

Този документ е средство за документиране и не обвързва институциите

► **V**

**ОСМА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА**

от 15 юни 1978 година

относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(78/633/ЕИО)

(ОВ L 206, 29.7.1978, стр. 43)

Изменена с

Официален вестник

№ страница дата

► **M1** Директива на Комисията от 30 юли 1981 година

L 246 32 29.8.1981

► **M2** Директива на Комисията от 20 декември 1983 година

L 15 28 18.1.1984

▼ B**ОСМА ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА**

от 15 юни 1978 година

относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

(78/633/ЕИО)

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. относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни <sup>(1)</sup>, последно изменена с Акта за присъединяване, и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че посочената директива изисква официалният 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, подзаконовите и административните разпоредби, отнасящи се до качеството и състава на храните за животни;

като има предвид, че с Директиви 71/250/ЕИО от 15 юни 1971 г. <sup>(2)</sup>, 71/393/ЕИО от 18 ноември 1971 г. <sup>(3)</sup>, 72/199/ЕИО от 27 април 1972 г. <sup>(4)</sup>, 73/46/ЕИО от 5 декември 1972 г. <sup>(5)</sup>, 74/203/ЕИО от 25 март 1974 г. <sup>(6)</sup>, 75/84/ЕИО от 20 декември 1974 г. <sup>(7)</sup> и 76/372/ЕИО на Комисията от 1 март 1976 г. <sup>(8)</sup> вече са установени редица общностни методи за анализ; като има предвид, че напредъкът на работата оттогава 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, флавофосфолипид, желязо, мед, манган и цинк да се извършват в съответствие с методите, описани в приложението към настоящата директива.

▼ M1▼ B*Член 2*

Държавите-членки приемат на 1 януари 1979 г. законовите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива. Те уведомяват незабавно Комисията за това.

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

<sup>(2)</sup> ОВ L 155, 12.7.1971 г., стр. 13.

<sup>(3)</sup> ОВ L 279, 20.12.1971 г., стр. 7.

<sup>(4)</sup> ОВ L 123, 29.5.1972 г., стр. 6.

<sup>(5)</sup> ОВ L 83, 30.3.1973 г., стр. 21.

<sup>(6)</sup> ОВ L 108, 22.4.1974 г., стр. 7.

<sup>(7)</sup> ОВ L 32, 5.2.1975 г., стр. 26.

<sup>(8)</sup> ОВ L 102, 15.4.1976 г., стр. 8.

**▼B**

*Член 3*

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

▼ **B**

## ПРИЛОЖЕНИЕ

▼ **M2****1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЦИНК БАЦИТРАЦИН**

— чрез дифузия в среда агар-агар —

**1. ЗАДАЧИ И ОБХВАТ**

Методът служи за определяне на цинк бацитрацин във храни за животни и премикси. Долната граница на определяне е 5 mg/kg (5ppm) <sup>(1)</sup>.

**2. ПРИНЦИП**

Пробата се екстрахира при рН 2 със смес на метанол/вода/солна киселина и разтвор на натриев сулфат. Натриевият сулфат се добавя, за да се утаят всички разтворими медни соли, които могат да повлияят на изпитването. Екстрактът се довежда до рН 6,5, концентриран (когато е необходимо) и разреден. Неговата антибиотична активност се определя чрез измерване на дифузията на вирджиниямицин в среда агар-агар, инокулирана с *Micrococcus luteus* (flavus). Дифузията става видима от образуването на зони на инхибиране в присъствието на микроорганизма. Диаметърът на тези зони се счита за правопрпорционален на логаритъма на концентрацията на антибиотика в обхвата на изследваните антибиотични концентрации.

**3. МИКРООРГАНИЗЪМ: MICROCOCCUS LUTEUS ATCC 10240****3.1. Поддържане на щама**

Инокулира се епруветка скосен агар с хранителна среда (4.1) с *Micrococcus luteus* (flavus) и се инкубира в продължение на 24 часа при 30 °С. Културата се съхранява в хладилник при 4 °С. Реинокулира се на всеки две седмици.

