«Приложение № 5

к Постановлению Правительства

 № 686 от 13 сентября 2012 г.

**МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

**по контролю нежелательных веществ в корме**

**1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНОГО
И ОБЩЕГО ГОССИПОЛА**

**1.1. Цель и область применения**

Настоящий метод позволяет определить уровень свободного госсипола, общего госсипола и родственных ему химических веществ из семян хлопчатника, муки из семян хлопчатника и брикетов семян хлопчатника и комбикорма, содержащих это сырье, когда свободный госсипол, общий госсипол и химические вещества, родственные ему, присутствуют в концентрации, превышающей 20 мг/кг.

**1.2. Принцип применения**

Госсипол добывается в присутствии 3-аминопропан-1-ола либо с помощью смеси пропан-2-ола и гексана, для определения свободного госсипола или диметилформамида, для определения общего госсипола. Госсипол преобразуется с помощью анилина в госсипол-дианилин, оптическую плотность которого измеряют при длине волны 440 нм.

**1.3. Применяемые реагенты**

1.3.1. Смесь пропан-2-ола-гексана: смешивают 60 объемных частей пропан-2-ола с 40 объемными частями *н-*гексана.

1.3.2. Растворитель A: вводят в 1 литровую мерную колбу примерно 500 мл смеси пропана-2-ола-гексана, 2 мл 3-аминопропана-1-ола, 8 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл воды. Доводится до объема смесью пропана-2-ола-гексана. Этот реагент стабилен в течение одной недели.

1.3.3. Растворитель В: вводят 2 мл 3-аминопропана-1-ола и 10 мл ледяной уксусной кислоты в мерную колбу объемом 100 мл.

Охлаждают при комнатной температуре и доводят до объема N,N-диметилформамидом. Этот реагент стабилен в течение одной недели.

1.3.4. Анилин: если оптическая плотность контрольной пробы превышает 0,022, анилин дистиллируется над цинковой пылью, с удалением первых и последних долей 10% дистиллята. Охлажденный в холодильнике и сохраненный в сосуде из коричневого стекла с пробкой, этот реагент сохраняется в течение нескольких месяцев.

1.3.5. Стандартный раствор госсипола A: помещают 27,9 мг ацетатного госсипола в 250 мл мерную колбу. Растворяют и доводят до нужного объема растворителем А. Вводят 50 мл этого раствора в 250 мл мерную колбу и доводят до объема растворителем А. Концентрация госсипола этого раствора составляет 0,02 мг/мл. Перед использованием оставляют в течение часа при комнатной температуре.

1.3.6. Стандартный раствор госсипола B: вводят 27,9 мг ацетатного госсипола в 50 мл мерную колбу, растворяют и доводят до нужного объема с помощью растворителя В. Концентрация госсипола из данного раствора составляет 0,5 мг/мл.

Стандартные растворы госсипола А и В остаются стабильными в течение 24 часов, если они защищены от воздействия света.

**1.4. Измерительные приборы**

1.4.1. Смеситель: около 35 об/мин.

1.4.2. Спектрофотометр.

**1.5. Процедура подготовки**

1.5.1. Исследуемая проба

Количество используемой исследуемой пробы зависит от предполагаемого содержания госсипола в пробе. Работать необходимо с небольшой пробой и относительно большой аликвотной частью фильтрата, чтобы получить достаточно госсипола для точного фотометрического измерения. Для определения свободного госсипола в семенах хлопчатника, муки семян хлопчатника и брикетов семян хлопчатника, исследуемый образец не должен превышать 1 г. Для комбикормов он может составлять не более 5 г. 10 мл аликвотной части фильтрата достаточно в большинстве случаев. Она содержит от 50 до 100 мкг госсипола. Для определения общего госсипола исследуемый образец составляет от 0,5 до 5 г, для того, чтобы 2 мл аликвотная часть фильтрата содержала от 40 до 200 мкг госсипола.

Анализ осуществляется при комнатной температуре около 20°C.

1.5.2. Определение свободного госсипола

Помещают исследуемый образец в колбу на 250 мл, дно колбы должно быть покрыто дробленым стеклом. С помощью пипетки добавляют 50 мл растворителя A, закрывают пробкой колбу и перемешивают в течение одного часа в смесителе. Фильтруют через сухой фильтр и собирают фильтрат в небольшую колбу со шлифованным горлышком. В процессе фильтрации покрывают воронку часовым стеклом.

Вводят одинаковые аликвотные части фильтрата, содержащие 50-100 мкг госсипола в каждой из двух мерных 25 мл колб (А и B). При необходимости, доводят объем до 10 мл растворителем A. Затем содержимое колбы A дополняют до объема смесью пропан-2-ол-гексана. Этот раствор используется в качестве ориентировочного раствора, по которому можно измерить растворный образец.

Вводят 10 мл растворителя А в каждую из двух других 25 мл мерных колб (C и D). Содержимое колбы C доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана. Этот раствор будет использоваться в качестве ориентировочного раствора, по которому можно измерить исследуемое контрольное вещество.

Добавляют 2 мл анилина в каждую из колб D и B. Нагревают в течение 30 минут на кипящей водяной бане до появления цвета. Охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа.

Определяют оптическую плотность контрольного исследуемого вещества D в сравнении с ориентировочным раствором C, а также оптическую плотность исследуемого раствора B в сравнении с ориентировочным раствором А, спектрофотометром при 440 нм с использованием стеклянных клеток 1 см.

Вычитают оптическую плотность контрольного вещества из исследуемого раствора, что представляет собой исправленную оптическую плотность. Из этого значения рассчитывают содержание свободного госсипола, как описано в пункте 1.6. настоящего приложения.

