

ОСМА ДИРЕКТИВА 78/633/ЕИО НА КОМИСИЯТА

от 15 юни 1978 година

за установяване на методи на Общността за анализ за официалния контрол на храните за животни

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО от 20 юли 1970 г. за въвеждане на методи на Общността за вземане на проби и за анализ за официалния контрол на храните за животни ¹, последно изменена с Акта за присъединяване и член 2 от него,

като има предвид, че директивата изисква официалния контрол на храните за животни да се извършва, като се използват методи на Общността за вземане на проби и анализ за проверка спазването на изискванията, произтичащи от законовите, подзаконови и административни разпоредби, отнасящи се до качеството и състава на храните за животни;

като има предвид, че с Директиви 71/250/ЕИО на Комисията от 15 юни 1971 г.² 71/393/ЕИО от 18 ноември 1971 г.³, 72/199/ЕИО от 27 април 1972 г.⁴, 73/46/ЕИО от 5 декември 1972 г.⁵, 74/203/ЕИО от 25 март 1974 г.⁶, 75/84/ЕИО от 20 декември 1974 г.⁷ и 76/372/ЕИО от 1 март 1976 г.⁸ вече са установени редица методи на Общността за анализ; като има предвид, че напредъкът на работата от тогава подсказва, че е препоръчително да се приеме осма поредица от методи;

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

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

1. Държавите-членки изискват анализите за официалния контрол на храните за животни, по отношение на съдържанието им на цинк-бацитрацин,

¹ ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.

² ОВ L 155, 12.7.1971 г., стр. 13

³ ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.

⁴ ОВ L 123, 29.5.1972 г., стр. 6.

⁵ ОВ L 83, 30.3.1973 г., стр. 21.

⁶ ОВ L 108, 22.4.1974 г., стр. 7.

⁷ ОВ L 32, 5.2.1975 г., стр. 26.

⁸ ОВ L 102, 15.4.1976 г., стр. 8.

флавофосфолипид, желязо, мед, манган и цинк да се извършва в съответствие с методите, описани в приложението към директивата.

2. Общите разпоредби, изложени в част 1, „Увод” на приложението към Първата директива 71/250/ЕИО, с изключение на частта, която разглежда приготвянето на пробата за анализ, се прилагат за методите, описани в приложението към настоящата директива.

Член 2

Държавите-членки приемат на 1 януари 1979 г. законовите, подзаконовите и административни разпоредби, необходими, за да приведат законодателството си в съответствие с настоящата директива. Те уведомяват незабавно Комисията за това.

Член 3

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 15 юни 1978 година.

За Комисията:

Finn GUNDELACH

Заместник-председател

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Определяне на цинк бацитрацин чрез дифузия в агарна среда

1. Цел и обхват

Методът служи за определяне на цинк бацитрацин в храните за животни, концентрирани фуражи и премикси. Най-ниското ниво за определяне е 5 mg/kg (5 ppm)(*). Методът не е валиден в присъствието на интерфериращи вещества, особено на големи количества на мед и аскорбинова киселина.

2. Принцип

Пробата се извлича при рН 2 със смес от метанол/вода/солна киселина. Екстрактът се довежда до рН 6.5, концентриран (ако е необходимо) и разреден. Антибиотичната му активност се определя чрез измерване на дифузията на цинк бацитрацина в агарна среда, инокулиран с микрококус лутеус (*syn. m. flavus*). Дифузията е показана чрез образуване на зони на инхибиране на микроорганизъма. Диаметърът на тези зони се приема за правопрпорционален на логаритъма на антибиотичната концентрация спрямо обема на използваната антибиотична концентрация.

3. Микроорганизъм: микрококус лутеус ATCC 10240

3.1. Поддържане на култура за размножение

Инокулира се микрококус лутеус на агарните склонове в средата за култивиране (4.1). Инкубира се 24 часа при 30-37С, съхранява се в хладилник при около 4С и се реинокулира на всеки две седмици в агарните склонове.

3.2. Подготовка на бактериална суспензия (а)

Събира се растежа от наскоро приготвения агарен склон (3.1) с от 2 до 3 ml разтвор на натриев хлорид (4.3). Използва се суспензията за да се инокулира 250 ml от средата за култивиране (4.1) съдържаща се в колба на Ру и се инкубира 18-20 часа при 30-37 С. Растежът се събира в 25 ml разтвор на натриев хлорид (4.3) и се смесва. Разтворът се разрежда до една десета с разтвор на натриев хлорид (4.3). Леката трансмисия на суспензията трябва да бъде около 75 %, измерено при 650 nm в 1 cm клетка срещу разтвор от натриев хлорид (4.3).

4. Среда за култивиране и реагенти

4.1. Среда за култивиране (б)

Месен пептон 6*0 г

триптон 4*0 g
екстракт от дрожди 3*0 g
месен екстракт 1*5 g
глюкоза 1*0 g,
агар 15*0 g
вода 1000 ml
pH 6*5 до 6*6 (след стерилизация).

4.2. Основна среда за дозировка (б)

триптон 10*0 г
екстракт от дрожди 3*0 г
месен екстракт 1*5 g
глюкоза 1*0 г
агар 20*0 г
Туин 80 1 ml
вода 1 000 ml,
pH6* (след стерилизация).

