

## ДИРЕКТИВА 2000/45/ЕО НА КОМИСИЯТА

от 6 юни 2000 година

относно установяване на методи на Общността за анализ с оглед определяне на витамин А, витамин Е и триптофан

(Текст от значение за ЕИП)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаването на Европейската общност,

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

като има предвид, че :

(1) Директива 70/373/ЕИО предвижда, че официалният контрол храните за животни, който има за цел да установи дали се спазват условията, изисквани по смисъла на законовите, подзаконовите и административните разпоредби, относно качеството и състава на храните за животни, трябва да се извършва съгласно методите на Общността за вземане на проби и анализ;

(2) Директива 70/524/ЕИО на Съвета от 23 ноември 1970 г. относно добавките във храните за животни <sup>3</sup>, изменена последно с Регламент (ЕО) № 2439/1999 на Комисията <sup>4</sup> предвижда, че съдържанието на витамин А и витамин Е трябва да бъде посочено на етикета, когато тези вещества се прибавят в предварителните смеси и във храните за животни;

(3) Директива 79/373/ЕИО на Съвета от 2 април 1979 г. относно търговията с комбинирани храни за животни последно изменена с Директива 2000/ 16/ЕО <sup>6</sup>, както и Директива 93/74/ЕИО на Съвета от 13 септември 1993 г. относно храните за животни, предназначени за специфични хранителни цели <sup>7</sup>, последно изменена с Директива 96/25/ЕО <sup>8</sup>, постановяват, че аминокиселините трябва да се вписват при етикетирването на храните за животни;

(4) Трябва да се разработят методи на Общността за анализ на тези вещества;

---

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

<sup>2</sup>ОВ L 241, 29.8.1994 г., стр. 1.

<sup>3</sup>ОВ L 270, 14.12.1970 г., стр. 1.

<sup>4</sup>ОВ L 297, 18.11.1999 г., стр. 8.

<sup>6</sup>ОВ L 105, 3.5.2000 г., стр. 36.

<sup>7</sup>ОВ L237, 22.9.1993 г., стр. 23.

<sup>8</sup>ОВ L 125, 23.5.1996 г., стр. 35.

(5) Предвидените в настоящата Директива мерки са съобразени със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА :

*Член 1*

Държавите-членки гарантират, че при анализите, извършени с цел официален контрол на съдържанието в храните за животни и в предварителните смеси на витамин А, витамин Е и триптофан, се спазва описаният в приложението метод.

*Член 2*

Преди 31 август 2000 г. държавите-членки въвеждат в сила необходимите закони, подзакони и административни разпоредби с оглед спазването на настоящата директива и незабавно информират за това Комисията.

Държавите-членки прилагат тези разпоредби, считано от 1 септември 2000 г.

Ако държавите-членки приемат тези разпоредби, последните съдържат препратка към настоящата директива или са придружени от такава препратка при официалното си публикуване. Формите за подобна препратка се определят от държавите-членки.

*Член 3*

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

*Член 4*

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 6 юни 2000 година.

*За Комисията:*  
**David BYRNE**  
*Член на Комисията*

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### ЧАСТ А

#### ДОЗИРАНЕ НА ВИТАМИН А

##### 1. Предмет и област на приложение

Методът дава възможност да се определи съдържанието на витамин А (ретинол) в храните за животни и предварителните смеси. Витамин А включва ретинол-*all-trans* и неговите цис-изомери(*cis*), които се определят по този метод. Съдържанието на витамин А се изразява в международни единици (UI) на кг. Една международна единица -UI отговаря на активността на 0,300 µg витамин А алкохол-*all-trans* или на 0,344 µg витамин А ацетат *all-trans*, или на 0,550 µg витамин А палмитат *all-trans*.

Прагът на значимост е 2 000 UI витамин А/кг.

##### 2. Принцип

Пробата се хидролизира с разтвор от етанолов калиев хидроксид и витамин А се извлича в петролен етер. Разтворителят се елиминира чрез изпаряване; утайката се разтваря в метанол (метилов спирт) и, ако е необходимо, се разрежда до изискваната концентрация. Съдържанието на витамин А се определя чрез течна високорезултатна хроматография в инверсна (обратна) фаза (CLHP-PI) с помощта на УВ- или флуорометричен датчик. Параметрите на хроматографията се подбират така, че да се получи отделяне между витамин А алкохол- *all-trans* и неговите цис-изомери.

##### 3. Реактиви

- 3.1 Етанол (етилов спирт),  $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Петролен етер, интервал на температура на кипене 40 °C-60 °C
- 3.3. Метанол (метилов спирт)
- 3.4. Разтвор на калиев хидроксид,  $\beta = 50 \text{ г/100 мл}$
- 3.5. Разтвор на натриев аскорбат,  $\beta = 10 \text{ г/100 мл}$  (вж. забележката в т. 7.7.)
- 3.6. Разтвор на натриев сулфид,  $c = 0,5 \text{ молбл в глицерин}$ ,  $\beta = 120 \text{ г/л}$  (за  $x=9$ )(вж. забележката в т. 7.8)
- 3.7. Разтвор на фенолфталеин,  $\beta = 2 \text{ г/100 мл}$  в етанол (етилов спирт) (3.1)
- 3.8. Пропанол-2

3.9. Мобилна фаза за CLHP : смес от метанол (метилол спирт) (3.3) и вода, например : 980 + 20 (v + v). Точните пропорции се определят от характеристиките на използваната колона.

3.10. Азот, свободен от кислород.

3.11. Витамин А ацетат *all-trans*, с изключителна чистота, гарантирана активност, например 2,80 ха 10 на 6 UI/г

3.11.1. Матерен разтвор на витамин А ацетат *all-trans* - претегляте приблизително до 0,1 мг витамин А ацетат (3.11) в колба, градуирана на 100 мл. Разтваряте в пропанол-2 (3.8) и допълвате до отметката със същия разтворител. Номиналната концентрация на този разтвор е 1 400 UI витамин А на мл. Точното съдържание се определя по т. 5.6.3.1.

3.12. Витамин А *all-trans*, с изключителна чистота, гарантирана активност, например 1,80 х 10 на 6 UI/г.

3.12.1. Матерен разтвор на витамин А ацпалмитат *all-trans* - претегляте приблизително до 0,1 80 мг витамин А палмитат (3.12) в колба, градуирана на 100 мл. Разтваряте в пропанол-2 (3.8) и допълвате до отметката със същия разтворител. Номиналната концентрация на този разтвор е 1 400 UI витамин А на мл. Точното съдържание се определя по т. 5.6.3.2.

3.13. ВНТ(*ди-мерп/tert/-*бутил-2,6-метил-4-фенол) (вж. забележката в т. 7.5)

#### 4. Апаратура

4.1. Ротативен вакуумен изпарител

4.2. Непрозрачни стъклени лабораторни съдове

4.2.1. Сферични или конусовидни колби, 500 мл, с шлифовано стъклено гърло

4.2.2. Градуирани колби с шлифована стъклена запушалка, тясно гърло, 10, 25, 100 и 500 мл

4.2.3. Конусовидни декантационни колби, 1 000 мл, с шлифована стъклена запушалка

4.2.4. Крушообразни колби, 250 мл, с шлифовано стъклено гърло

4.3. Охладител (хладилник) Allihn, полезна дължина 300 мм, с шлифовано стъклено съединение за захранваща тръба с газ

4.4. Гофрирана филтрова хартия за сепарация на фазите, диаметър 185 мм (например : Schleicher & Schuell 597 NY 1/2)

#### 4.5. Комплект CLHP с инжекторна система

4.5.1. Колона за течна хроматография, 250 мм x 4 мм, C18, частици 5 или 10 μm, или еквивалент (коэффициент на параметри : само един пик за всички ретинолови изомери при условия CLHP)

4.5.2. УВ- или флуорометричен датчик с променлива дължина на вълната

4.6. Спектрофотометър с 10-милиметрови кварцови (фото)елементи

4.7. Вана за водна баня с магнитен миксер

4.8. Екстрактор (вж. фиг.1), състоящ се от :

4.8.1. Епруветка с обем 1 л, с шлифовани стъклени гърло и запушалка

4.8.2. Шлифована част (мъжко притриване), снабдена със странична тръбичка и регулираща се тръба по средата. Долната част на тръбата е с форма на U и с дюза в противоположния край, така че горният течен слой в епруветката да може да се прехвърли в декантационната колба

### 5. Процедура

*Забележка :* Витамин А е чувствителен на светлина (УВ) и податлив на окисляване. Всички манипулации трябва да се извършват на тъмно (в непрозрачно стъкло или покрито с алуминиево фолио) и в отсъствие на кислород (елиминира се с азот). По време на екстракцията въздухът над течността трябва да се замени с азот (да се избягва прекалено голямото налягане, като от време на време запушалката трябва да се отваря).