1.5.3. Определение общего госсипола

Помещают исследуемый образец, содержащий 1-5 мг госсипола, в 50 мл мерную колбу и добавляют 10 мл растворителя B. В это же время подготавливают контрольный образец, помещая 10 мл растворителя B в другую 50 мл мерную колбу. Нагревают обе колбы в течение 30 минут на кипящей водяной бане.

Охлаждают при комнатной температуре и содержимое каждой колбы доводят до объема с помощью смеси пропан-2-ол-гексана. Стабилизируют и оставляют оседать в течение 10-15 минут, затем фильтруют и собирают фильтраты в колбы со шлифованным горлышком.

Вводят 2 мл фильтрата образца в каждую из двух 25 мл колб и 2 мл фильтрата контрольного теста в каждую из двух других 25 мл колб. Дополняют содержимое одной колбы из каждой серии до 25 мл пропан-2-ол-гексаном. Эти растворы используются в качестве ориентировочных растворов.

Добавляют 2 мл анилина в каждую из двух других колб. Нагревают в течение 30 минут на кипящей водяной бане до появления цвета. Охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема 25 мл смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа.

Определяют оптическую плотность в соответствии с указаниями из пункта 1.5.2. для свободного госсипола. Из этого значения рассчитывают содержание общего госсипола, как указано в пункте 1.6. настоящего приложения.

**1.6. Расчет результатов**

Результаты могут быть пересчитаны на основании удельной оптической плотности, указанной в подпункте 1.6.1. настоящего приложения, либо ссылаясь на калибровочную кривую, в соответствии с положениями, описанными в подпункте 1.6.2. настоящего приложения.

1.6.1. С помощью удельной оптической плотности

Удельной оптической плотностью, согласно описанию, являются:

1. Свободный госсипол E × 1%/1 см = 625;
2. Общий госсипол E × 1%/1 см = 600.

Содержание свободного и общего госсипола в образце рассчитывается по следующей формуле:

% госсипола: E × 1250/E 1% 1 см × p× a,

где:

E = скорректированная оптическая плотность, определенная согласно указаниям в подпункте 1.5.2. настоящего приложения;

р = исследуемый образец, в г;

a = аликвотная часть фильтрата, в мл.

1.6.2. С помощью калибровочной кривой

1) Свободный госсипол

Подготавливают две серии из пяти 25 мл градуированных колб. Титруется 2, 4, 6, 8 и 10 мл стандартного раствора госсипола A в каждой серии колб. Доводят до объема 10 мл растворителем А. Заполняют каждую серию 25 мл мерной колбой, содержащей только 10 мл растворителя А, что представляет собой контрольный тест.

Доводят до 25 мл объем колб из первой серии, в том числе колбу контрольного теста, смесью пропан-2-ол-гексана, которые представляют собой ориентировочные серии.

Добавляют 2 мл анилина в каждую колбу из второй серии, в том числе колбу контрольного образца. Нагревают в течение 30 минут в кипящей водяной бане до появления цвета. Охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа, которые представляют собой стандартные серии.

Определяют, согласно указаниям из подпункте 1.5.2. настоящего приложения, оптическую плотность растворов из стандартных серий, в сравнении с соответствующими растворами из ориентировочных серий. Проводят калибровочную кривую путем графического изображения оптической плотности в сравнении с количеством госсипола, в мкг.

2) Общий госсипол

Подготавливают шесть градуированных колб по 50 мл. В первую колбу вводится 10 мл растворителя B, в остальные по 2, 4, 6, 8 и 10 мл стандартного раствора госсипола B. Дополняют содержание каждой колбы до 10 мл растворителем B. Нагревают в течение 30 минут в кипящей водяной бане. Охлаждают при комнатной температуре, заполняют объем смесью пропан-2-ол-гексана и стабилизируют.

Помещают 2 мл этого раствора в каждую из двух серий, состоящих из шести колб, каждая по 25 мл. Дополняют содержимое колб из первой серии приблизительно 25 мл смеси пропан-2-ол-гексана, которые представляют собой ориентировочные серии.

Добавляют 2 мл анилина в каждую колбу из второй серии, нагревают в течение 30 минут в кипящей водяной бане, охлаждают при комнатной температуре, доводят до объема смесью пропан-2-ол-гексана, стабилизируют и оставляют в течение часа, которые представляют собой стандартные серии.

Определяют, согласно указаниям подпункта 1.5.2. настоящего приложения, оптическую плотность растворов из стандартных серий в сравнении с соответствующими растворами из ориентировочных серий. Проводят калибровочную кривую путем графического изображения оптической плотности в сравнении с количеством госсипола, в мкг.

1.6.3. Повторяемость

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

15% в относительной величины, при содержании госсипола менее 500 частей на миллион;

75 частей на миллион в абсолютной величине, при содержании госсипола минимум 500 и максимум 750 частей на миллион;

10% в относительной величине до самого высокого значения при содержании госсипола более чем 750 частей на миллион.

**2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ДИОКСИНА
И УРОВНЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННОГО БИФЕНИЛА, СХОЖИХ С ДИОКСИНОМ**

**I. Методы отбора и интерпретации результатов анализа**

**2.1. Цель и область применения**

Пробы, предназначенные для официального контроля уровня диоксинов, как полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД) полихлорированные дибензофураны (ПХДФ) и полихлорированные бифенилы (ПХБ) типа диоксинов и ПХБ, не принадлежащие к типу диоксинов из кормов, указанных в таблице 1 настоящего приложения, схожие с диоксином в кормах, отбираются в соответствии с указаниями приложения № 1. Необходимо применять количественные требования к контролю веществ или продуктов, равномерно распределенных в корме, как указано в главе 3 раздела I приложения № 1 к настоящему постановлению. Коллективные пробы, полученные таким образом, считаются представительными для партий или подпартий, из которых они отбираются. Соблюдение максимальных уровней, установленных в Постановлении Правительства № 1405 от 10 декабря 2008 года «Об утверждении Ветеринарно-санитарной нормы по гигиене кормов и содержанию нежелательных веществ в кормах», устанавливается на основании уровней, определенных в лабораторных пробах.

