3.3. Раствор на примерокот
Екстракт од примерокот (5.2) се вбризгува неколку пати, со користење на истиот волумен кој е користен за калибрациските раствори при што се утврдува вредноста на средниот пик (област) од пиковите на амполиум.

6. Пресметување на резултатите
Концентрацијата на растворот на примерокот се одредува во µg/ml, во однос на вредноста на средниот пик на ампролиум во растворот на примерокот во однос на графиконот на калибрација (5.3.2).
Содржината на ампролиум w (mg/kg.) на примерокот се пресметува со следната формула:

$$w= \frac{V x c x f}{M} \; [mg/kg]$$

во која:
V = волумен на растворувачот за екстракција (3.8) во ml според 5.2 (т.е. 200 ml)
c = концентрација на ампролиум во растворот на примерокот (5.2.) во µg./ml,
f = фактор на разредување според 5.2
m = тежина на делот за тестот во грами

7. Валидизација на резултати
7.1. Идентитет
Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија, или со користење на детектор со диодна матрица со кој се споредуваат спектарот на екстрактот на примерокот (5.2) и растворот за калибрација (3.7.3) кој содржи 2,0 µg/ml.

7.1.1. Ко-хроматографија
Еден екстракт на примерокот (5.2.) се збогатува со додавање на соодветна количина на раствор за калибрација (3.7.3). Количината на додаден ампролиум мора да биде слична на проценетото колчество на ампролиум пронајдена во екстрактот од примерокот.

Само највисоката вредност на амптолиум пиковите треба да биде збогатена земајќи ги во предвид додадената количина и разредувањетото на екстрактот. Ширината на пикот, на половина од својата максимална висина, мора да биде во рамките на ± 10% од оригиналната ширина на амптолиум пикот во незбогатениот екстракт од примерокот.

7.1.2. Детекција со диодна матрица

Резултатите се оценуваат согласно следните критериуми:

(а) брановата должина на максималната апсорпција на примерокот и на стандардните спектри снимени на врвот на пикот на хроматограмот, треба да бидат исти во рамките на маргината утврдена со моќта на откривање на системот за детекција. За детекцијата со диодна матрица, ова е обично во рамките на ± 2 nm;

(б) меѓу 210 и 320 nm, примерокот и стандардните спектри снимени на највисокиот врв пикот на хроматограмот, не треба да бидат различни за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% во однос на апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на ненабљудувана точка девијацијата помеѓу два спектри надминува 15% од апсорпцијата на стандардниот аналит;

(в) меѓу 210 и 320 nm, спектрите на искачувањето, највисоката точка и паѓањето на пикот произведен од екстракт од примерокот не смее да се различни едни од други за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% од апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на сите набљудувани точки отстапувањето помеѓу спектарите не надминува 15% од апсорпцијата на спектарот на највисоката точка од врвот.

Ако еден од овие критериуми не е исполнет, присуството на аналитот не е потврдено.

7.2. Повторливост

Разликата меѓу резултатите од две паралелни детекции изведени на ист примерок не смее да надмине:

- 15% во однос на повисокиот резултат на содржини на амптолиум од 25 до 500 mg/kg..
- 75 mg/kg.. за содржината на амптолиум помеѓу 500 mg/kg.. и 1 000 mg/kg..
- 7,5% во однос на повисока вредност за содржина на амптолиум на повеќе од 1000 mg/kg.

7.3. Обновување

За збогатен примерок земен од храна за животни за да се направи слепа проба, обновувањето треба да биде најмалку 90%.

8. Резултати од заеднички студија

Анализирани се три видови на храна за живина (примерок 1-3), една минерална храна (примерок 4) и еден премикс (примерок 5).

Добиените резултатите се дадени во следната табелата:

	Примерок 1 (слепа проба на храна за животни)	Примерок 2	Примерок 3	Примерок 4	Примерок 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Средна вредност[mg/kg]	-	45,5	188	5 129	25 140
s_r[mg/kg]	-	2,26	3,57	178	550
CV_r[%]	-	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R[mg/kg]	-	2,95	11,8	266	760
CV_R[%]	-	6,47	6,27	5,19	3,00
Почетна состојба [mg/kg]	-	50	200	5 000	25 000

L = број на лаборатории
n = број на единечни вредности
s_r = стандардна девијација на повторливост
CV_r = коефициент на варијација на повторливос (%)
s_R = стандардна девијација на повторна изводливост
CV_R = коефициент на варијација на повторна изводливост (%)

9. Забелешки
9.1. Ако примерокот содржи тиамин, пикот на тиамин во хроматограмот се појавува непосредно пред ампролиум врвот. Со овој метод мора да бидат одделени ампролиумот и тиаминот. Ако ампролиум и тиамин не се одделени од колоната (4.1.1) користена во овој метод, се заменуваат до 50% од делот на ацетонитрил на мобилната фаза (3.6) со метанол.

9.2. Според британската фармакопеја, спектарот на растворот на ампролиум (c= 0,02 mol/l) во хлороводородна киселина (c = 0,1 mol/l) покажува максимум на 246 nm и 262 nm. Апсорпцијата изнесува 0,84 на 246 nm и 0,80 на 262 nm.

9.3. Екстрактот треба секогаш да се разреди со мобилна фаза, бидејќи во спротивно времето на задржување на ампролиум пикот може значително да се смени, поради промените во јачината на јоните.

Г. УТВРДУВАЊЕ НА КАРБАДОКС

Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate N1,N4-dioxide

1. Предмет
Овој метод овозможува да се одреди нивото на карбадокс во храната за животни, премиксите и ветеринарно-медицински препарати. Границата на детекција е 1 mg/kg. Границата на квантификација е 5 mg/kg.

2. Општи податоци

Примерокот е еквилибриран со вода и екстрахиран со метанол-ацетонитрил. За храна за животни, доза од филтрираниот екстракт се подложува на чистење со алуминиум оксид колона. За премиксите и ветеринарно-медицински препаратите доза на филтрираниот екстракт се разредува до соодветна концентрација со вода, метанол и ацетонитрил . Содржината на карбадокс се определува обратно-фазна течна хроматографија со високи перформанси (HPLC) со користење на УВ детектор.

3. Реагенси

3.1. Метанол.

3.2. Ацетонитрил , еквивалентно чист за HPLC,

3.3. Оцетна киселина, w = 100%.

3.4. Алуминиум оксид: неутрален, со активност I.

3.5. Метанол-ацетонитрил 1 + 1 (v + v).
Се мешаат 500 ml метанол (3.1) и 500 ml ацетонитрил (3.2).

3.6. Оцетна киселина, σ = 10%.
Се добива со разредување на 10 ml раствор на оцетна киселина (3.3) со вода до 100 ml.

3.7. Натриум ацетат.

3.8. Вода, еквивалентно чиста заHPLC.

3.9. Пуферен раствор на ацетат, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.
Се добива со растворање на 0,82 g. на натриум ацетат (3.7) во 700 ml вода (3.8) и се прилагодува pH на 6,0 со оцетна киселина (3.6), се префрла во градуирана колба од 1000 ml, се додава до ознаката вода (3.8) и се меша.

3.10. Мобилна фаза за HPLC.
Се мешаат 825 ml пуферен раствор на ацетат (3,9) со 175 ml ацетонитрил (3.2). Се филтрира преку филтер со 0,22 µm (4.5) и растворот се ослободува од гас (на пример со ултразвук 10 минути).

3.11. Стандардна супстанција.
Чист карбадокс: *Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate N1,N4-dioxide*, E 850.
3.11.1. Стандарден раствор на карбадокс за складирање, 100 µg./ml (види Забелешка 5. Постапка):

Со точност од 0,1 mg, се мерат 25 mg од стандард супстанција на карбадокс (3.11) во градуирана колба од 250 ml .Во метанол-ацетонитрил се раствараат (3.5) со ултразвук (4.7). По третманот растворот се остава на собна температура по што се дополнува до ознаката со метанол-ацетонитрил (3,5) и се меша. Колбата треба да се завитка со алуминиумска фолија или да се употребат садови со темно стакло и да се чува во фрижидер. На температура од ≤ 4°C растворот е стабилен 1 месец.

3.11.2. Калибрациски раствори
Се префрлат 2,0, 5,0, 10,0, а 20,0 ml од стандардниот раствор за складирање (3.11.1) во неколку калибрирани колби од 100 ml. Се додаваат 30 ml вода и се полни до ознакатасо метанол - ацетонитрил (3,5) и се меша. Колбите се завиткуваат со алуминиумска фолија. Овие раствори кореспондираат на 2,0, 5,0, 10,0 и 20,0 µg/ml на карбадокс.
Калибрацисктите раствори мора да биде свежо подготвени пред употреба. *Забелешка*: За определување на карбадокс во храна која содржи помалку од 10 mg/kg, треба да бидат подготвени калибрациските раствори со концентрација под 2,0 µg/ml.

3.12. Ме шавина на вода [метанол-ацетонитрил] (3.5), 300 + 700 (v + v).
Се мешаат 300 ml вода со 700 ml мешавина на метанол-ацетонитрил (3,5).

4. Апаратура
4.1. Лабораториска маталка или магнетна мешалка.

4.2. Филтер-хартија со стаклени влакна (Whatman GF/A или еквивалент).

4.3. Стаклена колона (должина од 300 до 400 mm, со внатрешен дијаметар од околу 10 mm) со синтрирана стаклена преграда и вентил за одвод.

Забелешка: стаклена колона со чеп или стаклена колона со стеснат крај, исто така, може да се користи; во овој случај, стаклената волна се вметнува во долниот крај и се набива со стаклено стапче.

4.4. HPLC опрема со систем за вбризгување, погоден за вбризгување на волумени од 20 µl.

4.4.1. Течна хроматографска колона: 300 mm x 4 mm, C18, 10 µm пакување или еквивалентно.

4.4.2. УВ детектор со прилагодлива и променлива бранова должина или детектор со диодна матрица кој работи во опсегот од 225-400nm.

4.5. Филтер мембрана, 0,22 µm.

4.6. Филтер мембрана, 0,45 µm.

4.7. Ултразвучна бања.

5. Постапка
Забелешка: Карбадокс е чувствителен на светло. Сите постапки треба да се изведуваат под придушена светлина или се употребуваат садови со темно стакло или садови завиткани во алуминиумска фолија.

5.1. Општо
5.1.1. Храна за животни за слепа проба
За извршување на тест за обновување (5.1.2) треба да се анализира храната за животни за слепа проба за да се провери дека нес е присутни ниту карбадокс ниту

интерферентни супстанции. Храната за животни од кои се земаат примероци за слепа проба е од сличен вид на онаа на примерокот при што не смее да бидат откриени карбадокс или интерферентни супстанции.

5.1.2. Тест за обновување
Тест за обновување се врши преку анализа на храната за животни од кои се земаат примероци за слепа проба (5.1.1) која е збогатена со додавање на количина на карбадокс, слична на онаа присутна во примерокот. За да се збогати на ниво од 50 mg/kg, се пренесуваат 5,0 ml од стандардниот раствор за складирање (3.11.1) во конусна колба од 200 ml и растворот се испарува до 0,5 ml под проток на азот. Се додаваат 10 g. од храната за животни од кои се земаат примероци за слепа проба, se мешаат и се оставаат 10 минути при што се мешааат неколку пати пред да се продолжат на чекорот на екстракција (5.2).
Алтернативно, доколку храна за животни од кои се земаат примероци за слепа проба со сличен вид на онаа на примерокот не е на располагање (види 5.1.1), тестот за обновување може да се врши со помош на стандарднен метод на додавање. Во овој случај, примерокот кој треба да се анализира се збогатувасо количина на карбадокс слична на онаа која веќе е присутна во примерокот. Овој примерок е анализиран заедно со незбогатен примерок и обновувањето може да се пресмета со одземање.

