

## ЧЕТВЪРТА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 5 декември 1972 година

относно установяване на методи за Общността за анализ за официален контрол на храни за животни

(73/46/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива на Съвета от 20 юли 1970 г.<sup>1</sup> за въвеждане в Общността на методи за вземане на проби и анализ за официалния контрол на храни за животни, както е изменена с Директива 72/275/ЕИО от 20 юли 1972 г.<sup>2</sup> и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че тази директива изисква официалният контрол на храни за животни да се провежда, като се използват методите на Общността за вземане на проби и анализ с цел проверка на съответствието с изискванията, произтичащи от закони, подзаконови или административни разпоредбите, отнасящи се до качеството и състава на храните за животни;

като има предвид, че Директиви № 71/250/ЕИО от 15 юни 1971 г.<sup>3</sup>, № 71/393/ЕИО от 18 ноември 1971 г.<sup>4</sup> и № 72/199/ЕИО от 27 април 1972 г.<sup>5</sup> на Комисията са вече установили много методи на Общността за анализ; като има предвид, че поради постигнатия оттогава напредък, е препоръчително да бъде приета четвърта серия от методи;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет за храни за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

### *Член 1*

Държавите-членки изискват анализите за официален контрол на храните за животни, отнасящи се до съдържанието на влага в животински и растителни масла и мазнини, магнезий и сурови влакна да се провеждат в съответствие с методите, описани в приложение I към настоящата директива.

Общите разпоредби, посочени в част 1 (въведение) от приложението към Първа

---

<sup>1</sup> ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.

<sup>2</sup> ОВ L 171, 29.7.1972 г., стр. 39.

<sup>3</sup> ОВ L 155, 12.7.1971 г., стр. 13.

<sup>4</sup> ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.

<sup>5</sup> ОВ L 123, 29.5.1972 г., стр. 6.

директива № 71/250/ЕИО на Комисията от 15 юни 1971 г ще са приложими към методите, описани в приложение I към настоящата директива.

#### *Член 2*

Държавите-членки изискват анализите за официален контрол на храните за животни по отношение на съдържанието им на ретинол (витамин А), тиамин (аневрин, витамин В<sub>1</sub>), аскорбинова и дехидроаскорбинова киселини (витамин С) да се провеждат в съответствие с методите, описани в приложение II към настоящата директива.

Общите условия, посочени в част 1 (въведение) от приложението към Първа директива на № 71/250/ЕИО от 15 юни 1971 г. на Комисията с изключение на частта, която разглежда подготовката на проби за анализ, са приложими към методите, описани в приложение II към настоящата директива.

#### *Член 3*

Държавите-членки не по-късно от 1 януари 1974 г. приемат закони, подзаконови и административни разпоредби, за да приведат законодателство си, в съответствие с настоящата директива. Те незабавно уведомяват Комисията за това.

#### *Член 4*

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 5 декември 1972 година.

*За Комисията:*  
**S. L. MANSHOLT**  
*Председател*

## ПРИЛОЖЕНИЕ I

### 1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЛАГА В ЖИВОТИНСКИ И РАСТИТЕЛНИ МАЗНИНИ И МАСЛА

#### 1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се определи водата и летливите вещества, съдържащи се в животински и растителни мазнини и масла.

#### 2. Принцип

Пробата се изсушава до постоянно тегло при 103°C. Загубата на маса се определя чрез претегляне.

#### 3. Апаратура

3.1. Плоскодънно блюдо от корозионно устойчив материал с диаметър от 8 до 9 см и с приблизителна височина 3 см.

3.2. Живачен термометър с усилен резервоар и разширение в горната част на капиляра, градуиран от около 80°C до най-малко 110°C и дълъг приблизително 10 см.

3.3. Пясъчна баня или електрически котлон.

3.4. Ексикатор, съдържащ ефикасен сушител.

3.5. Аналитични везни.

#### 4. Процедура

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

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

За да се осигури напълно отстраняване на влагата, нагриването се повтаря няколко пъти до  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  с охлаждане до 93°C между нагриванията. След това се оставя да се охлади до стайна температура в ексикатора (3.4.) и се претегля. Тази операция се повтаря, докато загубата на маса между две последователни претегляния не надвишава 2 mg.

Забележка: Увеличаване на масата на пробата след повторно нагриване е индикация за окисляване на мазнината. В този случай резултатът се пресмята от претеглянето, проведено непосредствено преди масата да започне да нараства.

31973L0046 – ЦПР - редактиран

## 5. Пресмятане на резултатите

Съдържанието на влага, като процент от пробата се дава от следната формула:

$$(M_1 - M_2) \cdot \frac{100}{M_0}$$

където:

$M_0$  = масата в грамове на пробата за анализ ;

$M_1$  = масата в грамове на блюдото със съдържанието й преди нагряване

$M_2$  = масата в грамове на блюдото със съдържанието й след нагряване;

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

## Повторяемост

Разликата във влажността между резултатите в две паралелни определяния, проведени на една и съща проба, не трябва да надвишава 0.05 % като абсолютна стойност.

## 2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАГНЕЗИЙ

- чрез атомноабсорбционна спектрофотометрия

### 1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се определи количеството магнезий в храни за животни. Той е особено подходящ за определяне на съдържания на магнезий, по-ниски от 5 %.

### 2. Принцип

Пробата се опепелява и се разтваря в разредена солна киселина. Ако пробата не съдържа органични вещества, тя се разтваря директно в разредена солна киселина. Разтворът се разрежда и съдържанието на магнезий се определя чрез атомноабсорбционна спектрофотометрия при 285.2 nm при сравняване със стандартни разтвори.

### 3. Реактиви

3.1. Солна киселина, ч.з.а., плътност 1.16.

3.2. Концентрирана солна киселина, ч.з.а., плътност 1.16.