Методы скрининга представляют собой методы, используемые для отбора проб с уровнями ПХДД/ПХДФ и ПХБ типа диоксинов, превышающих максимальные уровни или пороги действия. Они предоставляют повышенную способность анализа проб, эффективного с точки зрения расходов, увеличивая, таким образом, шанс обнаружить новые случаи с высоким уровнем выражения и рисками для здоровья, важными для потребителей.

Методы скрининга основываются на биоаналитических методах и методах GC-MS. Результаты проб, превышающие предельное значение для проверки соответствия с максимальным уровнем, должны быть проверены новым полным анализом из оригинальной пробы путем подтверждающего метода.

Подтверждающими методами являются методы, предоставляющие полную или дополнительную информацию, позволяющую точно идентифицировать и квантифицировать ПХДД/ПХДФ и ПХБ типа диоксинов на максимальном пороге или, при необходимости, на пороге действия. Подобные методы используют газовую хроматографию/ масс-спектрометрию высокого разрешения (GC-HRMS) или газовую хроматографию/ тандемную масс-спектрометрию в (GC-MS/MS).

**2.2. Соответствие партии или подпартии характеристикам**

Партия допускается, если аналитический результат одного анализа не превышает максимальное содержание, установленное Постановлением Правительства № 1405 от 10 декабря 2008 года, с учетом погрешности измерения.

Партия не соответствует максимальному уровню, установленному в Постановлении Правительства № 1405 от 10 декабря 2008 года, если аналитический результат по максимальному пределу, подтвержденный параллельным исследованием, превышает с допустимой степенью достоверности максимальное содержание.

|  |
| --- |
| Таблица 1  **Таблица токсичных равнозначных факторов для диоксинов, фуранов и диоксиноподобных соединений ПХБ** |
| **Схожие (та же группа)** | **Значение TEF** | **Схожие (та же группа)** | **Значение TEF** |
| Дибензо-п-диоксин (ПХДД) дибензофураны (ПХДФ) |  | Диоксиноподобные соединения ПХБ |  |
| 2,3,7,8-TCDD | 1 |  | 0,0001 |
| 1,2,3,7,8-PeCDD  | 1 | Нон-орто ПХБ |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | 0,1 | ПХБ 77 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | 0,1 | ПХБ 81 | 0,0003 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | 0,1 | ПХБ 126 | 0,1 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD  | 0,01 | ПХБ 169 | 0,03 |
| OCDD | 0,0003 | Моно-орто ПХБ |  |
| Дибензофураны (ПХДФ) |  | ПХБ 105 | 0,00003 |
| 2,3,7,8-TCDF | 0,1 | ПХБ 114 | 0,00003 |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 0,03 | ПХБ 118 | 0,00003 |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 0,3 |  |  |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 0,1 | ПХБ 123 | 0,00003 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 0,1 | ПХБ 156 | 0,00003 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 0,1 | ПХБ 157 | 0,00003 |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 0,1 | ПХБ 167 | 0,000003 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0,01 | ПХБ 189 | 0,00003 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 0,01 |  |  |
| OCDF | 0,0003 |
| Использованные сокращения:TEF- факторы токсической эквивалентности; Т = тетра; Pe = пента; Нх = гекса; Нр = гепта; O = окта; CDD = хлордибензо-п-диоксин; CDF = хлордибензофуран; CB = хлорированные бифенилы |
|  |

Погрешность измерения можно рассчитать одним из двух способов:

1) подсчитывая расширенную погрешность при помощи коэффициента покрытия 2, который дает примерную достоверность 95%. Партия не считается соответствующей, если измеренное значение минус U больше максимального уровня.

В случае отдельного определения диоксинов и диоксиноподобных ПХБ определенная сумма расширенной погрешности отдельных аналитических результатов диоксина и диоксиноподобных ПХБ используется для суммы диоксинов и диоксиноподобных ПХБ;

2) установленный предел определения (CCα) – уровень, при котором и от которого разрешается сделать вывод с вероятностью ошибки α, что образец не соответствует.

Предел определения устанавливается в соответствии с требованиями для идентификации или идентификации и квантификации.

Партия является несоответствующей, если измеренное значение равно или превышает CCα.

**II. ПОДГОТОВКА ПРОБ И ТРЕБОВАНИЙ К ИСПОЛЬЗОВАННЫМ МЕТОДАМ АНАЛИЗА ДЛЯ ОФИЦИАЛЬНОГО КОНТРОЛЯ УРОВНЕЙ ДИОКСИНОВ (ПХДД/ПХДФ) И
ДИОКСИНОПОДОБНЫХ ПХБ**

**2.1. Цель и область применения**

Настоящие требования применяются, когда корма и сырье для кормов исследованы для выявления диоксинов, таких как полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД) и полихлорированные дибензофураны (ПХДФ)] и полихлорированные бифенилы (ПХБ).

Мониторинг присутствия диоксинов в кормах может быть достигнут посредством стратегии, предусматривающей утвержденный метод, в целях отбора тех же образцов с уровнем диоксинов и диоксиноподобных ПХБ, имеющих значения менее чем на 25% выше или ниже интересующего уровня. Концентрация диоксинов в образцах, в которых выявлены значительные уровни, определяется/подтверждается утвержденным методом.

Утвержденными методами являются методы, используемые для обнаружения присутствия диоксинов и диоксиноподобных ПХБ в концентрациях, представляющих интерес. Эти методы обладают высокой способностью к обработке образцов и используются для сортировки по категориям большого количества потенциально положительных образцов. Предназначены специально для избежания ложных отрицательных результатов.