4.3. Разтвор на натриев хлорид 0*8 % (т/об): Разтваря се натриев хлорид А.Р. във вода и се разрежда до 1000 ml; стерилизира се.

4.4. Смес от метанол, чист, вода, солна киселина а.р. (р:1*18 до 1* 19): 80/17*5/2*5 (об/об/об).

(*) 1 mg храна за животни с цинк-бацитрацин е еквивалентен на 42 международни единици (м.е.)

а) могат да се използват и други методи, ако е установено, че те дават сродни бактериални суспензии.

б) може да бъде използвана всяка комерсиална среда за култивиране със сроден състав и даваща същите резултати.

4.5. Фосфатен буфер, pH 6*5

Калиев водороден фосфат K_2HPO_4 А.Р. (22*15г).

Калиев водороден фосфат K_2HPO_4 А.Р. (27*85г). Вода до 1000 ml

4.6. Солна киселина А.Р. (р:1*18* до 1*19).

4.7. Солна киселина А.Р. (0*1N).

4.8. Натриев хидроксид 1N разтвор А.Р.

4.9. Бромокрезол, пурпурен разтвор 0*04 % (т/об): разтваря се 0*1 g пурпурен бромокрезол в 18*5 ml 0*01 разтвор на натриев хидроксид. Добавя се обема до 250 ml с вода и се смесва.

4.10. Стандартно вещество: цинк- бацитрацин с известно действие (в м.е.).

5. Стандартни разтвори

Примерва се количество от стандартен цинк бацитрацин (4.10), съответстващ на 1050 м.е. (според указаната активност). Добавя се 5 ml 0*1N солна киселина (4.7) и се оставя 15 минути. Добавя се 30 ml вода, регулира се рН до 4*5 с фосфатен буфер РН6*5 (4.5) (около 4 ml), достига се обем от 50 ml с вода и се бърка добре (1 ml=21 м.е.).

От този разтвор се приготвят, чрез последващо разреждане с фосфатен буфер РН6*5 (4.5) следните разтвори: S80*42 м.е./ml, S40*21 м.е./ml, S20*105 м.е./ml, S10*0525 м.е./ml.

6. Приготвяне на екстракта

6.1. Екстракция

6.1.1. Концентрирани фуражи, премикси и минерални храни за животни

Примерва се количество от пробата от 2*0 до 5*0 г, добавя се 30 ml от сместа (4.4) и се разклаща за кратко време. Проверява се дали рН е около 2. Разклаща се 10 минути, добавя се 30 ml фосфатен буфер РН6*5 (4.5) и се разклаща в продължение на 15 минути. Разрежда се с фосфатен буфер (4.5), за да се получи очакваното съдържание цинк бацитрацин от 0*42 м.е./ml (=U8).

6.1.2. Протеинови концентрати

Примерва се количество от пробата при 10*0 г, добавя се 50 ml от сместа (4.4) и се разклаща за кратко време. Проверява се дали рН е около 2. Разклаща се 10 минути, добавя се фосфатния буфер рН6*5 (4.5) и се разклаща 15 минути. Разрежда се с фосфатен буфер (4.5) за да се получи очакваното съдържание на цинк бацитрацин от 0*42 м.е./ml (=U8)

6.1.3. Други хранителни вещества

Примерва се количество от пробата с 10*0 g (20*0 g за очаквано съдържание на цинк бацитрацин от 5 mg/kg), добавя се 25 ml от сместа (4.4) и се хомогенизира около 10 минути. Добавя се 25 ml от фосфатния буфер рН6*5 (4.5), разклаща се 15 минути и се центрофугира. Вземат се 20 ml от супернатантния разтвор и се получава рН6*5 чрез 1N разтвор на натриев хидроксид (4.8) с разтвор на пурпурен бромокрезол (4.9) като индикатор. Изпарява се до около 4 ml в ротационен изпарител при температура не превишаваща 35C. Разрежда се утайката с вода, за да се постигне очакваното съдържание на цинк бацитрацин от 0*42 м.е./ml (=U8).

6.2. Разтвори за експерименти за дозиране

От разтвор U8 да се изготвят разтвори U4 (очаквано съдържание: $0 \cdot 21$ м.е./ml), U2 (очаквано съдържание: $0 \cdot 105$ м.е./ml) и U1 (очаквано съдържание: $0 \cdot 0525$ м.е./ml), чрез последващо разреждане (1+1) с фосфатен буфер (4.5).

7. Процедура на дозиране

7.1. Инокулация на среда на културата

Инокулира се основна среда на дозиране (4.2) с бактериална суспензия (3.2) при около 50С. Чрез предварителни опити на плаки със средата (4.2) се определя количеството необходима бактериална суспензия, за да се получат големи и чисти зони на инхибиране с концентрации от пари цинк бацитрацин.

7.2. Подготовка на плочките

Извършва се дифузия през плаките в агара с четирите концентрации на стандартния разтвор (S1, S2, S8, S4) и четирите концентрации на екстракта (U8,U4,U2,U1). Тези четири концентрации от екстракта и стандарта трябва непременно да бъдат поставени на всяка плака. За тази цел подберете достатъчно големи плочи, за да има поне осем дупки с диаметър от 10 до 13 mm и не по-малко от 30 mm между центровете, които трябва да бъдат направени в агарната среда. Тестът може да се извърши на плочки, които се състоят от стъклена плоча с алуминиева повърхност или пластмасов пръстен, поставен отгоре, 200 mm с диаметър и 20 mm височина.