5.2. Екстракција
5.2.1. Храна за животни
Со точност од 0,01 g, се мерат 10 g. на примерокот и префрлете во конусна колба од 200 ml. Се додаваат 15,0 ml вода, се меша, и изедначува 5 минути. Се додаваат 35,0 ml на метанол-ацетонитрил (3,5), колбата се затвора и тресете 30 минути на маталка или се меша на магнетна мешалка (4.1). Растворот се филтрира преку филтер хартија со стаклени влакна (4.2). Подготвениот раствор се користи за чекорот на прочистување (5.3).

5.2.2. Премикси (0,1%-2,0%)
Со точност од 0,001 g, се мери 1 g на несомелен примерок кој се префрла во конусна колба од 200 ml. Се додаваат 15,0 ml вода, се меша, и се изедначува 5 минути. Се додаваат 35,0 ml на метанол-ацетонитрил (3.5), колбата се затвора и тресете 30 минути во маталка или магнетна мешалка (4.1). Растворот се филтрира со помош на филтер хартија со стаклени влакна (4.2).

Со пипета се зема доза на филтрат и се префрла во калибрирана колба од50 ml. Се додаваат 15,0 ml вода, се дополнува до ознаката со метанол-ацетонитрил (3.5) и се меша. Концентрацијата на карбадокс во конечниот раствор треба да биде околу 10 μg/ml . Еден доза се филтрира преку филтер од 0,45 μm (4.6) по што се пристапува кон постапката на HPLC детекција (5.4).

5.2.3. Подготовки (> 2%)
Со точност од 0001 g, се мерат 0,2 g. на несомелен примерок и се префрла во конусна колба од 250 ml. Се додаваат 45,0 ml на вода, се мешат да се изедначи 5 минути Се

додаваат 105,0 ml на метанол-ацетонитрил (3.5), колбата се затвора и хомогенизира Примерокот се хогенизира со ултразвук (4.7) 15 минути По што се тресење или мешање 15 минути (4.1). Растворот се филтрира преку филтер хартија со стаклени влакна (4.2).

Доза од филтрат се разредува со мешавина од вода и метанол-ацетонитрил (3.12) до крајната концентрација на карбадокс од 10-15 μg/ml (за 10% подготовка, фактор на разредување е 10). Еден доза се филтрира преку филтер од 0,45 μm (4.6) пошто се пристапува кон постапката на HPLC детекција (5.4).

5.3. Прочистување

5.3.1. Подготовка на колона со алуминиум оксид

Се мерат 4 g. на алуминиум оксид (3.4) и се префрлат во стаклена колона (4.3).

5.3.2. Прочистување на примерокот

15 ml од филтрираниот екстракт (5.2.1) се ставаат во колоната со алуминиум оксид по што се исфрлаат првите 2 ml елуат. Следните 5 ml се собераат и една доза се филтерира преку филтер од 0,45 μm (4.6) по шо се пристапува кон постапката на HPLC детекција (5.4).

5.4. HPLC детекција

5.4.1. Параметри

Следниве услови се дадени како насока при што може да се користат и други услови доколку со нив се постигнуваат еквивалентни резултати:

Течна хроматографска колона (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C18, 10 μm пакување или еквивалентно
Мобилна фаза (3.10):	Мешавина од пуферски раствор на ацетат (3,9) и ацетонитрил (3.2), 825 + 175 (v + v)
Проток:	1,5-2 ml/минута
Бранова должина на детекција:	365 nm
Волумен на вбризгување:	20 μl

Се проверува стабилноста на хроматографскиот систем, се вбризгуваат неколку пати калибрациски раствор (3.11.2) кој содржи 5,0 mg/ml, додека не се постигнат постојани пикови (области) и време на задржување.

5.4.2. Графикон на калибрација

Секој калибрациски раствор (3.11.2) се вбризгува неколку пати и се мерат пиковите (областите) за секоја концентрација. Графикон на калибрација се црта со користење на вредностите на средните пикови или области на калибрациските раствори како ординати и соодветните концентрации во μg/ml како апциси.

5.4.3. Раствор на примерокот

Естракт од примерокот (5.3.2) за храна за животни (5.2.2.) за премикси и (5.2.3.) за подготовки се вбризгува неколку пати при што се утврдува вредноста на средниот пик (област) од пиковите на карбадокс.

6. Пресметување на резултатите

Концентрацијата на растворот на примерокот се одредува во µg/ml, во однос на вредноста на средниот пик (област) на карбадокс во растворот на примерокот во однос на графиконот на калибрација (5.4.2).

6.1 Храна за животни

Содржината на карбадокс w (mg/kg.) на примерокот се пресметува со следната формула:

$$w= \frac{C \times V_1}{m} \ [mg/kg]$$

во која:

c = концентрација на карбадокс во растворот на примерокот (5.3.2.) во µg/ml,

V1= волумен на екстракција во ml (т.е. 50)

m = тежина на делот за тестот во грами

6.2. Премикси и подготовки

Содржината на карбадокс w (мг / кг) во примерокот се пресметува со следната формула:

$$w= \frac{C \times V_2 \times f}{m} \ [mg/kg]$$

во која:

c = концентрација на карбадокс во екстракт на примерокот (5.2.2 или 5.2.3) во µg/ml

V2 = волумен на екстракција во ml (т.е. 50 за премиксите; 150 за препарати)

f = фактор на разредување според 5.2.2 (премиксите) или 5.2.3 (подготовки)

m = тежина на тестот дел во грами.

7. Валидација на резултати

7.1. Идентитет

Идентитетот на аналитот може да се потврди со ко-хроматографија, или со користење на детектор со диодна матрица со кој се споредуваат спектарот на екстрактот на примерокот (3.11.2) и растворот за калибрација (3.11.2) кој содржи 10,0 µg/ml.

7.1.1. Ко-хроматографија

Еден екстракт на примерокот се збогатува со додавање на соодветна количина на раствор за калибрација (3.11.2). Количината на додаден карбадокс мора да биде слична на проценетото количество на карбадокс пронајдена во екстрактот од примерокот.

Само највисоката вредност на карбадокс пиковите треба да биде збогатена земајќи ги во предвид додадената количина и разредувањето на екстрактот. Ширината на врвот, на половина од својата максимална висина, мора да биде во рамките на ± 10% од оригиналната ширина.

7.1.2. Детекција со диодна матрица
Резултатите се оценуваат согласно следните критериуми:

(а) брановата должина на максималната апсорпција на примерокот и на стандардните спектри снимени на врвот на пикот на хроматограмот, треба да бидат исти во рамките на маргината утврдена со моќта на откривање на системот за детекција. За детекцијата со диодна матрица, ова е обично во рамките на ± 2 nm;

(б) меѓу 225 и 400 nm, примерокот и стандардните спектри снимени на највисокиот врв на пикот на хроматограмот, не треба да бидат различни за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% во однос на апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на ненабљудувана точка девијацијата помеѓу два спектри надминува 15% од апсорпцијата на стандардниот аналит;

(в) меѓу 225 и 400 nm, спектрите на искачувањето, највисоката точка и паѓањето на пикот произведен од екстракт од примерокот не смее да се различни едни од други за оние делови на спектарот во рамките на опсег од 10% до 100% од апсорпцијата. Овој критериум е исполнет кога истите максимуми се присутни и кога на сите набљудувани точки отстапувањето помеѓу спектарите не надминува 15% од апсорпцијата на спектарот на највисоката точка од врвот.

Ако еден од овие критериуми не е исполнет, присуството на аналитот не е потврдено.

7.2. Повторливост

Разликата меѓу резултатите од две паралелни детекции изведени на ист примерок не смее да надмине 15% во однос на повисокиот резултат.

7.3. Обновување
За збогатена слепа проба од храна за животни, обновувањето треба да биде најмалку 90%.

8. Резултати од заеднички студија
Анализирани се три видови храна за животни, четири премикси и три препарати во осум лаборатории. Двојни анализи беа спроведувани на секој примерок. Резултатите (со исклучок на исклучоците) се прикажани подолу:

Табела 1
Резултати од заедничка студија за храна за животни

	Примерок 1	Примерок 2	Примерок 3	Примерок 4	Примерок 5	Примерок 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Средна вредност (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Почетна состојба (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Табела 2
Резултати од заеднички студии за премикси и ветеринарно-медицински препарати

	Премикси				Подготовки		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Средна вредност (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Почетна состојба (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = број на лаборатории
n = број на единечни вредности
S_r = стандардна девијација на повторливост
CV_r = коефициент на варијација на повторливост
S_R = стандардна девијација на повторна изводливост
CV_R = коефициент на варијација на повторна изводливост.

ОДБОР ЗА АКРЕДИТАЦИЈА И ЕВАЛУАЦИЈА

3664.

Врз основа на член 72 став 1 од Законот за високото образование („Службен весник на Република Македонија“, бр. 35/08, 103/08, 26/09, 83/09, 115/10, 17/11 и 51/11) и Глава X од Законот за научно-истражувачката дејност („Службен весник на Република Македонија“, бр. 46/08, 103/08, 24/11 и 80/12) Одборот за акредитација и евалуација донесе

П Р А В И Л Н И К
ЗА ОРГАНИЗАЦИЈАТА, РАБОТАТА, НАЧИНОТ НА ОДЛУЧУВАЊЕ, МЕТОДОЛОГИЈАТА ЗА АКРЕДИТАЦИЈА И ЕВАЛУАЦИЈА, СТАНДАРДИТЕ ЗА АКРЕДИТАЦИЈА И ЕВАЛУАЦИЈА, КАКО И ДРУГИ ПРАШАЊА ВО ВРСКА СО РАБОТАТА НА ОДБОРОТ ЗА АКРЕДИТАЦИЈА И ЕВАЛУАЦИЈА НА ВИСОКОТО ОБРАЗОВАНИЕ

I. ОСНОВНИ ОДРЕДБИ

Член 1

Со овој правилник се пропишува организацијата, работата, начинот на одлучување, методологијата за акредитација и евалуација, стандардите за акредитација и евалуација, како и други прашања во врска со работата на Одборот за акредитација и евалуација на високото образование (во натамошниот текст Одбор за акредитација и евалуација).

II. ОРГАНИЗАЦИЈА НА ОДБОРОТ ЗА АКРЕДИТАЦИЈА И ЕВАЛУАЦИЈА

Член 2

Целокупниот процес на работа на Одборот за акредитација и евалуација го организира и координира претседателот на Одборот за акредитација и евалуација кој се именува од Владата на Република Македонија од редот на членовите на Одборот.

Одборот за акредитација и евалуација од редовите на своите членови избира двајца заменици претседатели на Одборот за акредитација и евалуација.

Административно-техничките работи на Одборот за акредитација и евалуација ги врши Одделението за поддршка на работата на Одборот за акредитација и евалуација на високото образование при Министерството за образование и наука (во натамошниот текст: Одделение за поддршка).

Член 3

За спроведување на постапката за акредитација и за евалуација во рамките на своите надлежности, Одборот за акредитација и евалуација формира шест комисии составени од пет члена од соодветните научно-истражувачки подрачја според меѓународната фраскатиева класификација: 1. Природно-математички науки; 2. Техничко-технолошки науки; 3. Медицински науки и здравство; 4. Биотехнички науки; 5. Општествени науки; и 6. Хуманистички науки.