Утвержденными методами являются методы, которые предоставляют полную или дополнительную информацию, позволяющую обнаружение и достоверную квантификацию диоксинов и диоксиноподобных ПХБ в концентрациях, представляющих интерес.

**2.2. Контекст**

Учитывая, что экологические и биологические образцы, в том числе отбор проб из корма/сырья, как правило, содержат комплексное соединение смесей различных соединений диоксина, была разработана концепция факторов токсической эквивалентности (КТЭ) для содействия оценке рисков. Эта КТЭ была создана для выражения концентрации смесей 2,3,7,8-замещенных ПХДД и ПХДФ и неорто ПХБ и моно-орто-замещенных хлором с аналогичной деятельностью диоксина в токсичных эквивалентах (ТЭ) 2, 3, 7, 8-ТХДД. Концентрации отдельных веществ в данном образце умножаются на значение TEF, а затем суммируются для получения общей концентрации соединений диоксиноподобных ПХБ, выраженной в ТЭ.

Принятый специальный уровень квантификации для отдельных соединений является концентрацией аналита в пробе экстракта, производящей инструментальный ответ для двух различных ионов, которые должны быть рассмотрены на соотношение S/Z (сигнал/шум) как 3:1 для наименее чувствительного сигнала, и отвечает основным условиям, например, таким, как время удержания и изотопное соотношение.

В случае если по техническим причинам расчет соотношения сигнал/шум не предоставляет надежные результаты, самая низкая точка концентрации на кривой эталонирования, предоставляющая допустимое (≤ 30 %) и связное отклонение (измеренное как минимум в начале и в конце серии аналитических проб) от среднеотносительного отвечающего фактора, рассчитанного для всех пунктов кривой эталонирования для каждой серии проб. Предел квантификации (LOQ) вычисляется от самой низкой точки концентрации с учетом восстановления внутренних проб и отбора проб.

Биоаналитические методы скрининга не дадут результат на уровне одного вида, а только указание уровня ТЭ, выраженного в биоаналитических эквивалентах (БЭ), так как не все соединения, присутствующие в экстракте пробы, дающей ответ в рамках теста, могут выполнять все требования ТЭ-принципа.

Результаты, полученные при отборе одной части из партии кормов, считаются действительными для всех кормов того же класса или с тем же описанием из соответствующей партии.

**2.3. Требования к обеспечению контроля за качеством, которые должны быть соблюдены при подготовке проб**

Применяются общие положения по подготовке образцов для анализа, изложенные в приложении № 2 к настоящему постановлению.

Также должны выполняться следующие требования:

1) образцы хранятся и транспортируются в сосудах из стекла, алюминия, полипропилена или полиэтилена. Из контейнеров, содержащих образцы, должны быть удалены остатки бумажной пыли. Посуда предварительно промывается контролируемыми растворителями для обнаружения диоксинов;

2) осуществляется контрольный анализ путем проведения всей аналитической процедуры, с исключением только образца;

3) вес использованного для экстракции образца должен быть достаточным для выполнения требований относительно чувствительности;

4) проводится контроль реактивов, посуды и оборудования для предотвращения и исключения возможного оказания влияния на базовые результаты ТЭ или БЭ;

5) для биоаналитических методов вся посуда и все растворители, используемые в ходе анализа, проверяются на наличие соединений, мешающих обнаружению целевых соединений в рабочий интервал. Посуда промывается растворителем или прогревается на высоких температурах для удаления следов ПХДД/ПХДФ, соединений типа диоксинов и интерферирующих соединений с ее поверхности;

6) количество используемого для экстракции образца, необходимого для выполнения требований относительно сокращенного рабочего интервала, в том числе концентрации максимальных уровней или порога действия;

7) в той мере, в которой это является релевантным, каждая лабораторная проба измельчается и тщательно смешивается способом, посредством которого реализуется полная гомогенизация, как, например, проба, измельченная таким образом, чтобы проходить через сито с ячейками диаметром 1 мм. Пробы сушатся до измельчения, если коэффициент влажности слишком большой.

**2.4. Требования, примененные к национальной референтной лаборатории**

1) Национальная референтная лаборатория должна доказать эффективность метода на уровне интересов с приемлемым коэффициентом вариации при повторном анализе.

2) Уровень квантификации для подтверждающего метода должен находиться в пределах одной пятой от уровня интереса для гарантирования того, что на уровне заинтересованности будут выполнены приемлемые коэффициенты изменения.

3) Чтобы внутренние меры контроля качества были осуществлены должны регулярно проводиться контрольные исследования с зараженными образцами или анализ некоторых контрольных проб посредством сертифицированного ориентировочного материала.

4) Участие в межлабораторных исследованиях для определения постоянных диоксинов и диоксиноподобных ПХБ в структуре питания/корма.

5) Национальная референтная лаборатория для анализа проб, отобранных во время официального контроля, должна быть аккредитована в соответствии с национальным стандартом МС ИСО/МЭК 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

6) Национальная референтная лаборатория, применяющая методы скрининга для рутинного контроля проб, тесно сотрудничают с лабораториями, применяющими подтверждающий метод, как для контроля качества, так и для подтверждения аналитического результата подозрительных проб.

**2.5. Требования к аналитическим процедурам для диоксинов и диоксиноподобных ПХБ**

Основные требования для принятия аналитических процедур:

1) Высокая чувствительность и низкий предел обнаружения. Для ПХДД и ПХДФ обнаруживаемые количества должны быть в фемтограммах ТЭ (10-15 г), по причине крайней токсичности некоторых из этих соединений. Известно, что ПХБ находятся на более высоком уровне, чем ПХДД и ПХДФ. Для большинства ПХБ-подобных чувствительность разряда нанограмм (10-9 г) считается удовлетворительной. Для измерения более токсичных диоксиноподобных ПХБ, в частности, неорто-замещенных того же вида, нижний предел рабочего интервала достигает на низких уровнях порядка пикограмм (10-12 г). Для всех других ПХБ-подобных предел квантификации порядка нанограмм (10-9 г) является достаточным и должна быть достигнута идентичная чувствительность как для ПХДД, так и ПХДФ.

