

Acest document reprezintă un instrument de documentare, iar instituțiile nu își asumă responsabilitatea pentru conținutul său.

► **B**

A OPTA DIRECTIVĂ A COMISIEI

din 15 iunie 1978

de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

(78/633/CEE)

(JO L 206, 29.7.1978, p. 43)

Astfel cum a fost modificată prin:

		Jurnalul Oficial		
		NR.	Pagina	Data
► <u>M1</u>	Directiva Comisiei din 30 iulie 1981	L 246	32	29.8.1981
► <u>M2</u>	Directiva Comisiei din 20 decembrie 1983	L 15	28	18.1.1984

▼B**A OPTA DIRECTIVĂ A COMISIEI****din 15 iunie 1978****de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor**

(78/633/CEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽¹⁾, modificată ultima dată de Actul de aderare, în special articolul 2,

întrucât directiva menționată impune realizarea controlului oficial al furajelor cu ajutorul modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză în scopul verificării respectării cerințelor din cadrul dispozițiilor stabilite prin acte cu putere de lege sau acte administrative privind calitatea și compoziția furajelor;

întrucât Directivele 71/250/CEE din 15 iunie 1971 ⁽²⁾, 71/393/CEE din 18 noiembrie 1971 ⁽³⁾, 72/199/CEE din 27 aprilie 1972 ⁽⁴⁾, 73/46/CEE din 5 decembrie 1972 ⁽⁵⁾, 74/203/CEE din 25 martie 1974 ⁽⁶⁾, 75/84/CEE din 20 decembrie 1974 ⁽⁷⁾ și 76/372/CEE din 1 martie 1976 ⁽⁸⁾ ale Comisiei au stabilit deja un număr de metode comunitare de analiză; întrucât progresul înregistrat până în prezent arată că este necesară adoptarea unui al optulea set de metode;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

(1) Statele membre solicită realizarea analizelor pentru controalele oficiale ale furajelor cu privire la conținutul lor de bacitracin de zinc, flavofosfolipol, fier, cupru, magneziu și zinc în conformitate cu metodele descrise în anexa la prezenta directivă.

▼MI**▼B***Articolul 2*

Statele membre pun în aplicare la 1 ianuarie 1979 actele cu putere de lege sau actele administrative necesare aducerii la îndeplinire a prezentei directive. Statele membre notifică de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Articolul 3

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

⁽¹⁾ JO L 170, 3.8.1970, p. 2.⁽²⁾ JO L 155, 12.7.1971, p. 13.⁽³⁾ JO L 279, 20.12.1971, p. 7.⁽⁴⁾ JO L 123, 29.5.1972, p. 6.⁽⁵⁾ JO L 83, 30.3.1973, p. 21.⁽⁶⁾ JO L 108, 22.4.1974, p. 7.⁽⁷⁾ JO L 32, 5.2.1975, p. 26.⁽⁸⁾ JO L 102, 15.4.1976, p. 8.

▼ B

ANEXĂ

▼ M2

1. DOZAREA BACITRACINEI ZINC

— prin difuzare pe geloză —

1. OBIECT ȘI DOMENIU DE ACTIVITATE

Metoda permite dozarea bacitracinei zinc în alimente și amestecuri primare. Limita inferioară a dozării este de 5 mg/kg (5 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINCIPIU

Proba se extrage cu pH 2 printr-un amestec de metanol, apă și acid clorhidric și o soluție de sulfură de sodiu. Sulfura de sodiu permite precipitarea sărurilor de cupru solubile care pot interfera în determinare. Extrasul adus la pH 6,5 se concentrează (dacă este necesar) și se diluează. Activitatea sa antibiotică se determină prin măsurarea difuzării bacitracinei zinc într-un mediu gelozat, însămânțat cu *Micrococcus luteus (flavus)*. Difuzarea se observă prin formarea zonelor de inhibiție ale microorganismului. Diametrul acestor zone se consideră direct proporțional cu logaritmul concentrației de antibiotic pentru gama de concentrații utilizate.