Количеството среда, инокулирана както в точка 7.1, се изсипва върху плочите (4.2), за да се получи слой от около 2 mm дебелина (50 ml за плоча с 200 mm диаметър). Установява се и в хоризонтално положение, да се пробият дупки и тях да се постави точно премерени обеми от пробирни и стандартни разтвори (между $0 \cdot$ и $0 \cdot 15$ ml на дупка, според диаметъра). Всяка концентрация да се приложи поне четири пъти, така че всяко определяне се подлежи на оценяване в 32 зони на инхибиране.

7.3 Инкубация

Плочите се инкубират 16 - 18 часа при 28-30С.

8. Оценка

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране до най-близката $0 \cdot 1$ mm. Отбелязва се средната измерена стойност на всяка концентрация върху полулогаритмична графика върху хартия, която показва логаритъма на концентрациите спрямо диаметрите на зоните на инхибиране. Нанасят се най-добре съответстващите линии на стандартния разтвор и на екстракта, например както е посочено по-долу.

Определя се „най-добре съответстващата” точка на най-ниското ниво на стандарта (SL), като се използва формулата:

$$\text{а) } SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10}$$

Определя се „най-добре съответстващата” точка на най-високото ниво на стандарта (SH), като се използва формулата:

$$\text{б) } SH = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1}{10}$$

По същия начин се изчисляват „най-добре съответстващите” точки на най-ниската степен на екстракта (UL) и на най-високата степен на екстракта (UH), като се заменят S_1 , S_4 и S_8 с U_1 , U_2 с U_8 от посочените по-горе формули..

Отбелязват се изчислените стойности на SL и на SH върху същата разграфена хартия и се свързват, ката че „да дадат най-добре съответстващата линия” за стандартен разтвор. По същия начин се нанасят UL и UH и се свързват, ката че „да дадат най-добре съответстващата линия” за екстракта.

При отсъствие на интерференция линиите следва да бъдат успоредни. За практически цели линиите могат да се считат за успоредни, ако стойностите (SL - SH) и (UL и UH) не се различават с повече от 10 % от средната им стойности.

Ако се установи, че линиите не са успоредни, могат да не се вземат предвид U_1 и S_1 или U_8 и S_8 , а SL, SH, UL, UH да се изчислят, като се използват алтернативните формули с цел да се получат най-добре съответстващите линии:

$$\text{а'') } SL = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

$$\text{б'') } SH = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6}$$

като се действа по същия начин за UL и UH. Алтернативните най-добре съответстващи линии трябва да се проверят за паралелност както по-горе. Фактът, че резултатът е бил изчислен от три нива, следва да се отбележи в окончателния отчет.

Когато линиите се разглеждат за успоредни, се изчислява логаритъмът на относителната активност (log. A) чрез една от следните формули.

За четири нива:

$$в) \quad \log. A = \frac{(U1+U2+U4+U8-S1-S2-S4-S8) \times 0,602}{U4+U8+S4+S8-U1-U2-S1-S2}$$

За три нива:

$$г) \log. A = \frac{(U1+U2+U4-S1-S2-S4) \times 0,401}{U4+S4-U1-S1}$$

или

$$д) \log. A = \frac{(U2+U4+U8-S2-S4-S8) \times 0,401}{U8+S8-U2-S2}$$

действителната активност = предполагаемата активност x относителната активност.

Когато линиите се счита, че не са успоредни, се повтаря определянето. Ако все още не е постигната успоредността, се изчислява логаритъма на относителната активност (log. A) чрез формула в). Въпреки това, полученият резултат трябва да се разглежда като приблизителен и това трябва да се отбележи в окончателния отчет.

9. Повторяемост

Разликите между резултатите от двете определяния, извършвани върху същата проба от същия анализатор не трябва да превишават:

20 % по отношение на най-високата стойност за съдържанията на цинк бацитрацин от 5 и до 25 mg/kg;

5 mg/kg, в абсолютна стойност, за съдържания по-големи от 25 и до 50 mg/kg;

10 mg/kg, отнесени към най-голямата стойност, за съдържания над 50 mg/kg .

2. Определяне на флавофосфолипид чрез дифузия в среда агар

1. Цел и обхват

Този метод е предназначен за определяне на флавофосфолипид в храните за животни, концентрираните фуражи и премиксите. Ниската граница на определяне е 1 mg/kg (1 ppm).

2. Принцип

Пробата се извлича с разреден метанол чрез нагряване под рефлукс. След центрофугиране, екстрактът се пречиства (ако е необходимо) чрез третиране с йонообменни смоли и се разрежда. Антибиотичното действие се определя чрез измерване на дифузията на флавофосфолипида в агарна среда инокулирана със

стафилококкус ауреус. Дифузията е показана чрез формирането на зони на инхибиране от микроорганизъма. Диаметърът на тези зони се приема за правопрпорционален на логаритъма на антибиотичната концентрация над обхвата на прилаганите антибиотични концентрации.

3. Микроорганизъм: стафилококкус ауреус ATCC 6538 P.

3.1. Поддръжка на културата за посевка

Инокулира се стафилококкус ауреус в агарните склонове на средата на културата (4.1). Инкубира се 24 часа при 37° C, държи се в хладилник около при 4° C и се инокулира всеки месец в косите агарни посевки.