2) Для повышенной избирательности следует различать ПХДД, ПХДФ и диоксиноподобные ПХБ в связи с множеством других выявленных соединений и возможных интерференций, присутствующих в концентрациях, до нескольких порядков значений, превышающих присутствующие в исследуемых аналитах. Для методов газовой хроматографии/масс-спектрометрии - GC/MS необходимо различие между различными соединениями, например, между токсичными соединениями, как, например, семнадцать ПХДД, ПХДФ, замещенные 2,3,7,8 и диоксиноподобными ПХБ, и другие. Биопробы должны позволить определение выборочных значений TEQ, как сумма ПХДД, ПХДФ и диоксиноподобных ПХБ.

Целью чистки проб является удаление соединений, которые могут привести к ложным несоответствующим результатам или соединениям, которые могут уменьшить результат, приведя к ложным соответствующим результатам.

3) Для высокой тщательности необходимо, чтобы определение обеспечивало достоверную и надежную оценку действительной концентрации в образце. Высокая тщательность необходима для избежания отклонения результата анализа образца в виду уменьшенной надежности оценки TEQ. Тщательность выражается в точности, которая представляет разницу между средним значением измеряемой концентрации для аналита из сертифицированного материала и сертифицированного значения, выраженной в процентах от этой величины, и достоверностью (RSDR), стандартное относительное отклонение рассчитывается на основании результатов, полученных в условиях воспроизводимости.

Методы отбора биопроб включают в себя и методы GC/MS. Подтверждающие методы включают газовую хроматографию высокого разрешения/высокую разрешенную масс-спектрометрию (HRGC/HRMS).

Лаборатории демонстрируют показатели метода в интервале максимального уровня, например, 0,5х, 1х и 2х максимальный уровень, c коэффициентом колебания, применимым для повторного анализа во время процедуры утверждения и во время рутинного анализа.

В качестве внутренних мер контроля качества периодически проводятся проверки контрольного образца, эксперименты с обогащением или анализы контрольных проб, если возможно, сертифицированным ориентировочным материалом. Регистрируются и проверяются графики контроля качеств для контрольного образца, эксперименты с обогащением или анализы контрольных проб, для гарантирования, что аналитические показатели соответствуют требованиям.

Для биоаналитического метода скрининга установление предела квантификации не представляет собой крайне необходимое требование, однако метод должен доказать, что может провести отличие между контрольным значением и предельным значением. При предоставлении уровня БЭ устанавливается уровень отчетности для принятия решений, связанных с пробами, представляющими собой ответ под этим уровнем.

Уровень отчетности должен быть отличным от контрольных проб в рамках процедуры минимум на один фактор из трех, на один ответ, ниже рабочего интервала. Следовательно, рассчитывается исходя из проб, содержащих целевые соединения вокруг необходимого минимального уровня, а не из соотношения знак/шум или контрольного теста.

Для общего значения ТЭ должны соблюдаться следующие критерии, указанные в таблице 2 настоящего приложения:

|  |
| --- |
| Таблица 2   **Общее значение ТЭ**   |
|  | **Методы обнаружения** | **Подтверждающие методы** |
| Ложные отрицательные темпы | < 5% |  |
| Точность |  | –20% до +20% |
| Достоверность RSDR | < 25% | < 15% |
| Повторяемость RSDr | < 20% |  |

2.5.1. Как методы GC-MS, так и биоаналитические методы могут быть использованы для скрининга. Для методов GC-SM должны соблюдаться требования, предусмотренные в пункте 2.6. настоящего приложения. Для клеточных биоаналитических методов предусмотрены специфические требования в пункте 2.7 настоящего приложения.

Лаборатории, применяющие методы скрининга для рутинного контроля проб, тесно сотрудничают с лабораториями, применяющими подтверждающий метод.

Проверка возможного подавления клеточного ответа и цитотоксичности 20% из экстрактов проб измеряются в рутинном скрининге с и без 2,3,7,8-TCDD, который добавляется в зависимости от максимального уровня или порога действия, для проверки, если ответ, возможно, подавляется интерферирующими веществами, присутствующими в экстракте пробы. Измеренная концентрация обогащенной пробы сравнивается с суммой концентрации необогащенного экстракта, плюс концентрация с обогащением. Если эта измеренная концентрация более чем на 25% меньше рассчитанной концентрации, она указывает на возможность удаления сигнала, а соответствующая проба подвергается подтверждающему анализу посредством GC-HRMS. Результаты отображаются в графиках контроля качества.

Примерно 2-10 % соответствующих проб, в зависимости от матрицы пробы и опыта лаборатории, подтверждаются посредством GC-HRMS.

По меньшей мере, в условиях утверждения биоаналитические методы предоставляют действительно указание уровня ТЭ, рассчитанного и выраженного в БЭ.

И для биоаналитических методов, проведенных в условиях повторяемости, внутрилабораторное значение RSDr, в общем, является ниже RSDR, что представляет собой воспроизводимость.

2.5.2 Определение ложных соответствующих коэффициентов, исходя из данных контроля качества.

Определяется коэффициент ложных соответствующих результатов, вытекающих из скрининга проб, до и более максимального уровня или порога действия. Реальные ложные соответствующие коэффициенты составляют до 5%. В то время, как вследствие контроля качества соответствующих проб, доступно минимум 20 подтвержденных результатов на матрицу/группу матриц, заключения о ложном соответствующем коэффициенте должны быть взяты из этой базы данных. Результаты проб, анализируемых посредством внутрилабораторных тестирований или во время случаев заражения, покрывающих интервал концентраций до, например, 2х максимального уровня, могут быть также включены в те минимум 20 результатов для оценки ложного соответствующего коэффициента. Пробы покрывают самые частые образцы для подобных, представляя различные источники.

