31998L0064

ДИРЕКТИВА 98/64/ЕО НА КОМИСИЯТА

от 3 септември 1998 година

за установяване на общностни методи за анализ за определяне съдържанието на аминокиселини, сурови масла и мазнини и олахиндокс в храните за животни и за изменение на Директива 71/393/ЕИО

(текст от значение за ЕИП)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ([1]), последно изменена с Договора за присъединяване на Австрия, Финландия и Швеция, и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че Директива 70/373/ЕИО определя официалният контрол на храните за животни, предназначен да провери доколко те отговарят на изискванията, които произтичат от законовите, подзаконовите и административните разпоредби които определят тяхното качество и състав, да се осъществява посредством общностни методи за вземане на проби и анализ;

като има предвид, че Директива 79/373/ЕИО на Съвета от 2 април 1979 г. относно търговията с комбинирани фуражи ([2]), последно изменена с Директива 97/47/ЕО на Комисията ([3]) и Директива 93/74/ЕИО на Съвета от 13 септември 1993 г. относно храните за животни, предназначени за специални хранителни цели ([4]), последно изменена с Директива 96/25/ЕО ([5]), определят на етикетите на храните за животни да бъдат изписвани аминокиселините и суровите масла и мазнини;

като има предвид, че Директива 70/524/ЕИО на Съвета от 23 ноември 1970 г. относно добавките в храните за животни ([6]), последно изменена с Директива 98/19/ЕО на Комисията ([7]) определят на етикетите на храните за животни да бъде изписвано съдържанието на олахиндокс когато това вещество се използва като добавка в тях;

като има предвид, че втората Директива 71/393/ЕИО на Комисията от 18 ноември 1971 г. относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ([8]), последно изменена с Директива 84/4/ЕИО на Комисията ([9]), определя методи за анализ за определяне съдържанието на сурови масла и мазнини; като има предвид, че е уместно описаният метод да бъде изменен;

като има предвид, че задължително следва да се определят методи за анализ за проверката на тези вещества;

като има предвид, че предвидените в настоящата директива мерки са съобразени със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки осигуряват анализите, осъществявани във връзка с упражняването на официален контрол на съдържанието на аминокиселини, сурови масла и мазнини и олахиндокс в животинските храни, да се извършват по методите, определени в приложението към настоящата директива.

Член 2

В приложението към Директива 71/393/ЕИО на Комисията, точка „4. Определяне на суровите масла и мазнини“ се заменя с част Б на приложението към настоящата директива.

Член 3

1. Държавите-членки въвеждат в сила законовите, подзаконовите или административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива, преди 31 декември 1998 година. Те незабавно информират Комисията за това.

Те прилагат мерките от 1 януари 1999 година.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условията и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

([1]) ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.
([2]) ОВ L 86, 6.4.1979 г., стр. 30.
([3]) ОВ L 211, 5.8.1997 г., стр. 45.
([4]) ОВ L 237, 22.9.1993 г., стр. 23.
([5]) ОВ L 125, 23.5.1996 г., стр. 35.
([6]) ОВ L 270, 14.12.1970 г., стр. 1.
([7]) ОВ L 96, 28.3.1998 г., стр. 39.
([8]) ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.
([9]) ОВ L 15, 18.1.1984 г., стр. 28.

2. Държавите-членки съобщават на Комисията текста на основните разпоредби от националното си законодателство, които те приемат в областта, уредена с настоящата директива.

Член 4

Настоящата директива влиза в сила на двадесетия ден след публикуването ѝ в *Официален вестник на Европейските общности*.

Член 5

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 3 септември 1998 година.

За Комисията

Franz FISCHLER

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

ЧАСТ А

ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА АМИНОКИСЕЛИНИ

1. **Цел и обхват**

Настоящият метод служи за определяне съдържанието на свободните аминокиселини (синтетични и естествени) и общото съдържание на аминокиселини (участващи в пептидна връзка и свободни) в животинските храни посредством анализатор за аминокиселини. Методът е приложим за следните аминокиселини: цистеин, метионин, лизин, треонин, аланин, аргинин, аспарагинова киселина, глутаминова киселина, глицин, хистидин, изо-левцин, левцин, фенил-аланин, пролин, серин, тирозин и валин.

Методът не разграничава видовете соли на аминокиселините и не различава D- и L-формите на аминокиселините. Той не важи за определяне съдържанието на триптофан или на хидроксилни аналози на аминокиселините.

2. **Принцип**

2.1. *Свободни аминокиселини*

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

2.2. *Общо съдържание на аминокиселини*

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

Окисляването се извършва при 0 °C със смес от пероксимравчена киселина и фенол. Излишният реагент от окисляването се разлага с натриев дисулфит. Окислената или неокислена проба се подлага на хидролоза със солна киселина (c = 6 mol/l) в продължение на 23 часа. Продуктът на хидролизата се коригира до pH 2,20. Аминокиселините се отделят посредством йонообменна хроматография и се определят посредством нинхидринова реакция с фотометрично отчитане при 570 nm (440 nm за пролина).

3. **Реактиви**

Трябва да се използва двойно дестилирана вода, или вода със сходно качество (проводимост < 10 μS).

3.1 Водороден прекис, w = 30 %.

3.2 Мравчена киселина, w = 98—100 %.

3.3 Фенол.

3.4 Натриев дисулфит.

3.5 Натриева основа.

3.6 Дихидрат на 5-сулфосалициловата киселина.

3.7 Солна киселина, плътност приблизително 1,18 g/ml.

3.8 Дихидрат на три-натриев цитрат.

3.9 2,2′Y-тиодиетанол (тиодигликол).