3.2. Приготвяне на бактериална суспензия (А)

Вземат се две тръбички, съдържащи посевъчна култура (3.1) и се реинокулират месечно. Инкубят се 24 часа при 37° C и се държат в хладилник при 4° C.

24 часа преди дозирането, се инокулират с този растеж от две до 4 тръбички, съдържащи посевки на кос агар от култивираща среда (4.1). Инкубят се от 16 до 18 часа при 37° C. Прави се суспензия от растежа в разтвор от натриев хлорид (4.3). Леката трансмисия на суспензията трябва да бъде около 40 %, измерена при 578 NM в 1 см клетка срещу разтвор от натриев хлорид (4.3).

(А) Други методи могат да се използват, ако е установено, че такива дават сродни бактериални суспензии.

4. Култивационна среда и реагенти

4.1. Култивационна среда (А):

Месен пептон 6*0 г
триптон 4*0 г
екстракт от дрожди 3*0 г
месен екстракт 1*5 г
глюкоза 1*0 г
агар 15*0 г
вода 1000 ml
pH6*5 (след стерилизация)

4.2. Среда за дозиране

4.2.1. Основен слой (в)

Месен пептон 6*0 г
екстракт от дрожди 3*0 г
месен екстракт 1*5 г
агар 10*0 г
вода 1000 ml
pH6*5 (след стерилизация).

4.2.2. Посадъчен слой

Както при точка 4.1, с добавяне на 2*0 g от силиконова противоразпенваща емулсия (с)

4.3. Разтвор от натриев хлорид 0*4 % (т/об): разтваря се 4 g натриев хлорид ар във вода и се разрежда до 1000 ml; стерилизира се.

4.4. Чист метанол.

4.5. Метанол 50 % (об/об): разрежда се 500 ml метанол (4.4) с 500 ml вода.

4.6. Метанол 80 % (об/об): разрежда се 800 ml метанол (4.4) с 200 ml вода.

4.7. Трис (хидрометил) аминометан AP

4.8. Метанолов Разтвор от Калиев хлорид 1*5 % (т/об): разтваря се 1*5 g от калиевия хлорид ар в 20 ml вода, допълва се обема до 100 ml с метанол (4.4).

4.9. Катионен обменник: DOWEX 50 W BY 8 20 TO 50 MESH NA FORM (CAT. SERVA N 41600) или еквивалентен.

4.10. Анионен обменник: DOWEX 1 BY 2 50 TO 100 MESH CL FORM (CAT. SERVA N 41010) или еквивалентен. Преди употреба да се държи от 12-14 часа в 80 % метанол (4.6)

4.11. Стъклена вата.

4.12. pH индикаторна хартия (pH6* до 8*1).

4.13. Аскорбинова киселина.

4.14. Стандартна субстанция: флавофосфолипид с познато действие.

5. Апарат

5.1. Стъклена тръбичка за хроматография, вътрешен диаметър 9 mm, дължина: 150-200 mm, подходяща 316553 със запушалка в стеснената част в ниската част и скачващо устройство от матово стъкло (за свързване на капковата фуния (5.2)) на горния край.

5.2. Капкова фуния 250 ml, снабдена със запушалка и скачващо устройство от матово стъкло.

5.3. 250 ml конична колба с и скачващо устройство от матово стъкло.

5.4 Рефлуксен кондензатор със скачващо устройство от матово стъкло.

6. Стандартни разтвори

Разтваря се прецизно мерно количество от стандартното вещество (4.14) в 50 % метанол (4.5) и се разрежда, за да се получи разтвор от посевка, съдържаща 100 UG флавофосфолипид на милилитър. Съхранява се в запушени колби при 4С . Този разтвор е стабилен до 2 месеца.

а) всяка комерсиална култивационна среда или сроден състав, даващ същите резултати могат да се използват, напр. оксидна антибиотична среда 1 (см 327) с добавяне на оксиден агар N 3 (L 13).

б) всяка комерсиална култивационна среда или сроден състав, даващ същите резултати могат да се използват, напр. оксидна антибиотична среда 2 (см 335) с добавяне на оксиден агар N 3 (L 13).

в) Например SE 2 от WACKER CHEMIE GMBH, MUNICH

От този посадъчен разтвор да се приготви чрез разреждане с 50 % метанол (4.5) следния разтвор:

S8 0*2UG/ML ; S4 0*1UG/ML; S2 0*05UG/ML; S1 0*025 UG/ML

7. Подготовка на екстракта

7.1. Екстракция

7.1.1. Концентрати, предварителни смеси и минерални храни

Измерва се количество от пробата от 2*0 до 5*0 g и се добавя около 150 mg аскорбинова киселина (4.13). Хомогенизира се с 150 ml 50 % метанол (4.5) в конична колба и добавя се рН до 8*1 до 8*2 с около 400 mg трис (хидроксиметил) аминотан (4.7). Проверява се рН с индикаторната хартия (4.12). Престоява 15 минути. След това да се достига рН до 8*1 до 8*2 с трис(хидроксиметил) аминотан (4.7) и кипи 10 минути под рефлукс (5.4) с постоянно бъркане. Екстрактът се охлажда, центрифугира и се декантира.