Несмотря на то, что целью тестов по скринингу является обнаружение проб, превышающих порог действия, критерий определения ложных соответствующих коэффициентов представляет собой максимальный уровень, учитывая недостоверность измерения подтверждающего метода.

**2.6. Специальные требования для GC-MS методов, которым необходимо следовать в целях скрининга или подтверждения**

1) Добавление внутренних стандартов ПХДД/Ф 2,3,7,8-замещенных хлора и диоксиноподобных ПХБ, отмеченных 13С, необходимо осуществить в начале проведения метода анализа, например, в начале экстракции, для признания аналитической процедуры. Необходимо добавить не менее чем одно соединение для каждой группы, соответствующей тетра-окта-хлорированным ПХДД/Ф и не менее чем одно соединение для каждой из утвержденных групп диоксиноподобных ПХБ, или в альтернативном случае, не менее чем одно соединение для каждого выбранного режима регистрирования выбранного иона методом масс-спектрометрии, использованным для мониторинга ПХДД/Ф и диоксиноподобных ПХБ.

Необходимо, чтобы существовало явное предпочтение, особенно для подтверждающих методов, для использования всех 17 внутренних стандартов ПХДД/Ф замещенных 2,3,7,8-хлор и отмеченных 13С, и всех 12 внутренних стандартов диоксиноподобных ПХБ, отмеченных 13С.

2) Определяются также относительные отвечающие факторы для тех соединений, в которые не добавляют 13С-меченных аналогов, используя соответствующие растворы для калибровки.

3) Для кормов растительного происхождения и кормов животного происхождения, содержащих менее 10% жира, обязательно добавление внутренних стандартов перед экстракцией. Для кормов животного происхождения, содержащих более 10% жира, внутренние стандарты могут быть добавлены либо перед экстракцией, либо после извлечения жира. Осуществляется соответствующий утвержденный метод проверки эффективности экстракции, в зависимости от стадии внедрения внутренних стандартов и способа указания результатов, в зависимости от продукта или жира.

4) Перед GC/MS анализом должны быть добавлены один или два восстановительных стандарта, которые представляют собой суррогатные стандарты.

5) Необходим восстановительный контроль. Для подтверждающих методов восстановление отдельных внутренних стандартов должно быть в пределах 60-120%. Утверждены и наименьшие или наибольшие восстановления для отдельных соединений, особенно для дибензодиоксинов и дибензофуранов гепта- и октахлорированных, до тех пор, пока их вклад в значение TEQ не превышает 10% от общего значения TEQ, основанное на сумме ПХДД/Ф и диоксиноподобных ПХБ. Для методов скрининга восстановление должно быть в пределах 30-140%.

6) Разделение диоксинов из хлорированных интерферентных соединений, таких как ПХБ, не схожих с диоксином и хлорированным дифенилэтером, достигается с помощью адекватных соответствующих хроматографических методов, желательно на колонке флорисила, алюминия и/или угольной.

7) Разделение изомеров методом газовой хроматографии составляет < 25% от пика до пика между 1,2,3,4,7,8-HxCDF и 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

8) Определение тетра-октохлорированных диоксинов и фуранов достигается за счет изотопного разбавления HRGC/HRMS.

9) Разница между верхним и нижним пределом не должна превышать 20% для кормов, характеризуемых заражением диоксином в пределах, или превышающих максимальный уровень заражения. Для кормов со значительно более низкими уровнями заражения разница может быть в диапазоне 25-40%.

**2.7. Аналитические методы для обнаружения**

2.7.1.1. Скрининг-подход

Могут применяться различные аналитические подходы с использованием метода скрининга.

Реакция образцов сравнивается с ориентировочным образцом до уровня интересов.

Требования:

1) В каждую исследуемую серию необходимо включать один контрольный образец и один ориентировочный, подлежащие экстрагированию и тестированию в то же время и в одинаковых условиях. Ориентировочный образец должен давать намного большие результаты по сравнению с контрольной группой.

2) Включаются дополнительные ориентировочные образцы 0,5х и 2х уровень интереса, чтобы продемонстрировать эффективность теста в промежутке интересов, для контроля уровня интереса.

3) При тестировании других матриц необходимо продемонстрировать, что ориентировочный образец или образцы являются соответствующими, желательно с включением и образцов, которые доказали посредством HRGC/HRMS, что имеют приблизительно такой TEQ уровень, как и ориентировочный образец или иначе зараженной партии на данном уровне.

4) Поскольку внутренние стандарты не могут быть использованы в биопробах, тесты на повторяемость очень важны, чтобы получить информацию о стандартном отклонении серии тестов. Коэффициент вариации должен быть не менее 30%.

5) Для биотестирования определяются целевые соединения, возможные интерференции и максимально допустимые уровни партии.

2.7.1.2. Количественный подход

Этот поход требует стандартных серий разбавления, процедуры очистки и двойного или тройного измерения, а также проверки восстановления и партии. Результат может быть выражен как TEQ, предполагая тем самым, что соединения, которые находятся в начале сигнала, соответствуют TEQ. Это достигается с помощью ТХДД или стандартной смесью диоксинов/фуранов/диоксиноподобных ПХБ для получения калибровочной кривой для расчета уровня TEQ в экстракте и, следовательно, в образце. Полученная сумма впоследствии исправляется значением TEQ, рассчитанным для контрольного образца, с учетом примесей из растворителей и используемых химических веществ, и для восстановления - рассчитанное на основании значения TEQ из контрольного образца приблизительного качества интересующего уровня.

Часть возникающих потерь восстановления может быть установлена воздействием матрицы и/или различиями между значениями TEF в биопробах и официальными значениями TEF, установленными Всемирной организацией здравоохранения.