**3.2. Приготвяне на бактериалната суспензия <sup>(a)</sup>**

Бактериите се събират от наскоро приготвена епруветка скосен агар (3.1) с 2 до 3 ml разтвор на натриев хлорид (4.3). С тази суспензия се инокулира колба на Roux, съдържаща 250 ml хранителна среда (4.1) и се култивира в продължение на 18 до 20 часа при 30 °С. Бактериите се събират в 25 ml разтвор на натриев хлорид (4.3) и се хомогенизира. Суспензията се разрежда до 1/10 с разтвор на натриев хлорид (4.3). Пропускливостта на светлината на суспензията трябва да бъде около 75 %, измерена при 650 nm в клетка 1 cm, спрямо разтвор на натриев хлорид (4.3). Тази суспензия трябва да се съхранява една седмица при около 4 °С.

**4. ХРАНИТЕЛНА СРЕДА И РЕАКТИВИ****4.1. Хранителна <sup>(b)</sup>**

Месен пептон	6,0 g
Триптон	4,0 g
Дрождиев екстракт	3,0 g
Месен екстракт	1,5 g
Глюкоза	1,0 g
Агар-агар	10,0 до 20,0 g
Вода	1 000 ml
рН 6,5 (след стерилизация).	

<sup>(1)</sup> 1 mg фуражен клас цинк бацитрацин е еквивалентен на 42 международни единици (м.е.).

<sup>(a)</sup> Могат да се използват други методи, при условие че е установено, че те дават подобни бактериални суспензии.

<sup>(b)</sup> Може да се използва всяка комерсиална хранителна среда с подобен състав и даващи същите резултати.

▼ **M2**4.2. **Изпитателна среда** <sup>(a)</sup>

Триптон	10,0 g
Дрождиев екстракт	3,0 g
Месен екстракт	1,5 g
Глюкоза	1,0 g
Агар-агар	10,0 до 20,0 g
Tween 80	1 ml
Вода	1 000 ml
рН 6,5 (след стерилизация).	

4.3. Разтвор на натриев хлорид 0,8 % (w/v): разтварят се 8 g натриев хлорид във вода и се разрежда до 1 000 ml; стерилизира се.

4.4. Смес на метанол/вода/солна киселина (4.6):

80/17,5/2,5 (v/v/v)

4.5. **Фосфатен буфер рН 6,5:**

Монокалиев фосфат $K_2HPO_4$	22,15 g
Дикалиев фосфат $KH_2PO_4$	27,85 g
Вода до	1 000 ml

4.6. Солна киселина (d: 1,18 до 1,19).

4.7. Солна киселина (0,1 M).

4.8. Натриев хидроксид разтвор 1 M.

4.9. Натриев сулфид разтвор около 0,5 M.

4.10. Разтвор на бромокрезол, пурпурен разтвор 0,04 % (w/v): разтваря се 0,1 g пурпурен бромокрезол в 18,5 ml разтвор на натриев хидроксид 0,01 M. Добавя се до 250 ml с вода и се смесва.

4.11. Стандартна субстанция: цинк бацитрацин с известна активност (в i.u.).

5. **СТАНДАРТНИ РАЗТВОРИ**

Разтваря се количество от стандартна субстанция (4.11), което съответства на 1 050 м.е. (съгласно посочената активност). Добавя се 5 ml солна киселина 0,1 M (4.7) и се оставят спокойно в продължение на 15 минути. Добавя се 30 ml вода, коригира се рН до 4,5 с фосфатен буфер (4.5) (около 4 ml), долива се до 50 ml с вода и се смесва добре (1 ml = 21 i.u.).

От този разтвор се приготвят чрез последователно разреждане с фосфатен буфер (4.5) следните разтвори:

$s_8$	0,42	i.u./ml
$s_4$	0,21	i.u./ml
$s_2$	0,105	i.u./ml
$s_1$	0,0525	i.u./ml

6. **ПРИГОТВЯНЕ НА ЕКСТРАКТА И РАЗТВОРИТЕ ЗА ИЗПИТВАНЕ**6.1. **Екстракция**6.1.1. *Премикси и минерални храни*

Претегля се от 2,0 до 5,0 g от пробата, добавя се 29,0 ml от сместа (4.4) и 1,0 ml разтвор на натриев сулфид (4.9) и се разтръсква за кратко. Проверява се дали рН е около 2. Разтръсква се в продължение на 10 минути, добавя се 30 ml фосфатен буфер (4.5), разтръсква се в продължение на 15 минути и се центрофугира. Взема се подходящ аликват от разтвора, който плава отгоре, и рН се довежда до 6,5 с помощта на хидроксиден разтвор 1 M (4.8) с рН метър или с разтвор на бромкрезол пурпур (4.10) като индикатор. Разрежда се с фосфатен буфер (4.5), за да се получи очакваното съдържание на цинк бацитрацин 0,42 i.u./ml (=  $u_8$ ).