7.1.2. Други храни за животни

Измерва се количество от пробата от 5*0 до 30*0 г, съдържащо поне 30 UG флавофосфолипид. Хомогенизира се с 150 ml 50 % метанол (4.5) в конична колба и се постига рН до 8*1 до 8*2 с около 400 mg трис (хидроксиметил) аминотан (4.7). Проверява се рН с индикаторната хартия (4.12). Престоява 15 минути. След това да се регулира рН до 8*1 до 8*2 с трис(хидроксиметил) аминотан (4.7) и

кипи 10 минути под рефлукс (5.4) с постоянно бъркане. Екстрактът се охлажда, центрифугира и декантира.

7.2. Пречистване (тази стъпка може да се пропусне за концентрати, предварителни смески и минерални храни)

Смесва се 110 ml от екстракта с 11 g от катионния обменник (4.9), вари се 1 минута под рефлукс (5.4) с постоянно бъркане. Отделя се катионният обменник чрез центрифугиране или филтрация. Смесва се 100 ml от екстракта с 150 ml метанол (4.4) и се държи разтвора от 12-15 часа при 4°C. Филтрира се флокулентната маса, докато е студена.

Поставя се запушалка от стъклена вата (4.11) на дъното на стъклената тръбичка, изсипва се в нея 5 ml от анионния обменник (4.10) и се измива стълбът с 100 ml 80 % метанол (4.6). Използвайки фуния (5.2), прехвърля се към стълба обем от филтратата от поне 100 ml, за който се очаква да съдържа 16 UG флавофосфолипол. (200 ml за 30 g проба от хранителното вещество при 1 ppm). Ако е необходимо, преди прилагането в стълба, се разрежда с 80 % метанол (4.6), за да се получи очакваното съдържание на флавофосфолипол от 16 UG/100 ml. Напасва се потока до около 2 ml/минута. Изхвърля се ефлуента. След това се измива стълбът с 50 ml 80 % метанол и да отстранява ефлуента.

Елуира се флавофосфолипола с метанолов разтвор от калиев хлорид (4.8), като се поддържа поток около 2ml/минута. Събира се 50 ml от елуата в градуирана колба, добавя се 30 ml вода и се бърка. Този разтвор трябва да има флавофосфолиполно съдържание от $0 \cdot 2 \text{ UG/ml} = (\text{U8})$.

7.3 Разтвори за дозиране

Ако е необходимо (където се изпуска пречистване), се разрежда получения екстракт в точка 7.1.1. с 50 % метанол, за да се получи очаквано съдържание на флавофосфолипол $0 \cdot 2 \text{ UG/ml}$.

От разтвор U8 се приготвят разтвори U4 (очаквано съдържание: $0 \cdot 1 \text{ UG/ml}$) U2 (очаквано съдържание: $0 \cdot 5 \text{ UG/ml}$) и U1 очаквано съдържание: $0 \cdot 025 \text{ UG/ml}$) чрез последващо разреждане (1+1) с 50 % метанол (4.5).

8. Процедура на дозиране

8.1. Инокулация на средата на култивиране

Инокулира се средата за дозиране (4.2.2.) с бактериална суспензия (3.2) при 50° C. С предварителни опити върху плаки със среда (4.2.2.), се определя количеството бактериална суспензия необходимо, за да се получат най-големи и най-ясни зони на инхибиране с различните концентрации от флавофосфолипол (около 30 ml на литър).

8.2. Приготвяне на плочите

Извършва се дифузия през среда за дозиране върху плочи с четири концентрации на стандартните разтвори (S8, S4, S2, S1) и четирите концентрации на екстракта (U8, U4, U2, U1). Тези четири концентрации на екстракта и стандарта трябва да бъдат поставени на всяка плоча. За целта, се избират достатъчно големи плочи, за да има поне 8 дупки с диаметър 10-13 mm и не по-малки от 30 mm между центровете, които трябва да бъдат направени в среда за дозиране. Тестовите трябва да се извършват върху плочите, състоящи се от стъклени листове с облицовка от алуминий или пластмасов пръстен отгоре, 200 mm в диаметър и 20 mm висок.

Изсипва се върху плочите количество от средата (4.2.1.) за да се получи слой от 1*5 mm дебелина (45 ml за плоча от 200 mm диаметър). Установява се в хоризонтално положение и се покрива отгоре с количество (4.2.2.) инокулирано както в т. 8.1. за да се получи слой 1 mm дебел (30 ml за плоча с 200 mm диаметър). Поставя се в хоризонтално положение. Пробиват се дупки и в тях се поставя точно премереното количество екстракти и стандартни разтвори (между 0*10 и 0*15 ml на дупка, според диаметъра). Всяка концентрация се прилага поне четири пъти така че всяко определяне да може да се оценява в три зони на инхибиране.

8.3. Инкубиране - Плочите се инкубират 16 - 18 часа при 28-30° C.

9. Оценка

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране до най-близката 0*1 mm. Отбелязва се средната измерена стойност на всяка концентрация върху полулогаритмична графика върху хартия, която показва логаритъма на концентрациите спрямо диаметрите на зоните на инхибиране. Нанасят се най-добре съответстващите линии на стандартния разтвор и на екстракта, например както е посочено по-долу.