3.3. Магнезиева лента или жица, или магнезиев сулфат хептахидрат, изсушен при стайна температура.

31973L0046 – ЦПР - редактиран

3.4. Разтвор на стронциева сол (хлорид или нитрат), отговарящ на 2.5 % (т/о) стронций (= 76.08 g SrC<sub>12</sub>.6H<sub>2</sub>O ч.з.а. или 60.38 g Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ч.з.а.).

### 3.5. Стандартен разтвор на магнезий

Претегля се с точност до един mg 1 g магнезий (3.3.), от чиято повърхност предварително внимателно са отстранени окисите или съответно количество (10.143 g) магнезиев сулфат хептахидрат (3.3.). Пренася се в мерителна колба от 1000 ml, добавят се 80 ml солна киселина (3.1.), оставя се да се разтвори и обемът се довежда до 1000 ml с вода. 1 ml от този разтвор съдържа 1.000 mg магнезий.

## 4. Апаратура

4.1. Тигли от платина, кварц или порцелан.

4.2. Термостатируема електрическа муфелна пещ.

4.3. Атомноабсорбционен спектрофотометър.

## 5. Процедура

### 5.1. Приготвяне на разтвор от пробата

#### 5.1.1. Храни за животни, съставени изключително от неорганични вещества

В мерителна колба от 500 ml с 250 до 300 ml вода се претеглят с точност 1 mg 5 g от пробата. Добавят се 40 ml солна киселина (3.1.), довежда се до кипене и течността се оставя да кипи леко в продължение на 30 минути. Оставя се да изстине, обемът се допълва с вода, размесва се и се филтрува в суха Бехерова чаша през сух нагънат филтър. Първите 30 ml от филтрата се отстраняват. В присъствие на силикати проба от 5 g се обработва с достатъчно количество (15 - 30 ml) солна киселина (3.2.), изпарява се до сухо на водна баня и се пренася в пещ с температура 105°C за един час. По-нататък се процедира, както е указано в третото изречение на точка 5.1.2.

#### 5.1.2. Храни за животни, съставени предимно от неорганични вещества

В тегел се претеглят 5 g от пробата с точност до 1 mg и се опепеляват в муфелна пещ при 550°C, докато се получи пепел, свободна от въглени частици, и се оставя да изстине. За да се отстранят силикатите, към пепелта се добавя достатъчно количество (15 - 30 ml) солна киселина (3.2.), изпарява се до сухо на водна баня и се пренася в пещ при 105°C за един час. Остатъкът се обработва с 10 ml солна киселина (3.1.) и с топла вода се пренася в мерителна колба от 500 ml. Оставя се да се охлади и обемът се допълва с вода. Размесва се и се филтрува в суха Бехерова чаша през сух нагънат филтър. Първите 30 ml от филтрата се отстраняват.

#### 5.1.3. Храни за животни, съставени предимно от органични вещества

В тегел се претеглят 5 g от пробата с точност до 1 mg и се опепеляват в муфелна пещ

при 550°C, докато се получи пепел, свободна от въглени частици. Пробата се обработва с 5 ml солна киселина (3.2.), изпарява се до сухо на водна баня и след това се суши за един час в пещ при 105°C, за да се стопят неразтворимите силикати. Пепелта се обработва с 5 ml солна киселина (3.1.), пренася се с топла вода в мерителна колба от 250 ml, довежда се до кипене, оставя се да изстине и обемът се допълва с вода. Размесва се и се филтрува в суха Бехерова чаша през сух нагънат филтър. Първите 30 ml от филтратата се отстраняват.

## 5.2. Измерване чрез атомна абсорбция

Чрез разреждане на стандартния разтвор (3.5.) с вода се приготвят най-малко пет сравнителни разтвора с нарастващи концентрации, отговарящи на оптималния измервателен диапазон на спектрофотометъра. Във всеки разтвор се добавят 10 ml от разтвора на стронциева сол (3.4.) и обемът им се довежда до 100 ml с вода. Една аликвотна част от филтратата, получен по точки 5.1.1., 5.1.2. или 5.1.3. се разреждат с вода така, че да се получи концентрация на магнезий, която е в границите на концентрацията на сравнителните разтвори. Концентрацията на солна киселина в този разтвор не трябва да надвишава 0.4 N. Добавят се 10 ml разтвор на стронциева сол (3.4.) и обемът се допълва до 100 ml с вода. Абсорбцията на определяемия разтвор и на сравнителните разтвори се измерва при 285.2 nm.

## 6. Пресмятане на резултатите

Количеството на магнезия в пробата се пресмята по отношение на сравнителните разтвори. Резултатът се изразява като процент от пробата.

### Повторяемост

Разликата между резултатите в две паралелни определяния, проведени на една и съща проба, не трябва да надвишава 5 % в относителна стойност.

## 3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУРОВИ ВЛАКНА

### 1. Цел и обхват

Този метод дава възможност за определяне в храни за животни количеството на органични вещества, които не съдържат мазнини и са неразтворими в кисели и алкални среди. Обикновено те се означават като сурово влакно.

### 2. Принцип

Пробата, обезмаслена когато е необходимо, се обработва последователно с кипящи разтвори на сярна киселина и калиева основа с определени концентрации. Остатъкът се отделя чрез филтруване в присъствие на азбест, измива се, изсушава се, претегля се и се опепелява при 900°C. Загубата на тегло в резултат на опепеляването отговаря на суровото влакно, присъстващо в изследваната проба.

### 3. Реактиви

3.1. Сярна киселина 0.26 N

3.2. Обработен азбест:

Към азбест, от същия тип, който се използва за тигел на Gooch, се добавя разрежена солна киселина (1 обем солна киселина с плътност 1.19 + 3 обема вода) в обем пет пъти по-голям от обема на азбеста. Сместа кипи за около 45 минути, оставя се да изстине и се филтрува през фуния на Buchner. Остатъкът се мие първо с вода, докато изчезне солната киселина и след това с ацетон (3.6.). Азбестът се изсушава в сушилен шкаф и след това се налява за 2 часа при 900°C. Оставя се да изстине и се съхранява в шише със запушалка. Азбестът, обработен по този начин, може да се използва няколко пъти. Той трябва да отговаря на изискванията за празна проба, дадени в точка 5.