<sup>(a)</sup> Може да се използва всяка хранителна културална среда с подобен състав и даващи същите резултати.

▼ **M2**6.1.2. *Протеинови концентрати*

Претегля се 10,0 от пробата, добавя се 49,0 ml от сместа (4.4) и 1,0 ml разтвор на натриев сулфид (4.9) и се разтърсква за кратко. Проверява се дали рН е около 2. Разтърсква се в продължение на 10 минути. Добавя се 50 ml фосфатен буфер (4.5), разтърсква се в продължение на 15 минути и се центрофугира. Взема се подходящ аликват от разтвора, който плава отгоре, и рН се довежда до 6,5 с помощта на хидроксиден разтвор 1 M (4.8) с рН метър или с разтвор на бромкрезол пурпур (4.10) като индикатор. Изпарява се до приблизително половината обем в ротационен изпарител при температура, която не превишава 35 °C.

Разрежда се с фосфатен буфер (4.5), за да се получи очакваното съдържание на цинк бацитрацин 0,42 i.u./ml (=  $\mu\text{g}$ ).

6.1.3. *Други храни*

Претегля се 10,0 g от пробата (20,0 g за очаквано съдържание на цинк бацитрацин 5 mg/kg). Добавя се 24,0 ml от сместа (4.4) и 1,0 ml разтвор на натриев сулфид (4.9) и се хомогенизира в продължение на 10 минути. Добавя се 25 ml фосфатен буфер (4.5), разтърсква се в продължение на 15 минути и се центрофугира. Взема се 20 ml от разтвора, който плава отгоре, и рН се довежда до 6,5 с помощта на хидроксиден разтвор 1 M (4.8) с рН метър или с разтвор на бромкрезол пурпур (4.10) като индикатор. Изпарява се около 4 ml в ротационен изпарител при температура, която не превишава 35 °C. Разрежда се с фосфатен буфер (4.5), за да се получи очакваното съдържание на цинк бацитрацин 0,42 i.u./ml (=  $\mu\text{g}$ ).

6.2. **Разтвори за изпитване**

От разтвор  $\mu_8$  се приготвят разтвори  $\mu_4$  /очаквано съдържание: 0,21 i.u./ml),  $\mu_2$  (очаквано съдържание: 0,105 i.u./ml) и  $\mu_1$  (очаквано съдържание: 0,0525 i.u./ml) чрез последователно разреждане (1 + 1) със сместа (4.5).

7. **ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ**7.1. **Инокулиране на хранителната среда**

Хранителната среда (4.2) се инокулира с бактериалната суспензия (3.2) при около 50 °C. Чрез предварителни опити в петри със среда (4.2) се определя количеството на бактериалната суспензия, което се изисква, за да се получат най-големи и ясни зони на инхибиране с различните концентрации на цинк бацитрацин.

7.2. **Подготовка на паничките**

Дифузията в агар се осъществява в панички, като се използват четири концентрации на стандартния разтвор ( $s_8$ ,  $s_4$ ,  $s_2$ , и  $s_1$ ) и четири концентрации на екстракта ( $\mu_8$ ,  $\mu_4$ ,  $\mu_2$ , и  $\mu_1$ ). Тези четири концентрации на екстракта и стандарта е необходимо да се поставят във всяка паничка. За тази цел се избират панички, достатъчно големи да позволят да се направят в агарова среда най-малко осем дупки с диаметър от 10 до 13 mm и не по-малко от 30 mm между центровете. Тестът може да се извърши на панички, които се състоят от стъклен лист с поставени върху него алуминиеви или пластмасови пръстени с диаметър 200 mm и височина 20 mm.

Излива се в паничката част от средата (4.2), инокулирана, както е указано в точка 7.1, за да се получи пласт, дебел около 2 mm (60 ml за панички с диаметър 200 mm). Остава се да се разстеле равномерно, пробиват се дупки и в тях се поставят точно премерени обеми от изпитваните и стандартните разтвори (между 0,10 и 0,15 ml на дупка в зависимост от диаметъра). За всяка проба разрежданията се повтарят най-малко четири пъти с всяка концентрация, така че всяко определяне да включва оценяването на 32 зони на инхибиране.