Определя се „най-добре съответстващата“ точка на най-ниското ниво на стандарта (SL), като се използва формулата:

$$\text{а) } SL = \frac{7S1 + 4S2 + S4 - 2S8}{10}$$

Определя се „най-добре съответстващата“ точка на най-високото ниво на стандарта (SH), като се използва формулата:

$$\text{б) } SH = \frac{7S8 + 4S4 + S2 - 2S1}{10}$$

По същия начин се изчисляват „най-добре съответстващите“ точки на най-ниската степен на екстракта (UL) и на най-високата степен на екстракта (UH), като се заменят S₁, S₄ и S₈ с U₁, U₂ с U₈ от посочените по-горе формули..

Отбелязват се изчислените стойности на SL и на SH върху същата разграфена хартия и се свързват, ката че „да дадат най-добре съответстващата линия“ за стандартен разтвор. По същия начин се нанасят UL и UH и се свързват, ката че „да дадат най-добре съответстващата линия“ за екстракта.

При отсъствие на интерференция линиите следва да бъдат успоредни. За практически цели линиите могат да се считат за успоредни, ако стойностите (SL - SH) и (UL и UH) не се различават с повече от 10 % от средната им стойности.

Ако се установи, че линиите не са успоредни, могат да не се вземат предвид U₁ и S₁ или U₈ и S₈, а SL, SH, UL, UH да се изчислят, като се използват алтернативните формули с цел да се получат най-добре съответстващите линии:

$$a'') \quad SL = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

$$б'') \quad SH = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6}$$

като се действа по същия начин за UL и UH. Алтернативните най-добре съответстващи линии трябва да се проверят за паралелност както по-горе. Фактът, че резултатът е бил изчислен от три нива, следва да се отбележи в окончателния отчет.

Когато линиите се разглеждат за успоредни, се изчислява логаритъмът на относителната активност (log. A) чрез една от следните формули.

За четири нива:

$$в) \quad \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

За три нива:

$$г) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

или

$$д) \log. A = \frac{(U2 + U4 + U8 - S2 - S4 - S8) \times 0,401}{U8 + S8 - U2 - S2}$$

действителната активност = предполагаемата активност x относителната активност.

Когато линиите се счита, че не са успоредни, се повтаря определянето. Ако все още не е постигната успоредността, се изчислява логаритъма на относителната активност (log. A) чрез формула в). Въпреки това, полученият резултат трябва да се разглежда като приблизителен и това трябва да се отбележи в окончателния отчет.

10. Повторяемост - Разликата между резултатите от двете определяния, извършени върху една и съща проба от един анализатор не трябва да превишават:

- 0*5 mg/kg, в абсолютна стойност, за съдържанията на флавофосфолипид от 1 до 2 mg/kg;
- 25 %, съотнесени към най-високата стойност за съдържания по-големи от 2 и до 10 mg/kg;
- 20 %, съотнесени към най-високата стойност за съдържания по-големи от 10 и до
- 5 mg/kg, в абсолютна стойност за съдържания по-големи от 25 и до 50 mg/kg;
- 10 %, съотнесени към най-високата стойност за съдържания над 50 mg/kg;

3. Определяне на следи от елементи - желязо, мед, манган и цинк

1. Цел и обхват - Методът позволява да се определят и малки количества от желязо, мед, манган и цинк в храните. Ниските граници на определяне са следните: FE- 20 MG/KG, CU - 10 MG/KG, MN - 20 MG/KG, ZN - 20 MG/KG

2. Принцип - Пробата се поставя в разтвор от солна киселина след деструкция на органичното вещество, ако има такова. Елементите желязо, мед, манган и цинк се определят с атомноабсорбционна спектрометрия.

3. Реагенти - уводен коментар

За изготвянето на реагентите и аналитичните разтвори се използва вода, без да се определят катионите. Получена чрез двойно дестилиране в боросиликатно стъкло или кварц с двойно третиране чрез йонообменна смола. Реагентите трябва да бъдат поне с аналитично качество (AP) Отсъствието на елемента за определяне трябва да се проверява чрез експеримент на празна проба. Ако е необходимо, реагентите трябва допълнително да се пречистват. Вместо по-долу описаните стандартни разтвори, могат да се използват стандартни комерсиални, ако те са гарантирани и проверени преди употреба.

3.1. Солна киселина AP (Д:1*19)

3.2. Солна киселина AP (6N)

3.3. Солна киселина AP (0*5N)

3.4. Солна киселина 38 до 40 % (V/V) със съдържание на желязо по-малко от 1 mg на литър и утайка след изпаряване по-малко от 10 mg (като сулфат) на литър.

3.5. Сярна киселина AP (P1*84).

3.6. Водороден прекис AP (приблизително 100 обема кислород 30 % на тегло)

3.7. Стандартен железен разтвор (1000 UGFE/ML) изготвен както следва: разтваря се 1 g желязна тел AP. В 200 ml от 6N солна киселина (3.2), добавя се 16 ml водороден прекис (3.6) и се добавя до един литър с вода.

3.7.1. Работен стандартен железен разтвор (100 UG FE/ML) изготвен чрез разтваряне на стандартен разтвор (3.7) + 1+9 с вода.

3.8. Стандартен меден разтвор (1000 UG Cu/ml), приготвен както следва: разтваря се 1 g мед на прах (AP) в 25 ml от 6N солна киселина (3.2), добавя се водороден прекис и се добавя до един литър вода.

3.8.1. Работен стандартен меден разтвор (10 UG CU/ML) приготвен чрез разреждане на стандартен разтвор (3.8) с вода и след това разреждане на получения разтвор 1+9 с вода.