3.10 Натриев хлорид.

3.11 Нинхидрин.

3.12 Петролеев етер, диапазон на кипене 40—60 °C.

3.13 Норлевцин, или друго съединение подходящо за целта според местните стандарти.

3.14 Азот — газ (< 10 ppm кислород).

3.15 1-октанол.

3.16 Аминокиселини.

3.16.1 Стандартните вещества изброени в параграф 1. Чисти съединения без съдържание на вода от кристализация. Изсушени под вакуум над P_2O_5 или H_2SO_4 в продължение на 1 седмица преди употреба.

3.16.2. Цистеинова киселина.

3.16.3. Метионин сулфон.

3.17. Разтвор на натриева основа, c = 7,5 mol/l:

Разтворете 300 g NaOH (3.5) във вода и долейте до 1 литър.

3.18. Разтвор на натриева основа, c = 1 mol/l:

Разтворете 40 g NaOH (3.5) във вода и долейте до 1 литър.

3.19. Разтвор на мравчена киселина и фенол:

Смесете 889 g мравчена киселина (3.2) със 111 g вода и добавете 4,73 g фенол (3.3).

3.20. Смес за хидролизата, c = 6 mol HCl/l със съдържание на 1 g фенол/l:

Добавете 1 g фенол (3.3) към 492 ml HCl (3.7) и долейте вода до 1 литър.

3.21. Смес за екстракцията, c = 0,1 mol HCl/l със съдържание на 2 % тиодигликол:

Вземете 8,2 ml HCl (3.7), разредете с приблизително 900 ml вода, добавете 20 ml тиодигликол (3.9) и долейте вода до 1 литър (не смесвайте 3.7 директно с 3.9).

3.22. 5-сулфосалицилова киселина, β = 6 %:

Разтворете 60 g 5-сулфосалицилова киселина (3.6) във вода и долейте вода до 1 литър.

3.23. Окислителна смес (Пероксимравчена киселина-фенол):

Смесете 0,5 ml водороден прекис (3.1) с 4.5 ml разтвор на мравчена киселина и фенол (3.19) в малка бекерова чаша. Дръжте в термостат при 20-30 °C в продължение на 1 час, за да се получи пероксимравчена киселина, след това охладете във вана с ледена вода (15 минути) преди да добавите към пробата.

Внимание: Избягвайте контакти с кожата и носете защитно облекло.

3.24. Цитратен буферен разтвор, c = 0,2 mol Na+/l, pH 2,20:

Разтворете 19,61 g натриев цитрат (3.8), 5 ml тиодигликол (3.9), 1 g фенол (3.3) и 16,50 ml HCl (3.7) в приблизително 800 ml вода. Коригирайте до pH 2,20. Долейте с вода до 1 литър.

3.25. Отмиващи буферни разтвори, приготвени според условията за използвания анализатор (4.9).

3.26. Нинхидринов реактив, подготвен според условията за използвания анализатор (4.9).

3.27. Стандартни разтвори на аминокиселини. Тези разтвори трябва да се съхраняват под 5 °C.

3.27.1. Основен стандартен разтвор на аминокиселини (3.16.1). c = 2,5 µmol/ml от всяка в солна киселина. Могат да се набавят и готови.

3.27.2. Основен стандартен разтвор на цистеинова киселина, c = 1,25 µmol/ml.

Разтворете 0,2115 g цистеинова киселина (3.16.2) и 0,2265 g метионин сулфон (3.16.3) в цитратен буферен разтвор (3.24) в еднолитрова градуирана колба и долейте цитратен буферен разтвор до маркировката. Съхранявайте не повече от 12 месеца при температура под 5 °C. Този разтвор не се използва ако основния стандартен разтвор (3.27.1) съдържа цистеинова киселина и метионин сулфон.

3.27.3. Основен стандартен разтвор според вътрешните норми, например норлевцин, c = 20 µmol/ml.

Разтворете 0,6560 g норлевцин (3.13) в цитратен буферен разтвор (3.24) в градуирана колба и долейте буферен разтвор до 250 ml. Съхранявайте не повече от 6 месеца при температура под 5 °C.

3.27.4. Калибриращ разтвор на стандартни аминокиселини, който да се използва за продукти на хидролизата, c = 5 nmol/50 µl цистеинова киселина и метионин сулфон и c = 10 nmol/50 µ за останалите аминокиселини.

Разтворете 2,2 g натриев хлорид (3.10) в бекерова чаша от 100 ml с 30 ml цитратен буферен разтвор (3,24). Добавете 4,00 ml основен стандартен разтвор на аминокиселини (3.27.1), 4,00 ml основен стандартен разтвор на цистеинова киселина и метионин сулфон (3.27.2) и 0,50 ml основен стандартен разтвор според вътрешните норми (3.27.3), когато се използва. Коригирайте pH до 2,20 като използвате натриева основа (3.18).

Прехвърлете количествено в градуирана колба от 50 ml и долейте цитратен буферен разтвор (3.24) до маркировката, след което разбъркайте.

Съхранявайте не по-дълго от 3 месеца при температура под 5 °C.

Вижте също и наблюденията, описани в т. 9.1.

3.27.5. Калибриращ разтвор на стандартни аминокиселини, който се използва с продуктите от хидролизата приготвени съгласно параграф 5.3.3.1. и с екстрактите (5.2). Калибриращият разтвор се приготвя както 3.27.4, но без натриевия хлорид.

Съхранявайте не по-дълго от 3 месеца при температура под 5 °C.

4. **Апаратура**

4.1. Колба с обло дъно от 100 или 250 ml с кондензатор за обратния поток.