3. MICROORGANISMUL: MICROCOCCUS LUTEUS (FLAVUS) ATCC 10240

3.1. Întreținerea sușei

Se însămânțează mediul de cultură (4.1), în tuburi înclinate, cu *Micrococcus luteus (flavus)*. Se incubează timp de 24 de ore la 30 °C, se păstrează la frigider la aproximativ 4 °C și se însămânțează din nou o dată la două săptămâni.

3.2. Pregătirea suspensiei bacteriene ^(a)

Se recoltează germeii dintr-un tub de geloză (3.1) preparată recent, cu ajutorul a 2-3 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3). Se însămânțează cu această suspensie 250 ml din mediul de cultură (4.1) într-o fiolă Roux și se incubează timp de 18-20 de ore la 30 °C. Se recoltează germeii în 25 ml de soluție de clorură de sodiu (4.3) și se omogenizează. Se diluează suspensia la 1/10 cu ajutorul soluției de clorură de sodiu (4.3). Transmisia luminoasă a suspensiei, măsurată la 650 nm la o grosime de 1 cm trebuie să fie, prin comparație cu soluția de clorură de sodiu, de aproximativ 75 %. Suspensia poate fi păstrată timp de o săptămână la aproximativ 4 °C.

4. MEDII DE CULTURĂ ȘI REACTIVI

4.1. Mediul de întreținere a sușei ^(b)

Peptonă de carne	6,0 g
Tripton	4,0 g
Extras de drojdie	3,0 g
Extras de carne	1,5 g
Glucoză	1,0 g
Geloză	10,0-20,0 g
Apă	1 000 ml
pH 6,5-6,6 (după sterilizare)	

4.2. Mediul de bază al dozării ^(b)

Tripton	10,0 g
Extras de drojdie	3,0 g
Extras de carne	1,5 g
Glucoză	1,0 g

⁽¹⁾ 1 mg de bacitracină zinc (calitate pentru alimentele animalelor) este echivalent cu 42 unități internaționale (UI).

^(a) Se pot utiliza și alte metode în măsura în care se dovedește că acestea produc suspensii bacteriene analoge.

^(b) Se poate utiliza orice mediu de cultură comercial cu o compoziție analogă și care dă aceleași rezultate.

▼ **M2**

Geloză	10,0-20,0 g
Tween 80	1 ml
Apă	1 000 ml
pH 6,5 (după sterilizare)	

- 4.3. Soluție de 0,8 % (p/v) clorură de sodiu: se dizolvă în apă 8 g de clorură de sodiu, se diluează până la 1 000 ml și se sterilizează.
- 4.4. Amestec de metanol/apă/acid clorhidric (4.6):
80/17,5/2,5 (v/v/v).
- 4.5. **Tampon fosfat, pH 6,5:**
- | | |
|--------------------------------|-----------|
| Fosfat bipotasic, K_2HPO_4 | 22,15 g |
| Fosfat monopotasic, KH_2PO_4 | 27,85 g |
| Apă până la | 1 000 ml. |
- 4.6. Acid clorhidric (d: 1,18-1,19).
- 4.7. Acid clorhidric (0,1 M).
- 4.8. Soluție 1 M de hidroxid de sodiu.
- 4.9. Soluție de aproximativ 0,5 M de sulfură de sodiu.
- 4.10. Soluție de 0,04 % (p/v) de roșu de bromocresol: se dizolvă 0,1 g de roșu de bromocresol în 18,5 ml de soluție 0,01 M de hidroxid de sodiu. Se completează până la 250 ml cu apă și se omogenizează.
- 4.11. Substanța etalon: bacitracina zinc cu activitate cunoscută (în UI).

5. SOLUȚII ETALON

Se cântărește o cantitate de substanță etalon (4.11) echivalentă cu 1 050 UI (în conformitate cu titlul indicat). Se adaugă 5 ml de acid clorhidric 0,1 M (4.7) și se lasă în repaus 15 minute. Se adaugă 30 ml apă, se ajustează pH-ul la 4,5 cu ajutorul tamponului fosfat (4.5) (aproximativ 4 ml), se completează până la 50 ml cu apă și se omogenizează (1ml = 21 UI).