#### 5.1. Обработка на пробата

Пробата се смела, така че да може да премине през сито с отвори 1 мм, като се избягва нагряване. Смилането трябва да стане непосредствено преди претеглянето и осапуняването, в противен случай съществува риск от загуби на витамин А.

#### 5.2. Осапуняване

Според тегловото съдържание на витамин А, претегляте с точност до 0,01 г, от 2 до 25 г от пробата в сферична или конусовидна колба от 500 мл (4.2.1.). Прибавяте последователно при постоянно размесване 130 мл етанол (етилов спирт) (3.1), около 100 мг ВНТ (3.13), 2 мл разтвор на натриев аскорбат (3.5) и 2 мл разтвор на натриев сулфид (3.6). Монтирате охладителя (хладилника) (4.3) на колбата и я потапяте във вана за водна баня с магнитен миксер (4.7). Нагрявате до кипене и оставяте да се отвърне за 5 мин. Прибавяте след това 25 мл разтвор на калиев хидроксид (3.4) през охладителя (4.3) и оставяте отново да се отвърне за 25 мин., като бъркате при слаб приток на азот.

Изплакватے охладителя с около 20 мл вода и оставяте съдържанието на колбата да изстине до околната температура.

### 5.3. Екстракция

Прехвърляте чрез декантация количеството осапуняващ разтвор, като изплакватے с целия обем от 250 мл вода, в декантационната колба от 1 000 мл (4.2.3) или в екстрактора (4.8). Изплакватے последователно колбата за осапуняване с 25 мл етилов спирт (3.1) и 100 мл петролен етер (3.2) и прехвърляте течността за изплакване в декантационната колба или в екстрактора. Пропорцията на водата и на етиловия спирт при комбинираните разтвори трябва да е около 2:1. Разклащате силно в продължение на 2 мин. и оставяте в покой за 2 мин.

#### 5.3.1. Екстракция с помощта на декантационна колба (4.2.3)

Когато слоевете се отделят (вж. забележката в т. 7.3), прехвърляте слой петролен етер в друга декантационна колба (4.2.3). Повтаряте два пъти операцията с 100 мл петролен етер (3.2), а след това два пъти с 50 мл петролен етер (3.2).

Промивате два пъти комбинираните екстракти в декантационната колба като разклащате леко (за да се избегне образуването на емулсия) с части по 100 мл вода и отново разклащате с нови части по 100 мл вода, докато последната стане безцветна след добавянето на разтвор на фенолфталеин (3.7) (обикновено са достатъчни четири промивания). Филтрирате промития екстракт със сух гофриран филтър за разделяне на фазите (4.4), за да се отстрани остатъчната вода, и прехвърляте в градуирана 500-милилитрова колба (4.2.2). Изплакватے декантационната колба и филтъра с 50 мл петролен етер (3.2), доливате до делението с петролен етер (3.2) и разбъркватے добре.

#### 5.3.2. Екстракция с помощта на екстрактор (4.8)

Когато слоевете се разделят (виж забележката в точка 7.3), поставяте отново запушалката на епруветката (4.8.1) в шлифованата част (мъжко притриване) (4.8.2) и поставяте долния край във форма на U на регулиращата се тръба, така че тя да се окаже точно над нивото на граничната повърхност. През страничната тръбичка подавате налягане чрез азота, прехвърляте горния слой петролен етер в декантационна колба от 1 000 мл (4.2.3). Прибавяте 100 мл петролен етер (3.2) в стъкления цилиндър, затваряте запушалката и разклащате силно. Оставяте слоевете да се разделят и прехвърляте горния слой в декантационната колба, както е посочено по-горе. Повтаряте процедурата на екстракция с нови 100 мл петролен етер (3.2), след това още два пъти с 50 мл петролен етер (3.2) и прибавяте слоевете петролен етер в декантационната колба.

Промивате комбинираните екстракти от петролен етер съгласно процедурата, описана в т. 5.3.1, и действате както е посочено в тази точка.

### 5.4. Подготовка на пробния разтвор за CLHP

Накапватے с пипета аликвотна част от разтвора на петролен етер (от 5.3.1 или 5.3.2) в крушообразна колба от 250 мл (4.2.4). Оставяте разтворителят да се

изпари почти изцяло в ротативния изпарител (4.1) при понижено налягане, при температура на ваната не по-висока от 40 °С. Възстановявате атмосферното налягане, като пуснете азот (3.10), и изваждате колбата от изпарителя. Отстранявате останалото количество разтворител в поток азот (3.10) и незабавно разтваряте утайката в дадения обем (10-100 мл) метанол (метилов спирт) (3.3) (концентрацията на витамин А трябва да е в порядъка от 5 UI/мл до 30 UI/мл).

#### 5.5. Дозирание чрез CLHP

Витамин А се отделя на колона C18 в инверсна (обратна) фаза (4.5.1) и концентрацията се измерва с помощта на УВ-датчик (325 nm) или флуорометричен датчик (възбуждане : 325 nm; емисия : 475 nm) (4.5.2)

Впръскват аликвотна част (например 20 µl) от получения метанолов разтвор (виж точка 5.4) и елюират с мобилната фаза (3.9). Изчисляват средната височина на пика (повърхност) на няколко инжектирания със същия пробен разтвор и средните височини на пиковете (повърхност) на няколко инжектирания с еталонните разтвори (5.6.2).

#### Условия CLHP

За ориентиране се предлагат следните условия; и други условия могат да се прилагат, стига да дават еквивалентни резултати :

Колона за течна хроматография (4.5.1) : 250ммx4 мм, C18, частици от 5 или 10 µm, или еквивалент

Мобилна фаза (3.9) : смес от метилов спирт(3.3) и вода, например 980 + 20(v+v)

Дебит : 1-2 мл/мин.

Датчик (4.5.2) : УВ-детектор (325 nm) или флуорометричен датчик (възбуждане : 325 nm/емисия : 475 nm)

#### 5.6. Изготвяне на сравнителен разтвор

##### 5.6.1. Изготвяне на работните сравнителни (стандартни) разтвори

Капват с пипета 20 мл от матерния разтвор на витамин А ацетат (3.11.1) или 20 мл от матерния разтвор на витамин А палмитат (3.12.1) в колба с плоско или конусообразно дъно с обем 500 мл (4.2.1) и хидролизират както е описано в т. 5.2, но без да прибавят ВНТ. Пристъпват след това към екстракция с петролен етер (3.2) (виж точка 5.3) и допълват до 500 мл с петролен етер (3.2). Оставят 100 мл от този екстракт да се изпари почти напълно на ротативния изпарител (вж. 5.4), отстраняват останалото количество разтворител в поток азот (3.10) и отново разтваряте утайката в 10,0 мл метанол (метилов спирт) (3.3). Номиналната концентрация на този разтвор е 560 UI витамин А на мл. Точното съдържание трябва да се определи съгласно т. 5.6.3.3. Работният сравнителен разтвор се изготвя за всяка отделна манипулация.

Капватe 2,0 мл от работния сравнителен разтвор в градуирана колба от 20 мл, допълватe до делението с метанол (3.3) и размесватe. Номиналната концентрация на този разреден работен сравнителен разтвор е 56 UI витамин А на мл.

5.6.2. Изготвяне на сравнителните разтвори и начертаване на градуираната крива

Прехвърлятe 1,0, 2,0, 5,0 и 10, 0 мл от разредения работен сравнителен разтвор в няколко градуирани на 20 мл колби, допълватe до съответното деление с метанол (3.3) и смесватe. Номиналните концентрации на тези разтвори са 2,8, 5,6, 14,0 и 28,0 UI витамин А на мл.

Впръскватe няколко пъти 20 мл от всеки сравнителен разтвор и определятe средните височини на пиковетe (повърхности). Според средните височини на пиковетe (повърхности), начертаватe градуирана крива, като се вземат предвид резултатите от УВ-контрола (5.6.3.3).