За секоја комисија од соодветното подрачје Одборот за акредитација и евалуација назначува претседател на комисијата со мандат колку што трае мандатот во Одборот за акредитација и евалуација.

Член 4

Комисиите од соодветните подрачја ги вршат следните работи: ја следат работата на стручните комисии за акредитација и за евалуација; ги разгледуваат, даваат сугестии и мислење по извештаите на стручните комисии за спроведената надворешна евалуација; ги доставуваат до Одборот за акредитација и евалуација финалните извештаи на стручните комисии за извршената надворешна евалуација; во соработка со претседателот на стручната комисија ја проверуваат и одобруваат содржината на решенијата за акредитација согласно изработените извештаи од стручните комисиии, усвоени од Одборот за акредитација и евалуација; ги назначуваат членовите на комисиите за надворешно оценување на студентите согласно со четиригодишната програма за надворешно оценување која ја донесува министерот надлежен за работите на високото образование; и вршат други работи што ќе им ги додели Одборот за акредитација и евалуација.

Член 5

За изработка на извештаите од спроведената постапка за акредитација Одборот за акредитација и евалуација формира стручни комисии составени од претседател и два до три члена од соодветните научни подрачја, во зависност од природата на барањето за акредитација.

Членовите на стручните комисии се од редот на членовите на Одборот за акредитација и евалуација, а по потреба се ангажираат и надворешни стручњаци од високообразовни и научни установи и од други институции.

Надворешните стручњаци од став 2 на овој член учествуваат во работата на Одборот за акредитација и евалуација без право на гласање.

За спроведување на надворешната евалуација на високообразовните установи Одборот за акредитација и евалуација формира комисии за надворешна евалуација на високообразовните установи (во натамошниот текст комисија за надворешна евалуација).

Составот и начинот на работење на комисиите за надворешна евалуација се уредени со членовите од 39 до 44 од овој правилник.

III. РАБОТА НА ОДБОРОТ ЗА АКРЕДИТАЦИЈА И ЕВАЛУАЦИЈА

Член 6

Одборот за акредитација и евалуација е самостоен и независен во својата работа.

Својата независност Одборот за акредитација и евалуација ја остварува преку:

- службената документација која обезбедува оперативна независност;
- автономноста и независноста при дефинирањето и спроведувањето на сопствените постапки и методи, како и при именувањето и ангажирањето на надворешни стручњаци;
- преземањето на одговорност за целосниот процес на оценка на квалитетот, во текот на кој се вршат консултации со релевантни учесници во високообразовниот процес, а особено со студенти.

Член 7

Мисијата на Одборот за акредитација и евалуација е унапредување на системот на високото образование за обезбедување на континуиран квалитет на високообразовниот процес. Таа се остварува преку двете основни активности: акредитација на високообразовните установи и студиските програми кои се реализираат во нивни рамки и преку надворешна евалуација со која се проверува квалитетот на високообразовната дејност со што се стекнува увид за исполнетоста на условите за продолжување на акредитацијата.

Член 8

Одборот за акредитација и евалуација работи на седници, кои се свикуваат по потреба, а најмалку еднаш во месецот.

Одборот за акредитација и евалуација заседава од 1 септември до 30 јуни.

Седниците на Одборот за акредитација и евалуација ги свикува претседателотна Одборот за акредитација и евалуација по сопствена иницијатива, или по иницијатива на член на Одборот за акредитација и евалуација.

Седниците на Одборот за акредитација и евалуација се свикуваат со покана, која содржи место и време на одржување на седницата и предлог на дневен ред.

Со поканата за седницата се доставува и материјалот што се предлага да биде разгледан на седницата.

Одговорно за организацијата на седниците е Одделението за поддршка.

Член 9

Поканата и материјалот за седницата до претседателот на Одборот за акредитација и евалуација се доставуваат во електронска форма, а еден примерок и во писмена форма.

Поканата и материјалот за седница до членовите на Одборот за акредитација и евалуација по правило се доставуваат во електронска форма. Прилозите кон проектите, односно елаборатите за акредитација и за евалуација се доставуваат во писмена форма.

Член 10

Седниците се свикуваат најмалку седум дена пред нивното одржување.

За итни и неодложни работи претседателот на Одборот за акредитација и евалуација може да свика седница и во пократок рок од рокот утврден во став 1 на овој член.

Член 11

Со седниците на Одборот за акредитација и евалуација, претседава претседателот на Одборот за акредитација и евалуација, а во негово отсуство заменик претседателот.

Член 12

За седниците на Одборот за акредитација и евалуација се води записник.

По одржување на седницата, изготвениот записник се доставува до членовите на Одборот за акредитација и евалуација на разгледување и прифаќање.

По забелешките на записникот се расправа на првата наредна седница на Одборот за акредитација и евалуација на која се врши и усвојување на записникот.

Записниците, извештаите од експертските комисии и донесените мислења и решенија се чуваат во архивата на Одборот за акредитација и евалуација во писмена и во електронска форма.

Член 13

Записникот содржи: означување на седницата, време и место на одржување на седницата, присутни членови и други експерти и стручни лица, податоци за усвојување на записникот од претходната седница, дневен ред на седницата, донесените одлуки, решенија, односно мислења и заклучоци, мнозинството со кое се донесени истите и друго.

Член 14

Одборот за акредитација и евалуација има веб страница на која ги објавува:

- мислењето за основање на јавна високообразовна установа, односно решенијата за акредитација на: високообразовна установа, единица на високообразовната установа, на нова односно иновирана студиска програма, извештаите и резултатите од спроведената надворешна евалуација;
- проекти кои имаат за цел стекнување на квалификации на наставно-научните работници и студентите од земјата за учество во комисиите за надворешна евалуација;
- извештаи за својата самоевалуација;
- проекти за унапредување на својата дејност и усогласување на својата работа со препораките на Европската асоцијација за обезбедување на квалитет на високото образование (во натамошниот текст: ENQA);
- други податоци релевантни за неговата работа.

Најмалку еднаш годишно Одборот за акредитација и евалуација објавува сумарен извештај за спроведените надворешни евалуации со цел да се презентира општата состојба на системот на високото обрзование во Република Македонија и да се дадат насоки за негово унапредување.

Член 15

Претседателот на Одборот за акредитација и евалуација:

- го претставува и застапува Одборот за акредитација и евалуација;
- го организира и координира целокупниот процес на работа на Одборот за акредитација и евалуација;
- ги организира и свикува седниците и претседава со нив;
- ги потпишува актите што ги донесува Одборот за акредитација и евалуација;
- остварува службена комуникација и односи со министерот за образование и наука, надлежните органи на високообразовните установи и други институции, во врска со работата на Одборот за акредитација и евалуација;
- го извршува финансискиот план на Одборот за акредитација и евалуација;
- потпишува договор со министерот за образование и наука за начинот на кој се вршат стручните и административно-техничките работи и за примањето и чувањето на документацијата, како и за финансиските работи на Одборот за акредитација и евалуација;
- се грижи за зајакнување и унапредување на меѓународната соработка; и
- врши други работи утврдени со овој правилник.

Член 16

Претседателот и заменик претседателите на Одборот за акредитација и евалуација, се одговорни за својата работа пред членовите на Одборот за акредитација и евалуација.

Член 17

Членот на Одборот за акредитација и евалуација редовно присуствува на седниците на Одборот за акредитација и евалуација.

За своето отсуство, членот на Одборот за акредитација и евалуација благовремено го известува претседателот на Одборот за акредитација и евалуација.

Член 18

Членот на Одборот за акредитација и евалуација учествува во работата на седницата на Одборот за акредитација и евалуација, ги изнесува своите ставови и мислења и одлучува по прашањата кои што се на дневен ред.

Член 19

Одборот за акредитација и евалуација еднаш годишно спроведува самоевалуација според критериуми предложени во Упатствата и стандардите на ENQA за обезбедување на квалитетот во високото образование.

За спроведување на самоевалуацијата Одборот за акредитација и евалуација формира комисија, составена од три члена од Одборот за акредитација и евалуација, со мандат од две години.

При спроведување на самоевалуацијата Комисијата во прв ред ги има предвид: навременото и професионално исполнување на задолженијата од страна члено-

вите на Одборот за акредитација и евалуација, соодветниот избор на членови во стручните комисии за акредитација и надворешна евалуација, исполнувањето на задачата за унапредување на законските акти кои го регулираат високото образование, финансиското работење на Одборот за акредитација и евалуација, јавноста во работењето, поврзаноста на Одборот за акредитација и евалуација со соодветни тела на европскиот високообразовен простор, настојувањата за стручно усовршување на своите членови, особено во делот на спроведувањето на надворешната евалуација.

Надворешната евалуација на Одборот за акредитација и евалуација ја врши комисија, составена од членови предложени од ENQA и потврдени од Министерството за образование и наука.

Извештаите за самоевалуацијата и надворешната евалуација се доставуваат до Минстерството за образование и наука, до ENQA и се објавуваат на веб страната на Одборот за акредитација и евалуација.

IV. НАЧИН НА ОДЛУЧУВАЊЕ НА ОДБОРОТ ЗА АКРЕДИТАЦИЈА И ЕВАЛУАЦИЈА

Член 20

Одборот за акредитација и евалуација може да работи и одлучува доколку на седницата присуствуваат две третини од вкупниот број членови на Одборот за акредитација и евалуација.

Одборот за акредитација и евалуација одлучува со мнозинство на гласови од вкупниот број на присутни членови на Одборот за акредитација и евалуација.

Член 21

Одборот за акредитација и евалуација одлучува со јавно гласање.

Одборот за акредитација и евалуација може да донесе одлука за одделни прашања од својот делокруг со тајно гласање.

Член 22

По секоја точка од дневниот ред се води расправа и се донесуваат одлуки, решенија, односно мислења, заклучоци или препораки, во зависност од карактерот на прашањето.

Одборот за акредитација и евалуација, во однос на точките кои се однесуваат на барањата за акредитација и евалуација, по констатацијата дека се исполнети сите услови пропишани со Законот за високото образование, Уредбата за нормативите и стандардите за основање на високообразовни установи и за вршење на високообразовна дејност (во натамошниот текст: Уредбата за нормативите и стандардите), Правилникот за задолжителните компоненти кои треба да ги поседуваат студиските програми од првиот, вториот и третиот циклус (во натамошниот текст: Правилникот за задолжителните компоненти), Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации, Упатството за начинот на обезбедување и оценување на квалитетот на високообразовните установи и на академскиот кадар во Република Македонија, усвојува извештај од експертската комисија и:

- донесува решение за акредитација по проектот за основање на приватна високообразовна установа, односно донесува решение за одбивање на барањето за акредитација на проектот за основање на приватна високообразовна установа;
- донесува решение за акредитација на студиски програми, односно решение за одземање на дадената акредитација;
- дава мислење по проектот за основање на јавна високообразовна установа;
- дава мислење по елаборат за вршење на високообразовна дејност од странска високообразовна установа;
- расправа по завршниот извештај од спроведената надворешна евалуација;
- донесува решение за продолжување на акредитацијата на акредитирана високообразовна установа, односно решение за укинување на акредитацијата.