2.7.2. Аналитические требования для выявления

1) Обнаружение основано на аналитических методах GC/MS или биопробах. Для GC/MS методов должны использоваться требования, предусмотренные в пункте 2.6. Для клеточных биопроб установлены специальные требования, изложенные в подпункте 2.7.3, а для биопроб, осуществленных с помощью диагностических тестов, установлены специальные требования, указанные в подпункте 2.7.4.

2) Необходима информация о количестве ложных положительных и отрицательных результатов, полученных для большого набора образцов, превышающих или находящихся ниже максимального уровня или уровня вмешательства, в сравнении с установленным содержанием TEQ, как это определено аналитическим методом подтверждения. Фактическая доля ложного отрицательного количества должна быть ниже 1%. Доля ложного положительного количества достаточно ниже, чтобы сделать более эффективным использование инструмента по выявлению.

3) Положительные результаты должны подтверждаться каждый раз методом анализа соответствия HRGC/HRMS.

Образцы из широкого спектра TEQ подтверждаются HRGC/HRMS примерно 2-10% отрицательных образцов. Поставляется информация о соответствии результатов биотестирования и HRGC/HRMS.

2.7.2.1. Биоаналитическими методами являются методы, основанные на использовании биологических принципов, таких как тесты на основе клеток или рецепторов или иммунодозировки. Настоящий подпункт устанавливает требования для биоаналитических методов в общем.

Метод скрининга, в принципе классифицирующий пробу как соответствующую. С этой целью рассчитанный уровень BEQ сравнивается с предельным значением. Пробы до предельного значения объявляются соответствующими, пробы равные и более предельного значения, подозреваются как несоответствующие, требующие анализа подтверждающим методом.

На практике, один уровень BEQ, соответствующий 2/3 максимального уровня, может служить предельным значением при условии обеспечения ложного соответствующего коэффициента до 5% и принятую ставку для ложных несоответствующих результатов.

Различными максимальными уровнями для ПХДД/ПХДФ и для суммы ПХДД/ПХДФ и ПХБ типа диоксинов, проверка соответствия проб без разделения требует соответствующих предельных значений биотестов для ПХДД/ПХДФ. Для проверки проб, превышающих пороги действия, соответствующий процентаж соответствующего порога действия считается предельным значением.

2.7.3. Особые требования для клеточных биопроб

1) При оуществлении биопробы каждый тест требует ряд ориентировочных концентраций ТХДД или смеси диоксинов/фуранов, что представляет собой кривую доза-эффект в комплекте с R2 > 0,95. Тем не менее, может быть использована кривая с низким уровнем расширения для анализа образцов с низким содержанием.

2) Для результатов анализа биологической активности в постоянном интервале времени используют на контрольном листе качества ориентировочную ТХДД концентрацию, примерно в три раза превышающую предел квантификации.

3) Графики контроля за качеством для каждого типа ориентировочного материала регистрируются и проверяются, с тем чтобы убедиться, что результат соответствует установленным правилам.

4) Для количественных расчетов выполнение разбавления образца должно быть в пределах линейного участка ответной кривой. Образцы, расположенные выше линейной части ответной кривой, должны быть разбавлены и повторно проверены. Тестирование проводится не менее чем один раз в три разведения.

5) Процент стандартного отклонения не превышает 15% в трехразовом определении для каждого разбавленного образца и 30% в трех независимых испытаниях.

6) Предел обнаружения может быть установлен в 3-х стандартном отклонении контрольного растворителя или фонового ответа. Другой подход заключается в применении ответа, который превышает фоновый ответ - фактор индукции в 5x раз выше, чем контрольный растворитель, рассчитанный из калибровочной кривой на день. Предел квантификации может быть определен как значение от 5x до 6x стандартного отклонения контрольного растворителя или фонового ответа или применяются ответные меры, которые явно превосходят фоновый ответ - фактор индукции в 10x раз выше, чем контрольный растворитель, рассчитанный из калибровочной кривой на день.

2.7.4. Особые требования для биопроб, выполненных на основании диагностических тестов

1) Чтобы была гарантия, что наборы на основе биопроб имеют достаточную чувствительность и надежность для применения их к кормам.

2) Чтобы соблюдались инструкции производителя при подготовке и анализе проб.

3) Диагностические тесты не используют после истечения срока годности.

4) Не используют материалы или компоненты, предназначенные для применения с другими комплектами.

5) Диагностические тесты хранятся при температуре, расположенной в пределах указанного диапазона, и используются при указанной рабочей температуре.

6) Предел обнаружения для иммунодозировки определяется как средняя сумма и значения в 3х стандартном отклонении, основанная на серии 10 повторных контрольных анализов, которая делится на пятиступенчатое значение линейного уравнения регрессии.

7) Для лабораторных испытаний используются стандартные наборы, чтобы гарантировать, что результат измерения находится в пределах допустимого диапазона.

**2.8. Отчетность о результатах**

Если использованный метод исследования позволяет, то аналитические результаты содержат индивидуальные уровни аналогов ПХДД/Ф и диоксиноподобных ПХБ; аналитические результаты соотносятся к нижнему, верхнему и среднему уровню для максимального включения информации в отчетность о результатах, позволяющему интерпретацию результатов в соответствии с конкретными требованиями.

Отчетность также включает содержание липидов образца и метод, используемый для экстракции липидов.

Должна быть доступной информация о восстановлении отдельных внутренних стандартов, если восстановление выходит за пределы, указанные в пункте 2.6., когда превышается максимальный уровень.