Pornind de la această soluție, se prepară soluțiile următoare, prin diluții succesive cu ajutorul unui tampon fosfat (4.5):

s_8	0,42	UI/ml
s_4	0,21	UI/ml
s_2	0,105	UI/ml
s_1	0,0525	UI/ml

6. PREPARAREA EXTRASULUI

6.1. **Extragerea**6.1.1. *Amestecuri primare și alimente minerale*

Se cântărește o cantitate de eșantion de 2,0 până la 5,0 g, se adaugă 29,0 ml de amestec (4.4) și 1,0 ml de soluție de sulfură de sodiu (4.9); se agită scurt. Se verifică pH-ul care trebuie să fie de aproximativ 2. Se agită timp de zece minute, se adaugă 30 ml de tampon fosfat (4.5), se agită timp de 15 minute și se centrifughează. Se scoate o parte alicotă din soluția supranatantă și se aduce pH-ul la 6,5 cu ajutorul soluției 1 M de hidroxid de sodiu (4.8) folosind un pH-metru sau soluția de roșu de bromocresol (4.10) ca indicator. Se diluează cu ajutorul unui tampon fosfat (4.5) pentru a se obține o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 0,42 UI/ml (= u_8).

6.1.2. *Concentrate proteinice*

Se cântărește o probă de 10,0 g, se adaugă 49,0 ml de amestec (4.4) și 1,0 ml de soluție de sulfură de sodiu (4.9); se agită scurt. Se verifică pH-ul care trebuie să fie de aproximativ 2. Se agită timp de zece minute, se adaugă 50 ml de tampon fosfat (4.5), se agită timp de 15 minute și se centrifughează. Se scoate o parte alicotă din soluția supranatantă și se aduce pH-ul la 6,5 cu ajutorul soluției 1 M de hidroxid de sodiu (4.8) folosind un pH-metru sau soluția de roșu de bromocresol (4.10) ca indicator. Se evaporează aproximativ jumătate din volum într-un evaporator rotativ la o temperatură care nu depășește 35 °C.

▼ **M2**

Se diluează cu ajutorul tamponului fosfat (4.5) pentru a se obține o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 0,42 UI/ml (= u_8).

6.1.3. *Alte alimente*

Se cântărește o probă de 10,0 g (20,0 g pentru o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 5 mg/kg). Se adaugă 24,0 ml de amestec (4.4) și 1,0 ml de soluție de sulfură de sodiu (4.9); se omogenizează timp de zece minute. Se adaugă 25 ml de tampon fosfat (4.5), se agită timp de 15 minute și se centrifughează. Se scot 20 ml din soluția supranatantă și se aduce pH-ul la 6,5 cu ajutorul soluției 1 M de hidroxid de sodiu (4.8) folosind un pH-metru sau soluția de roșu de bromcresol (4.10) ca indicator. Se evaporază până la aproximativ 4 ml într-un evaporator rotativ la o temperatură care nu depășește 35 °C. Se diluează reziduu cu ajutorul tamponului fosfat (4.5) pentru a se obține o concentrație preconizată de bacitracină zinc de 0,42 UI/ml (= u_8).

6.2. **Soluțiile de extras**

Se prepară, pornind de la soluția u_8 prin diluții succesive (1 + 1) cu ajutorul unui tampon fosfat (4.5), soluțiile u_4 (concentrația preconizată: 0,21 UI/ml), u_2 (concentrația preconizată: 0,105 UI/ml) și u_1 (concentrația preconizată: 0, 0525 UI/ml).

7. METODE DE DOZARE

7.1. **Inocularea în mediul de cultură**

Se însămânțează la aproximativ 50 °C mediul de bază de dozare (4.2) cu suspensia bacteriană (3.2). Prin încercări preliminare pe lamele cu mediul de cultură (4.2) se determină cantitatea de suspensie bacteriană care permite obținerea diferitelor concentrații de bacitracină zinc în zone de inhibiție cât mai întinse și deocamdată curate.