Во рамки на активностите за одржување и развивање на квалитетот на високото образование Одборот за акредитација и евалуација:

- на основа на искуствата од тековното работење дава препораки за подобрување на законските акти кои го регулираат високото образование;
- еднаш годишно изготвува сумарен извештај за спроведените надворешни евалуации и за констатираните состојби во доменот на високото образование во Република Македонија;
- покренува проекти за оспособување на високообразовните кадри и студентите од Република Македонија за учество во комисиите за надворешна евалуација.
- дава предлози за изготвување на мерливи, недвосмислени и препознатливи критериуми за оценување во постапката на евалуација за секоја поединечна област, кои ќе се применуваат од први јануари 2016 година.

За унапредување на својата работа Одборот за акредитација и евалуација:

- формира комисија за своја самоевалуација;
- покренува постапка за своја надворешна евалуација;
- расправа по извештаите за својата самоевалуација и надворешна евалуација и донесва заклучоци за унапредување на својата дејност;
- реализира проекти чија цел е перманентно усогласување на својата дејност со добрите практики на соодветните институции кои делуваат на европскиот високообразовен простор.
- донесува Етички кодекс за квалитетно извршување и унапредување на својата работа, како и за чување на угледот на Одборот за акредитација и евалуација и за чување на личниот углед на неговите членови.

Член 23

Решенијата за акредитација од членот 22 од овој правилник содржат:

А. За прва акредитација:

- позитивна оценка за исполнетоста на условите за соодветната акредитација;
- времетраење на валидноста на акредитацијата, која е за период од пет години за прв и втор циклус и три години за трет циклус на студии, односно привремено решение за акредитација во траење до наредната надворешна евалуација;
- препораки што високообразовната установа треба да ги исполни како мандатен услов за добивање решение за почеток со работа.

Б. За повторна акредитација:

- позитивна оценка за исполнетоста на условите за соодветната акредитација;
- признание за постигнатите резултати доколку тие се констатирани од страна на комисијата за надворешна евалуација.

В. За повторна акредитација пократка од законски утврдениот рок од пет години:

- заедничка оценка за исполнетоста на условите за соодветната акредитација, дополнета со посебните оценки за областите што се предмет на оценување;
- список на констатираните неправилности во менаџментот и организацијата, академските и истражувачките активности и академската и истражувачката средина, како и
- препораки за нивно надминување како мандатен услов за продолжување на акредитацијата.

Г. За укинување на решението за акредитација:

- список на констатираните неправилности во менаџментот и организацијата, академските и истражувачките активности и академската и истражувачката средина;

- препораки што високообразовната установа треба да ги исполни како мандатен услов за отворање на нова постапка;

- термин после чие истекување може да биде барана нова постапка: овој термин нема да надминува 18 месеци од денот на укинувањето на решението за акредитацијата.

V. МЕТОДОЛОГИЈА ЗА АКРЕДИТАЦИЈА

Член 24

Работата на Одборот за акредитација и евалуација се заснова на методологија на вреднување на исполнетоста на условите утврдени со Уредбата за нормативите и стандардите, со Правилникот за задолжителните компоненти, со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации, со Упатството за начинот на обезбедување и оценување на квалитетот на високообразовните установи и на академскиот кадар во Република Македонија согласно кое се спроведува надворешната евалуација, со условите содржани во проектот за основање на високообразовна установа, односно во елаборатот за вршење на високообразовна дејност на странска високообразовна установа, односно со условите на соодветната високообразовна установа за остварување на нови студиски програми, а во функција на обезбедување и оценување на квалитетот на високото образование кое опфаќа:

- одобрување и признавање на високообразовна установа и на студиски програми, за вршење на високообразовна дејност согласно со Законот за високото образование, што се остварува преку акредитација,

- процена на квалитетот на вршењето на високообразовната дејност, управувањето, финансирањето, академските и други активности и нејзините приоритети, што се остварува преку системот за евалуација,

- други активности и механизми преку кои се развива и одржува квалитетот на високото образование утврдени со закон, со актите на телата што го оценуваат квалитетот на високото образование, како и со Стандардите и насоките за обезбедување на квалитетот на Европскиот простор на високото образование во рамките на Европската мрежа за обезбедување на квалитетот на високото образование.

Член 25

Постапката за акредитација пред Одборот за акредитација и евалуација започнува со поднесување на барање од:

- основачот на високообразовната установа;
- високообразовната, односно научната установа;
- Министерството за образование и наука.

Член 26

Барањето со целокупната документација (проект, односно елаборат за основање на високообразовна установа и/или студиска програма) со цел добивање на акредитација до Одборот за акредитација и евалуација се доставува во печатена форма во 4 примероци и во електронска (пдф) форма во 23 примероци.

Член 27

Одборот за акредитација и евалуација одлучува по барањето откако ќе биде доставена целокупната документација пропишана со овој правилник, во согласност со Законот за високото образование, Уредбата за нормативите и стандардите и Правилникот за задолжителните компоненти.

Член 28

Одборот за акредитација и евалуација барањата за акредитација на студиските програми планирани за реализација во наредната учебна година вообичаено ги разгледува доколку се доставени заклучно до 31 јануари во тековната година.

Член 29

Целокупната документација од член 26 на овој правилник се доставува согласно:

1. Барање мислење по Проектот за основање на јавна високообразовна установа:

Проектот за основање на јавна високообразовна установа, содржи:

- податоци за усогласеност на Проектот со Програмата за високообразовна дејност, односно општествената оправданост за основање на нова јавна високообразовна установа; начинот на кој високообразовната установа ќе ги остварува својата мисија и цели; научно-истражувачки подрачја, полиња и области во кои ќе се остварува високообразовна и научно-истражувачка дејност; единиците во состав на високообразовната установа; студиските програми со составни делови согласно со законот; изворот на финансиски средства за вршење на високообразовна дејност; можноста за обезбедување на потребен број лица кои можат да бидат избрани во наставно-научни, научни и наставни звања за сите предметни програми во студиската програма, најмалку за првите две години на студиите; материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираните студиски програми најмалку за стандардното траење на програмите; процедурите што се предвидуваат за контрола, обезбедување и унапредување на квалитетот на наставата во предложените студиски области; научно- истражувачката, односно уметничко-творечката дејност на академскиот кадар и учеството на студентите докторанти во неа; планираниот број студенти; и начин на кој ќе бидат исполнети и другите услови утврдени со Уредбата за нормативите и стандардите, Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации.

Кон Проектот за основање на јавна високообразовна установа се доставува документација согласно Списокот на потребната документација за основање на јавна високообразовна установа, кој е составен дел на овој правилник (Прилог број 1).

2. Барање решение за акредитација на проектот за основање на приватна високообразовна установа:

Проект за основање на приватна високообразовна установа, со податоци за:

- основачот; научно-истражувачки подрачја, полиња и области во кои ќе се остварува високообразовната и научно-истражувачката дејност; начинот на кој високообразовната установа ќе ги остварува својата мисија и цели; единиците во состав на високообразовната установа; студиските програми со составни делови согласно законот; изворот на финансиски средства за вршење на високообразовна дејност и обезбедување на квалитетна финансиска гаранција најмалку за стандардното траење на програмата; можноста за обезбедување на потребен број лица кои можат да бидат избрани во наставнно-научни, научни и наставни звања за сите предметни програми во студиската програма, најмалку за првите две години на студиите; материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираните студиски програми најмалку за стандардното траење на програмите; процедурите што се предвидуваат за контрола, обезбедување и унапредување на квалитетот на наставата во предложените студиски области; научно- истражувачката, односно уметничко-творечката дејност на академскиот кадар и

учеството на студентите докторанти во неа; планираниот број студенти; и начин на кој ќе бидат исполнети и другите услови уредени со Уредбата за нормативите и стандардите, Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации.

Кон Проектот за основање на приватна високообразовна установа се доставува документација согласно Списокот на потребната документација за основање на приватна високообразовна установа, кој е составен дел на овој правилник (Прилог број 2).

3. Барање решение за акредитација на нова студиска програма во рамките на акредитирана високообразовна установа:

Елаборат за акредитација на студиска програма, со податоци за:

- опис на содржината на студиската програма согласно со законот и правилникот за задолжителните компоненти; услови за запишување и напредување во текот на студиите; методите на предавање и оценување на постигнувањата на студентите, односно начинот на проверка на знаењата; стручниот, односно научниот назив определен согласно статутот на високообразовната установа; изворот на финансиски средства за остварување на студиската програма; обезбеденоста на потребен број лица во наставно-научни, научни и наставни звања за сите предметни програми во студиската програма, најмалку за првите две години на студиите; материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираната студиска програма најмалку за стандардното траење на програмата; активностите и механизмите преку кои се развива и се одржува квалитетот на високото образование; научно-истражувачката, односно уметничко-творечката дејност на академскиот кадар и учеството на студентите докторанти во неа; планираниот број студенти; резултати од изведена самоевалуација; документација за обезбедени простории кои што се соодветни за изведување на новата студиска програма, согласно со Уредбата за нормативите и стандардите; како и начинот на кој ќе бидат исполнети и другите услови утврдени со Уредбата за нормативите и стандардите, Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации.

Кон Елаборатот за акредитација на студиска програма се доставува документација согласно Прилог број 3 и Прилог број 5, кои се составен дел на овој правилник.

4. Барање мислење за вршење на високообразовна дејност на странска високо-бразовна установа на територијата на Република Македонија:

Елаборат на странска високообразовна установа за вршење на високообразовна дејност на територијата на Република Македонија, со податоци за:

- странската високообразовна установа; студиските подрачја во кои ќе се остварува високообразовната дејност; опис на студиските програми; изворот на финансиски средства за вршење на високообразовна дејност и обезбедување на квалитетна финансиска гаранција најмалку за стандардното траење на програмата; можноста за обезбедување на потребен број лица во наставно-научни, научни и наставни звања за сите предметни програми во студиската програма, најмалку за првите две години на студиите; материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираните студиски програми најмалку за стандардното траење на програмите; активностите и механизмите преку кои се развива и се одржува квалитетот на високото образование; планираниот број студенти; начин на кој ќе бидат исполнети и другите услови утврдени со Уредбата за нормативите и стандардите, Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации; и меѓудржавен договор за соработка во доменот на образованието и науката на Република Македонија и земјата на странската високообразовна установа.

Кон Елаборатот за вршење на високообразовна дејност на територијата на Република Македонија, се доставува документација согласно Прилог број 4 и Прилог број 5, кои се составен дел на овој правилник.

5. Барање за продолжување на акредитацијата со:

- соодветните барања од овој член;

- мислење на Одборот за акредитација и евалуација за исполнетост на условите за продолжување на акредитацијата; и

- Карта на високообразовната установа (Прилог број 5).

Член 30

Доставените барања со целокупната документација се разгледуваат на седница на Одборот за акредитација и евалуација.

За секое пристигнато барање се формира стручна комисија, во зависност од природата на барањето за акредитација, до која се доставува барањето со целокупната документација.

Доколку доставената документација не е комплетна согласно со овој правилник, Одборот за акредитација и евалуација нема да покрене постапка за акредитација се до целосното комплетирање на документацијата.

Член 31

Стручната комисија:

- го разгледува пристигнатото барање за акредитација со придружната документација;

- по потреба бара дополнителни информации и материјали од поднесувачот на барањето;

- врши непосредни посети на високообразовните установи и на другите институции кои поднеле барање за акредитација и остварува непосредни контакти и разговори со раководните органи на институцијата, наставниците и студентите;

- врши и други работи за кои ќе оцени дека е потребно или кои и ги доверил Одборот за акредитација и евалуација во врска со покренатата постапка.