5.6.3. Калибриране чрез УВ на сравнителните разтвори

5.6.3.1. Матерен разтвор на витамин А ацетат

Капватe с пипета 2,0 мл от материния разтвор на витамин А ацетат (3.11.1) в градуирана колба от 50 мл (4.2.2) и допълватe до съответното деление с пропанол-2 (3.8). Номиналната концентрация на този разтвор е 56 UI витамин А на мл. Капватe с пипета 3,0 мл от този разреден разтвор на витамин А ацетат в градуирана колба от 25 мл и допълватe до съответното деление с пропанол-2 (3.8). Номиналната концентрация на този разтвор е 6,72 UI витамин А на мл. Измеретe УВ-спектъра на разтвора по отношение на пропанол-2 (3.8) със спектрометъра (4.6) между 300 nm и 400 nm. Максималното затихване трябва да е между 325 nm и 327 nm.

Изчисление на съдържанието на витамин А :

UI витамин А /мл = E 326 x 19,0

1 %

(E витамин А ацетат = 1 530 до 326 nm в пропанол-2)

1 см

5.6.3.2. Матерен разтвор на витамин А палмитат

Капватe с пипета 2,0 мл от материния разтвор на витамин а палмитат (3.12.1) в градуирана колба от 50 мл (4.2.2) и допълватe до съответното деление с пропанол-2 (3-8). Номиналната концентрация на този разтвор е 56 UI витамин А на мл. Капватe с пипета 3,0 мл от този разреден разтвор на витамин А палмитат в градуирана колба от 25 мл и допълватe до съответното деление с пропанол-2 (3.8). Номиналната концентрация на разтвора е 6,72 UI витамин А на мл. Измеретe УВ-спектъра на разтвора по отношение на пропанол-2 (3.8) със спектрометъра (4.6) между 300 nm и 400 nm. Максималното затихване трябва да е между 325 nm и 327 nm.



Изчисление на съдържанието на витамин А :  
UI витамин А /мл = E 326 x 19,0  
1 %  
(Е витамин А ацетат = 957 до 326 nm в пропанол-2)  
1 см

#### 5.6.3.3. Работен сравнителен разтвор на витамин А

Капвате с пипета 3,0 мл неразреден работен сравнителен разтвор на витамин А, изготвен по т. 5.6.1, в градуирана колба от 50 мл (4.2.2) и допълвате до съответното деление с пропанол-2 (3.8). Капвате с пипета 5,0 мл от този разтвор в градуирана колба от 25 мл и допълвате до съответното деление с пропанол-2 (3.8). Измерете УВ-спектъра на разтвора по отношение на пропанол-2 (3.8) със спектрометъра (4.6) между 300 nm и 400 nm. Максималното затихване трябва да е между 325 nm и 327 nm.

Изчисление на съдържанието на витамин А :  
UI витамин А/мл = E 325 x 18,3  
1 %  
(Е витамин А алкохол = 1 821 до 325 nm в пропанол-2)  
1 см

### 6. Изчисление на резултатите

Като изхождате от средната височина (повърхност) на пиковете на витамин А на пробния разтвор, определяте концентрацията на този разтвор в UI/мл по показатели на градуираната крива (5.6.2).

Съдържанието w на витамин А в пробата, изразено в UI/kg, е дадено от следната формула :

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V2 \cdot 1\ 000}{V1 \cdot m} \text{ (UI/ kg)}$$

в която :

$\beta$  = съдържанието на витамин А в пробния разтвор (5.4) в UI/мл

V1 = обема на пробния разтвор (5.4) в мл

V2 = обема на взетата аликвотна част по т. 5.4 в мл

m = масата на опитния материал в г

## 7. Забележки

7.1. При пробите с ниско съдържание на витамин А би било полезно да се обединят екстрактите в петролен етер, получени от две осапунявания (претеглено количество : 25 г), в един пробен разтвор за дозиране чрез СЛНР.

7.2. Взетата за анализ проба не трябва да съдържа повече от 2 г мастни вещества.

7.3. Ако няма разделяне на фазите, прибавете около 10 мл етанол (етилов спирт) (3.1), за да елиминирате емулсията.

7.4. С рибено масло и други мастни вещества времето на осапуняване трябва да достигне 45-60 мин.

7.5. ВНТ може да се замени с хидрохинон (*n*-диоксибензол).

7.6. Като се използва колоната в директна фаза, ретиноловите изомери могат да се разделят.

7.7. Разтворът на натриев аскорбат може да се замени с около 150 мг аскорбинова киселина.

7.8. Разтворът на натриев сулфид може да се замени с около 50 мг EDTA.

## 8. Повторяемост

Разликата в резултатите от двете паралелни дозираня на една и съща проба не трябва да надхвърля 15 % по отношение на върховия резултат.

## 9. Резултати от вътрешнолабораторно проучване <sup>1</sup>

	Предварителна смес	Предварителна смес	Минерален концентрат	Протеинов хранителен продукт	Храна за малки прасета
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
средно (UI/ug)	17,02x10 на 6	1,21x10 на 6	537 100	151 800	18 070
sr (UI/ug)			22 080	12 280	682
r (UI/ug)	0,51x10 на 6	0,039x10 на 6	61 824	34 384	1 910
CVr (%)	1,43x10 на 6	0,109x10 на 6	4,1	8,1	3,8

SR (UI/ug)	6 3,0	6 3,5	46 300	23 060	3 614
R (UI/ug)	1,36x10 на 6	0,069x10 на 6	129 568	64 568	10 119
CVR ( %)	3,81x10 на 6	0,193x10 на 6	8,6	15	20
	8,0	6,2			

L: брой лаборатории

n: брой индивидуални стойности

sg: типово отклонение при повторяемост

SR:типово отклонение при възпроизводимост

г: повторяемост

R: възпроизводимост

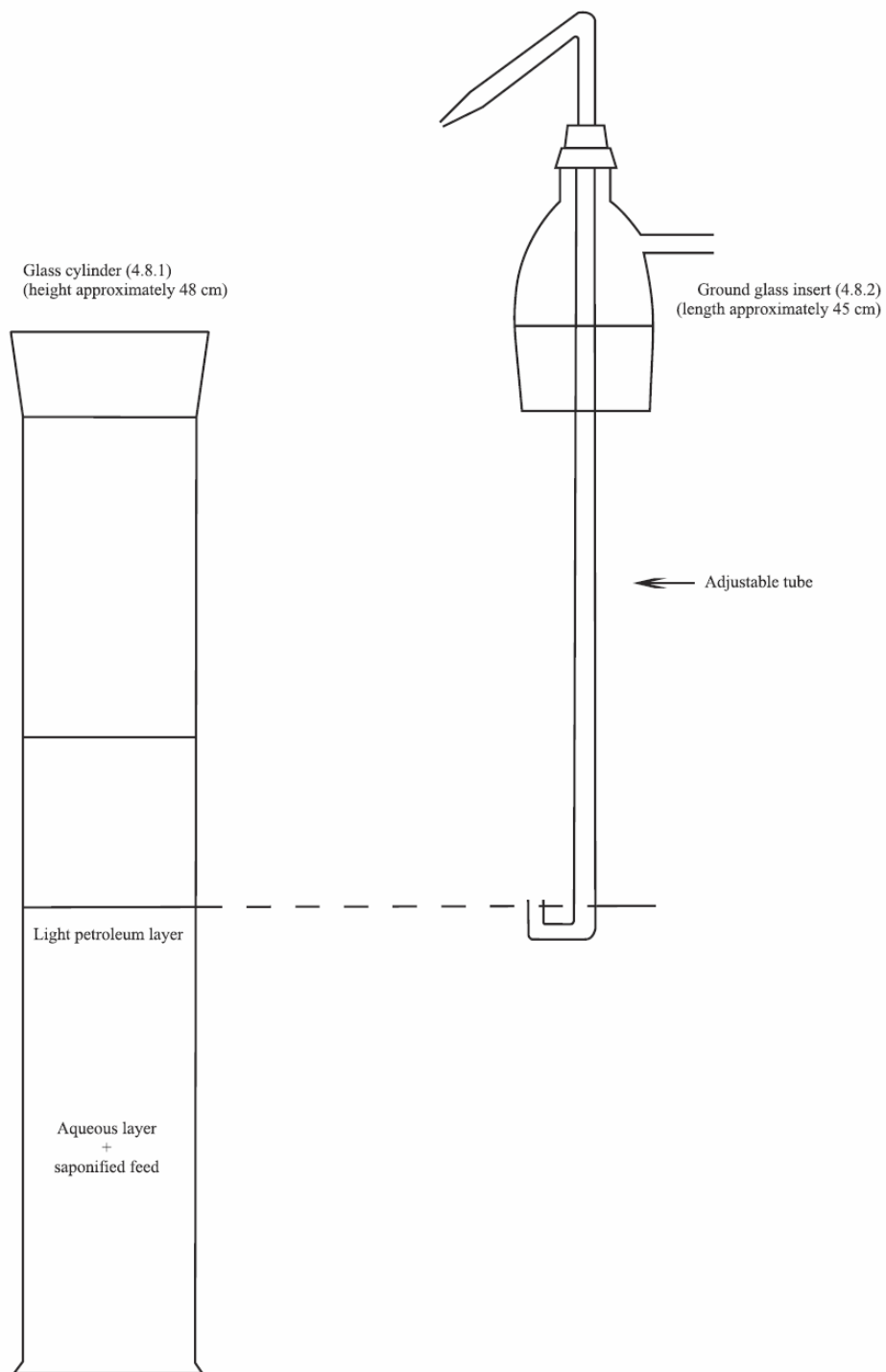
CVr: коефициент на изменяемост при повторяемост