3.9. Стандартен манганов разтвор (1000 UG MN/ML) изготвя се както следва: разтваря се 1 g манган на прах (AP) в 25 ml от 6 N солна киселина (3.2) и се добавя до един литър вода.

3.9.1. Работен стандартен манганов разтвор (10 UG MN/ML) изготвя се както следва: разрежда се стандартния разтвор (3.9) 1+9 с вода и след това се разрежда получения разтвор 1+9 с вода.

3.10. Стандартен цинков разтвор (1000UG ZN/ML) изготвен както следва: разтваря се 1 g цинк на парчета или листове (AP) в 25 ml 6 N солна киселина (3.2) и се добавя до 1 л вода.

3.10.1. Работен стандартен цинков разтвор (10 UG ZN/ML) изготвя се както следва: разрежда се стандартния разтвор (3.10) 1+9 с вода и след това се разрежда получения разтвор 1+9 с вода.

3.11. Разтвор на лантаниев хлорид се приготвя по следния начин: разтваря се 12 g лантаниев окис в 150 ml вода, добавя се 100 ml 6 N солна киселина (3.2) и се добавя до 1 литър с вода.

4. Апаратура

4.1. Муфелна пещ с регулиране на температурата и записващо устройство.
4.2. Стъклените съдове трябва да бъдат от устойчив боросиликатен тип и се препоръчва да се използва апарат, който е изключително предназначен за определяне на редки елементи.

4.3. Платинен и (опция) кварцов тигел

4.4. Атомен абсорбционен спектрометър, съответстващ на изискванията на метода, с оглед на чувствителността и прецизността в необходимия обхват.

5. Процедура

5.1. Проби, съдържащи органично вещество

5.1.1. Опепеляване и изготвяне на разтвор за анализ (*)

(I) Поставя се от 5 до 10 g премерена проба, да бъде близо до 0.2 mg в платинен или кварцов тигел (4.3) (виж забележка (б)), изсушава се в пещ при 105°C и тигела се поставя в студена муфелна пещ (4.1). Пещта се затваря (виж забележка (с)) и температурата постепенно се повишава до $450\text{--}475^\circ\text{C}$ за около 90 минути. Тази температура се поддържа 4-16 часа (една нощ) за отделяне на сажите, след това пещта се отваря, за да се охлади, виж забележка (д)). Тигелът се измива с около 5 ml солна киселина (3.1) като последната бавно и внимателно се добавя към чаша от химически устойчиво стъкло (може да има бурна реакция, поради образуването на CO_2). Добавя се солна киселина (3.1) на капки с разклащане, докато спре отделянето на мехурчета. Да се изпарява до изсъхване, като от време на време се разбърква със стъклена пръчка.

(*) Зеленият фураж (пресен или изсушен) често съдържа големи количества растителни силикати, които могат да задържат следи от елементи и трябва да се отстраняват. За проби от тези храни за животни, следователно, следната изменена процедура трябва да се следва.

Операция 5.1.1. (I) трябва да се извърши по отношение на филтрацията. Филтърната хартия, която съдържа неразтворимата утайка трябва да се измие два пъти с вряща вода и да се постави в платинения тигел (4.3). Да се запали муфелната пещ (4.1), да гори при температура под 550°C докато изчезнат напълно всички въглеродни материали и сажди. Да се остави да се охлади. Да се прибавят няколко капки вода, след това от 10-15 ml хидрофлуорна киселина (3.4) и да се изпарява до изсъхване при около 150°C . Ако остават някакви силициевы частици в седимента, да се разтвори отново в няколко милилитра хидрофлуорна киселина и да се изпари до сухо състояние. Да се добавят пет капки сярна киселина (3.5) и да се нагрее докато не се появяват повече бели пушеци. След добавянето на 5 ml 6N солна киселина (3.2) и около 30 ml вода, да се нагрее, разтворът да се филтрира в 250 ml мерителна

колба и да се достигне до маркировката чрез добавяне на вода (концентрация на HCL около 0*5N). Продължава се с определянето от точка 5.1.3. След това се добавя 15 ml 6N солна киселина (3.2) към утайката, след това 120 ml вода, разбърка се със стъклена пръчка, която трябва да остане в мензурата, а тя да се покрие със стъкло за наблюдение. Достига се до кипене бавно, поддържа се точката на кипене, докато повече не се наблюдава разтварянето на пепел. Филтрира се през чиста от пепел филтърна хартия и филтрат се събира в 250 ml мерителна колба. Мензурната чаша и филтърът се измиват с 5 ml гореща 6N солна киселина (3.2) и два пъти с вряща вода. Напълва се мерителната колба до мярката с вода (концентрацията на солната киселина около 0*5N).

II. Ако седиментът във филтъра изглежда черен (въглерод), се връща в пещта и се опепелява отново при 450-475°C. Това опепеляване, което само изисква няколко часа (около 3-5 часа), е завършено, когато пепелта изглежда бяла или почти бяла. Седиментът се разтваря с около 2 ml солна киселина (3.1), изпарява се до изсъхване и се добавя 5 ml 6N солна киселина (3.2). Нагрява се, филтрира се разтворът в мерителната колба и се достига маркировката чрез прибавяне на вода (концентрацията на солната киселина около 0*5N).