Доколку поднесувачот на барањето не ги достави бараните дополнителни информации и материјали во рок од 30 дена, стручната комисија го известува Одборот за акредитација и евалуација дека е потребно да го врати проектот, односно елаборатот на доработка.

Одборот за акредитација и евалуација барањето за акредитација може да го врати на доработка најмногу двапати.

Доколку и после втората доработка не се исполнети барањата што ги поставил Одборот за акредитација и евалуација, Одборот за акредитација и евалуација донесува одлука за неисполнетост на условите за акредитација.

Членовите на стручната комисија работите од став 1 на овој член ги вршат во име на Одборот за акредитација и евалуација и не ги изнесуваат јавно резултатите и согледувањата од својата работа.

Член 32

Во процесот на одлучувањето стручната комисија особено ќе има предвид:

А. Кај барањата за акредитација на високообразовна установа:

- начинот на кој високообразовната установа ќе ги остварува својата мисија и цели во согласност со членовите 17 до 19 од Законот за високото образование;

- исполнетоста на материјално- техничките и просторните услови за изведување на наставата;

- усогласеноста на студиските програми кои се предвидува да се реализираат со потребите на општеството за дадениот профил на кадри;

- можностите за обезбедување на соодветни кадри за реализација на студиските програми;
- обезбеденост на условите за истражувачка дејност на наставниците и за вклучување на студентите;
- моделот за самоевалуација, односно процедурите што се предвидуваат за реализација на внатрешна контрола, обезбедување и унапредување на квалитетот на наставата во предложените студиски програми на високообразовната установа.

Б. Кај барањата за акредитација на студиска програма:
- структурата, организацијата и содржината на студиските и предметните програми;
- усогласеноста на теоретската и практичната настава со целите на студиската програма;
- формалното образование и истражувачкото искуство на наставниците кое кореспондира со специфичноста на студиската програма, односно профилот и квалификацијата на наставно-научниот кадар;
- исполнетоста на материјално-техничките и просторните услови за изведување на наставата;
- методите на предавање и оценување на постигнувањата на студентите;
- активностите и механизмите преку кои се развива и се одржува квалитетот на високото образование;
- научно-истражувачката, односно уметничко-творечката дејност на академскиот кадар и учеството на студентите докторанти во неа;
- соодветноста на предложената литература за совладување на материјата од предметниот наставник;
- обезбеденоста на предложената литература според законски пропишаните барања;
- усогласеноста на студиската програма со потребите на општеството за дадениот профил на кадри;
- соодветноста на структурата и содржината на циклусот на студии со општите дескриптори и на студиската програма со специфичните дескриптори.

В. Кај барањата за продолжување на акредитација:
- внатрешниот систем на оценување и обезбедување на квалитетот на високото образование;
- постапките за одобрување, следење и обновување на студиските програми;
- постапките за преземање дејности во врска и по повод резултатите од внатрешната и надворешната евалуација и други независни проверки на квалитетот;
- применувањето на кредит трансфер системот;
- соработката со други високообразовни установи;
- поддршката, управувањето и развојот на материјалната база на високообразовната установа;
- научно-истражувачката, применувачката, апликативната и високостручната дејност и учеството на академскиот кадар во таа дејност.

Член 33

По спроведените активности од членовите 31 и 32 на овој правилник, стручната комисија подготвува извештај и го доставува до Одборот за акредитација и евалуација.

Член 34

По добивањето на извештајот од стручната комисија, претседателот на Одборот за акредитација и евалуација го става на дневен ред на седницата на Одборот за акредитација и евалуација за разгледување и прифаќање.

На седницата покрај претседателот на стручната комисија присуствуваат и нејзините членови.

Член 35

Претседателот на стручната комисија, освен ако комисијата не одреди друг член, реферира по извештајот.

По извештајот и придружната документација се отвора расправа.

Доколку повеќето од половината од вкупниот број на присутни членови на Одборот за акредитација и евалуација се изјаснат позитивно по извештајот на комисијата, Одборот за акредитација и евалуација донесува решение, односно дава мислење.

Член 36

Одборот за акредитација и евалуација нема да даде акредитација ако:
- не се исполнети условите од членовите 24 до 28 од Законот за високото образование за основање на високообразовна установа, односно студиските програми не се во согласност со членот 99 од Законот за високото образование, Уредбата за нормативите и стандардите и Правилникот за задолжителните компоненти;
- нема доволно обезбедено кадар, опрема и информациски услови за реализација на студиската програма;
- наставниот кадар е несоодветен, не е избран според законски пропишаните услови за избор во звање и напредување во кариерата или е ангажиран од други високообразовни установи без дозвола од матичната установа;
- спроведувањето на студиската програма не е поткрепено со доволни финансиски, материјални и технички ресурси;
- високообразовната установа не дава гаранции дека ќе ја обезбеди наставата;
- барањето содржи неточни податоци кои се важни за добивање на акредитацијата.

Член 37

Во случаите на негативен одговор по барањето за продолжување на акредитацијата согласно Законот за високото образование, Одборот за акредитација и евалуација му предлага на министерот за образование и наука најмногу до една година високообразовната установа да ги исполни барањата за продолжување на одземената акредитација.

Продолжувањето на реализацијата на студиските програми во случај од став 1 на овој член се врши врз основа на правила што ги изготвува министерот за образование и наука.

Доколку овие барања не се исполнат во рамките на определеното време, високообразовната установа престанува да изведува студиски програми во дадените подрачје, поле и област и дадениот циклус на студии со истекот на периодот од став 1 на овој член.

VI. МЕТОДОЛОГИЈА ЗА ЕВАЛУАЦИЈА

Подготовка на надворешната евалуација

Член 38

Одборот за акредитација и евалуација подготвува план за спроведување на надворешна евалуација на високообразовните установи во Република Македонија, согласно кој секоја високообразовна установа поминува низ надворешна евалуација еднаш на пет години.

Високообразовната установа во која ќе се спроведува надворешна евалуација најмалку една година порано ќе биде информирана за терминот кога ќе се спроведе евалуацијата.

Одборот за акредитација и евалуација може да спроведе надворешна евалуација и по барање на акредитирана високообразовна установа.

Формирање и должности на Комисијата за надворешна евалуација

Член 39

Комисијата за надворешна евалуација е составена од пет членови и тоа три од меѓународно признати универзитети, од кои најмалку еден од странство, из-

брани според критериумите од член 69 од Законот за изменување и дополнување на Законот за високото образование ("Службен весник на Република Македонија", бр.17/2011), еден од Одборот за акредитација и евалуација и еден претставник на студентите.

Членот од Одборот за акредитација и евалуација е претседател на комисијата за надворешна евалуација.

При изборот на членовите на комисијата за надворешна евалуација предност ќе имаат лица кои поминале низ посебна едукација за изведување на надворешна евалуација.

За членови на комисијата за надворешна евалуација нема да бидат бирани лица од високообразовната установа која се евалуира.

Член 40

Членовите на Комисијата за надворешна евалуација ќе бидат:

- независни во одлучувањето;
- непристрасни во одлучувањето;
- добро запознаени со системот на високото образование и со начелата на надворешната евалуација;
- ќе поседуваат вештини за тимска работа потребни за извршување на задачата.

При изборот на членови на комисијата од ставот 1 на овој член Одборот за акредитација и евалуација на високото образование се раководи и со следниве критериуми:

- познавање на академските методи на предавање и учење;
- искуство со раководење и управување на високообразовна односно научноистражувачка установа;
- релевантно меѓународно искуство, доволно за споредба со меѓунардни искуства;
- искуство во воспоставување, развивање и евалуација на студиски програми;
- познавање на законските и подзаконските прописи како и релевантните меѓународни стандарди.

Член 41

Одборот за акредитација и евалуација непосредно после формирањето на комисијата за надворешна евалуација ја известува високообразовната установа за составот на комисијата.

Високообразовната установа во рок од една недела може да побара дополнување на комисијата со нов член или за замена на еден од членовите.

Претседателот на Одборот за акредитација и евалуација ќе го потврди конечниот состав на комисијата и ќе назначи нејзин претседател и координатор на евалуацијата.

Координаторот на евалуацијата е лице од стручната служба на Одборот за акредитација и евалуација кое ќе и дава поддршка на комисијата и ќе го администрира евалуациониот процес. Координаторот не е член на Комисијата.

Членовите на комисијата со потпис ја потврдуваат обврската за чување на доверливост на информацијата која ќе произлезе од евалуацијата, како и за отсуство на конфликт на интереси.

Член 42

Должности на членовите на комисијата за надворешна евалуација се:

- да ги проучат документите што ја регулираат надворешната евалуација;
- да поднесат извештај за самоевалуацијата на установата и да дадат препораки за точките на кои треба да се фокусира текот на надворешната евалуација;
- да учествуваат на состаноците и дискусиите на комисијата;
- да учествуваат во подготовките на посетата;
- да учествуваат во посетата,
- да учествуваат во оценувањето на установата и подготовката на извештајот;
-да ги проучат коментарите на установата за извештајот и да оценат дали може да се земат предвид во крајниот извештај;
- да извршуваат други задачи поврзани со евалуациониот процес согласно со поделбата на задачите меѓу членовите на комисијата;
- да се придржуваат на роковите определени од комисијата.

Член 43

Должности на координаторот се:

- да обезбеди непречено одвивање на евалуациониот процес согласно со определените барања од овој правилник и определените временски рамки;
- на основа на препораките од членовите на комисијата за надворешна евалуација да ја подготви документацијата на која треба да се фокусира комисијата;
- да ги координира средбите со лицата со кои комисијата сака да разговара, како и да ги подготви дополнителните материјали кои и се потребни на комисијата во подготовката на посетата,
- да ја извести високообразовната установа во која ќе се спроведува евалуацијата за распоредот на посетата, за имињата и позициите на лицата кои ќе учествуваат на состаноците, како и, доколку тоа е потребно, да побара дополнителни материјали од високообразовната установа;
- да подготви предлог- извештај на база на извештаите доставени од членовите на комисијата;
- да извршува и други задачи поврзани со спецификите на евалуацијата, определени од претседателот на комисијата.

Член 44

Должности на претседателот на комисијата за надворешна евалуација се:

- да ги води состаноците на комисијата;
- да ги подели задачите меѓу членовите на комисијата;
- да ја води комисијата за време на посетите;
- после посетата да оформи привремени заклучоци на комисијата за високообразовната установа;
- да го подготви и одобри евалуациониот извештај.

VII. СТАНДАРДИ ЗА АКРЕДИТАЦИЈА

Акредитационен извештај

Член 45

За добивање позитивно мислење за основање на државна високообразовна установа, акредитација на приватна високообразовна установа и акредитација на студиска програма потребно е да бидат исполнети сите услови предвидени со Законот за високото образование, Уредба за нормативите и стандардите, Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации, Правилникот на Одборот за акредитација и евалуација и Правилникот за задолжителните компоненти.

Член 46

Акредитациониот извештај содржи три дела: 1) преглед на доставената документација; 2) мислење во однос на исполнетоста на условите; и 3) предлог до Одборот за акредитација и евалуација кој може да биде позитивен или негативен.