7.3. **Инкубиране**

Паничките се инкубират от 16 до 18 часа при  $30 \pm 2$  °C.

▼ M2

## 8. ОЦЕНЯВАНЕ

За предпочитане е диаметърът на зоните на инхибиране да се измери с точност до 0,1 mm. Записват се средните аритметични стойности на измерванията за всяка концентрация на милиметрова хартия, която показва логаритъма на концентрациите спрямо диаметрите на зоните на инхибиране. Начертават се линиите на най-добро съвпадане на стандартния разтвор и екстракта, например както по-долу:

Определя се точката на „най-добро съвпадане“ за най-ниското ниво на стандарта (SL), като се използва формулата:

$$a) SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Определя се точката на „най-добро съвпадане“ за най-високото ниво на стандарта (SH), като се използва формулата:

$$б) SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

По същия начин се изчисляват точките на „най-добро съвпадане“ за най-ниското ниво на екстракта (UL) и най-високото ниво на екстракта (UH), като се заместят  $u_8, u_4, u_2$ , и  $u_1$  и  $s_8, s_4, s_2$ , и  $s_1$  в горните формули.

Отбелязват се изчислените стойности на SL и SH на същата милиметрова хартия и се съединяват, за да се получи линията на „най-добро съвпадане“ за стандартния разтвор. По същия начин се отбелязват UL и UH и се съединяват, за да се получи линията на „най-добро съвпадане“ за екстракта.

При отсъствие на външни влияния линиите трябва да бъдат успоредни. За практични цели линиите могат да се считат успоредни, ако стойностите (SH - SL) и (UH - UL) не се различават с повече от 10 % от тяхната средна аритметична стойност.

Ако линиите не са успоредни, могат да се изключат или  $u_1$  и  $s_1$ , или  $u_8$  и  $s_8$  и да изчислят SL, SH, UL и UH, като се използват алтернативните формули, за да се получат линиите на „най-добро съвпадане“:

$$(a') SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{или} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

и по-същия начин за UL и UH. Трябва да бъде удовлетворен същият критерий за успоредност. Фактът, че резултатът е бил изчислен от три нива, трябва да бъде отбелязан в крайния отчет.

Когато линиите се считат за успоредни, се изчислява логаритъмът на относителната активност ( $\log A$ ) чрез една от следните формули, в зависимост от това дали четири или три нива са били използвани за оценка на успоредността.

*За четири нива*

$$в) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

*За три нива*

$$г) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

**▼ M2**

илиг

$$r') \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Активността на екстракта от пробата = активността на съответния стандарт  $\times A$

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Ако се установи, че относителната активност е извън обхвата 0,5 до 2,0, изпитването се повтаря, като се направят подходящи корекции на концентрациите на екстракта или ако това не е възможно, на стандартните разтвори. Когато относителната активност не може да бъде вкарана в изисквания обхват, всеки получен резултат трябва да се счита за приблизителен и това трябва да бъде отбелязано в крайния отчет.

Когато се счита, че линиите не са успоредни, определянето се повтаря. Ако и тогава не се постига успоредност, определянето трябва да счита за незадоволително.

Резултатът се изразява в милиграми бацитрацин на килограм храни за животни.

## 9. ПОВТОРЯЕМОСТ

Разликата между резултатите на две паралелни определяния, проведени върху същата проба от същия лаборант, не трябва да превишават:

- 2 mg/kg в абсолютна стойност за съдържание на бацитрацин до 10 mg/kg,
- 20 % спрямо най-високата стойност за съдържание от 10 до 25 mg/kg,
- 5 mg/kg в абсолютна стойност за съдържание от 25 до 50 mg/kg,
- 10 % спрямо най-високата стойност за съдържание над 50 mg/kg.

**▼ B**

## 2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФЛАВОФОСФОЛИПОЛ 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 флавофосфолипола в агарна среда, инокулирана със стафилококус ауреус. Дифузията е показана чрез формирането на зони на инхибиране от микроорганизма. Диаметърът на тези зони се приема за право пропорционален на логаритъма на антибиотичната концентрация над обхвата на прилаганите антибиотични концентрации.