3.3. Емулсия за пеногасене (напр. силикон).

3.4. Разтвор на калиева основа 0.23 N.

3.5. Солна киселина 0.5 N.

3.6. Ацетон.

3.7. Диетилов етер.

4. Апаратура

4.1. Бехерови чаши с обем най-малко 600 ml, с градуировка на нивото на 200 ml.

4.2. Порцеланови дискове с диаметър около 80 мм и дебелина около 4 мм, перфорирани с приблизително 32 дупки, всяка от които с диаметър около 4 мм.

4.3. Смукателно шише с гумена запушалка с вместимост около 2 л, с градуировка на нивото на 800 ml, окомплектовано със стъклени фунии с диаметър 120 мм.

4.4. Филтрувални дискове с диаметър 40 мм и дебелина около 4 мм, със скосен ръб, който да пасва на конуса на фунията (4.3.), перфорирани с около 16 отвора, всеки от които с диаметър около 4 мм и покрити с мрежа с размер на отворите около 1 мм. Както дисковете, така и мрежата трябва да бъдат устойчиви на киселини и основи.

4.5. Тигли за изгаряне от платина или кварц.

4.6. Термостатируема електрическа муфелна пещ

4.7. Ексикатор.

4.8. Азбестов филтър

Суспендират се 2.0 g азбест (3.2.) в 100 ml вода. Филтрува се под вакуум през филтрувален диск, покрит с метална мрежа (4.4.) поставен във фунията на 31973L0046 – ЦПР - редактиран

смукателното шише (4.3.). Филтратът се събира и се филтрува още веднъж през същия филтър. Отстранява се филтратът.

## 5. Процедура

В Бехерова чаша (4.1.) се претеглят с точност до 1 mg 3 g от пробата и 2 g обработен азбест (3.2.), добавят се 200 ml сярна киселина (3.1.) и няколко капки емулсия за гасене на пяна (3.3.). Нагрива се бавно до завиране и се оставя да ври точно 30 минути. За да се запази постоянен обемът Бехеровата чаша се покрива с приспособление за охлаждане, като например облодънна колба от 500 ml, в която циркулира студена вода. Кипенето се прекратява чрез добавяне на около 50 ml студена вода и се филтрува веднага под вакуум през азбестов филтър, подготвен предварително, както е указано в точка 4.8.

Остатъкът се промива с пет порции от по приблизително 100 ml много гореща вода така, че да се получи краен обем на филтрата 800 ml. Остатъкът се пренася количествено в Бехеровата чаша (4.1.), в която предварително е бил поставен порцелановият диск за регулиране на кипенето (4.2.). Добавят се 200 ml разтвор на калиева основа (3.4.). Нагрива се до кипене и се оставя да ври точно 30 минути. Добавят се приблизително 50 ml студена вода и се филтрува незабавно под вакуум през свеж азбестов филтър, подготвен предварително, както е указано в точка 4.8. Остатъкът се мие с много гореща вода, докато промивната вода стане неутрална (изпитва се с лакмусова хартия) и след това три пъти с ацетон (3.6.) (общо около 100 ml ацетон).

Остатъкът се пренася количествено в тигел за изгаряне (4.5.) като, ако е необходимо се натрошава, и се суши до постоянно тегло в сушилният шкаф при 130°C.

Оставя се да се охлади в ексикатора (4.7.) и бързо се претегля.

Тигелът се поставя в муфелната пещ (4.6.) и се налява за 30 минути при 900°C. Оставя се да се охлади в ексикатора (4.7.) и бързо се претегля.

Празната проба се провежда, като се приложи същата процедура към обработения азбест (3.2.), но без пробата. Загубата на тегло в резултат от наляването на 6 g азбест не трябва да надвишава 10 mg.

## 6. Изчисляване на резултатите

Съдържанието на сурово влакно като процент от пробата се дава от отношението:

$$\frac{(a - b) \cdot 100}{3}$$

където:

a = загуба на теглото след опепеляване по време на определянето;

b = загуба на теглото след опепеляване по време на теста с празна проба



## Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени на една и съща проба, не трябва да надвишават:

0.3, като абсолютна стойност, за съдържание на сурово влакно по-малко от 10 %;

3 %, като относителна стойност, за съдържание на сурово влакно, равно или по-голямо от 10 %.

## 7. Наблюдения

7.1. Храните за животните, съдържащи повече от 10 % масла или мазнини трябва да бъдат обезмаслени с диетилов етер (3.7.) преди анализа. За да се направи това, пробата (3 г, претеглена с точност до 1 mg) се поставя върху азбестов филтър (4.8.). Залива се трикратно с около 50 ml диетилов етер и всеки път се филтрува внимателно под вакуум. Обезмаслената проба и азбестът се пренасят количествено в Бехерова чаша (4.1.) и анализът продължава, както е показано в точка 5.

7.2. Храните за животните, съдържащи масла и мазнини, които не могат директно да бъдат екстрахирани, трябва да бъдат обезмаслени, както е указано в точка 7.1. и допълнително обезмаслявани всеки път след измиване на киселината от остатъка при киселинната обработка.

За да се направи това, киселината се измива от остатъка трикратно с ацетон (3.6.) (общо 100 ml), след това трикратно с 50 ml диетилов етер (3.7.). След това остатъкът се пренася количествено в Бехерова чаша (4.1.) и анализът се продължава, както е указано във втория параграф на точка 5 (Обработка с разтвор на калиева основа).