4.2. Шише от боратно стъкло от 100 ml с винтова капачка с каучуково/тефлоново уплътнение (например от вида Duran, Schott) за поставяне в сушилнята.

4.3. Сушилня с допълнителна вентилация и терморегулатор с точност по-голяма от ± 2 °C.

4.4. pH-метър (три десетични знака).

4.5. Мембранен филтър (0,2 μm).

4.6. Центрофуга.

4.7. Ротационен вакуумен изпарител.

4.8. Механичен вибратор или магнитна бъркалка.

4.9. Анализатор на аминокиселини или уред HPLC с йонообменна колона, устройство за нинхидрин, следколонна дериватизация и фотометричен детектор.

Колоната е пълна със сулфонирани полистиролни смоли, които могат да отделят аминокиселините една от друга и от останалите нинхидрин-положителни материали. Циркулацията на потока в буферните и нинхидриновите линии се осигурява от помпи с устойчивост на потока ± 5 % за целия период както на стандартното времетраене на калибрирането, така и на извършване на анализа на пробата.

При някои анализатори на аминокиселини може да се използва хидролизна процедура при която продуктът на хидролизата е с концентрация на натрий c = 0.8 mol/l и съдържа цялата остатъчна мравчена киселина от етапа на окисляването. Други не осигуряват задоволително отделяне на някои определени аминокиселини когато продуктът на хидролизата съдържа излишък от мравчена киселина и/или високи концентрации на натриеви йони. В този случай количеството на киселината се намалява чрез изпарение до приблизително 5 ml след хидролизата и преди коригиране на киселинността. Изпарението трябва да се извършва във вакуумна среда при максимум 40 °C.

5. **Процедура**

5.1 *Подготовка на пробата*

Пробата се смила, за да може да преминава през сито от 0,5 mm. Преди смилането пробите с високо съдържание на влага трябва да бъдат изсушени във въздушна среда при температура не по-висока от 50 °C или чрез замразяване. Преди смилане пробите с високо съдържание на мазнини трябва да бъдат подложени на екстракция с петролеев етер (3.12).

5.2 Определяне на свободни аминокиселини в животински храни и предварителни смеси.

Претеглете до най-близките 0,2 mg едно достатъчно количество (1-5 g) от така подготвената проба (5.1) в конусообразна колба и добавете 100,0 ml от сместа за екстракцията (3.21). Разбийте сместа в продължение на 60 минути като използвате механичния вибратор или магнитната бъркалка (4.8). оставете да се утаи и с пипета отмерете 10,0 ml от супернатантен разтвор в бекерова чаша от 100 ml.

Добавете 5,0 ml разтвор на сулфосалицилова киселина (3.22) като разбърквате и продължете разбъркването още 5 минути с помощта на магнитната бъркалка. Филтрирайте или пуснете в центрофугата супернатант за да отстраните утайката. Изсипете 10,0 ml от получения в резултат разтвор в бекерова чаша от 100 ml и коригирайте pH до 2,20 като използвате разтвор на натриева основа (3.18), прехвърлете в мерителна колба с подходящ обем като използвате цитратния буферен разтвор (3.24) и долейте буферен разтвор (3.24) до маркировката.

Когато се използва вътрешен стандартен разтвор, добавете по 1,00 ml от този стандартен разтвор (3.27.3) на всеки 100 ml от крайния разтвор и долейте буферен разтвор (3.24) до маркировката.

Пристъпете към хроматографския етап съгласно параграф 5.4.

Ако екстрактите не бъдат изследвани същия ден, те трябва да се съхраняват при температура под 5 °C.

5.3 *Определяне на общото съдържание на аминокиселини*

5.3.1 Окисляване

Претеглете до най-близките 0,2 mg от 0,1 до 1 g от така приготвената проба (5.1) в:

— колба с обло дъно (4.1) от 100 ml за открита хидролиза (5.3.2.3), или

— колба с обло дъно (4.1) от 250 ml ако е необходимо да има ниска концентрация на натрий (5.3.3.1), или

— шише от 100 ml с винтова капачка (4.2) (за затворена хидролиза 5.3.2.4).

Претеглената част от пробата трябва да бъде с азотно съдържание от около 10 mg и съдържание на влага не повече от 100 mg.

Поставете колбата/шишето във вана с ледена вода и охладете до 0 °C, добавете 5 ml от сместа за окисляването (3.23) и разбъркайте със стъклена шпатула с извит край. Затворете колбата/шишето с шпатулата с херметизиращо фолио, поставете ваната с ледената вода в която е поставен херметизирания съд в хладилник при 0 °C и оставете така 16 часа. След 16 часа извадете от хладилника и разградете излишния окислителен реактив като добавите 0,84 g натриев дисулфит (3.4).

Продължете с 5.3.2.1.

5.3.2. Хидролиза

5.3.2.1. Хидролиза на окислените проби

Добавете 25 ml от сместа за хидролозата (3.20) към окислената проба, приготвена съгласно 5.3.1, като се стараете да отмиете всеки остатък от пробата, който може да е полепнал по стените на съда и по шпатулата. Според хидролизната процедура, която ще се използва, пристъпете към 5.3.2.3 или 5.3.2.4.

5.3.2.2. Хидролиза на неокислени проби

Претеглете до най-близките 0,2 mg в колба с обло дъно (4.1) от 100 ml или 250 ml, или в шише с винтова капачка (4.2) от 100 ml от 0,1 до 1 g от подготвената проба (5.1). Претегленото количество от пробата трябва да бъде с азотно съдържание от около 10 mg. Внимателно добавете 25 ml от сместа за хидролизата (3.20) и разбъркайте с пробата. Преминете към 5.3.2.3 или 5.3.2.4.