### 3. МИКРООРГАНИЗЪМ: СТАФИЛОКОКУС АУРЕУС ATCC 6538 P

#### 3.1. Поддръжка на посевъчната култура

Инокулира се стафилококус ауреус в агарните склонове на средата на културата (4.1). Инкубира се 24 часа при 37 °C, държи се в



**▼B**

хладилник при около 4 °C и се инокулира всеки месец в косите агарни посевки.

3.2. **Приготвяне на бактериална суспензия** <sup>(a)</sup>

Вземат се две тръбички, съдържащи посевъчна култура (3.1) и се реинокулират месечно. Инкубират 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 култивационна среда (4.1). Инкубира 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 спрямо разтвор от натриев хлорид (4.3).

4. **КУЛТИВАЦИОННА СРЕДА И РЕАГЕНТИ**

4.1. **Култивационна среда** <sup>(b)</sup>:

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	1 000 мл
pH 6,5 (след стерилизация)	

4.2. **Среда за дозиране**

4.2.1. *Основен слой* <sup>(c)</sup>

Месен пептон	6,0 г
Екстракт от дрожди	3,0 г
Месен екстракт	1,5 г
Агар	10,0 г
Вода	1 000 мл
pH 6,5 (след стерилизация)	

4.2.2. *Посадъчен слой*

Както при точка 4.1, с добавяне на 2,0 г силиконова противоразпенваща емулсия <sup>(d)</sup>.

4.3. Разтвор от натриев хлорид 0,4 % (т/об): разтваря се 4 г натриев хлорид А.Р. във вода и се разрежда до 1 000 мл; стерилизира се.

4.4. Чист метанол

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

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

4.7. Трис (хидрометил) аминотетан А.Р.

4.8. Метанолов разтвор от калиев хлорид 1,5 % (т/об): разтваря се 1,5 г от калиевия хлорид А.Р. в 20 мл вода, допълва се обемът до 100 мл с метанол (4.4).

4.9. Катионен обменник: Dowex 50 W x 8, 20 to 50 mesh Na form (cat. Serva № 41600) или еквивалентен.

4.10. Анионен обменник: Dowex 1 x 2, 50 to 100 mesh, Cl form (cat. Serva № 41010) или еквивалентен. Преди употреба да се държи от 12—14 часа в 80 % метанол (4.6).

<sup>(a)</sup> Други методи могат да се използват, ако е установено, че такива дават сходни бактериални суспензии.

<sup>(b)</sup> Всяка комерсиална култивационна среда или сходен състав, даващ същите резултати, могат да се използват, напр. оксидна антибиотична среда 1 (см 327) с добавяне на оксиден агар № 3 (L 13).

<sup>(c)</sup> Всяка комерсиална култивационна среда или сходен състав, даващ същите резултати, могат да се използват, напр. оксидна антибиотична среда 2 (см 335) с добавяне на оксиден агар № 3 (L 13).

<sup>(d)</sup> Например SE 2 от Wacker Chemie GmbH, Munich.

**▼B**

- 4.11. Стъклена вата
- 4.12. рН индикаторна хартия (рН от 6,6 до 8,1)
- 4.13. Аскорбинова киселина
- 4.14. Стандартна субстанция: флавофосфолипид с познато действие.

## 5. АПАРАТУРА

- 5.1. Стъклена тръбичка за хроматография, вътрешен диаметър 9 мм, дължина 150—200 мм, снабдена 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 мл, снабдена със запушалка и скачващо устройство от матово стъкло.
- 5.3. 250 мл конична колба със 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 посявка, съдържаща 100 µg флавофосфолипид на милилитър. Съхранява се в запушени колби при 4 °C. Този разтвор е стабилен до 2 месеца.

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

S <sub>8</sub>	0,2	µg/ml
S <sub>4</sub>	0,1	µg/ml
S <sub>2</sub>	0,05	µg/ml
S <sub>1</sub>	0,025	µg/ml

## 7. ПОДГОТОВКА НА ЕКСТРАКТА

7.1. **Екстракция**7.1.1. *Концентрирани фуражи, премикси и минерални храни за животни*

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

7.1.2. *Други храни за животни*

Измерва се количество от пробата от 5,0 до 30,0 г, съдържащо поне 30 µg флавофосфолипид. Хомогенизира се със 150 мл 50 % метанол (4.5) в конична колба и се постига рН от 8,1 до 8,2 с около 400 мг трис (хидроксиметил) аминетан (4.7). Проверява се рН с индикаторната хартия (4.12). Престоява 15 минути. След това отново се постига рН от 8,1 до 8,2 с трис (хидроксиметил) аминетан (4.7) и кипи 10 минути под рефлукс (5.4) с постоянно бъркане. Екстрактът се охлажда, центрофугира и декантира.