Прегледот на доставената документација вклучува мислење по: картата на високообразовната установа; одлуката за усвојување на студиската програма од Наставно- научниот совет на единицата, односно Советот

на научната установа; одлуката за усвојување на студиската програма од Ректорската управа или Универзитетскиот сенат, односно Советот на научната установа; соодветноста на определбата на научно- истражувачко подрачје, поле и област каде припаѓа студиската програма; податоци за степенот на образование; како се дефинирани целта и оправданоста за воведување на студиската програма; соодветноста на општите дескриптори со циклусот на студии и специфичните дескриптори на студиската програма и на предметните програми (резултати од учењето); години и семестри на траење на студиската програма; ЕКТС кредити со кои се стекнува студентот и соодветноста на распределбата на ЕКТС кредитите по предметни програми и активности; начин на финансирање, а за приватните високообразовни и научни установи и доказ за обезбедена квалитетна финансиска гаранција за студиската програма; услови за запишување; информација за продолжување на образованието; утврден сооднос помеѓу задолжителните, изборните факултетски предмети и изборните универзитетски предмети, со листа на задолжителни предмети, листа на изборни факултетски предмети и листа на изборни универзитетски предмети и дефиниран начин на избор на предметите; податоци за просторот предвиден за реализација на студиската програма; листа на опрема предвидена за реализација на студиската програма; предметни програми со информации согласно со Прилог бр. 3 од Правилникот за задолжителните компоненти; список на наставен кадар; податоци за наставниците кои изведуваат настава; изјава од наставникот за давање согласност за учество во изведување на настава по одредени предмети од студиската програма; согласност од високообразовната установа за учество на наставникот во реализацијата на студиската програма; информација за бројот на студентите; информација за обезбедена задолжителна и дополнителна литература; информација за веб страницата; стручниот/научниот назив со кој се стекнува студентот по завршување на студиската програма; активности и механизми преку кои се развива и се одржува квалитетот на наставата, како и резултати од изведена самоевалуација.

Мислењето по однос на исполнетоста на условите вклучува податоци за тоа дали се исполнети сите услови, а доколку некои услови не се исполнети се доставува список на неисполнетите услови.

Предлогот може да биде позитивен – да се даде акредитација; условен – да се даде акредитација со доставувањето на документи кои недостасуваат, а се наведени во мислењето; негативен – да му се врати елаборатот на подносувачот со укажување што треба да направи за да ги исполни законските услови за добивање акредитација.

VIII. СТАНДАРДИ ЗА НАДВОРЕШНАТА ЕВАЛУАЦИЈА

Евалуционен извештај

Член 47

Комисијата за надворешна евалуација ја евалуира високообразовната установа во четири посебни области: организациски менаџмент и изведување; настава и учење; научноистражувачка дејност и други креативни активности; и општествена оправданост, според критериумите утврдени со овој правилник, како и според Упатството за начинот на обезбедување и оценување на квалитетот на високообразовните установи и на академскиот кадар во Република Македонија.

Секоја област ќе биде посебно евалуирана, со скала од три оценки: „ги задоволува барањата", „условно ги задоволува барањата" и "не ги задоволува барањата".

Организациски менаџмент и изведување

Член 48

При оценувањето на општиот менаџмент ќе се земе предвид дали:

- високообразовната установа ја има дефинирано својата улога во македонското општество;
- има усвоено развоен план и со него поврзаните акциони планови кои произлегуваат од конкретните цели вградени во мисијата, визијата и суштинските вредности, како и дали мисијата е усогласена со приоритетите на државата и очекувањата на општеството;
- се дефинирани клучните резултати на високообразовната установа;
- менаџментот на високообразовната установа активно учествува во подготовката и спроведувањето на развојните и акционите планови и го вклучува членството и различните групи на интерес;
- е дефинирана и пропишана одговорноста на сите нивоа на одлучување и дали одговорноста го поддржува исполнувањето на институционалните цели и кохерентното изведување на клучните процеси;
- внатрешните и надворешните комуникации на високообразовната установа се целисходни и менаџирани.

При оценување на менаџментот на вработените ќе се земе предвид дали:

- критериумите за избор во наставно-научни, наставни и научни звања на вработените во високообразовната установа се во согласност со Упатството за оценка на квалитетот на високообразовните установи и високообразовните кадри;
- принципите и процедурите за вработување и напредување израснуваат од целите на развојниот план на високообразовната установа и ја обезбедуваат академската одржливост;
- при изборот, именувањето и оценувањето на членовите на академскиот кадар се земени предвид нивните минати активности (настава, истражување, оценки на студентите) согласно со Законот за високото образование и правилниците за избор во соодветната установа;
- принципите на наградување и мотивирање на вработените се јасно дефинирани и еднакво применувани за сите вработени;
- редовно е истражувано задоволството на вработените од менаџментот, работните услови и протокот на информации, и резултатите од истражувањето се користат за унапредување на активностите;
- вработените учествуваат во меѓународни програми на мобилност, соработка, мрежи и др.;
- вработените ги засновуваат своите активности на принципите на академска етика.

При оценување на менаџментот на финансиските ресурси и инфраструктурата ќе се земе предвид дали:

- распределбата на финансиските ресурси на високообразовната установа и администрацијата и развојот на инфраструктурата се економски оправдани; и засновани на целите на развојните планови на високообразовната установа и на националните приоритети (со исклучок на приватните високообразовни установи);
- високообразовната установа користи информациони системи кои го поддржуваат нејзиниот менаџмент и кохерентното изведување на клучните процеси;
- работните услови на кадарот и условите за учење и истражување на студентите (библиотека, студија, лаборатории и др.) се во согласност со барањата поврзани со спецификите на високообразовната установа и со очекувањата на вработените.

Настава и учење

Член 49

Ефективноста на наставата и учењето ќе се оценуваат на основа на тоа дали:

- високообразовната установа ги има дефинирано своите образовни цели и мерките за нивна имплементација;
- високообразовната установа креира предуслови за да им обезбеди на своите дипломирани студенти национална и меѓународна конкурентност;
- бројот на студентските места е планиран во согласност со општествените потреби и можностите и целите на високообразовната установа;
- условите за прием се во согласност со мисијата и целите на високообразовната установа и го поддржуваат оформувањето на мотивирано студентско тело;
- студентите се обезбедени со неопходните стандарди за студирање на високообразовната установа независно од специфичноста на потребите.

Унапредувањето на студиските програми ќе се оценува на основа на тоа дали:

- високообразовната установа има усогласено своите студиски програми со целите и потребите на работниот пазар и ги зема предвид државните стратегии и очекувањата на општеството;
- реализацијата на развојните активности поврзани со студиските програми е систематска и редовна; со вклучување на различни групи на интерес во унапредувањето на студиските програми;
- задоволството на дипломираните студенти со квалитетот на студиите и задоволството на вработувачите со квалитетот на дипломираните студенти се истражуваат и анализираат; и дали резултатите се земаат предвид при унапредувањето на студиските програми.

Напредувањето и оценувањето на студентите ќе се оценува на основа на тоа дали:

- академското напредување на студентите се контролира и поддржува;
- оценувањето на студентите го мотивира учењето и е во согласност со резултатите од учењето;
- високообразовната установа има ефикасен систем за земање во предвид на претходното образовно и работно искуство на студентите.

Поддршката на процесот на учење ќе се оценува на основа на тоа дали:

- организацијата на студиите креира можности за тоа студентите да ги завршат студиите во определениот период;
- високообразовната установа обезбедува советување поврзано со студиите и кариерата (ментори на студии, центри за советување и др.);
- високообразовната установа ја поддржува меѓународната мобилност на студентите;
- за организирање на образовните активности се користи современа техничка и образовна технологија;
- од студентите повремено се бара мислење за процесите на учење и поддршка (организација на студиите, оценување, советување и др.);и дали овие резултати од истражувањето на мислењата од студентите се земаат во предвид за унапредување на активностите.

Истражување, развој и/или креативни активности

Член 50

Истражувачките, развојните и/или креативните (во натамошниот текст: ИРК) активности ќе се оценуваат на основа на тоа дали:

- високообразовната установа ги има дефинирано своите ИРК цели и мерките за нивно спроведување;
- високообразовната установа ги согледува потребите на општеството и работниот пазар и ги зема предвид при планирањето на ИРК активности.

Ресурсите за ИРК и процесите на поддршка ќе се оценуваат на основа на тоа дали:

- високообразовната установа има ефикасен систем за поддршка на ИРК активности;
- високообразовната установа има финансиски ресурси потребни за унапредување на ИРК активностите и стратегија за поддршка на нивното стекнување;
- високообразовната установа учествува во различните ИРК мрежи;
- ИРК инфраструктурата се подновува и се користи ефикасно.

Оценувањето на квалитетот на научно-истражувачката дејност на научно-истражувачките установи како и на научните центри на извонредност во Република Македонија опфаќа оценка и за:

- активната посветеност на наставно-научниот кадар на научноистражувачка работа;
- објавувањето на резултатите од научно-истражувачката работа во научни списанија со висок фактор на влијание;
- учеството на наставно-научниот кадар во меѓународни научно-истражувачки проекти (на пр. FP6, FP7, EUREKA, IAEA, NATO, COST, UNESCO и сл.);
- обемот и квалитетот на завршените постдокторски студии од соодветното научно поле на реномирани меѓународни и домашни високообразовни односно научни установи на наставно-научниот кадар;
- воведување и спроведување на Систем за менаџмент на квалитет соодветен на научното поле на кои се однесува научно-истражувачката работа;
- воспоставениот релевантен Систем за самоевалуација на научно-истражувачката работа;
- редовното вклучување на млади истражувачи на ниво на прв, втор и трет циклус на студии во научно-истражувачката работа;
- придонесот на научно-истражувачката работа за унапредување на квалитетот на третиот циклус на студии од соодветното научно поле;
- одржувањето на редовни контакти со истражувачи од реномирани странски високообразовни или научни установи и нивна ангажираност во научно-истражувачката работа;
- организацијата и распределбата на работата како и структурната поставеност со цел обезбедување блискост на соработката помеѓу истражувачите, задоволителна кохезија и постигнување на целите;
- остварување на меѓународна мобилност во водечки истражувачки групи во соодветното научно поле;
- резултатите од научно-истражувачката работа директно придонесуваат за воведување на нови производи/услуги, формирање на нови фирми и отварање на нови работни места;
- соодветноста на просторот, распоредот и организација за изведување на научно-истражувачката работа во соодветното научно поле;
- располагањето, користењето и редовното одржување на опрема соодветна на научното поле на кое се однесува научно-истражувачката работа;
- поседувањето литература соодветна на научната област на која се однесува научно-истражувачката работа и редовното дополнување на литература;
- редовното одржување електронски пристап до меѓународни бази на научни списанија;
- мерливите ефекти од научно-истражувачката работа врз унапредувањето на научно-истражувачките потенцијали на национално ниво;
- интересот на стопанството односно релевантните организации од соодветното научно поле за научно-истражувачката работа и соодветна применливост на резултатите кои се нејзин плод;
- потенцијали за обезбедување научно-истражувачката обуки од пошироко општествено значење, во функција на зајакнување на трансферот на знаење кон стопанството;

- остварувањето на финансиски средства од соработка со стопанство или други релевантни организации;

- инвестирање на остварените средства за унапредување на научно-истражувачката работа.

Учеството на студентите од сите циклуси на студии, а особено од третиот циклус, во научно-истражувачки активности ќе се оценува на основа на тоа дали:

- високообразовната установа ги вклучува студентите од сите циклуси во истражувачки, креативни и проектни активности, и систематски го истражува нивното задоволство од квалитетот на изведување на овие активности;

- професионализмот, ефективноста и работното оптоварување на наставно-научниот кадар кој ги води истражувањата се добро балансирани, со што се обезбедува квалитет на истражувачките трудови и позитивни оценки на испитите;

- студентите се информираат да го препознаат плагијаторството и да го избегнуваат;

- се обезбедени услови за прием на странски студенти на докторски студии;

- високообразовната установа вклучува признати странски научници во обезбедувањето на докторските студии и во надзорот на докторските тези.