5.3.2.3. Открита хидролиза

Добавете 3 стъклени топчета в сместа в колбата (подготвена съгласно 5.3.2.1 или 5.3.2.2) и сварете при непрекъснато кипене с обратно стичане в продължение на 23 часа. След приключване на хидролизата измийте кондензатора с 5 ml цитратен буферен разтвор (3.24). Свалете колбата от статива и я охладете в ледена вана. Преминете към 5.3.3.

5.3.2.4. Затворена хидролиза

Поставете шишето с приготвената съгласно 5.3.2.1 или 5.3.2.2 смес в сушилня (4.3) при 110 °C. За да избегнете покачване на налягането (поради отделянето на газообразни вещества) и за да се предотврати избухване през първия час поставете капачето върху гърлото на съда без да го затваряте. След един час затворете съда с капачката и оставете в сушилнята (4.3) в продължение на 23 часа. След приключване на хидролизата, извадете съда от сушилнята, внимателно отворете капачката и поставете шишето в ледена вана. Оставете да се охлади.

В зависимост от процедурата за коригиране на pH (5.3.3), количествено прехвърлете съдържанието на шишето в бекерова чаша от 250 ml или колба с обло дъно от 250 ml като използвате цитратния буферен разтвор (3.24).

Преминете към 5.3.3.

5.3.3. Коригиране на pH

В зависимост от натриевия толеранс на анализатора на аминокиселини (4.9), преминете към 5.3.3.1 или 5.3.3.2 за да коригирате pH.

5.3.3.1. За хроматографските системи (4.9) изискващи ниски натриеви концентрации

Когато се използват анализатори на аминокиселини, изискващи ниски концентрации на натрий, (и количеството на киселината трябва да се намали) е препоръчително да се използва основен разтвор по вътрешни стандарти (3.27.3).

В конкретния случай, добавете 2,00 ml основен разтвор по вътрешен стандарт (3.27.3) към продукта на хидролизата преди да извършите изпарението.

Добавете 2 капки 1-октанол (3.15) към продукта на хидролизата, получен съгласно параграф 5.3.2.3 или 5.3.2.4.

Като използвате ротационен изпарител (4.7), намалете обема до 5-10 ml във вакуум при температура 40 °C. Ако обемът инцидентно бъде намален до под 5 ml, продуктът от хидролизата трябва да се изхвърли и анализът да бъде повторен.

Коригирайте pH до 2,20 с разтвор на натриева основа (3.18) и пристъпете към параграф 5.3.4.

5.3.3.2. За всички останали видове анализатори на аминокиселини (4.9)

Вземете продуктите на хидролизата, получени в 5.3.2.3 или 5.3.2.4 и частично ги неутрализирайте, като внимателно добавяте докато разбъркват 17 ml разтвор на натриева основа (3.17), като осигурете температурата да се запази под 40 °C.

Коригирайте pH до 2,20 при стайна температура, като използвате разтвор на натриева основа (3.17) и накрая разтвор на натриева основа (3.18). Преминете към 5.3.4.

5.3.4. Пробен разтвор за хроматографията

Количествено прехвърлете продукта на хидролизата с коригираната киселинност (5.3.3.1 или 5.3.3.2) като използвате цитратен буферен разтвор (3.24) в градуирана колба от 200 ml и долейте буферен разтвор (3.24) до маркировката.

Ако вече не е използван основен разтвор по вътрешен стандарт, добавете 2,00 ml основен разтвор по вътрешен стандарт (3.27.3) и долейте цитратен буферен разтвор (3.24) до маркировката. Разбъркайте добре.

Преминете към хроматографския метод (5.4).

Ако екстрактите не бъдат изследвани същия ден, те трябва да се съхраняват при температура под 5 °C.

5.4. *Хроматография*

Преди хроматографията уеднаквете температурата на екстракта (5.2) или продукта на хидролизата (5.3.4) със стайната температура. Разклатете сместа и филтрирайте едно подходящо количество през мембранен филтър 0,2 μm (4.5). Полученият в резултат от това бистър разтвор се подлага на йонообменна хроматография като за целта се използва анализатор на аминокиселини (4.9).

Впръскването може да се извърши както ръчно, така и автоматично. Важното е, в колоната за анализ на стандартните разтвори и пробните разтвори да се добавя едно и също количество разтвор ± 0.5 %, освен когато се използва основен разтвор по вътрешен стандарт, и отношенията натрий:амино киселини в стандартния и пробния разтвор да бъдат възможно най-близки.

В общия случай, честотата на калибриране зависи от устойчивостта на нинхидриновият реактив и от аналитичната система. Стандартният или пробен разтвор се разрежда с цитратен буферен разтвор (3.24) до постигане на зоната на максимума на стандартния разтвор 30—200 % от зоната на максимума на пробната аминокиселина.

Хроматографията на аминокиселините малко се различава при различните видове анализатори и смоли, които се използват. Избраната система трябва да е в състояние да отделя аминокиселините една от друга и от нинхидрин-положителните материали. В рамките на работния си диапазон хроматографската система трябва да дава линейна честотна характеристика на измененията в количествата добавяни в колоната аминокиселини.

По време на хроматографския етап отношенията максимум-минимум се прилагат когато се анализира равномоларен разтвор (на аминокиселините, чието съдържание се определя). Равномоларният разтвор задължително трябва да съдържа най-малко 30 % от максималното съдържание на всяка аминокиселина, което може да бъде прецизно измерено със системата за анализ на аминокиселини (4.9).