7.2. **Пречистване (тази стъпка може да се пропусне за концентрирани фуражи, премикси и минерални храни за животни)**

Смесва се 110 мл от екстракта с 11 г 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 мл от екстракта с 150 мл метанол (4.4) и разтворът се държи 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 мл от анионния

**▼B**

обменник (4.10) и стълбът се измива със 100 мл 80 % метанол (4.6). Използвайки фуния (5.2), към стълба се прехвърля обем от филтрат от поне 100 мл, за който се очаква да съдържа 16 µg флавофосфолипид (200 мл за 30 г проба от хранителното вещество при 1 ppm). Ако е необходимо преди прилагането в стълба филтратът се разрежда с 80 % метанол (4.6), за да се получи очакваното съдържание на флавофосфолипид от 16 µg/100 мл. Напасава се потокът до около 2 мл/минута. Изхвърля се ефлуентът. След това стълбът се измива с 50 мл 80 % метанол (4.6) и ефлуентът се отстранява.

Елуира се флавофосфолипола с метанолов разтвор от калиев хлорид (4.8), като се поддържа поток от около 2 мл/минута. Събира се 50 мл от елуата в градуирана колба, добавя се 30 мл вода и се бърка. Този разтвор трябва да има флавофосфолипидно съдържание от 0,2 µg/мл = (U<sub>8</sub>).

### 7.3. Разтвори за дозиране

Ако е необходимо (където се пропуска пречистване), полученият в точка 7.1.1. екстракт се разрежда с 50 % метанол, за да се получи очаквано съдържание на флавофосфолипид от 0,2 µg/мл.

От разтвор U<sub>8</sub> се приготвят разтвори U<sub>4</sub> (очаквано съдържание: 0,1 µg/мл), U<sub>2</sub> (очаквано съдържание: 0,05 µg/мл) и U<sub>1</sub> (очаквано съдържание: 0,025 µg/мл) 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 плочки 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 флавофосфолипид (около 30 мл на литър).

### 8.2. Приготвяне на плочките

Извършва се дифузия през среда за дозиране върху плочки с четири концентрации на стандартните разтвори (S<sub>8</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>) и четирите концентрации на екстракта (U<sub>8</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>2</sub>, U<sub>1</sub>). Тези четири концентрации на екстракта и стандарта трябва да бъдат поставени на всяка плочка. За целта се избират достатъчно големи плочки, за да има поне 8 дупки с диаметър 10—13 мм и не по-малко от 30 мм между центровете, които трябва да бъдат направени в среда за дозиране. Тестовите трябва да се извършват върху плочките, състоящи се от стъклени листове с облицовка от алуминий или с пластмасов пръстен отгоре, 200 мм в диаметър и 20 мм височина.

Изсипва се върху плочките количество от средата (4.2.1.), за да се получи слой от 1,5 мм дебелина (45 мл за плочка от 200 мм диаметър). Установява се в хоризонтално положение и се покрива отгоре с количество (4.2.2.), инокулирано както в точка 8.1., за да се получи слой с дебелина 1 мм (30 мл за плочка с 200 мм 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 мл 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

Плочките се инкубират 16—18 часа при 28—30 °C.

## 9. ОЦЕНКА

Измерва се диаметърът на зоните на инхибиране до най-близката стойност 0,1 мм. 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 съот-

## ▼B

ветстващите 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:

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

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

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  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$  и  $S_8$  в посочените по-горе формули с  $U_1$ ,  $U_2$ ,  $U_4$  и  $U_8$ .

Отбелязват се изчислените стойности на SL и на SH върху същата разграфена хартия и се свързват така, че „да дадат най-добре съответстващата линия“ за стандартен разтвор. По същия начин се нанасят UL и UH и се свързват така, 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  $(UL - UH)$  не се различават с повече от 10 % от средната им стойност.