Општествена оправданост

Член 51

Популаризацијата на ИРК активности и вклучувањето на високообразовната установа во општествениот развој ќе се оценува на основа на тоа дали:

- високообразовната установа има систем за популаризација на ИРК активности;

- вработените во високообразовната установа учествуваат во активностите на професионалните асоцијации, и како експерти во општествени супервизорски органи и тела кои донесуваат одлуки.

Ин-сервис тренингот и образовните активности за поширока намена ќе се оценуваат на основа на тоа дали високообразовната установа има стратегиски цели и јасен акционен план на полето на доживотното учење, како и дали примената на акциониот план периодично се оценува и унапредува доколку тоа е потребно.

Други јавно ориентирани активности се оценуваат согласно со тоа дали :

- се целисходни, периодично се оценуваат и се воведуваат унапредувања засновани на оценките;

- дали високообразовната установа придонесува за зголемување на општествената добросостојба со споделување на своите ресурси (библиотека, музеи, спортски погодности и др.) и/или организира концерти, изложби, перформанси, конференции, саеми и други активности.

Член 52

Заедничката оценка на комисијата ќе биде заснована на следните начела подетално регулирани со Упатството за начинот на обезбедување и оценување на квалитетот на високообразовните установи и на академскиот кадар во Република Македонија:

- ако сите посебни области се оценети со „ги задоволува барањата“, заедничката оценка ќе биде: „ги задоволува барањата“;

- ако една посебна област е оценета со „условно ги задоволува барањата“, а сите останати со „ги задоволува барањата“, заедничката оценка ќе биде „ги задоволува барањата“ или „условно ги задоволува барањата“, согласно со оценката на комисијата заснована на мерењето на јачината на областа во која се констатирани слабости;

- ако повеќе од една посебна област се оценети со „условно ги задоволува барањата“, заедничката оценка ќе биде „ условно ги задоволува барањата“;

- ако една посебна област е оценета со „ не ги задоволува барањата“ , а сите останати се оценети со „ги задоволува барањата“, заедничката оценка ќе биде „условно ги задоволува барањата“;

- ако една посебна област е оценета со „ не ги задоволува барањата“ , а најмалку една со „условно ги задоволува барањата“, заедничката оценка ќе биде „условно ги задоволува барањата“ или „не ги задоволува барањата“, согласно со оценката на комисијата заснована на мерењето на јачината на областа во која се констатирани слабости;

- ако најмалку две посебни области се оценети со „не ги задоволува барањата“, заедничката оценка ќе биде „ не ги задоволува барањата“.

Член 53

Заедничката оценка комисијата ја донесува со одлука базирана на консензус. Доколку не се постигне консензус, решението ќе се донесе со просто мнозинство на членовите на комисијата. Ако гласовите се еднакво поделени одлучува гласот на претседателот на комисијата.

Член 54

Посебната област во која високообразовната установа покажала исклучителни резултати и/или иницијативи, комисијата ќе ја оцени со „заслужно признание“. Доколку комисијата оцени дека најмалку две посебни области заслужуваат признание, постигнувањата на високообразовната установа комисијата ќе ги оцени со “заслужно признание“.

Член 55

Комисијата го подготвува извештајот за надворешната евалуација во рок од еден месец од посетата на високообразовната установа.

Член 56

Високообразовната установа има можност да ги приложи своите забелешки по извештајот во рок од две недели после неговото примање. Комисијата ги разгледува забелешките и ги зема предвид при подготовката на завршниот извештај.

Член 57

Претседателот на комисијата го доставува завршниот извештај до Одборот за акредитација и евалуација не подоцна од крајот на осмата недела од посетата.

IX. ОДЛУКА ЗА СПРОВЕДЕНАТА НАДВОРЕШНА ЕВАЛУАЦИЈА

Член 58

Одборот за акредитација и евалуација донесува конечно решение за евалуацијата во рок од два месеци од денот на добивањето на извештајот по претходно доставено мислење од соодветната комисија од член 39 на овој правилник. Доколку е потребно Одборот за акредитација и евалуација може да го повика претседателот на комисијата за надворешна евалуација или член од истата комисија определен од претседателот на комисијата за надворешна евалуација да присуствува на седницата и да даде објаснувања.

Член 59

Одборот за акредитација и евалуација одлуката ја засновува на самоевалуациониот извештај на високообразовната установа, на завршниот извештај на коми-

сијата за надворешна евалуација и на мислењето на комисијата од соодветното научно-истражувачко подрачје за овој извештај, на коментарите на високообразовната установа по извештајот, како и на дополнителни материјали добиени по барање на Одборот за акредитација и евалуација.

Член 60

Во случај на противречности во посебните извештаи или несоодветна аргументација по донесената оценка Одборот за акредитација и евалуација може да побара од комисијата за надворешна евалуација повторно да го разгледа материјалот и да поднесе нов извештај.

Член 61

Одборот за акредитација и евалуација на основа на критериумите дефинирани во Упатството за начинот на обезбедување и оценување на квалитетот на високообразовните установи и на академскиот кадар во Република Македонија, донесува одлука, ако:

- Сите посебни области во евалуациониот извештај се оценети со „ги задоволува барањата“, Одборот за акредитација и евалуација ќе заклучи дека менаџментот, администрацијата, академските и истражувачките активности и академската и истражувачката средина ги задоволуваат барањата и ќе одлучи да ја акредитира високообразовната установа за пет години.
- Една посебна област во завршниот извештај е оценета со „условно ги задоволува барањата“ и сите останати со „ги задоволува барањата“, Одборот за акредитација и евалуација, на основа на анализата на значајноста на областите кои ги задоволуваат барањата и областа што бара подобрување ќе одлучи дали високообразовната установа ќе ја акредитира на пет или на три години.
- Најмалку две посебни области од завршниот извештај се оценети со „условно ги задоволува барањата“ и ниту една со „не ги задоволува барањата“, Одборот за акредитација и евалуација ќе констатира дека постојат недостатоци во менаџментот, администрацијата, академските и истражувачките активности и академската и истражувачката средина, ќе даде упатства за нивно отстранување и ќе ја акредитира високообразовната установа на три години.
- Сите посебни области во завршниот извештај се оценети со „условно ги задоволува барањата“, Одборот за акредитација и евалуација ќе констатира дека постојат недостатоци во менаџментот, администрацијата, академските и истражувачките активности и академската и истражувачката средина, ќе даде упатства за нивно отстранување и на основа на јачината на недостатоците ќе одлучи да ја акредитира високообразовната установа на три години или да не ја акредитира.
- Една посебна област во завршниот извештај е оценета со „не ги задоволува барањата“, Одборот за акредитација и евалуација ќе ја анализира јачината на областа што треба да се подобри и ако констатира дека високообразовната установа не ги исполнува условите ќе одлучи да не даде акредитација; или, ако констатира дека постојат недостатоци во менаџментот, администрацијата, академските и истражувачките активности и академската и истражувачката средина, ќе даде упатства за нивно отстранување и ќе одлучи да ја акредитира високообразовната установа на три години.
- Најмалку две посебни области од завршниот извештај се оценети со „не ги задоволува барањата“, Одборот за акредитација и евалуација ќе заклучи дека менаџментот, администрацијата, академските и истражувачките активности и академската и истражувачката средина не ги испонуваат условите и ќе одлучи да не даде акредитација.

Член 62

Ако Комисијата за надворешна евалуација согледала напредок во посебна област, Одборот за акредитација и евалуација ќе го наведе признанието во решението за акредитација.

Член 63

Во рок од седум дена, Одборот за акредитација и евалуација ќе ги објави на својата веб страница решението за акредитација, конечниот извештај за надворешна евалуација, и, во координација со високообразовната установа, нејзиниот извештај за самоевалуација.

Важноста на издадената акредитација започнува со денот кога Министерството за образование и наука ќе издаде решение за почеток со работа, односно за продолжување на дејноста.

Во законски определениот рок, високообразовната установа може да го оспори решението за одземање на акредитацијата, односно за времетраењето на продолжувањето на акредитацијата издадено од Одборот за акредитација и евалуација пред надлежните органи на Репблика Македонија.

Член 64

Одборот за акредитација и евалуација, со сопствен акт, го определува начинот на собирање на податоци што се од значење за неговите надлежности.

Одборот за акредитација и евалуација го известува Министерството за образование и наука за секоја акредитација и му доставува листа на акредитирани високообразовни установи и студиски програми.

Одборот за акредитација и евалуација го известува Министерството за образование и наука за секоја спроведена надворешна евалуација и му доставува листа на евалуирани високообразовни установи.

Член 65

Одборот за акредитација и евалуација во рок од три месеци од влегување во сила на овој правилник, ќе подготви програма за надворешна евалуација за годините 2013 до 2017 и ќе ја усогласи со високообразовните установи.

Член 66

Со денот на влегувањето во сила на овој правилник, престанува да важи Правилникот за организацијата, работата, начинот на одлучување, методологијата и постапката за акредитација, критериумите и стандардите за акредитација, како и други прашања во врска со работата на Одборот за акредитација на високото образование („Службен весник на Република Македонија” бр. 121/09).

Член 67

Овој правилник влегува во сила со денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија”, а ќе се објави по добивањето согласност од Владата на Република Македонија.

Бр. 20-347/1
28 ноември 2012 година
Скопје

Претседател
на Одборот за акредитација
и евалуација,
проф. др. **Михаил Петковски**, с.р.

Прилог бр.1. Список на потребните податоци и пропратна документација за основање на јавна високообразовна установа

Податоци за усогласеност на Проектот со Програмата за високообразовна дејност, односно општествената оправданост за основање на нова јавна високообразовна установа	
Начинот на кој високообразовната установа ќе ги остварува својата мисија и цели	
Научно-истражувачки подрачја, полиња и области во кои ќе се остварува високообразовна и научно-истражувачка дејност	
Единиците во состав на високообразовната установа	
Студиските програми со составни делови согласно со законот	
Изворот на финансиски средства за вршење на високообразовна дејност: Фискален образец во кој се предвидени средствата од Буџетот на Република Македонија за работа на јавната високообразовна установа најмалку за стандардното траење на планираните студиски програми	
Можноста за обезбедување на потребен број лица кои можат да бидат избрани во наставно-научни, научни и наставни звања и да засноват работен однос. Списокот е со податоци за: - Име и презиме на кандидатот; дата на раѓање; степен на образование, односно научен степен; наслов на научниот степен; каде и кога го завршил образованието, односно се стекнал со научен степен; доколку е во работен однос да се наведе институцијата каде работи и звањето во кое е избран. - Писмена изјава од кандидатот за избор на наставник дека е подготвен да заснова работен однос согласно Законот за високото образование.	
Материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираните студиски програми најмалку за стандардното траење на програмите: - Список на опрема и на наставни средства (по вид,број и намена) за вршење на дејноста што одговараат на нормативите и стандардите за вршење на високообразовна дејност	
Процедурите што се предвидуваат за контрола, обезбедување и унапредување на квалитетот на наставата во предложените студиски области	
Научно- истражувачката, односно уметничко-творечката дејност на академскиот кадар и учеството на студентите докторанти во неа	
Планираниот број студенти	