CVR: коефициент на изменяемост при възпроизводимост

---

(<sup>1</sup>) Проучване, проведено от работната група по храните за животни на Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

**Фигура 1 : Екстрактор (4.8)**



Епруветка (4.8.1)  
(приблизителна височина : 48 см)

Шлифована част (мъжко притриване)  
(приблизителна височина: 45 см)

Слой петролен етер  
Воден слой

← Регулираща се тръба

+  
осапунен хранителен  
продукт

## ЧАСТ Б

### ДОЗИРАНЕ НА ВИТАМИН Е

#### 1. Предмет и област на приложение

Методът дава възможност да се определи съдържанието на витамин Е в храните за животни и предварителните смеси. Съдържанието на витамин Е се изразява в мг DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат на кг. 1 мг DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат отговаря на 0,91 мг DL- $\alpha$ -токоферол (витамин Е).

Прагът на значимост е 2 мг витамин Е/кг.

#### 2. Принцип

Пробата се хидролизира с разтвор от етанолов калиев хидроксид и витамин Е се извлича в петролен етер. Разтворителят се елиминира чрез изпаряване; утайката се разтваря в метанол (метилов спирт) и, ако е необходимо, се разрежда до изискваната концентрация. Съдържанието на витамин Е се определя чрез течна високорезултатна хроматография в инверсна (обратна) фаза (CLHP-PI) с помощта на УВ- или флуорометричен датчик.

#### 3. Реактиви

- 3.1 Етанол (етилов спирт),  $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Петролен етер, интервал на температура на кипене 40 °C-60 °C
- 3.3. Метанол (метилов спирт)
- 3.4. Разтвор на калиев хидроксид,  $\beta = 50 \text{ г/100 мл}$
- 3.5. Разтвор на натриев аскорбат,  $\beta = 10 \text{ г/100 мл}$  (вж. забележката в т. 7.7.)
- 3.6. Натриев сулфид,  $\text{Na}_2\text{S}$  ( $x = 7-9$ )
  - 3.6.1 Разтвор на натриев сулфид,  $c = 0,5 \text{ мол/л}$  в глицерин,  $\beta = 120 \text{ г/л}$  (за  $x = 9$  (виж забележката в точка 7.8))
- 3.7. Разтвор на фенолфталеин,  $\beta = 2 \text{ г/100 мл}$  в етанол (етилов спирт) (3.1)
- 3.8. Мобилна фаза за CLHP : смес от метанол (метилов спирт) (3.3) и вода, например : 980 + 20 ( $v + v$ ). Точните пропорции се определят от характеристиките на използваната колона.

3.9. Азот, свободен от кислород.

3.10. DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат, извънредно чист, с гарантирана активност

3.10.1. Матерен разтвор на DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат - претегляте приблизително до 0,1 мг 100 мг DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат (3.10) в колба, градуирана на 100 мл. Разтваряте в етанол (3.1) и допълвате до делението със същия разтворител. 1 мл от този разтвор съдържа 1 мг DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат (за УВ-контрол : виж точка 5.6.1.3; за стабилизация : вж. забележката в т. 7.4)

3.11. DL- $\alpha$ -токоферол, с изключителна чистота, с гарантирана активност

3.11.1. Претегляте приблизително до 0,1 мг 100 мг DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат (3.10) в колба, градуирана на 100 мл. Разтваряте в етанол (3.1) и допълвате до делението със същия разтворител. 1 мл от този разтвор съдържа 1 мг DL- $\alpha$ -токоферол (за УВ-контрол : виж точка 5.6.2.3; за стабилизация : вж. забележката в точка 7.4)

3.12. ВНТ(ди-*терп*/*tert*-бутил-2,6-метил-4-фенол) (вж. забележката в точка 7.5)

#### 4. Апаратура

4.1. Ротативен вакуумен изпарител

4.2. Непрозрачни стъклени лабораторни съдове

4.2.1. Сферични или конусовидни колби, 500 мл, с шлифовано стъклено гърло

4.2.2. Градуирани колби с шлифована стъклена запушалка, тясно гърло, 10, 25, 100 и 500 мл

4.2.3. Конусовидни декантационна колби, 1 000 мл, с шлифована стъклена запушалка

4.2.4. Крушообразни колби, 250 мл, с шлифовано стъклено гърло

4.3. Охладител (хладилник) Allihn, полезна дължина 300 мм, с шлифовано стъклено съединение за захранваща тръба с газ

4.4. Гофрирана филтрова хартия за сепарация на фазите, диаметър 185 мм (например : Schleicher & Schuell 597 NY 1/2)

4.5. Комплект CLHP с инжекторна система

4.5.1. Колона за течна хроматография, 250 мм x 4 мм, C18, частици 5 или 10  $\mu$ m, или еквивалент

- 4.5.2. УВ- или флуорометричен датчик с променлива дължина на вълната
- 4.6. Спектрофотометър с 10-милиметрови кварцови (фото)елементи
- 4.7. Вана за водна баня с магнитен миксер
- 4.8. Екстрактор (вж. фиг.1), състоящ се от :
  - 4.8.1. Епруветка с обем 1 л, с шлифовани стъклени гърло и запушалка
  - 4.8.2. Шлифована част (мъжко притриване), снабдена със странична тръбичка и регулираща се тръба по средата. Долната част на тръбата е с форма на U и с дюза в противоположния край, така че горният течен слой в епруветката да може да се прехвърли в декантационната колба

## 5. Процедура

*Забележка* : Витамин Е е чувствителен на светлина (УВ) и податлив на окисляване. Всички манипулации трябва да се извършват на тъмно (в непрозрачно стъкло или покрито с алуминиево фолио) и в отсъствие на кислород (елиминира се с азот). По време на екстракцията въздухът над течността трябва да се замени с азот (да се избягва прекалено голямото налягане, като от време на време запушалката трябва да се отваря).

### 5.1. Обработка на пробата

Пробата се смела, така че да може да премине през сито с отвори 1 мм, като се избягва нагряване. Смилането трябва да стане непосредствено преди претеглянето и осапуняването, в противен случай съществува риск от загуби на витамин Е.

### 5.2. Осапуняване

Според тегловото съдържание на витамин Е, претегляте с точност до 0,01 г, от 2 до 25 г от пробата в сферична или конусовидна колба от 500 мл (4.2.1.). Прибавяте последователно при постоянно размесване 130 мл етанол (етилов спирт) (3.1), около 100 мг ВНТ (3.12), 2 мл разтвор на натриев аскорбат (3.5) и 2 мл разтвор на натриев сулфид (3.6). Монтирате охладителя (4.3) на колбата и я потапяте във вана за водна баня с магнитен миксер (4.7). Нагрявате до кипене и оставяте да се отвърне за 5 мин. Прибавяте след това 25 мл разтвор на калиев хидроксид (3.4) през охладителя (4.3) и оставяте отново да се отвърне за 25 мин., като бъркате при слаб приток на азот. Изплаквате охладителя с около 20 мл вода и оставяте съдържанието на колбата да изстине до околната температура.