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 изчисляват, като се използват алтернативните формули, с цел да се получат най-добре съответстващите линии:

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

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

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

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

За три нива

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

или

$$д) \log. A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0 \cdot 401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Действителната активност = предполагаемата активност  $\times$  относителната активност.

**▼B**

Когато линиите се разглеждат, че не са успоредни, определянето се повтаря. Ако все още не е постигната успоредността, се изчислява логаритъмът 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 мг/кг в абсолютна стойност за съдържанията на флавофосфолипид от 1 до 2 мг/кг;

25 %, съотнесени към най-високата стойност за съдържания, по-големи от 2 и до 10 мг/кг;

20 %, съотнесени към най-високата стойност за съдържания, по-големи от 10 и до 25 мг/кг;

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

10 %, съотнесени към най-високата стойност за съдържания над 50 мг/кг.

**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:

желязо (Fe): 20 mg/kg

мед (Cu): 10 mg/kg

манган (Mn): 20 mg/kg

цинк (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, в която не присъстват катионите за определяне. Тя се получава чрез двойно дестилиране в боросиликатно стъкло или кварц с двойно третиране чрез йонообменна смола.

Реагентите трябва да бъдат поне с аналитично качество (A.P.) 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 разтвори, ако те са гарантирани и проверени преди употреба.

3.1. Солна киселина A.P. (p:1,19)

3.2. Солна киселина A.P. (6 N)

3.3. Солна киселина A.P. (0,5 N)

**▼B**

- 3.4. Солна киселина 38 до 40 % (об/об) със съдържание на желязо по-малко от 1 мг на литър и утайка след изпаряване по-малко от 10 мг (както сулфат) на литър.
- 3.5. Сярна киселина А.Р. (р 1,84).
- 3.6. Водороден прекис А.Р. (приблизително 100 обема кислород (30 % на тегло)).
- 3.7. Стандартен железен разтвор (1 000 µg Fe/ml), приготвен, както следва: разтваря се 1 г желязна тел А.Р. в 200 мл от 6 N солна киселина (3.2), добавят се 16 мл водороден прекис (3.6) и се допълва до един литър с вода.
- 3.7.1. Работен стандартен железен разтвор (100 µg Fe/ml), приготвен чрез разреждане на стандартния разтвор (3.7) с вода 1 + 9.
- 3.8. Стандартен меден разтвор (1 000 µg Cu/ml), приготвен, както следва: разтваря се 1 г мед на прах (А.Р.) в 25 мл от 6 N солна киселина (3.2), добавя се водороден прекис и се допълва до един литър с вода.
- 3.8.1. Работен стандартен меден разтвор (10 µg Cu/ml), приготвен чрез разреждане на стандартния разтвор (3.8) с вода и след това разреждане на получения разтвор с вода 1 + 9.
- 3.9. Стандартен манганов разтвор (1 000 µg Mn/ml), приготвен, както следва: разтваря се 1 г манган на прах (А.Р.) в 25 мл от 6 N солна киселина (3.2) и се допълва до един литър с вода.
- 3.9.1. Работен стандартен манганов разтвор (10 µg Mn/ml), приготвен чрез разреждане на стандартния разтвор (3.9) с вода 1 + 9 и след това разреждане на получения разтвор с вода 1 + 9.
- 3.10. Стандартен цинков разтвор (1 000 µg Zn/ml), приготвен, както следва: разтваря се 1 г цинк на парчета или листове (А.Р.) в 25 мл 6 N солна киселина (3.2) и се допълва до 1 литър с вода.
- 3.10.1. Работен стандартен цинков разтвор (10 µg Zn/ml), приготвен чрез разреждане на стандартния разтвор (3.10) с вода 1 + 9 и след това разреждане на получения разтвор с вода 1 + 9.
- 3.11. Разтвор на лантаниев хлорид, приготвен, както следва: разтварят се 12 г лантаниев окис в 150 мл вода, добавят се 100 мл 6 N солна киселина (3.2) и се допълва 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**

## ▼B

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

- i) Постава се от 5 до 10 г проба, премерена с приблизителна точност до 0,2 мг, в платинен или кварцов тигел (4.3) (виж забележка б), изсушава се в пещ при 105 °C и тигелът се поставя в студена муфелна пещ (4.1). Пещта се затваря (виж забележка в) и температурата постепенно се повишава до 450—475 °C за около 90 минути. Тази температура се поддържа 4—16 часа (например през нощта) за отделяне на саждите, след това пещта се отваря, за да се охлади (виж забележка г).