Забележки:

а) При определянето на остатъчните елементи важно е да се обърне внимание на рисковете от замърсяване, особено с цинк, мед и желязо. По тази причина, използваните прибори не трябва да съдържат тези метали.

За намаляване на общия риск от замърсяване, да се работи в обезпрашена атмосфера с безупречно чисти прибори и внимателно измити стъклени съдове. Определянето на цинка е особено чувствително към много видове замърсяване, напр. от стъклените съдове, реагентите, прахта и др.

б) Теглото на пробата, която трябва да се опепелява се изчислява от приблизителното съдържание на проследявания елемент в храната за животни по отношение на чувствителността на използвания спектрофотометър. За определени храни за животни, които съдържат малко следи на елементи, може да е необходимо да се започне с проба от 10-20 g и да се добави с разтвор само до 100 ml.

в) Опепеляването трябва да се извършва в затворени пещи без подаване на въздух или кислород.

г) Температурата, която показва пирометърът не трябва да превишава 475°C.

5. 1. 2. Определяне чрез спектрофотометрия

5.1.2.1. Приготвяне на разтворите за калибриране - За всеки от елементите, които ще се определят, се приготвя от работните стандартни разтвори, посочени в точки 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1, и 3.1.1 гама от калибрационни разтвори, като всеки има

концентрация на солна киселина около *5N, и (в случаите за желязото, мангана и цинка) - концентрация на лантаниев хлорид еквивалентна на 0*1 % LA (т/об). Подбраните концентрации на следите на елементи трябва да бъдат в рамките на чувствителността на използвания спектрометър. Таблицата, по-долу, показва, чрез пример съставите на типични калибрационни разтвори; в зависимост обаче от вида и чувствителността на използвания спектрофотометър, може да се наложи да се изберат други концентрации.

Желязо

mg Fe /ml	0	0,5	1	2	3	4	5
работен стандартен разтвор в ml (3.7.1)							
(1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+10 ml разтвор на лантаниев хлорид (3.11) и достигане на 100 ml с добавяне на вода							

+10 ml разтвор на лантаниев хлорид (3.11) и достигане на 100 ml с добавяне на вода

Мед –

mg Cu /ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,1
работен стандартен разтвор в ml (3.8.1)							
(1 ml = 10 mg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml 6 N HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8
Допълва се до 100 ml с вода.							

Манган

mg Mn /ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,1
работен стандартен разтвор в ml (3.9.1)							
(1 ml = 10 mg Mn)	0	1	2	4	6	8	10

+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml разтвор на лантаниев хлорид (3.11) и добавяне до 100 ml вода							

5.1.2.2. Подготовка на разтвора за анализ

За определяне на медта, разтворът приготвен както е указано в точка 5.1.1 може да се използва директно. Ако е необходимо концентрацията му да се сведе до рамките на разтворите за калибриране аликвотна част може да се прибави с пипета в 100 ml измервателна колба и да се достигне до маркировката с 0*5N солна киселина (3.3).

За определяне на желязото, мангана и цинка, се прибавя с пипета аликвотна част от разтвора, приготвен както е указано в точка 5.1.1. В 100 ml измервателна колба, да се добавя 10 ml разтвор от лантаниев хлорид (3.11) и се достига до маркировката с 0*5N солна киселина (3.3). (Виж също точка 8 „Наблюдение”).

5.1.2.3. Контролен експеримент

Контролният експеримент трябва да включва всички указани стъпки на процедурата, освен че се изпуска пробния материал. Калибрационен разтвор „0” не трябва да се използва като контролен.

5.1.2.4. Измерване на атомната абсорбция - Да се измери атомната абсорбция на калибрационните разтвори, които ще се анализират, чрез използване на оксидиращ и въздушно-ацетиленов пламък при следните дължини на вълната.:

FE: 248*3 NM; CU: 324*8NM; MN: 279*5NM; ZN: 213*8NM

Всички измервания да се извършат няколко пъти.

5.2. Минерални храни за животни - Ако пробата не съдържа органично вещество, не е необходимо да се извършва предварително опепеляване. Трябва да се процедира, както е указано в точка 5.1.1 (I), като се започне от параграф втори. Може да се пропусне изпаряването с хидрофлуорна киселина.

6. Изчисляване на резултатите - Чрез калибрационна крива се изчисляват концентрациите на редките елементи в разтвора за анализ и резултатът се изразява в милиграми рядък елемент на килограм проба (ppm).

7. Повторяемост - разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени чрез една проба от един анализатор не трябва да превишават:

- 5 mg/kg, в абсолютна стойност, за съдържания на въпросните редки елементи до 50 mg/kg;
- 10 % от по-високия резултат за съдържание на въпросният рядък елемент от 50 и до 100 mg/kg;
- 10 mg/kg, в абсолютна стойност, за съдържания на въпросните редки елементи от 100 и до 200 mg/kg;

- 5 % от по-високия резултат за съдържание на въпросният рядък елемент над 200 mg/kg.

8. Наблюдение - наличието на големи количества фосфати може да попречи на определянето на желязото, мангана и цинка. Това влияние може да се коригира с прибавяне на разтвор от лантаниев хлорид (3.11). Ако обаче тегловното

$$\frac{Ca + Mg}{P} = 2$$

съотношение в пробата е , добавянето на разтвор от лантаниев хлорид (3.11) към разтвора за анализ и към калибрационните разтвори може да се пропусне.