За отделянето на треонин-серин отношението максимум-минимум на по-ниската от двете припокриващи се аминокиселини от хроматограмата не трябва да надвишава 2:10 (ако се определя съдържанието само на цистеин, метионин, треонин и лизин, недостатъчното отделяне от съседни максимуми ще влоши резултата от определянето). За всички останали аминокиселини, отделянето трябва да бъде по-добро от 1:10.

Системата трябва да осигурява отделянето на лизина от „лизиновия продукт“ и орнитина.

6. **Изчисляване на резултатите**

За всяка отделна аминокиселина се измерва зоната на максимума на пробата и стандарта и се изчислява количеството аминокиселина в грамове за всеки килограм от пробата.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1000} = g \text{ аминокиселина на килограм проба.}$$

Когато се използва основен разтвор по вътрешен стандарт, умножете по $\frac{D}{C}$.

A = зона максимим на продукта на хидролизата или екстракта,

B = зона максимум на калибриращия стандартен разтвор,

C = зона максимум на вътрешния стандартен разтвор в продукта на хидролизата или екстракта,

D = зона максимум на вътрешния стандартен разтвор, калибриращия стандартен разтвор,

MW = молекулно тегло на аминокиселината, чието съдържание се определя,

E = концентрация на стандарта в µmol/ml,

W = тегло на пробата (g) (коригирано до първоначалното ако е била изсушавана или обезмаслявана),

F = ml общо продукт на хидролизата (5.3.4) или ml изчислен общ разтворен обем на екстракта (6.1).

Цистинът и цистеинът се определят като цистеинова киселина в продукти на хидролизата на окислена проба, но се изчисляват като цистин ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MW 240,30 като се използва MW 120,15 (= 0,5 × 240,30).

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

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

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

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

V = количеството на окончателния екстракт

7. **Оценка на метода**

Методът е изпробван чрез взаимно сравнение направено на международно ниво през 1990 година като за целта са използвани четири различни животински храни (хранителна смеска за свине, смеска за бройлери, белтъчен концентрат, предварителна смеска). На долната таблица са дадени резултатите за средното и стандартно отклонение след като са елиминирани стойностите, които рязко се отличават от повечето останали замервания.

Средни стойности в g/kg.

Материал	Аминокиселини			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Хранителна смеска за свине	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Смеска за бройлери	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Белтъчен концентрат	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Предварителна смеска	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = брой на участвалите лаборатории

7.1. *Повторяемост*

Повторяемостта на гореспоменатото сравнително изпитание, изразена като „стандартно лабораторно отклонение“, е дадена на следващите таблици:

В рамките на стандартното лабораторно отклонение (S_r) в g/kg

Материал	Аминокиселини			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Хранителна смеска за свине	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Смеска за бройлери	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Белтъчен концентрат	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Предварителна смеска	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = брой на участвалите лаборатории

Коефициент на изменение (%) на стандартното лабораторно отклонение (S_r)

Материал	Аминокиселини			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Хранителна смеска за свине	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Смеска за бройлери	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Белтъчен концентрат	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Предварителна смеска	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = брой на участвалите лаборатории

7.2. *Възпроизвеждимост*

На долната таблица са дадени резултатите за стандартното отклонение между лабораториите при гореспменатото сравнение.

Стандартно отклонение между лабораториите (S_R) в g/kg

Материал	Аминокиселини			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Хранителна смеска за свине	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Смеска за бройлери	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Белтъчен концентрат	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Предварителна смеска	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = брой на участвалите лаборатории

Коефициент изменение (%) за стандартното отклонение между лабораториите (S_R)

Материал	Аминокиселини			
	Треонин	Цистеин	Метионин	Лизин
Хранителна смеска за свине	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Смеска за бройлери	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Белтъчен концентрат	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Предварителна смеска	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = брой на участвалите лаборатории

8. **Използване на еталонни материали**

Точното прилагане на метода трябва да се проверява с повтаряне на измерванията върху утвърдени еталонни материали, когато има налични такива. Препоръчва се калибриране с утвърден калибриращ разтвор на аминокиселини.

9. **Наблюдения**

9.1 Поради различията между отделните анализатори на аминокиселини, за ръководни се считат окончателните концентрации на калибриращите разтвори на стандартни аминокиселини (виж 3.27.4 и 3.27.5) и на продукта на хидролизата (виж 5.3.4).

Диапазона на линейната характеристика на апарата трябва да се провери за всички аминокиселини.

Стандартният разтвор се разрежда с цитратен буфер, за да могат зоните на максимума да се получат в средата на диапазона.

9.2 Когато за анализиране на продукти на хидролизата се използва течно хроматографско оборудване с високи експлоатационни качества, експерименталните условия трябва да бъдат оптимизирани според препоръките на производителя.

9.3 При прилагането на метода за животински храни съдържащи повече от 1 % хлорид (концентрати, минерални храни, хранителни добавки) е възможно да се получат твърде ниски стойности за метионина и затова се налага специална обработка.

ЧАСТ Б

ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА СУРОВИ МАСЛА И МАЗНИНИ

1. **Цел и обхват**

Този метод служи за определяне съдържанието на сурови масла и мазнини в животинските храни. Той не обхваща анализа на маслодайни семена и плодове, дефинирани в Регламент № 136/66/ЕИО на Съвета от 22 септември 1966 година.

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

1.1. *Процедура А – Директно екстрактируеми природни масла и мазнини*

Този метод е приложим за хранителни материали с растителен произход, с изключение на включените в обхвата на процедура Б.