### 5.3. Екстракция

Прехвърляте чрез декантация осапуняващия разтвор, като изплаквате с целия обем от 250 мл вода в декантационната колба от 1 000 мл (4.2.3) или в екстрактора (4.8). Изплаквате последователно колбата за осапуняване с 25 мл

етилов спирт (3.1) и 100 мл петролен етер (3.2) и прехвърляте течността за изплакване в декантационната колба или в екстрактора. Пропорцията на водата и на етиловия спирт при комбинираните разтвори трябва да е около 2:1. Разклащате силно в продължение на 2 мин. и оставяте в покой за 2 мин.

#### 5.3.1. Екстракция с декантационна колба (4.2.3)

Когато слоевете се отделят (вж. забележката в точка 7.3), прехвърляте слоя петролен етер в друга декантационна колба (4.2.3). Повтаряте два пъти операцията с 100 мл петролен етер (3.2), а след това два пъти с 50 мл петролен етер (3.2).

Промивате два пъти комбинираните екстракти в декантационната колба като разклащате леко (за да се избегне образуването на емулсия) с части по 100 мл вода и отново разклащате с нови части по 100 мл вода, докато последната стане безцветна след добавянето на разтвор на фенолфталеин (3.7) (обикновено са достатъчни четири промивания). Филтрирате промития екстракт със сух гофриран филтър за отделяне на фазите (4.4), за да се отстрани остатъчната вода, и прехвърляте в градуирана 500-милилитрова колба (4.2.2). Изплакватے декантационната колба и филтъра с 50 мл петролен етер (3.2), доливате до делението с петролен етер (3.2) и разбърквате добре.

#### 5.3.2. Екстракция с помощта на екстрактор (4.8)

Когато слоевете се отделят (вж. забележката в точка 7.3), поставяте отново запушалката на епруветката (4.8.1) в шлифованата част (мъжко притриване) (4.8.2) и поставяте долния край във форма на U на регулиращата се тръба, така че тя да се окаже точно над нивото на граничната повърхност. През страничната тръбичка подавате налягане чрез азота, прехвърляте горния слой петролен етер в декантационна колба от 1 000 мл (4.2.3). Прибавяте 100 мл петролен етер (3.2) в стъкления цилиндър, затваряте запушалката и разклащате силно. Оставяте слоевете да се отделят и прехвърляте горния слой в декантационната колба, както е посочено по-горе. Повтаряте процедурата на екстракция с нови 100 мл петролен етер (3.2), след това още два пъти с 50 мл петролен етер (3.2) и прибавяте слоевете петролен етер в декантационната колба.

Промивате комбинираните екстракти от петролен етер съгласно процедурата, описана в точка 5.3.1, и действате както е посочено в тази точка.

#### 5.4. Подготовка на пробния разтвор за CLHP

Накапвате с пипета аликвотна част от разтвора на петролен етер (от 5.3.1 или 5.3.2) в крушообразна колба от 250 мл (4.2.4). Оставяте разтворителят да се изпари почти изцяло в ротативния изпарител (4.1) при понижено налягане, при температура на ваната не по-висока от 40 °C. Възстановявате атмосферното налягане, като пуснете азот (3.9), и изваждате колбата от изпарителя. Отстранявате останалото количество разтворител в поток азот (3.9) и незабавно разтваряте утайката в дадения обем (10-100 мл) метанол (метилов спирт) (3.3) (концентрацията на DL- $\alpha$ -токоферол трябва да е в порядъка от 5  $\mu$ g/мл до 30  $\mu$ g/мл).



### 5.5. Дозиране чрез CLHP

Витамин Е се отделя на колона C18 в инверсна (обратна) фаза (4.5.1) и концентрацията се измерва с помощта на флуорометричен датчик (възбуждане : 295 nm; емисия : 330 nm) (4.5.2)

Впръскват аликвотна част (например 20 µl) от получения метанолов разтвор (виж точка 5.4) и елюирате с мобилната фаза (3.8). Изчисляват средните височини на пика (повърхности) на няколко впръсквания със същия пробен разтвор и средните височини на пиковите (повърхност) на няколко впръсквания с еталонните разтвори (5.6.2).

### Условия CLHP

За ориентиране се предлагат следните условия; и други условия могат да се прилагат, стига да дават еквивалентни резултати :

Колона за течна хроматография (4.5.1) : 250ммx4 мм, C18, частици от 5 или 10 µm, или еквивалент

Мобилна фаза (3.8) : смес от метилов спирт(3.3) и вода, например 980 + 20(v+v)

Дебит : 1-2 мл/мин.

Датчик (4.5.2) : флуорометричен датчик (възбуждане : 295 nm/емисия : 330 nm) или УВ-датчик (292 nm)

### 5.6. Изготвяне на сравнителен (стандартен) разтвор (DL-α-токоферолон ацетат или DL-α-токоферол)

#### 5.6.1. Изготвяне на сравнителен разтвор на DL-α-токоферол

##### 5.6.1.1. Изготвяне на работен сравнителен разтвор

Капват с пипета 25 мл от матерния разтвор на DL-α-токоферолов ацетат (3.10.1) в колба с плоско или конусообразно дъно с обем 500 мл (4.2.1) и хидролизирате както е описано в точка 5.2. Пристъпват след това към екстракция с петролен етер (3.2) (вж. т.5.3) и допълват до 500 мл с петролен етер (3.2). Оставят 25 мл от този екстракт да се изпари почти напълно на ротативния изпарител (вж. 5.4), отстраняват останалото количество разтворител в поток от азот (3.9) и отново разтварят утайката в 25,0 мл метанол (метилов спирт) (3.3). Номиналната концентрация на този разтвор е 45,5 µg на DL-α-токоферол на мл. Работният сравнителен разтвор се изготвя за всяка отделна манипулация.

##### 5.6.1.2. Изготвяне на сравнителните разтвори и начертаване на градуираната крива

Прехвърляте 1,0, 2,0, 4,0 и 10, 0 мл от работния сравнителен разтвор в няколко градуирани на 20 мл колби, допълвате до съответното деление с метанол (3.3) и смесвате. Номиналните концентрации на тези разтвори са 2,5, 5,0 и 25,0 µg/ml DL-α-токоферолон ацетат, или 2,28, 4,55, 9,10 µg DL-α-токоферол.

Впръсквате няколко пъти 20 млот всеки сравнителен разтвор и определяте средните височини на пиковете (повърхности). Според средните височини на пиковете (повърхности), начертавате градуирана крива.

5.6.1.3. Ув-калибриране на матерния разтвор на DL-α-токоферол (3.10.1)  
Разтваряте 5,0 мл матерен разтвор на DL-α-токоферол (3.10.1), допълвате до 25,0 мл в етанол и измервате УВ-спектъра на този разтвор по отношение на етанола (3.1) в спектрофотометър (4.6) между 250 nm и 320 nm. Максималната абсорбция трябва да е 284 nm.

1 %

E = 43,6 до 284 nm в етанол

1 см

При това разреждане трябва да се получи стойност на затихване от 0,84 до 0,88.

5.6.2. Сравнителен разтвор на DL-α-токоферол

5.6.2.1. Изготвяне на работния сравнителен разтвор на DL-α-токоферол  
Капвате с пипета 2,0 мл от сравнителния разтвор на DL-α-токоферол (3.11.1) в градуирана колба от 50 мл, разтваряте в метанол (3.3) и допълвате до съответното деление с метанол. Номиналната концентрация на този разтвор е 44,0 µg DL-α-токоферол на мл, еквивалент на 44,0 µg DL-α-токоферолон ацетат на мл. Работният сравнителен разтвор се изготвя за всяка отделна манипулация.

5.6.2.2. Изготвяне на сравнителните разтвори и начертаване на градуираната крива

Прехвърляте 1,0, 2,0, 4,0 и 10, 0 мл от работния сравнителен разтвор в няколко градуирани на 20 мл колби, допълвате до съответното деление с метанол (3.3) и смесвате. Номиналните концентрации на тези разтвори са 2,0, 8,0 и 20,0 µg/ml DL-α-токоферол, или 2,20, 4,40, 8,79 µg DL-α-токоферолов ацетат.