7.2. **Pregătirea cutiilor**

Difuzarea pe geloză se efectuează în cutii conținând cele patru concentrații de soluție etalon (s_8, s_4, s_2, s_1) și cu cele patru concentrații ale extrasului (u_8, u_4, u_2, u_1). Fiecare cutie trebuie să conțină cele patru concentrații ale etalonului, respectiv ale extrasului. În acest scop, se alege dimensiunea cutiilor astfel încât să se poată realiza în mediul de geloză cel puțin opt cavități de 10-13 mm diametru, al căror centru se află la o distanță de cel puțin 30 mm. Se pot utiliza drept cutii plăci de sticlă plane, având deasupra un inel de aluminiu sau de plastic și dimensiunile de 200 mm diametru, respectiv 20 mm înălțime.

Se introduce în cutii o cantitate de mediu (4.2) însămânțată conform indicațiilor de la 7.1, care permite obținerea unui strat de aproximativ 2 mm grosime (60 ml pentru o cutie de 200 mm diametru). Se lasă să se solidifice, se operează cavitățile și se pun în ele volumele, măsurate cu exactitate, ale soluțiilor de etalon și de extras (0,10 la 0,15 ml pe cavitare, în funcție de diametru). Se fac cel puțin patru repetări cu fiecare concentrație, astfel încât fiecare determinare să facă obiectul unei evaluări pentru 32 de zone de inhibiție.

7.3. **Incubația**

Timp de 16-18 ore, cutiile pot fi incubate la 30 °C ± 2 °C.

8. Evaluare

Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție cu o toleranță de 0,1 mm. Pentru fiecare concentrație, se înregistrează măsurile medii pe hârtie semilogaritmă făcând logaritmul concentrațiilor în comparație cu diametrele zonelor de inhibiție. Se trasează dreptele cele mai potrivite pentru soluția etalon și pentru extras procedând în felul următor:

Se determină punctul optim pentru cel mai scăzut nivel al soluției etalon (SL) cu ajutorul formulei:

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

Se determină punctul optim pentru cel mai înalt nivel al soluției etalon (SH) cu ajutorul formulei:

▼ M2

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

În același mod se determină punctele cele mai adecvate de extras pentru nivelul cel mai scăzut (UL) și nivelul cel mai înalt (UH), înlocuind s_1 , s_2 , s_4 și s_8 din formulele precedente cu u_1 , u_2 , u_4 și u_8 .

Se înscriu valorile SL și SH în același grafic. Unind cele două puncte se obține dreapta cea mai potrivită pentru soluția etalon. Procedând în același fel pentru UL și UH se obține dreapta cea mai potrivită pentru extras.

În cazul în care nu există nici o interferență, dreptele ar trebui să fie paralele. În practică, sunt considerate paralele atunci când (SH - SL) și (UH - UL) nu diferă cu mai mult de 10 % față de media lor.

În cazul în care dreptele nu sunt paralele, se pot elimina fie u_1 și s_1 , fie u_8 și s_8 . Valorile SL, SH, UL și UH care permit obținerea dreptelor celor mai potrivite se calculează în acest caz cu ajutorul formulelor următoare:

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

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

și a formulelor analoge pentru UL și UH. Utilizarea acestei alternative impune respectarea aceluiași criterii de paralelism. Obținerea unui rezultat provenind de la trei niveluri se menționează pe buletinul de analiză.

Când dreptele sunt considerate paralele, se calculează logaritmul activității relative (log. A) cu ajutorul uneia din formulele care urmează, în funcție de numărul de niveluri (4 sau 3) folosite pentru evaluarea paralelismului.

Pentru 4 niveluri:

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

Pentru 3 niveluri:

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

sau

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

Activitatea extrasului de eșantion = activitatea etalonului corespunzător $\times A$:

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

În cazul în care activitatea relativă se află în afara gamei de valori cuprinse între 0,5 și 2,0, se repetă determinarea făcându-se ajustări adecvate ale concentrațiilor de extras sau, eventual, ale soluțiilor etalon. Când această activitate nu mai poate fi adusă în gama valorilor cerute, rezultatul trebuie considerat aproximativ și această indicație trebuie să fie notată în buletinul de analiză.