1.2. *Процедура Б – Общо съдържание на сурови природни масла и мазнини*

Този метод е приложим за хранителни материали с животински произход и за всички смесени храни. Той трябва да се използва за всички материали, от които маслата и мазнините не могат да бъдат извлечени напълно без преди това да се осъществи хидролиза (т.е. глутени, мая, картофени протеини и продукти подлежащи на преработка, като екструдиране, наслояване и нагряване).

1.3. *Обсъждане на резултатите*

Във всички случаи когато се получава по-висок резултат когато се използва процедура Б в сравнение с този от процедура А, за действителни се приемат резултатите от процедура Б.

2. **Принцип**

2.1. *Процедура А*

Пробата се отделя с петролеев етер. Разтворителят се отделя чрез дестилация и остатъка се изсушава и претегля.

2.2. *Процедура Б*

Пробата се обработва със солна киселина под действието на топлина. Сместа се охлажда и флитрира. Утайката се измива и изсушава и подлага на определяне на съдържанието съгласно процедура А.

3. **Реактиви**

3.1. Петролеев етер с диапазон на кипене: 40 до 60°. Бромното число трябва да бъде под 1 и утайката при изпарение – под 2 mg/100 ml.

3.2. Натриев сулфат, безводен.

3.3. Солна киселина, c = 3 mol HCl/l.

3.4. Средство улесняващо филтрирането, например кизелгур, супер-клетъчно средство Hyflo.

4. **Апаратура**

4.1. Екстракционна апаратура. Когато е снабдена със сифон (апарат на Сокслет), скоростта на обратния поток трябва да бъде такава, че да се получават около 10 цикъла на час; когато апаратът не е сифонен тип, скоростта на обратния поток трябва да бъде около 10 ml в минута.

4.2. Екстракционни гилзи, свободни от разтворими в петролеев етер вещества и с порьозност, която отговаря на изискванията на точка 4.1.

4.3. Сушилня – вакуумна сушилня регулирана на 75 °C ± 3 °C или въздушна сушилня регулирана на 100 °C ± 3 °C.

5. **Процедура**

5.1. *Процедура А (виж точка 8.1)*

Претеглете 5 g от пробата до най-близкия 1 mg, прехвърлете я в една екстракционна гилза (4.2) и закрийте с памучен тампон, по който не трябва да има мазнини.

Поставете гилзата в екстрактора (4.1) и екстрактирайте в продължение на шест часа с петролеев етер (3.1). Съберете петролеевия етерен екстракт в суха градуирана колба, в която има частици пемза на късове ([1]).

Отстранете разтворителя чрез дестилация. Изсушете утайката, като оставите колбата за час и половина в сушилнята (4.3). Оставете да изстине в изпарител и претеглете. Изсушете отново за 30 минути, за да сте сигурни, че теглото на маслата и мазнините остава постоянно (загубата в теглото между две последователни претегляния трябва да бъде по-малка от 1 mg).

5.2. *Процедура Б*

Претеглете 2,5 g от пробата до най-близкия 1 mg (виж точка 8.2), поставете в бекерова чаша от 400 ml или конусообразна колба от 300 ml и добавете 100 ml солна киселина (3.3) и частици пемза на късове. Закрийте бекеровата чаша със стъкло за наблюдение или поставете на конусообразната колба кондензатор за обратния поток. Оставете сместа да заври леко над слаб пламък или котлон и я задръжте така един час. Не позволявайте на продукта да полепне по стените на съда.

Охладете и добавете малко количество средство за подпомагане на филтрирането (3.4), достатъчно да не позволи загуба на масло и мазнини по време на филтрирането. Филтрирайте през навлажнена, несъдържаща мазнини, двойна филтърна хартия. Измийте утайката в студена вода до получаване на неутрален филтрат. Проверете дали филтратът не съдържа масла и мазнини. Наличието им означава, че преди хидролизата пробата трябва да бъде екстрактирана с петролеев етер, като се използва процедура А.

Поставете двойната филтърна хартия с утайката върху стъкло за наблюдения и изсушете в продължение на час и половина във въздушната сушилня (4.3) 100 °C ± 3 °C.

Поставете двойната филтърна хартия със сухата утайка в екстракционна гилза (4.2) и покрийте с памучен тампон без съдържание на мазнини. Поставете гилзата в екстрактор (4.1) и продължете както е указано във втория и третия параграф на точка 5.1.

([1]) Когато маслото или мазнините трябва след това да бъдат подложени на изпитания за качество, вместо пемза на късове използвайте стъклени сачми.

6. **Изразяване на резултатите**

Изразете теглото на утайката като процент от това на пробата.

7. **Повторяемост**

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

— 0.2 % в абсолютна стойност, за съдържание на сурови природни масла и мазнини по-малко от 5 %,

— 4.0 % спрямо най-високия резултат за съдържания от 5 до 10 %,

— 0.4 % в абсолютна стойност, за съдържания над 10 %.

8. **Наблюдения**

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

Претеглете 20 g от пробата до най-близкия 1 mg и смесете с 10 g или повече безводен натриев сулфат (3.2). Екстрактирайте с петролеев етер (3.1), както е указано в точка 5.1. Долейте към получения екстракт петролеев етер (3.1) до 500 ml и смесете. Вземете 50 ml от разтвора и поставете в малка, суха, градуирана колба, в която има частици пемза на късове ([1]). Отстранете разтворителя чрез дестилация, изсушете и продължете както е указано в последния параграф на точка 5.1.

Отстранете разтворителя от утайката от екстракцията, която е останала в гилзата, натрошете пробата до едрина 1 мм, върнете я в екстракционната гилза (не добавяйте натриев сулфат) и продължете както е указано във втория и третия параграф на точка 5.1.