5.6.2.3. УВ-калибриране на матерния разтвор на DL-α-токоферол (3.11.1)  
Разтваряте 2,0 мл матерен разтвор на DL-α-токоферол (3.10.1), допълвате до 25,0 мл в етанол и измервате УВ-спектъра на този разтвор по отношение на етанола (3.1) в спектрофотометър (4.6) между 250 nm и 320 nm. Максималната абсорбция трябва да е 292 nm :

1 %

E = 75,8 до 292 nm в етанол

1 см

При това разреждане трябва да се получи стойност на затихване от 0,6.

## 6. Изчисление на резултатите

Като изхождате от средната височина (повърхност) на пиковете на витамин Е на пробния разтвор, определяте концентрацията на този разтвор в  $\mu\text{g}/\text{мл}$  (изразена в DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат) по показатели на градуираната крива (5.6.1.2 или 5.6.2.2.).

Съдържанието  $w$  на витамин Е в пробата, изразено в  $\text{мг}/\text{кг}$ , е дадено от следната формула :

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V2}{V1 \cdot m} \quad (\text{мг}/\text{кг})$$

в която :

$\beta$  = съдържанието на витамин Е в пробния разтвор (5.4) в  $\mu\text{g}/\text{мл}$

$V1$  = обема на пробния разтвор (5.4) в мл

$V2$  = обема на взетата аликвотна част по точка 5.4 в мл

$m$  = масата на опитния материал в г

## 7. Забележки

7.1. При пробите с ниско съдържание на витамин Е е добре да се обединят екстрактите в петролен етер, получени от две осапунявания (претеглено количество : 25 г), в един пробен разтвор за дозиране чрез CLHP.

7.2. Взетата за анализ проба не трябва да съдържа повече от 2 г мастни вещества.

7.3. Ако няма разделяне на фазите, прибавете около 10 мл етанол (етилов спирт) (3.1), за да елиминирате емулсията.

7.4. След спектрофотометричното измерване на разтвора от DL- $\alpha$ -токоферолов ацетат или на DL- $\alpha$ -токоферола съгласно точка 5.6.1.3 или 5.6.2.3 прибавяте около 10 мг ВНТ (3.12) към разтвора (3.10.1 или 3.10.2) и оставяте този разтвор в охладителя (хладилника)(максимален срок на годност : четири седмици).

7.5. ВНТ може да се замени с хидрохинон (*n*-диоксибензол).

7.6. Колоната може да се използва в директна фаза, за да се разделят токоферолите  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ .

7.7. Разтворът на натриев аскорбат може да се замени с около 150 мг аскорбинова киселина.

7.8. Разтворът на натриев сулфид може да се замени с около 50 мг EDTA.

## 8. Повторяемост

Разликата в резултатите от двете паралелни дозирания на една и съща проба не трябва да надхвърля 15 % по отношение на върховия резултат.

## 9. Резултати от вътрешнолабораторно проучване <sup>(1)</sup>

	Предварителна смес	Предварителна смес	Минерален концентрат	Протеинов хранителен продукт	Храна за малки прасета
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
средно (мг/кг)	17 380	1 187	926	315	61,3
sr (мг/кг)	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r (мг/кг)	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr (%)	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
SR (мг/гг)	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R (мг/кг)	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR (%)	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

<sup>(1)</sup> Проучване, проведено от работната група по храните за животни на Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

L: брой лаборатории

n: брой индивидуални стойности

sr: типово отклонение при повторяемост

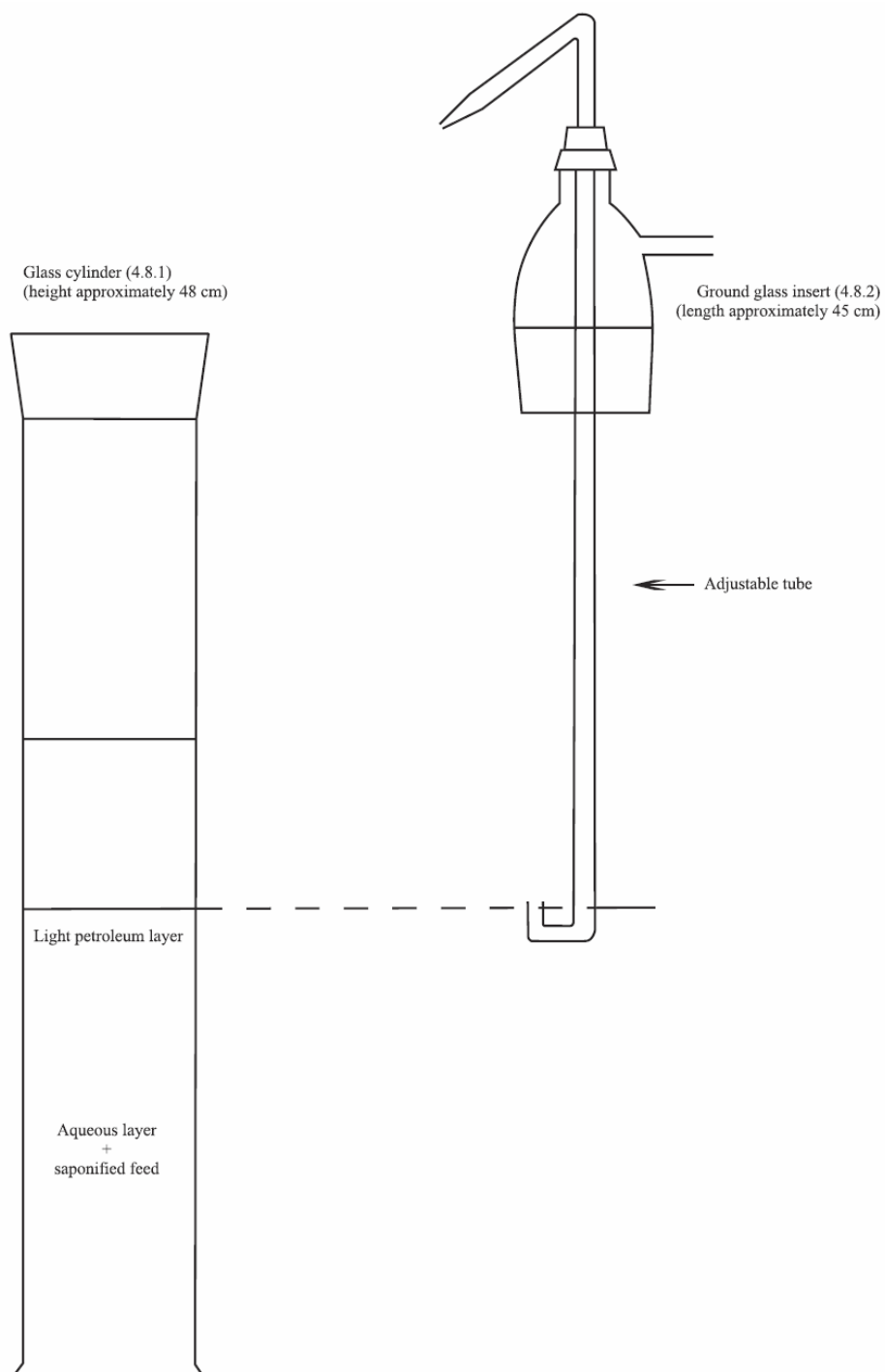
SR: типово отклонение при възпроизводимост

r: повторяемость

R: възпроизводимост

CVr: коефициент на изменяемост при повторяемост

CVR: Коефициент на изменяемост при възпроизводимост



**Фигура 1 : Екстрактор (4.8)**

Епруветка (4.8.1)  
(приблизителна височина : 48 см)

Шлифована част (мъжко  
притриване)  
(приблизителна височина:  
45 см)

← Регулираща се тръба

Слой петролен етер  
Воден слой  
+  
осапунен хранителен  
продукт

## ЧАСТ В

### ДОЗИРАНЕ НА ТРИПТОФАНА

#### 1. Предмет и област на приложение

Методът дава възможност да се определи общия и свободен триптофан в храните за животни. Методът не прави разлика между форми D и L.

#### 2. Принцип

За да се определи общия триптофан, пробата се хидролизира в алкална среда с разтвор на наситен бариев хидроксид и се загрява до 110 °C за двадесет часа. След хидролизата се прибавя вътрешен еталон (еталонно вещество, примесено към прахообразен образец - бел. прев.)

За да се определи свободния триптофан, пробата се екстрахира в кисела среда при наличие на вътрешен еталон.

Триптофанът и вътрешният еталон в хидролизата или в екстракта се определят от CLHP с флуорометричен датчик.