Так, когда устанавливается соответствие образца, и необходимо учитывать погрешность измерения, этот параметр должен быть доступен. Анализ результатов сопоставим как х +/- U, где «х» является аналитическим результатом и «U» является расширенной неопределенностью измерения с использованием покрытия в 2 раза, и уровнем достоверности примерно 95%. В случае отдельных определений диоксинов и диоксиноподобных ПХБ сумма предполагаемой расширенной неопределенности отдельных результатов анализа диоксинов и диоксиноподобных ПХБ используется для суммы диоксинов и диоксиноподобных ПХБ.

Если погрешность измерения учитывается путем применения CCα, этот параметр сообщается.

2.8.1. Подготовка проб и требования относительно аналитических методов, используемых для официального контроля уровней ПХБ, не типа диоксинов (ПХБ # 28, 52, 101, 138, 153, 180).

Требования, установленные в настоящей главе, применяются, когда анализируются для официального контроля уровней полихлорированных бифенилов, не типа диоксинов, ПХБ, не типа диоксинов, а также в иных регламентирующих целях.

В качестве применяемого метода используется газохроматографический метод с детектором электронного захвата (GC-CDE, GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS) или эквивалентные методы.

В смысле идентификации и подтверждения аналитов интереса время задержания является относительным в соотношении с внутренними и ориентировочными пробами, с допустимым отклонением ± 0,25 %.

Газохроматографическое разделение всех шести индикаторных ПХБ, а именно ПХБ 28, ПХБ 52, ПХБ 101, ПХБ 138, ПХБ 153 и ПХБ 180, от интерферирующих веществ, в частности, ко-элюентных ПХБ, особенно, в случае, когда уровни проб находятся в законных пределах, и несоответствие должно подтверждаться, образцы, в отношении которых установлено, что они часто являются ко-элюентами, как, например, ПХБ 28/31, ПХБ 52/69 и ПХБ 138/163/164. Для GC-MS необходимо учитывать и возможные помехи со стороны наиболее сильно хлорированных фрагментов образцов.

Требования для техник GC-SM

Мониторинг, по крайней мере :

1) двух специальных ионов для HRMS;

2) двух специальных ионов m/z > 200 или трех специальных ионов m/z > 100 для LRMS;

3) одного предшествующего иона и 2 ионов продукта для MS-MS.

Относительное отклонение относительного изотопического изобилия для отобранных массовых фрагментов и теоретическая ценность изотопического изобилия или проба для целевого иона, который представляет собой контролируемый ион с самым повышенным изотопическим изобилием, и качественный(е) ион(ы) представлены в таблице 3.

 Таблица 3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Относительная интенсивность качественного(ых) иона(ов) в сравнении с целевым ионом** | **GC-EI-MS (относительное отклонение)** | **GC-CI-MS, GCMSn (относительное отклонение)** |
| > 50 % | ± 10 % | ± 20 % |
| > 20 % к 50 % | ± 15 % | ± 25 % |
| > 10 % к 20 % | ± 20 % | ± 30 % |
| ≤ 10 % | ± 50 % (1) | ± 50 % (1) |
| Количество массовых фрагментов с относительной интенсивностью > 10 %, следовательно, не рекомендуется использовать качественный(е) ион(ы) с относительной интенсивностью менее 10 % в сравнении с целевым ионом. |

Достижение метода проявляется в интервале максимального уровня от 0,5 до 2 раз максимального уровня, с допустимым коэффициентом колебания для повторного анализа.

Контрольные значения не более 30% от уровня заражения, соответствующего максимальному уровню.

2.8.2 Контроль восстановлений

Используются внутренние пробы с физико-химическими свойствами, сравнимыми со свойствами аналитов интереса.

1) Требования к методам, используемым всеми шестью пробами индикаторных ПХБ, отмеченных изотопом:

а) результаты скорректированы для восстановления внутренних проб;

b восстановления внутренних проб, отмеченных изотопом, составляют между 50 и 120 %;

c) нижние и верхние восстановления для индивидуальных образцов с вкладом в сумму шести индикаторных ПХБ ниже 10% допускаются.

2) Требования относительно методов, которые не используют шесть внутренних проб, отмеченных изотопом, или другие внутренние пробы:

a) восстановление внутренней(их) пробы (проб) контролируется для каждой пробы;

b) восстановления внутренней(их) пробы (проб) составляет между 60 и 120 %;

c) результаты корректируются для восстановлений внутренних проб.

Показательные характеристики: критерии для суммы всех шести индикаторных ПХБ на максимальном уровне

|  |  |
| --- | --- |
| Достоверность | – 30 до + 30 % |
| Промежуточная точность (RSD %) | ≤ 20 % |
| Разница между верхней и нижней оценкой расчета | ≤ 20 % |

2.8.3 Отчетность о результатах

В той мере, в которой используемая аналитическая процедура позволяет это, аналитические результаты включают уровни отдельных соединений ПХБ и указываются низшая, высшая и средняя оценки для предоставления большего количества информации в отчете о результатах, что позволяет толкование результатов в соответствии со специальными требованиями.

Отчет включает метод, используемый для экстракции ПХБ и липидов.

Восстановления индивидуальных внутренних проб возможно, в случае если восстановления происходят за пределами интервала, указанного в подпункте 2.8.2 настоящего приложения, если превышается максимальный уровень, в иных случаях, по требованию.

Когда принимается решение о соответствии пробы, в учет принимается неопределенность измерения, данный параметр также предоставляется в распоряжение.

Аналитические результаты соотносятся как х ± U, где «х» является аналитическим результатом и «U» является расширенной неопределенностью измерения с использованием покрытия в 2 раза и уровнем достоверности примерно 95%.

В случае если во внимание принимается неопределенность измерения посредством применения CCα, данный параметр соотносится.

Результаты выражаются в тех же единицах и посредством минимум того же количества десятых, как максимальные уровни, предусмотренные в Постановлении Правительства № 1405 от 10 декабря 2008 года «Об утверждении Ветеринарно-санитарной нормы по гигиене кормов и содержанию нежелательных веществ в кормах.