Изчислете съдържанието на масла и мазнини като процент от пробата, като за целта използвате следната формула:

(10 a + b) × 5,

където:

a = масата в грамове на утайката след първата екстракция (аликвотна част от екстракта),

b = масата в грамове на утайката след втората екстракция.

8.2. При продукти с ниско съдържание на мазнини, тестовата проба може да се увеличи на 5 g.

8.3. Преди хидролизата и екстракцията, съгласно процедура Б, може да е необходимо храните за домашни любимци, които са с високо водно съдържание, да се смесят с безводен натриев сулфат.

8.4. В параграф 5.2, за измиване на утайката след филтрирането може да е по-ефикасно да се използва топла вода вместо студена.

8.5. За някои видове храни може да се наложи времето за сушене от 1,5 часа да бъде увеличено. Трябва да се избягва прекалено изсушаване, тъй като това може да доведе до занижени резултати. Може да се използва също и микровълнова печка.

8.6 Когато съдържанието на сурови масла/мазнини е по-голямо от 15 % се препоръчва преди хидролизата да се направи предварителна екстракция съгласно процедура А и повторна екстракция съгласно процедура Б. Това донякъде зависи от характера на храните и характера на маслата/мазнините в храните.

ЧАСТ В

ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ОЛАХИНДОКС

(2-[N-2′-(хидроксиетил)карбамоил]-3-метилхиноксалин-N^1,N^4-диоксид)

1. **Цел и обхват**

Методът служи за определяне съдържанието на олахиндокс в храни за животни. Долната граница на определено съдържание е 5 mg/kg.

2. **Принцип**

Пробата се екстрактира посредством смес от вода и метанол. Съдържанието на олахиндокс се определя посредством течна хроматография в обратна фаза (HPLC), като се използва UV детектор.

([1]) Когато маслото или мазнините трябва след това да бъдат подложени на изпитания за качество, вместо пемза на късове използвайте стъклени сачми.

3. **Реактиви**

3.1. Метанол

3.2. Метанол, тип HPLC

3.3. Вода, тип HPLC

3.4. Невискозна фаза за HPLC:

Смес от вода (3.3) и метанол (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Стандартно вещество: чист олахиндокс 2-[N-2′-(хидроксиетил)карбамоил]-3-метилхиноксалин-N^1, N^4-диоксид, E 851.

3.5.1 Основен стандартен разтвор на олахиндокс, 250 μg/ml.

Претеглете до най-близките 0,1 mg 50 mg олахиндокс (3.5) в градуирана колба от 200 ml и добавете са. 190 ml. След това поставете колбата в ултразвукова вана (4.1) в продължение на 20 минути. След обработката с ултразвук, охладете разтвора до стайна температура, долейте вода до маркировката и разбъркайте. Завийте колбата в алуминиево фолио и съхранявайте в хладилник. Този разтвор трябва да се приготвя ежемесечно, за да е пресен.

3.5.2 Междинен стандартен разтвор на олахиндокс, 25 μg/ml.

Прехвърлете 10,0 ml от основния стандартен разтвор (3.5.1) в градуирана колба от 100 ml, долейте невискозната фаза (3.4) до маркировката и разбъркайте. Завийте колбата в алуминиево фолио и съхранявайте в хладилник. Този разтвор трябва да се приготвя ежедневно, за да е пресен.

3.5.3 Решения за калибрирането:

Последователно прехвърлете в градуирана колба от 50 ml 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 и 20,0 ml от междинния стандартен разтвор (3.5.2). Долейте невискозната фаза (3.4) до маркировката и разбъркайте. Завийте колбата в алуминиево фолио. Тези разтвори съответстват съответно на 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 и 10,0 μg олахиндокс на ml.

Тези разтвори трябва да се приготвят ежедневно, за да са пресни.

4. **Апаратура**

4.1. Ултразвукова вана

4.2. Механичен вибратор

4.3. Оборудване за HPLC с ултравиолетов детектор или детектор със система от диоди с вариращa дължина на вълната

4.3.1. Течна хроматографска колона, 250 mm × 4 mm, C18, 10 μm обшивка или подобна.

4.4. Мембранни филтри, 0,45 μm.

5. **Процедура**

Забележка: Олахиндоксът е светочувствителен. Извършвайте всички процедури под убита светлина или използвайте кехлибарена стъклария.

5.1. *Общо*

5.1.1. Анализира се празна проба за да се провери дали по нея няма олахиндокс или други влияещи върху нея вещества.

5.1.2. Извършва се регенерационен тест посредством анализиране на празната проба като се обогатява с добавянето на известно количество олахиндокс, равно на наличното количество в пробата. За обогатяване до нивото от 50 mg/kg прехвърлете 10,0 ml от основния стандартен разтвор (3.5.1) в конусообразна колба от 250 ml и изпарете разтвора до са. 0,5 ml. Добавете 50 g празна проба, разбъркайте добре и оставете 10 минути като разбърквате няколко пъти преди да продължите с етапа на екстракция (5.2).

Забележка: За целите на този метод празната проба трябва да бъде сходна по вид с действителната проба и не трябва да се отчита наличие на олахиндокс.

5.2. *Екстракция*

Претеглете до най-близките 0.01 g приблизително 50 g от пробата. Прехвърлете в конусообразна колба от 1000 ml, добавете 100 ml метанол (3.1) и поставете колбата в ултарзвукова вана (4.1) за 5 минути. Добавете 410 ml вода и оставете в ултразвуковата вана още 15 минути. Извадете колбата от ултразвуковата вана, разклатете в продължение на 30 минути с вибратора (4.2) и филтрирайте през нагънат филтър. Прехвърлете 10,0 ml от отфилтрувания материал в градуирана колба от 20 ml, долейте вода до маркировката и разбъркайте. Една аликвотна част се филтрира през мембранен филтър (4.4) (виж 9. Наблюдения) Преминете към определяне на съдържанието посредством HPLC (5.3).