Тигелът се измива с около 5 мл 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<sub>2</sub>). 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.

След това се добавя 15 мл 6 N солна киселина (3.2) към утайката, след това 120 мл вода, разбърква 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 филтратът се събира в 250 мл мерителна колба. Мензурната чаша и филтърът се измиват с 5 мл гореща 6 N солна киселина (3.2) и два пъти с вряща вода. Напълва се мерителната колба до мярката с вода (концентрацията на солната киселина около 0,5 N).

- ii) Ако седиментът във филтъра изглежда черен (въглерод), той 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 мл солна киселина (3.1), изпарява се до изсъхване и се добавят 5 мл 6 N солна киселина (3.2). Нагрива се, филтрира се разтворът в мерителната колба и се достига маркировката чрез прибавяне на вода (концентрация на солната киселина около 0,5 N).

*Забележки:*

- a) При определянето на остатъчните елементи е важно 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 трябва 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, например 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

(\*) Зеленият фураж (пресен или изсушен) често съдържа големи количества растителни силикати, които могат да задържат следи от елементи и трябва да се отстраняват. Следователно за проби от тези храни за животни 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 10—15 мл хидрофлуорна киселина (3.4) и да се изпарява до изсъхване при около 150 °C. Ако остават някакви силициеви 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 пушци. След добавянето на 5 мл 6 N солна киселина (3.2) и около 30 мл вода да се нагрее, разтворът да се филтрира в 250 мл мерителна колба и да се достигне до маркировката чрез добавяне на вода (концентрация на HCl около 0,5 N). Продължава се с определянето от точка 5.1.3.

**▼В**

необходимо да се започне с проба от 10—20 г и да се ограничи крайният разтвор само до 100 мл.

- в) Опееляването трябва да се извършва в затворени пещи без подаване на въздух или кислород.
- г) Температурата, която показва пирометърът, не трябва да превишава 475 °С.

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 0,5 N 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**

$\mu\text{g Fe/ml}$	0	0,5	1	2	3	4	5
работен стандартен разтвор в мл (3.7.1)							
(1 мл = 100 $\mu\text{g Fe}$ )	0	0,5	1	2	3	4	5
+ млб N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 мл разтвор на лантаниев хлорид (3.11) и допълване до 100 мл с вода.

**Мед**

$\mu\text{g Cu/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	08	1,0
работен стандартен разтвор в мл (3.8.1)							
(1 мл = 10 $\mu\text{g Cu}$ )	0	1	2	4	6	8	10
+ мл 6 N HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Допълва се до 100 мл с вода.

**Манган**

$\mu\text{g Mn/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
работен стандартен разтвор в мл (3.9.1)							
(1 мл = 10 $\mu\text{g Mn}$ )	0	1	2	4	6	8	10
+ мл 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 мл разтвор на лантаниев хлорид (3.11) и допълване до 100 мл с вода.





### Цинк

$\mu\text{g Zn/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
работен стандартен разтвор в мл (3.10.1) (1 мл = 10 $\mu\text{g Zn}$ )	0	0,5	1	2	4	6	8
+ мл 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 мл разтвор на лантаниев хлорид (3.11) и допълване до 100 мл с 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, може да се прибави аликвотна част с пипета в 100 мл измервателна колба и да се достигне до маркировката с 0,5 N 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 мл измервателна колба, добавя се 10 мл разтвор от лантаниев хлорид (3.11) и се достига до маркировката с 0,5 N 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, с изключение на това, че се изпуска пробният 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 въздушноацетиленов пламък при следните дължини на вълната:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

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 втори параграф. 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 мг/кг в абсолютна стойност за съдържания на въпросните редки елементи до 50 мг/кг;

— 10 % от по-високия резултат за съдържание на въпросния рядък елемент от 50 и до 100 мг/кг;

**▼B**

- 10 мг/кг в абсолютна стойност за съдържания на въпросните редки елементи от 100 и до 200 мг/кг;
- 5 % от по-високия резултат за съдържание на въпросния рядък елемент над 200 мг/кг.

## 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 съотношение в пробата е  $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}} \geq 2$ , добавянето на разтвор от лантаниев хлорид (3.11) към разтвора за анализ и към калибрационните разтвори може да се пропусне.