7.3. Ако храните за животни са богати на калций (повече от 2 % калций), пробата за изследване (3 г, претеглени с точност до 1 mg) се поставя в Бехерова чаша (4.1.) със 100 ml 0.5 N солна киселина (3.5.) и се оставя на хладно за 5 минути. Филтрува се незабавно и се промива със студена вода. Като спомагателно средство за филтруване се използват 2 г от азбеста, указан за варенето със сярна киселина. Ако филтруването се окаже трудно, суспензията се разрежда с ацетон (3.6.). След това се процедира, както е указано в точка 5.

## ПРИЛОЖЕНИЕ II

### 1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РЕТИНОЛ (ВИТАМИН А)

#### 1. Цел и обхват

Този метод дава възможност за определяне количеството ретинол (витамин А) в храни за животни, в концентрати и премикси. По-ниската граница на определяне е 10 000 IU/kg при силно пигментирани храни и 4 000 IU/kg при други<sup>(1)</sup>. Според предполагаемото съдържание на ретинол продуктите се класифицират в две групи:

Група А: съдържание по-ниско от 200 000 IU/kg

Група В: съдържание равно на или по-високо от 200 000 IU/kg

#### 2. Принцип

Пробата се хидролизира на горещо в етанолова среда с разтвор на калиева основа в присъствие на антиоксидант или в азотна атмосфера. Сместа се екстрахира с 1,2-дихлоретан. Екстрактът се изпарява до сухо и се обработва с петролеев етер. Разтворът се хроматографира на колона с алуминиев окис (за продукти от група В хроматография е необходима само в някои случаи). За продукти от група А ретинолът се определя чрез спектрофотометрия при 610 nm след образуването на цветен комплекс съгласно реакцията на Кар-Прайс; за продуктите от група В определянето чрез спектрофотометрия се извършва в UV-спектъра при 325 nm.

#### 3. Реактиви

а) Използвани за анализ на продукти от групи А и В

3.1. Етанол, 96 % (o/o)

3.2. Разтвор на натриев аскорбат, ч.з.а., 10 % (т/о) или

3.3. Пречистен азот

3.4. Разтвор на калиева основа, ч.з.а., 50 % (т/о)

3.5. Разтвор на калиева основа, ч.з.а., 1 N

3.6. Разтвор на калиева основа, ч.з.а., 0.5 N

3.7. 1,2-дихлоретан, ч.з.а.

3.8. Петролеев етер, диапазон на кипене от 30 до 50°C. Ако е необходимо, пречиства се както следва: 1000 ml петролеев етер се разбъркват с порции от по 20 ml концентрирана сярна киселина, докато киселината остане безцветна. Киселината се

---

<sup>(1)</sup> 1 IU = 0,3 µg ретинол.

отстранява и петролеевият етер се промива последователно с 500 ml вода, двукратно с 250 ml 10 %-ен (т/о) разтвор на натриева основа и трикратно с 500 ml вода. Отстранява се водният слой, петролеевият етер се суши за един час над активен въглен и безводен натриев сулфат, филтрува се и се дестилира.

3.9. Алуминиев окис, стандартизиран по Брокман: алуминиевият окис се накалява за 8 часа при 750°C, охлажда се в ексикатор и се съхранява в бутилка от кафяво стъкло с шлифова запушалка. Преди използване за хроматографиране се овлажнява както следва: в бутилка от кафяво стъкло се поставят 10 g алуминиев окис и 0.7 ml вода, бутилката се запушва с шлифова запушалка и се нагрива за 5 минути в кипяща водна баня при разклащане. Остава се да изстине. Активността на така получения алуминиев окис се проверява чрез обработването на известно количество ретинол (3.17) (около 500 IU) по процедурите, описани в точки 5.3 и 5.4, като се проверява загубата.

3.10. Основен алуминиев окис, степен на активност 1 (Woelm, Merck или еквивалентен)

3.11. чист диетилов етер

Пероксидите и следите от вода се отстраняват чрез хроматография върху колона с основен алуминиев окис (3.10.) (25 g алуминиев окис за 250 ml диетилов етер).

3.12. Разтвори на петролеев етер (3.8) при 4, 8, 12, 16 и 20 % (о/о) диетилов етер (3.11.)

3.13. Разтвор на натриев сулфид 0.5 M в 70 %-ен (о/о) глицерин, приготвен от натриев сулфид, ч.з.а

б) Използвани изключително за анализиране на продукти от група А

3.14. Кристализиращ бензол, ч.з.а.

3.15. Хлороформ, ч.з.а.

Етанол, фосген и следи от вода се отстраняват чрез хроматографиране върху колона с основен алуминиев окис (3.10) (50 g алуминиев окис за 200 ml хлороформ; препоръчително е първите 50 ml от елюата да се хроматографират повторно).

3.16. Реактив на Кар-Прайс

Разбъркват се около 25 g антимонов трихлорид, ч.з.а. (пазен в ексикатор) със 100 ml хлороформ (3.15), докато разтворът се насити. Неполямо количество остатъчен антимонов трихлорид не създава проблеми. Добавят се 2 ml оцетен анхидрид, ч.з.а. Съхранява се в хладилник, в бутилка от кафяво стъкло с шлифована запушалка. Разтворът се съхранява няколко седмици.

3.17. Ретинол, стандартизиран спектрофотометрично.

в) Използвани изключително за анализиране на продукти от група В

3.18. Изопропанол, за хроматография.

4. Апаратура

4.1. Водна баня.

4.2. Апарат за вакуум-изпаряване с облодънни колби с различна вместимост.

4.3. Стъклени колони за хроматография (дължина 300 мм, вътрешен диаметър около 13 мм)

4.4. Спектрофотометър с кювети от 10 мм. Измерването в UV изисква кварцови кювети.

4.5. UV-лампи, подходящи за 365 nm.

5. Процедура

Забележка: Всички операции трябва да се провеждат далече от пряка светлина, а ако е необходимо, в оборудване от кафяво стъкло.