#### 3. Реактиви

3.1. Използвате двойно дестилирана вода или вода с равностойно качество (проводимост < 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ )

3.2. Еталонно вещество : триптофан (чистота/съдържание  $\geq$  99 %), изсушен във вакуум при наличие на дифосфорен петоокис (дифосфор пентоксид)

3.3. Вътрешен еталон в точното му значение :  $\alpha$ -метил-триптофан (чистота/съдържание  $\geq$  99 %), изсушен във вакуум при наличие на дифосфорен петоокис (дифосфор пентоксид)

- 3.4. Октахидратиран бариев хидроксид (да се внимава  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$  да не се излага прекалено дълго на въздух, за да се избегне образуването на  $BaCO_3$ , който може да попречи на дозирането) (вж. забележката в точка 9.3)
- 3.5. Натриев хидроксид (хидроокис)
- 3.6. Ортофосфорна киселина,  $w = 85 \%$
- 3.7. Солна киселина,  $\rho_{20} = 1,19$  г/мл
- 3.8. Метанол, качество CLHP
- 3.9. Петролен етер, температура на кипене : 40 - 60 °C
- 3.10. Разтвор на натриев хидроксид,  $c = 1$  мол/л :  
разтваряте 40,0 г NaOH (3.5) във вода и доливате с вода (3.1) до 1 литър
- 3.11. Солна киселина,  $c = 6$  мол/л :  
взимате 492 мл HCl (3.7) и доливате с вода до 1 литър
- 3.12. Солна киселина,  $c = 1$  мол/л :  
взимате 82 мл HCl (3.7) и доливате с вода до 1 литър
- 3.13. Солна киселина,  $c = 1$  мол/л :  
взимате 8,2 мл HCl (3.7) и доливате с вода до 1 литър
- 3.14. Ортофосфорна киселина,  $c = 0,5$  мол/л :  
взимате 34 мл ортофосфорна киселина (3.6) и доливате с вода (3.1) до 1 литър
- 3.15. Матерен разтвор на триптофан (3.2),  $c = 2,50$   $\mu\text{mol/ml}$   
В градуирана колба от 500 мл разтваряте 0,2553 г триптофан (3.2) в солна киселина (3.13) и допълвате до съответното деление със солна киселина (3.13). Съхранявате при - 18 °C в продължение на четири седмици най-много.
- 3.16. Концентриран вътрешен еталонен (сравнителен) разтвор,  $c = 2,50$   $\mu\text{mol/ml}$   
В градуирана колба от 500 мл разтваряте 0,2728 г  $\alpha$ -метил-триптофан (3.3) в солна киселина (3.13) и допълвате до съответното деление със солна киселина (3.13). Съхранявате при - 18 °C в продължение на четири седмици най-много.
- 3.17. Сравнителен разтвор за калибриране на триптофан и вътрешен еталон  
Взимате 2,00 мл матерен разтвор на триптофан (3.15) и 2,00 мл матерен вътрешен сравнителен разтвор (на  $\alpha$ -метил-триптофан) (3.16). Разреждате с вода (3.1) и метанол (3.8) приблизително до същия обем и приблизително до същата концентрация на метанол (10 - 3- %) като готовия хидролизат.  
Този разтвор се изготвя при всяка манипулация.  
Да се осигури защита срещу пряка светлина по време на изготвянето на разтвора.

- 3.18. Оцетна киселина
- 3.19. Трихлор-1,1,1-метил-2-пропанол-2
- 3.20. Етаноламин (коламин) > 98 %
- 3.21. 1 г разтвор на трихлор-1,1,1-метил-2-пропанол-2 (3.19) в 100 мл метанол (3.8)
- 3.22. Мобилна фаза за СLНР : 3,00 г оцетна киселина (3.18) + 900 мл вода (3-1) + 50 мл разтвор (3.21) на трихлор-1,1,1-метил-2-пропанол-2 (3.19) в метанол (3.8) (1 г/100 мл). рН трябва да достигне 5,00 с етаноламин (3.20). Долейте до 1 000 мл с вода (3.1).

#### 4. Апаратура

- 4.1. Инсталация за СLНР със спектрофлуорометрично детектиране
- 4.2. Колона за течна хроматография, 125 мм x 4 мм, С18, частици от 3 μm или еквивалент
- 4.3. рН-метър
- 4.4. Пропиленова колба, обем 125мл, с широко гърло и винтова запушалка
- 4.5. Мембранен филтър, 0,45 μm
- 4.6. Автоклав, 110 (±2) °С, 1,4 (±0,1) бара
- 4.7. Механичен или магнитен миксер
- 4.8. Миксер Vortex

#### 5. Процедура

- 5.1. Изготвяне на пробите

Смелате пробата, за да премине през сито с отвори 0,5 мм. Пробите с голяма влажност трябва да се изсушат на въздух при температура 50 °С максимум или чрез лиофилизация преди смилането. Преди смилането пробите с голямо съдържание на мастни вещества трябва да се екстрахират с петролен етер (3.9).

- 5.2. Определяне на свободния триптофан (екстракт)

Претегляйте близо 1 мг подходящо количество (1 - 5 г) от изготвената проба (5.1) в конусовидна колба. Прибавяте 100,0 мл солна киселина, с = 0,1 мол/л (3.13) и 5,00 мл вътрешен сравнителен матерен разтвор (3.16). Разбъркватے или



размесват в продължение на 60 мин. с механичния или магнитен миксер (4.7). Оставете седимента да се избистри чрез утаяване и прибавяте с пипета 10,0 мл от повърхностния слой в бехерова чаша. Прибавяте 5 мл ортофосфорна киселина,  $c = 0,5$  мол/л (3.14). Достигате рН 3 с натриев хидроксид,  $c = 1,0$  мол/л (3.10). Прибавяте достатъчно количество метанол (3.8), за да постигнете концентрация между 10 и 30 % метанол в крайния обем. Прехвърляте в градуирана колба с подходящ обем и разреждате с достатъчен обем вода, необходим за хроматографията (почти еднакъв обем с този на контролния разтвор за еталониране (3.17).

Филтрирате няколко милилитра от разтвора през мембранен филтър  $0,45 \mu\text{m}$ , преди да пристъпите към впръскването в колона CLHP. Преминавате към етапа на хроматографията според точка 5.4.

Необходима е защита на сравнителния разтвор и на екстрактите срещу пряка слънчева светлина. Ако няма възможност да се анализират в същия ден, екстрактите трябва да са съхраняват при температура  $5^\circ\text{C}$  за максимум три дни.

### 5.3. Дозирание на общия триптофан (хидролизат)

Претеглете приблизително 0,2 мг (между 0,1 и 1 г) от подготвената проба (5.1) в пропиленова колба (4.4). Претеглената част трябва да съдържа около 10 мг азот. Прибавяте 8,4 г октахидратиран бариев хидроксид (3.4) и 10 мл вода. Размесват с миксер Vortex (4.8) или с магнитен миксер (бъркалка) (4.7). Оставете магнита с тефлоново покритие в сместа. Измивате стените на съда с 4 мл вода. Поставете винтовата запушалка и затворете колбата без да затягате. Прехвърляте в автоклав (4.6) с вряща вода и пара за 30 до 60 мин. Затваряте автоклава и го включвате при температура  $110^\circ\text{C} (\pm 2)$  в продължение на двадесет часа.

Преди да отворите автоклава, намалете температурата малко под  $100^\circ\text{C}$ . За да се избегне кристализация на  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , прибавяте към загрялата смес 30 мл вода със стайна температура. Леко разклащате или разбърквате. Прибавяте 2,00 мл от вътрешния матерен сравнителен разтвор ( $\alpha$ -метил-триптофан) (3.16). Охлаждате съдовете във вана с ледена вода в продължение на 15 мин.

Тогава прибавяте 5 мл ортофосфорва киселина,  $c = 0,5$  мол/л (3.14). Държите съда в охлаждаща вана и неутрализирате солната киселина,  $c = 6$  мола/л (3.11) след това, като разклащате, след което регулирате рН на 3,0 с  $\text{HCl}$ ,  $c = 1$  мол/л (3.12). Прибавяте достатъчно количество метанол, за да достигнете концентрация между 10 и 30 % метанол в крайния обем. Прехвърляте в градуирана колба с подходящ капацитет и разреждате с обема, необходим за хроматографията (например 100 мл). Добавянето на метанол не трябва да предизвика утаяване.