Документација за обезбедени сопствени простории или простории под закуп кои се соодветни за вршење на високообразовна дејност, како: - заверена копија од Одлуката на Владата на Република Македонија за доделување на градежно земјиште сопственост на Република Македонија, кога објектот за вршење на високообразовна дејност е во фаза на изградба на тоа земјиште; - имотен лист издаден од Државниот завод за геодетски работи за сопственоста на основачот на градежното земјиште на коешто се гради објектот за вршење на високообразовна дејност; - заверена копија од одобрението за градење на објектот наменет за вршење на високообразовна дејност доколку тој е во процес на изградба.	
Начин на кој ќе бидат исполнети и другите услови утврдени со Уредбата за нормативите и стандардите, Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации	

Прилог бр.2. Список на потребните податоци и пропратната документација за основање на приватна високообразовна установа

Основач, со предлог одлука за основање на приватна високообразовна установа, со податоци за: - подрачјата, полињата и областите во кои ќе се врши високообразовна дејност; - видот, називот и седиштето на високо-образовната установа; - изворот и начинот на финансирањето; - правата и обврските на основачот; - други податоци што се од значење за основањето на високообразовната установа.	
Студиските подрачја во кои ќе се остварува високообразовната и научно-истражувачката дејност	
Начинот на кој високообразовната установа ќе ги остварува својата мисија и цели	
Единиците во состав на високообразовната установа	
Студиските програми со составни делови согласно законот	
Изворот на финансиски средства за вршење на високообразовна дејност и обезбедување на квалитетна финансиска гаранција најмалку за стандардното траење на програмата. Се доставува: - Финансиски план за одржливо ниво на финансирање на приватната високообразовна установа во траење од пет години (прв и втор циклус на студии), односно три години за висока стручна школа;	

- Оригинален документ или заверена копија кај нотар од документот издаден од банка, државен орган или друга институција за обезбедени средства како гаранција за надомест на школарината и на другите трошоци во случај високообразовната установа да престане пред време.	
Можноста за обезбедување на потребен број лица кои можат да бидат избрани во наставнно-научни, научни и наставни звања за сите предметни програми во студиската програма, најмалку за првите две години на студиите. Списокот е со податоци за: - Име и презиме на кандидатот; дата на раѓање; степен на образование, односно научен степен; наслов на научниот степен; каде и кога го завршил образованието, односно се стекнал со научен степен; доколку е во работен однос да се наведе институцијата каде работи и звањето во кое е избран. - Писмена изјава од кандидатот за избор на наставник дека е подготвен да заснова работен однос согласно Законот за високото образование.	
Материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираните студиски програми најмалку за стандардното траење на програмите: - Список на опрема и на наставни средства (по вид,број и намена) за вршење на дејноста што одговараат на нормативите и стандардите за вршење на високообразовна дејност	
Процедурите што се предвидуваат за контрола, обезбедување и унапредување на квалитетот на наставата во предложените студиски области	
Научно-истражувачката, односно уметничко-творечката дејност на академскиот кадар и учеството на студентите докторанти во неа	
Планираниот број студенти	
Резултати од изведена самоевалуација	
Документација за обезбедени сопствени простории или простории под закуп кои се соодветни за вршење на високообразовна дејност, како: - заверена копија кај нотар од документот (решение, договор и др.) за сопственоста на основачот на простории наменети за изведување на високообразовната дејност; - заверена копија од договорот за користење простории под закуп за вршење на високообразовна дејност, што основачот го склучил со сопственикот на просториите; - заверена копија од Одлуката на Владата на Република Македонија за доделување на градежно земјиште сопственост на Република Македонија, кога објектот за вршење на високообразовна дејност е во фаза на изградба на тоа земјиште;	

- имотен лист издаден од Државниот завод за геодетски работи за сопственоста на основачот на градежното земјиште на коешто се гради објектот за вршење на високообразовна дејност; - заверена копија од одобрението за градење на објектот наменет за вршење на високообразовна дејност доколку тој е во процес на изградба.	
Начин на кој ќе бидат исполнети и другите услови уредени со Уредбата за нормативите и стандардите, Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации	
Одобрение од Владата на Република македонија кога странско правно или физичко лице основа приватна високообразовна установа.	

Прилог бр. 3. Список на потребните податоци и пропратна документација за акредитација на нова студиска програма во рамките на акредитирана високообразовна установа

Карта на високообразовната установа (Прилог бр. 5)	
Одлука од надлежните органи на високообразоввната установа согласно со чл. 104 став 1 од Законот за високото образование за нова студиска програма	
Опис на содржината на студиската програма согласно со законот и правилникот за задолжителните компоненти	
Услови за запишување и напредување во текот на студиите	
Методите на предавање и оценување на постигнувањата на студентите, односно начинот на проверка на знаењата	
Стручниот, односно научниот назив определен согласно статутот на високообразовната установа	
Изворот на финансиски средства за остварување на студиската програма. - За јавни високообразовни установи: мислење од Советот за потребата и можностите за финансирање на студиската програма. - За приватни високообразовни установи: оригинален документ или заверена копија кај нотар од документот издаден од банка, државен орган или друга институција за обезбедени средства како гаранција за надомест на школарината и на другите трошоци во случај високообразовната установа да престане пред време.	
Обезбеденоста на потребен број лица во наставно-научни, научни и наставни звања за сите предметни програми во студиската програма, најмалку за првите две години на студиите:	

Списокот е со податоци за: - Име и презиме на кандидатот; дата на раѓање; степен на образование, односно научен степен; наслов на научниот степен; каде и кога го завршил образованието, односно се стекнал со научен степен; доколку е во работен однос да се наведе институцијата каде работи и звањето во кое е избран. - Доколку кадарот се обезбедува од постојниот наставен кадар на високообразовната установа, во списокот да се наведат и податоци за наставните претмети што ги предаваат со вкупниот фонд на часови. - Писмена изјава од кандидатот за избор на наставник дека е подготвен да заснова работен однос согласно Законот за високото образование.	
Материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираната студиска програма најмалку за стандардното траење на програмата: - Список на опрема и на наставни средства (по вид,број и намена) за вршење на дејноста што одговараат на нормативите и стандардите за вршење на високообразовна дејност	
Активностите и механизмите преку кои се развива и се одржува квалитетот на високото образование	
Научно-истражувачката, односно уметничко-творечката дејност на академскиот кадар и учеството на студентите докторанти во неа	
Планираниот број студенти	
Документација за обезбедени простории кои што се соодветни за изведување на новата студиска програма, согласно Уредбата за нормативите и стандардите за основање на високообразовни установи и за вршење на високообразовна дејност.	
Начинот на кој ќе бидат исполнети и другите услови утврдени со Уредбата за нормативите и стандардите, Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации	

Прилог бр. 4. Список на потребните податоци и пропратна документација за вршење на високообразовна дејност од странска високообразовна установа на територијата на Република Македонија

Податоци за странската високообразовна установа: - Карта на високообразовната установа (Прилог. бр. 5); - Документација за признат статус (акредитација) на високообразовната установа и право да врши високообразовна дејност издадена од орган во државата од каде потекнува странската високообразовна установа.	

Студиските подрачја во кои ќе се остварува високообразовната дејност	
Опис на студиските програми	
Изворот на финансиски средства за вршење на високообразовна дејност и обезбедување на квалитетна финансиска гаранција најмалку за стандардното траење на програмата: - Финансиски план за одржливо ниво на финансирање на приватната високообразовна установа во траење од пет години (прв и втор циклус на студии), односно три години за висока стручна школа; - Оригинален документ или заверена копија кај нотар од документот издаден од банка, државен орган или друга институција за обезбедени средства како гаранција за надомест на школарината и на другите трошоци во случај високообразовната установа да престане пред време.	
Можноста за обезбедување на потребен број лица во наставно-научни, научни и наставни звања за сите предметни програми во студиската програма, најмалку за првите две години на студиите: - Име и презиме на кандидатот; дата на раѓање; степен на образование, односно научен степен; наслов на научниот степен; каде и кога го завршил образованието, односно се стекнал со научен степен; доколку е во работен однос да се наведе институцијата каде работи и звањето во кое е избран. - Писмена изјава од кандидатот за избор на наставник дека е подготвен да заснова работен однос согласно Законот за високото образование.	
Материјалните, техничките и информациските услови за изведување на планираните студиски програми најмалку за стандардното траење на програмите: - Список на опрема и на наставни средства (по вид,број и намена) за вршење на дејноста што одговараат на нормативите и стандардите за вршење на високообразовна дејност	
Активностите и механизмите преку кои се развива и се одржува квалитетот на високото образование	
Планираниот број студенти	
Документација за обезбедени сопствени простории или простории под закуп кои се соодветни за вршење на високообразовна дејност, како: - заверена копија кај нотар од документот (решение, договор и др.) за сопственоста на основачот на простории наменети за изведување на високообразовната дејност; - заверена копија од договорот за користење простории под закуп за вршење на високообразовна дејност, што основачот го склучил со сопственикот на просториите.	

Начин на кој ќе бидат исполнети и другите услови утврдени со Уредбата за нормативите и стандардите; Правилникот за задолжителните компоненти и со Уредбата за Националната рамка на високообразовните квалификации	
Меѓудржавен договор за соработка во доменот на образованието и науката на Република Македонија и земјата на странската високообразовна установа	

Прилог бр. 5. Карта на високообразовната установа

Назив на високообразовната установа	
Седиште	
Веб страница	
Вид на високообразовната установа (јавна, приватно-јавна непрофитна, приватна непрофитна, приватна профитна)	
Податоци за основачот (на приватна високообразовна установа)	
Податоци за последната акредитација	
Студиски и научноистражувачки подрачја за кои е добиена акредитација	
Единици во состав на високообразовната установа	
Студиски програми што се реализираат во единицата која бара проширување на дејноста со воведување на нова/и студиска/и програма/и	
Податоци за меѓународна соработка на планот на наставата, истражувањето и мобилноста на студентите	
Податоци за просторот наменет за изведување на наставната и истражувачката дејност	
Податоци за опремата за изведување на наставната и истражувачката дејност	
Број на студенти за кои е добиена акредитација	
Број на студенти (првпат запишани)	
Број на лица во наставно-научни, научни и наставни звања	
Број на лица во соработнички звања	
Однос наставник: студенти (број на студенти на еден наставник) за секоја единица одделно	
Внатрешни механизми за обезбедување и контрола на квалитетот на студиите	
Фреквенција на самоевалуациониот процес (секоја година, на две години, на три години)	
Податоци за последната спроведена надворешна евалуација на установата	
Други податоци кои установата сака да ги наведе како аргумент за нејзината успешност	

Претседател
на Одборот за акредитација и евалуација,
проф. др. **Михаил Петковски**, с.р.

Службен весник на Република Македонија

www.slvesnik.com.mk contact@slvesnik.com.mk

Издавач: ЈП СЛУЖБЕН ВЕСНИК НА РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА, ц.о.-Скопје
бул. „Партизански одреди“ бр. 29. Поштенски фах 51.
Директор и одговорен уредник – м-р Тони Трајанов.
Телефон: +389-2-55 12 400.
Телефакс: +389-2-55 12 401.

Претплатата за 2012 година изнесува 10.100,00 денари.
„Службен весник на Република Македонија“ излегува по потреба.
Рок за рекламации: 15 дена.
Жиро-сметка: 300000000188798.
Депонент на Комерцијална банка, АД - Скопје.
Печат: ГРАФИЧКИ ЦЕНТАР ДООЕЛ, Скопје.

ISSN 0354-1622
2012151