5.1. Проба за изследване

От окончателно разделената проба се взема проба за анализ, пропорционална на предполагаемото съдържание на ретинол или:

от 0.1 до 1.0 g за концентрати (съдържание, по-голямо от 20 000 IU/g);

от 3.0 до 5.0 g за премикси съдържание между 400 и 20 000 IU/g);

от 10 до 20 g за неорганични смеси;

30 g за продукти от група А

Пробата за изследване се поставя незабавно в колба ок 500 ml с шлифова запушалка.

5.2. Хидролизиране и екстрахиране <sup>6</sup>

Към пробата за изследване се добавят последователно 40 ml етанол (3.1), 2 ml разтвор на натриев аскорбат (3.2.) <sup>7</sup> (3), 10 ml разтвор на калиева основа (3.4.) и 2 ml разтвор

---

<sup>6</sup> За продуктите, които се използват за кърмене и тези, които проявяват тенденция да агломерират или да набухват, количеството на реактивите, указани в първия и втория параграфи на точка 5.2. се увеличават двукратно.

<sup>7</sup> Няма нужда от прибавяне на натриев аскорбат, когато хидролизата се провежда в азотна атмосфера.

на натриев сулфид (3.13.).

Нагрива се за 30 минути при 70-80°C с обратен хладник, след което се оставя да се охлади под струя вода. Добавят се 50 ml етанол (3.1.) и 100 ml 1,2-дихлоретан (3.7.) (взема се с пипета). Разклаща се енергично, след което супернатантата се декантира в делителна фуния. В делителната фуния се добавят 150 ml разтвор на калиева основа (3.5.), разклаща се за 30 секунди и се оставя да се разделят слоевете. Слойт на дихлоретан (долният слой) се събира в делителна фуния, добавят се 40 ml разтвор на калиева основа (3.6.), разклаща се за 10 секунди и се оставя да се разделят слоевете. Слойт на дихлоретан се събира в делителна фуния и се промива 6-8 пъти с порции от по 40 ml вода, докато се освободи от алкалите (проба с фенолфталеин). Събира се слойт на дихлоретан и се отстраняват последните следи вода с лентички филтърна хартия.

Аликвотна част от разтвора се изпарява до сухо под вакуум и остатъкът се обработва бързо на водна баня при 40°C с 5 ml петролеев етер (3.8.).

За продукти от група А хроматографирането е указано в точка 5.3.1.

За продукти от група В разтворът се прехвърля в мерителна колба от 50 ml, обемът се долива с петролеев етер (3.8.), разбърква се и се измерва оптичната плътност, както е указано в точка 5.4.2.

### 5.3. Хроматографиране

#### 5.3.1. Продукти от група А

Хроматографската колона (4.3.) се запълва до височина 200 mm с 10 g алуминиев окис (3.9.), предварително напоен с петролеев етер (3.8.). В колоната се пренася разтворът, получен в точка 5.2 и незабавно се добавят 20 ml петролеев етер (3.8.). Елуира се последователно с порции от по 10 ml от разтворите на петролеев етер с 4, 8, 12, 16 и 20 % диетилов етер под налягане или при слаб вакуум така, че потокът да бъде 2 до 3 капки в секунда.

Каротинът се елуира първи <sup>8</sup> (4). Обикновено ретинолът се елуира с разтворът на петролеев етер, съдържащ 20 % диетилов етер (3.12.). Елуирането се съпровожда от осветяване с UV светлина (колоната се облъчва за кратко с живачна лампа). Флуоресцентната зона на ретинола се отделя ясно от жълтите ксантофилни зони, които я следват. Елуатната фракция, съдържаща ретинола, се събира в Ерленмайерова колба.

#### 5.3.2. Продукти от група В

Хроматографиране се провежда, само ако измерванията на оптичната плътност,

---

<sup>8</sup> Няма нужда от прибавяне на натриев аскорбат, когато хидролизата се провежда в азотна атмосфера.

$$E \frac{1\%}{1cm} = 2600 \cdot$$

получени в точка 5.4.2. не се съгласуват с изискванията, дадени в точка 5.4.2.

Ако хроматографирането се окаже необходимо, в хроматографската колона се пренася аликвотна част от разтвора в петролеев етер, получен в точка 5.2., която съдържа около 500 IU ретинол и се хроматографира, както е указано в точка 5.3.1.

#### 5.4. Измерване на оптичката плътност

##### 5.4.1. Продукти от група А

Елуатът, съдържащ ретинол, получен в точка 5.3.1. се изпарява до сухо под вакуум. Остатъкът се обработва с 2 ml бензол (3.14.). Вземат се 0.3 ml от този разтвор и се добавят 3 ml от реактива на Кар-Прайс (3.16.). Получава се синьо оцветяване. Оптичката плътност се измерва със спектрофотометър при 610 nm, точно 30 секунди след началото на реакцията. Съдържанието на ретинол се определя чрез сравняване със стандартна крива, получена от разтвори на бензол, съдържащи нарастващи концентрации на стандартен ретинол и обработени с реактива на Кар-Прайс (от 2 до 16 IU стандартен ретинол (3.17.) в 0.3 ml бензол (3.14.) + 3 ml реактив на Кар-Прайс (3.16.)). Стандартната крива трябва да бъде редовно и често проверявана с използването на стандарта и свежо приготвен реактив на Кар-Прайс.

##### 5.4.2. Продукти от група Б

Взема се аликвотна част от разтвора в петролеев етер, получен в точка 5.2., който съдържа приблизително 200 IU ретинол. Изпарява се под вакуум до сухо и остатъкът се обработва с 25 ml изопропанол (3.18.). Оптичката плътност се измерва на спектрофотометър при 325, 310 и 334 nm. Абсорбционният максимум се намира при 325 nm.