5.3. *Определяне съдържанието посредством HPLC*

5.3.1 Параметри

Като ориентир предлагаме следните условия, но могат да се използват и други, при условие че дават същите резултати:

Аналитична колона (4.3.1)

Мобилна фаза (3.4):	смес от вода (3.3) и метанол (3.2), 900 + 100 (V + V)
Дебит:	1,5—2 ml/min.
Дължина на вълната на отчитане:	380 nm
Обем на впръскване:	20 µl—100 µl

Проверете устойчивостта на хроматографската система, като няколко пъти впръскате хроматографския разтвор (3.5.3), в който се съдържат 2,5 µg/ml, докато се постигнат постоянни височини на максимума и постоянни времена на задържане.

5.3.2 Калибрираща графика

Впръскайте всеки калибриращ разтвор (3.5.3.) няколко пъти и определете средната височина на максимума (площта) за всяка концентрация. Начертайте калибрираща графика като нанесете средната височина на максимума (площта) на калибриращите разтвори на ординатата, а съответната концентрация в µg/ml — на абцисата.

5.3.3 Пробен разтвор

Впръскайте пробния екстракт (5.2) няколко пъти като използвате същия обем както за калибриращите разтвори и определете средната височина на максимума (площта) за максимумите за олахиндокса.

6. **Изчисление на резултатите**

От средната височина (площ) на максимумите за олахиндокса в пробния разтвор определете концентрацията на пробния разтвор в µg/ml спрямо калибриращата графика (5.3.2).

Съдържанието на олахиндокс w в mg/kg в пробата се определя по формулата:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

където:

c = концентрацията на олахиндокс на пробния екстракт (5.2) в µg/ml

m = масата на пробната порция в g (5.2).

7. **Проверка на резултатите**

7.1. *Идентичност*

Идентичността на анализираната проба може да бъде проверена посредством извършване на паралелна хроматография или с детектор със система от диоди с вариращa дължина на вълната, с помощта на който се сравняват спектрите на пробния екстракт (5.2) и на калибриращия разтвор (3.5.3), съдържащ 5,0 µg/ml.

7.1.1. Паралелна хроматография

Един екстракт от пробата (5.2) се обогатява с добавяне на подходящо количество калибриращ разтвор (3.5.3). Добавеното количество олахиндокс трябва да бъде равно на количеството олахиндокс в пробата.

Трябва да се увеличи само височината на максимума на олахиндокса след като се вземе предвид както добавеното количество, така и разреждането на екстракта от пробата. Широчината на максимума по средата на височината му трябва да бъде в рамките от ± 10 % от първоначалната широчина на максимума на олахиндокса в необогатената проба.

7.1.2. Отчитане със система от диоди с вариращa дължина на вълната

Резултатите се оценяват според следните критерии:

a) Дължината на вълната при максимална оптична плътност на пробата и на стандартните спектри, отчетени на върха на максимума на хроматограмата, трябва да бъдат в рамките на диапазона, определен от разрешаващата способност на отчитащата система. За отчитане със система от диоди с вариращa дължина на вълната този диапазон обикновено е в рамките на ± 2 nm.

б) Между 220 и 400 nm, спектрите на пробата и на еталона, отчетени на върха на максимума на хроматограмата не трябва да се различават за онези части от спектъра, които са в рамките от 10 до 100 % от относителната оптична плътност. Този критерий е спазен когато имаме едни и същи максимуми и отклонението между двата спектъра в която и да е точка не надвишава 15 % от оптичната плътност на анализирания еталон.

в) Между 220 и 400 nm, спектрите на точките от изкачващата се страна, върха и слизащата страна на кривата за пробния екстракт не трябва да се различават един от друг за онези част от спектъра, които попадат в рамките на диапазона от 10—100 % от относителната оптична плътност. Този критерий е спазен когато имаме едни и същи максимуми и отклонението между спектрите, в която и да е точка, не надвишава 15 % от оптичната плътност на спектъра на върха на максимума.

Когато не е спазен един от тези критерии, наличието на анализираното съдържание не може да бъде потвърдено.

7.2. *Повторяемост*

Разликата между резултатите от две успоредни определяния на съдържанието, извършени върху една и съща проба, не трябва да надвишава 15 % спрямо по-високия резултат за съдържание на олахиндокс между 10 и 200 mg/kg.

7.3. *Регенериране*

За една обогатена празна проба регенерирането трябва да бъде най-малко 90 %.

8. **Резултати от едно съвместно проучване**

Организирано бе съвместно проучване, при което 13 лаборатории анализираха четири проби от храна за малки прасенца, включително една празна проба. Резултатите са обобщени по-долу:

	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
средно (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
Номинално съдържание(mg/kg)	—	15	50	100
Регенериране (%)	—	97,3	96,0	95,4

L: брой на лабораториите

n: брой на единичните стойности

S_r: стандартно отклонение на повторяемостта

S_R: стандартно отклонение на възпроизводимостта

CV_r: коефициент на изменение на повторяемостта

CV_R: коефициент на изменение на възпроизводимостта.

9. **Наблюдения**

Въпреки че методът още не проверен за храни със съдържание на олахиндокс повече от 100 mg/kg, възможно е да се постигнат задоволителни резултати като се вземе проба с по-малко тегло и/или екстракта (5.2) се разтвори до постигане на концентрация в рамките на диапазона на калибриращата крива (5.3.2).