Филтрирате няколко милилитра от разтвора през мембранен филтър  $0,45 \mu\text{m}$  (4.5) преди да впръскате (инжектирате) в колона CLHP. Пристъпете към етапа на хроматографията съгласно точка 5.4.

Необходима е защита на сравнителния разтвор и на екстрактите срещу пряка слънчева светлина. Ако няма възможност да се анализират в същия ден, екстрактите трябва да са съхраняват при температура 5 °С за максимум три дни.

#### 5.4. HPLC дозиране

За ориентиране се предлагат следните условия за елюиране; и други условия могат да се прилагат, стига за дадат еквивалентни резултати (виж също така забележките в точки 9.1 и 9.2.

Колона за хроматография (4.2)	125 мм x 4 мм, C <sub>18</sub> , частици 3 μm или еквивалент
Температура на колоната	Стайна температура (на околната среда)
Мобилна фаза (3.22)	3,00 г оцетна киселина (3.18) + 900 мл вода (3.1)+50 мл разтвор(3.21) на три-хлор-1,1,1-метил-2-пропанол-2(3.19) (1 г/100 мл). Регулирайте рН на 5,00 с етаноламин (3.20). Долейте до 1 000 мл с вода (3.1)
Дебит	1 мл/мин.
Общо време на емулсия	около 34 мин.
Дължина на вълната на детектиране	възбуждане : 280 nm; емисия : 356 nm
Инжекционен обем	20 μl

#### 6. Изчисляване на резултатите

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{г триптофан на 100 г от пробата (образца)}$$

A повърхнина на пика на вътрешния еталон, еталонен разтвор (за еталониране) (3.17)

B повърхнина на пика на триптофана, екстракт (5.2) или хидролизат (5.3)

C обем в мл (2 мл) на матерния разтвор на триптофан (3.15), прибавен към разтвора за еталониране (3.17)

D концентрация в μмол/мл (=2,50) на матерния разтвор на триптофан (3.15), прибавен към разтвора за еталониране (3.17)

E обем в мл на вътрешния матерен разтвор (3.16), прибавен към екстракта (5.2) (= 5,00 мл) или към хидролизата (5.3) (= 200 мл)

F повърхнина на пика на вътрешния еталон, екстракт (5.2) или хидролизат (5л3)

G повърхнина на пика на триптофана, разтвор за еталониране (3.17)

H обем в мл (= 200 мл) от вътрешния матерен еталонен разтвор (3.16), прибавен към разтвора за еталониране

W тегло на пробата в г (коригирано, за да се получи началното тегло, ако продуктът е изсушен и/или обезмаслен)

MW молекулно тегло на триптофана (= 204.23)

## 7. Повторяемост

Разликата в резултатите от двете паралелни дозирания на една и съща проба не трябва да надхвърля 10 % по отношение на най-високия резултат.

## 8. Резултати от вътрешнолабораторно изпитание

	Проба 1 Храна за свине	Проба 2 Храна за свине, с добавка на L- триптофан	Проба 3 Концентрирана храна за свине
L	12	12	12
n	50	55	50
средно (г/кг)	2,42	3,40	4,22
sr (г/кг)	0,05	0,05	0,08
r (г/кг)	0,14	0,14	0,22
CVr ( %)	1,9	1,6	1,9
SR (г/гг)	0,5	0,20	0,09
R (г/кг)	0,42	0,56	0,25
CVR ( %)	6,3	6,0	2,2

L: брой лаборатории, представящи резултати

n: брой индивидуални резултати след елиминиране на грешките (идентифицирани по тестове Cochran-Dixon)

sr: типово отклонение при повторяемост

SR: типово отклонение при възпроизводимост

r: повторяемост

R: възпроизводимост

CVr: коефициент на изменяемост при повторяемост, в %

Проведено е друго междулабораторно изпитание в рамките на Общността (трето сравнение м/у лабораториите); анализирани са две проби (образци) от 13 лаборатории, за да се легализира екстракционния метод за свободния триптофан. На всяко изпитание се направени пет анализа. Резултатите са дадени в следващата таблица :

	Проба 4 Смес от пшеница и соя	Проба 5 Смес от пшеница и соя (= проба 4) с добавка на триптофан (0,457 г/кг)
L	12	12
n	55	60
средно (г/кг)	0,391	0,931
sr (г/кг)	0,005	0,012
r (г/кг)	0,014	0,034
CVr ( %)	1,34	1,34
SR (г/гг)	0,018	0,048
R (г/кг)	0,050	0,134
CVR ( %)	4,71	5,11

L: брой лаборатории, представящи резултати

n: брой индивидуални резултати след елиминиране на грешките (идентифицирани по тестове Cochran-Dixon

sr: типово отклонение при повторяемост

SR: типово отклонение при възпроизводимост

r: повторяемост

R: възпроизводимост

CVr: коефициент на изменяемост при повторяемост, в %

Проведено е още едно междулабораторно изпитание в рамките на Общността; анализирани са четири проби (образци) от седем лаборатории, за да се

легализира Метода чрез хидролиза. На всяко изпитание се направени пет анализа. Резултатите са дадени в следващата таблица :

	Проба 1 Смесена храна за свине (CRM 117)	Проба 2 Рибено брашно с ниско съдържание на мастни вещества (CRM 118)	Проба 3 Соево брашно (CRM 119)	Проба 4 Обезмаслено мляко на прах (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
средно (г/кг)	2,064	8,801	6,882	5,236
sr (г/кг)	0,021	0,101	0,089	0,040
r (г/кг)	0,059	0,283	0,249	0,112
CVr ( %)	1,04	1,15	1,30	0,76
SR (г/гг)	0,031	0,413	0,283	0,221
R (г/кг)	0,087	1,156	0,792	0,619
CVR ( %)	1,48	4,69	4,11	4,22

L: брой лаборатории, представящи резултати

n: брой индивидуални резултати след елиминиране на грешките (идентифицирани по тестове Cochran-Dixon

sr: типово отклонение при повторяемост

SR:типово отклонение при възпроизводимост

r: повторяемост

R: възпроизводимост

CVr: коефициент на изменяемост при повторяемост, в %

## 9. Забележки

9.1. Следните специални условия за хроматография могат да доведат до добро разделяне на триптофана и  $\alpha$ -метил-триптофана.

Изократично елуиране, последвано от почистване на колоната по градиент :

Колона за течна хроматография :	125ммx4мм, C18, частици 5 $\mu$ m, или еквивалент
Температура на колоната :	32 °C
Мобилна фаза :	А : смес 95/5 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ с 0,01 мола/л/метанол ( V + V) Б : метанол
Програма на градиента :	0 мин.            100 % А        0 % Б 15 мин.           100 % А        0 % Б 17 мин.            60 % А 40 % Б 19 мин.            60 % А 40 % Б 21 мин.            100 % Б        0 % Б 33 мин.            100 % А        0 % Б
Дебит :	1,2 мл/мин.
Общо време на елуиране :	около 33 мин.

9.2. Хроматографията варира според типа CLHP и според напълването на колоната. Избраната система трябва да доведе до връщане на базисния ред между пиковете на триптофана и на вътрешния еталон. Освен това е важно продуктите на разлагането определено да са разделени от триптофана и вътрешния еталон. Трябва да се пристъпи към изпитание без вътрешен еталон, така че да провери, че няма примеси на базисния ред на нивото на вътрешния еталон. От значение също така е времето за елуиране да е достатъчно продължително, за да има възможност за елуиране на всички продукти на разлагане, в противен случай късните пикове на елуиране могат да интерферират със следващите операции по хроматографията.

В поредицата от операции хроматографската система трябва да даде линейна реакция. Тази реакция трябва да се измери при постоянна концентрация (т.е. нормалната концентрация) на вътрешния еталон и при различни концентрации на триптофана. Важно е височината на пиковете на триптофана и на вътрешния еталон да се намира в линейния диапазон на системата CLHP/флуоресценция. Ако пикът или пиковете на триптофана и/или на вътрешния еталон са прекалено ниски или прекалено високи, анализът трябва да се повтори с проба с друг размер и/или изменен краен обем.

9.3. Бариев хидроксид (хидроокис)

С течение на времето бариевият хидроксид все по-трудно се разтваря. Това води до мътен разтвор при определяне по CLHP, което пък ще означава слаби резултати за триптофана.