Съдържанието на ретинол в разтвора се пресмята както следва:

$$E_{325} \times 18.30 = \text{IU ретинол на ml}$$

като отношението на оптичките плътности

$$E_{310} : E_{325} \text{ и } E_{334} : E_{325}$$

трябва да бъде  $6 : 7 = 0.857$ .

Ако едно от тези съотношения се отличава чувствително от тази величина ( $< 0.830$  или  $> 0.880$ ) измерването на оптичката плътност трябва да бъде предшествано от хроматографиране в съответствие с метода, изложен в точка 5.3.2. Ако измерването на оптичките плътности, проведено след хроматографиране покаже, че споменатите по-горе отношения още се отличават значително от стойността 0.857 ( $< 0.830$  или  $> 0.880$ ), определянето трябва да бъде проведено в съответствие с метода, указан за продукти от група А.

#### 6. Пресмятане на резултатите

Съдържанието на ретинол в пробата за изследване се пресмята, като се имат предвид теглото на пробата за изследване и разрежданията, които са направени в хода на анализа. Резултатите се изразяват в IU за kg продукт за изхранване на животните или за kg концентрат или за kg премикс.

#### Повторяемост

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

- 20 %, като относителна стойност, за съдържание на ретинол, по-ниско от 75 000 IU/kg;
- 15 000 IU за съдържание между 75 000 и 150 000 IU/kg;
- 10 %, като относителна стойност, за съдържание между 150 000 и 250 000 IU/kg;
- 25 000 IU за съдържание между 25 000 и 500 000 IU/kg;
- 5 %, като относителна стойност, за съдържание, по-високо от 500 000 IU/kg;

## 2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТИАМИН (ВИТАМИН В1, АНЕВРИН)

### 1. Цел и обхват

Този метод дава възможност да се определи количеството на тиамин (аневрин, витамин В1) в храни за животни, концентрати и премикси. Долната граница на определяне е 5 ppm.

### 2. Принцип

Разтворът се третира на горещо с разредена солна киселина, след което се хидролизира ензимно. Полученият разтвор се подлага на алкално окисляване. Образуваният тиохром се екстрахира с изобутанол и се определя флуориметрично.

### 3. Реактиви

#### 3.1. Стандартен разтвор на тиамин, 100 mg/ml

Разтварят се 112.3 mg тиамин хидрохлорид, предварително изсушен под вакуум до постоянно тегло, в 1000 ml 0.2 N сярна киселина (3.2.). Ако се държи на хладно и тъмно място, този разтвор се запазва за един месец.

#### 3.2. Сярна киселина, 0.2 N

#### 3.3. чист натриев бисулфит.

#### 3.4. Разтвор на калиев ферицианид, ч.з.а., 20 % (т/о)

#### 3.5. Разтвор на калиева основа, ч.з.а., 25 % (т/о)

#### 3.6. Смес за окисляване

Смесват се 2 ml разтвор на калиев ферицианид (3.4.) с 48 ml разтвор на калиева основа (3.5.). Тази смес не се съхранява повече от 4 часа.

#### 3.7. Изобутанол, ч.з.а.

#### 3.8. Разтвор на натриев ацетат, 2.5 N

#### 3.9. Многоензимен препарат, съдържащ протеаза, фосфатаза и амилаза (напр. Clarase).

#### 3.10. Етанол, 96 %-ен (о/о)

### 4. Апаратура

#### 4.1. Водна баня

#### 4.2. Центрофуга (3500 оборота в минута) с епруветки с капацитет от 30 до 50 ml, 31973L0046 – ЦПР - редактиран



комплектовани с шлифови запушалки.

#### 4.3. Флуориметър.

### 5. Процедура

#### 5.1. Ензимна хидролиза

Във всяка от две мерителни колби от 250 ml, А и В, се поставят еднакви количества от фино раздробената проба, съдържаща около 100 mg тиамин и 125 ml сярна киселина (3.2.). Само в колба А се добавя също 1.0 ml стандартен разтвор (3.1.) (вътрешен стандарт).

Колбичките се разклащат енергично, поставят се в кипяща водна баня и се държат там 15 минути, като от време на време се разклащат. Оставят се да се охладят до около 45°C. Във всяка колба се добавят 20 ml разтвор на натриев ацетат (3.8.) и 0.5 g многоензимен препарат (3.9.), след което се оставят за 20 минути при стайна температура. Добавят се 20 ml разтвор на натриев ацетат (3.8.), обемът се допълва с вода, хомогенизира се и се филтрува. Филтратите А и В се събират, след като се изхвърлят първите 15 ml. Приготвят се следващите разтвори:

##### 5.1.1. Сравнителен разтвор Т

В центрофужна епруветка (4.2.) се поставят 5 ml филтрат А и около 10 mg натриев бисулфит (3.3.). Епруветката се потапя в кипяща водна баня за 15 минути, след което се оставя да се охлади до стайна температура.

##### 5.1.2. Разтвори А (вътрешен стандарт) и В (проба)

В центрофужна епруветка (4.2.) се поставят 5 ml филтрат А, а в друга центрофужна епруветка (4.2.)- 5 ml филтрат В.

#### 5.2. Окисляване

Към разтворите Т, А и В се добавят 5 ml окисляваща смес (3.6.) и, една минута покъсно, 10 ml изобутанол (3.7.). Епруветките се запушват и се разклащат енергично за 5 секунди. Оставят се да престоят за 1 минута и се центрофугират, за да се разделят слоевете. От всяка епруветка се пренасят 5 ml от супернатантния изобутанолов слой във всяка от 25 милилитровите мерителни колби, обемът се допълва с етанол (3.10.) и се хомогенизира (= екстракти Т, А и В).

#### 5.3. Измерване на флуоресценцията

Измерването се провежда при дължина на вълната, при която флуориметърът отговаря оптимално на флуоресценцията на тиохрома. Използва се дължина на вълната около 365 nm.

Апаратът се юстира на нула с използването на екстракт Т. Измерва се интензивността на флуоресценция на екстрактите А и В.

## 6. Пресмятане на резултатите

Съдържанието на тиамин в mg/kg в пробата се дава от отношението:

$$\frac{d \cdot b}{(a - b) \cdot c}$$

където:

a = интензивност на флуоресценцията на екстракт А (вътрешен стандарт);

b = интензивност на флуоресценцията на екстракт Б (проба);

c = тегло на пробата за изследване в g;

d = количество на тиамин в  $\mu\text{g}$  добавена към пробата за изпитване (вътрешен стандарт).

### Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определения, проведени на една и съща проба, не трябва да надвишава:

10 %, като относителна стойност, за съдържание по-малко от 500 mg/kg, и

5 %, като относителна стойност, за съдържание равно или по-голяма от 500 mg/kg.

## 3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АСКОРБИНОВА КИСЕЛИНА И ДЕХИДРОАСКОРБИНОВА КИСЕЛИНА (ВИТАМИН С)

### 1. Цел и обхват

Този метод дава възможност за определяне на общото количество аскорбинова и дехидроаскорбинова киселини (витамин С) в Храни за животни, в концентрати и премикси. Долната граница на определяне е 5 ppm. Според предполагаемото съдържание на витамин С, продуктите се класифицират в две групи:

Група А: съдържание по-ниско от 10 g/kg

Група Б: съдържание равно на или по-голямо от 10 g/kg

### 2. Принцип

Пробата се суспендира в разреден разтвор на метафосфорна киселина и се екстрахира с хлороформ. Водната фаза се обработва с разтвор на 2,6-дихлорфенол-индофенол, за да се превърне аскорбиновата киселина в дехидроаскорбинова киселина и след това - с разтвор на 2,4-динитрофенилхидразин. Образованият хидразон се екстрахира със смес от етилацетат, ледена оцетна киселина и ацетон. Разтворът се хроматографира на колона със силикагел, елуатът се изпарява до сухо и остатъкът се разтваря в разредена солна киселина. Оптичестката плътност на разтворът се измерва чрез

спектрофотометър при 509 nm.

За продуктите от група А елуатът от колонната хроматография се подлага по-нататък на тънкослойна хроматография за изолиране на хидразона.

### 3. Реактиви

#### 3.1. Стандартен разтвор на L-аскорбинова киселина, 0.05 %

Разтварят се 50 mg L-аскорбинова киселина, ч.з.а. в около 20 ml разтвор на метафосфорна киселина (3.2.) и обемът се довежда до 100 ml с вода. Приготвя се непосредствено преди употреба.

#### 3.2. Разтвор на метафосфорна киселина, 10 % (т/о)

200 g метафосфорна киселина, ч.з.а. се стриват в хаван, разтварят се във вода и обемът се довежда с вода до 2000 ml. Съхранява се при 4°C. Разтворът е стабилен за една седмица.

#### 3.3. Хлороформ, ч.з.а.

#### 3.4. Разтвор на 2,6-дихлорфенол-индофенол, ч.з.а., 0.5 % (т/о)

Приготвя се непосредствено преди употреба.

#### 3.5. Пулпа за филтруване (Schleicher & Schuel N 121 или еквивалентна)

#### 3.6. Кисел разтвор на 2,4-динитрофенилхидразин

Разтварят се 2 g 2,4-динитрофенилхидразин в 100 ml разредена сярна киселина (25 ml сярна киселина, ч.з.а., плътност 1.84, се разреждат до 100 ml с вода). При съхраняване на студено този разтвор е годен една седмица.

#### 3.7. Азот или

#### 3.8. Въглероден двуокис

3.9. Смес от етилацетат, ч.з.а., ледена оцетна киселина и ацетон, ч.з.а. в обемно съотношение 96 : 2 : 2.

3.10. Смес от дихлорметан, ч.з.а. и ледена оцетна киселина в обемно съотношение 97:3

3.11. Силикагел с размер на частиците от 0.05 до 0.2 mm

3.12. Силикагел Н за тънкослойна хроматография (качество по Stahl)

3.13. Разредена сярна киселина

В мерителна колба от 200 ml с 105 ml вода се добавя до обема сярна киселина, ч.з.а., с плътност 1.84.

#### 3.14. Елуиращ разтвор за тънкослойна хроматография

Смесват се 75 ml диетилов етер, ч.з.а., 25 ml етилацетат, ч.з.а. и 4.0 ml 96 % (т/о) оцетна киселина, ч.з.а. Подновява се след две до три хроматографираня.

### 4. Апаратура

4.1. Водна баня, комплектувана с термостат, регулиран на 20°C

4.2. Центрофуга (3500 оборота в минута) с епруветки с вместимост от 40 до 50 ml, комплектовани с шлифови запушалки.

4.3. Ротационен вакуум изпарител с колби от 250 ml

4.4. Стъклени хроматографски колони (дължина 100 мм, вътрешен диаметър 20 мм) и с фрита от поресто стъкло (напр. колони Allihn).

4.5. Спектрофотометър или колориметър с филтри с кювети от 10 мм.

4.6. Апарат за тънкослойна хроматография със силикагелови плаки (3.12), с дебелина на слоя от 0.5 до 0.6 мм. (Подходящи са търговски плаки.) Плаките се изсушават за 2 S до 3 часа в сушилен шкаф при 120 до 130°C. Оставят се да изстинат и се съхраняват в ексикатор най-малко 24 часа преди употреба.

4.7. Сушилен шкаф, регулиран на 120 до 130°C.

### 5. Процедура

#### 5.1. Екстрахиране

Във всяка от две мерителни колби (А и В) с обем 250 ml и с шлифови запушалки се поставят еднакви количества от фино раздробената проба, съдържаща около 200 mg витамин С. Само в колба А се добавят 0.4 ml стандартен разтвор (3.1.) и се смесва като се разклаща внимателно (вътрешен стандарт).

Във всяка колба при 4°C се добавят 30 ml хлороформ (3.3.) и 20 ml разтвор на метафосфорна киселина (3.2.). Разклащат се за кратко време и се оставят да престоят от 10 до 15 минути. Добавят се 25 ml вода, колбите се запушват, разклащат се енергично за 10 секунди и се оставят за 10 до 15 минути във водната баня (4.1.). Центрофугира се, за да се разделят водната фаза от фазата на хлороформа. За водния екстракт А (вътрешен стандарт) и В операциите се провеждат едновременно, както е описано по-долу.

#### 5.2. Окисляване

В епруетка с шлифована запушалка с пипета се пренасят 40 ml от плаващия отгоре 31973L0046 – ЦПР - редактиран

воден разтвор, получен в точка 5.1. (той е леко мътен). Добавят се от 0.5 до 1 ml разтвор на 2,6-дихлорфенол-индофенол (3.4.) и се смесват. Появява се червено оцветяване, което трябва да се запази най-малко 15 минути. След това се добавят около 300 mg филтрувална пулпа (3.5.), разклаща се и се филтрува през нагънат филтър. Няма нужда филтратът да бъде бистър.

### 5.3. Реакция с 2,4-динитрофенил хидразин и екстрахиране на хидразона

В центрофужна епруветка (4.2.) се пренасят с пипета 10 ml от филтрата, получен в точка 5.2., добавят се 2 ml разтвор на 2,4-динитрофенил хидразин (3.6.) и се смесват. В епруветката бързо се пуска поток азот (3.7.) или въглероден двуокис (3.8.), запущва се и се потапя за около 15 часа (за през нощта) във водната баня (4.1.). След това се добавят 3 ml вода, 20 ml от сместа на етилацетат, ледена оцетна киселина и ацетон (3.9.) и около 800 mg филтрувална пулпа (3.5.). Епруветките се запущват, разклащат се енергично за 30 секунди и се центрофугират. 15 ml от супернатантната фаза се пренасят в колбата на изпарителя и се изпаряват при намалено налягане с ротационния изпарител (4.3.) докато се получи масловиден остатък. Остатъкът се разтваря в 2 ml смес на етилацетат, ледена оцетна киселина и ацетон (3.9.) чрез нагряване при 50°C, оставя се да се охлади, добавят се 10 ml от сместа на дихлорметан и ледена оцетна киселина (3.10.) и се смесват.

### 5.4. Колонна хроматография

Хроматографската колона (4.4.) се запълва на височина около 30 mm със сместа дихлорметан и ледена оцетна киселина (3.10.). При енергично разклащане се суспендират 5 g силикагел (3.11.) в 30 ml от сместа на дихлорметан и ледена оцетна киселина (3.10.); суспензията се налива в колоната. Оставя се да се слегне и след това се сбива чрез пропускане на азот (3.7.) при ниско налягане. Разтворът, получен в точка 5.3. се декантира в колоната, колбата се измива с малки количества от сместа на дихлорметан и ледена оцетна киселина (3.10.); които се пренасят в колоната, след което последната се напълва със сместа (3.10) и колоната се измива със същата смес (3-4 порции от по около 5 ml), докато се получи безцветен елюат. Тази част от елюата, която е оцветена жълто, се изхвърля.

червеникавата зона в горната част на колоната се елуира със сместа на етилацетат, ледена оцетна киселина и ацетон (3.9.), елюатът се събира и се изпарява до сухо.

5.4.1. При продукти от група А (съдържание на витамин С по-малко от 10 g/kg) остатъкът се разтваря в 2 ml от сместа на етилацетат, ледена оцетна киселина и ацетон (3.9.) и се подлага на тънкослойна хроматография, както е указано в точка 5.5.

5.4.2. При продукти от група В (съдържание на витамин С равно на или по-голямо от 10 g/kg) масловидният остатък се обработва с 4 ml разрежена сярна киселина (3.13), разклаща се енергично, за да се разтвори напълно остатъкът и се измерва оптичестката плътност, както е указано в точка 5.6.

### 5.5. Тънкослойна хроматография

Всички операции, описани по-долу, се дублират.

31973L0046 – ЦПР - редактиран

0.5 ml от разтвора, получен в точка 5.4.1. се нанасят като тънка линия върху плаката (4.6.). Хроматограмата се развива за около 20 минути с разтвора за елуиране (3.14) във вана, наситена с пари на разтворителя, докато се раздели ясно розово оцветената зона на хидразона. Остава се да изсъхне на открито. Отбелязват се границите на розовата зона, която се изстъргва с шпатула и се пренася количествено като прах в хроматографската колона (4.4.).

Елуира се последователно един път с 2 ml и два пъти с по 1.5 ml от сместа на етилацетат, ледена оцетна киселина и ацетон (3.9.). Елуатът се събира в малка колбична (последната част трябва да бъде безцветна). Изпарява се до сухо; масловидният остатък се обработва с 4.0 ml разредена сярна киселина (3.13.) като се разклаща енергично, за да се разтвори напълно и се измерва оптичната плътност.

#### 5.6. Измерване на оптичната плътност

Оптичната плътност се измерва със спектрофотометър при 509 nm, 20 до 30 минути след разтварянето на остатъка в сярна киселина. Измерването се провежда срещу разредена сярна киселина.

#### 5.7. Тест с празна проба

Тестът с празна проба се провежда по същата процедура, но без пробата за анализ.

#### 6. Пресмятане на резултатите

$$\frac{(c - a) \cdot 2}{(b - c) \cdot 10d}$$

където:

a = оптична плътност на празната проба;

b = оптична плътност на вътрешния стандартен разтвор;

c = оптична плътност на разтвора на пробата;

d = тегло, в грамове, на разтвора на пробата.