Când dreptele sunt considerate neparalele, se repetă determinarea. Dacă tot nu se ajunge la paralelism, determinarea se consideră nesatisfăcătoare.

▼M2

Se exprimă rezultatul în miligrame de bacitracină zinc pe kilogram de aliment.

9. REPETABILITATE

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe aceeași probă de același analist nu trebuie să depășească:

- 2 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de bacitracină zinc sub 10 mg/kg;
- 20 % din rezultatul cel mai mare pentru un conținut între 10 și 25 mg/kg;
- 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut între 25 și 50 mg/kg;
- 10 % din rezultatul cel mai mare pentru un conținut de peste 50 mg/kg.

▼B**2. DETERMINAREA FLAVOFOSFOLIPOLULUI PRIN DIFUZAREA ÎNTR-UN MEDIU AGAR**

1. OBIECTIV ȘI DOMENIU DE APLICARE

Metoda se folosește pentru determinarea flavofosfolipolului din furaje, concentrate și preamestecuri. Limita inferioară de determinare este 1 mg/kg (1 ppm).

2. PRINCIPIU

Eșantionul este extras cu metanol diluat prin încălzire sub reflux. După centrifugare, extractul este purificat (dacă este necesar) prin tratare cu rășini cu transfer de ioni și diluată. Activitatea sa antibiotică se determină prin măsurarea difuzării de flavofosfolipol într-un mediu agar inoculat cu *Staphylococcus aureus*. Difuzarea este indicată de formarea de zone de inhibare a microorganismului. Diametrul acestor zone este considerat ca fiind direct proporțional cu logaritmul concentrației de antibiotice raportat la intervalul de concentrații de antibiotice folosite.

3. MICROORGANISM: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

3.1. Menținerea culturii-mamă

Se inoculează *Staphylococcus Aureus* în lichidul agar din mediul de cultură (4.1). Se incubează timp de 24 de ore la 37 °C, se păstrează într-un frigider la aproximativ 4 °C și se reinoculează în fiecare lună în lichid agar.

3.2. Prepararea suspensiei bacteriene ^(a)

Se păstrează două eprubete ce conțin cultură-mamă (3.1) și se reinoculează săptămânal. Se incubează timp de 24 ore la 37 °C și se păstrează într-un frigider la aproximativ 4 °C.

Cu 24 de ore înainte de analiză, se inoculează cu această cultură două până la patru eprubete ce conțin mediu de cultură (4.1). Se incubează timp de 16-18 ore la 37 °C. Se realizează o suspensie a culturii în soluție de clorură de sodiu (4.3). Transmisia ușoară a suspensiei trebuie să fie de aproximativ 40 %, măsurată la 578 nm într-o celulă de 1 cm în comparație cu soluția de clorură de sodiu (4.3).

4. MEDII DE CULTURĂ ȘI REACTIVI

4.1. Mediul de cultură ^(b)

Peptonă din carne	6,0 g
Triptonă	4,0 g

^(a) Se pot folosi și alte metode dacă s-a stabilit că determină suspensii bacteriene similare.

^(b) Se poate folosi orice mediu de cultură din comerț care are o compoziție asemănătoare și dă aceleași rezultate, de exemplu mediu antibiotic oxoid 1 (CM 327) cu adaos de agar oxoid nr. 3 (L 13).

▼ B

Extract de drojdie	3,0 g
Extract de carne	1,5 g
Glucoză	1,0 g
Agar	15,0 g
Apă	1 000 ml
pH 6,5 (după sterilizare)	

4.2. Mediul de analiză**4.2.1. Stratul de bază^(a)**

Peptonă din carne	6,0 g
Extract de drojdie	3,0 g
Extract de carne	1,5 g
Agar	10,0 g
Apă	1 000 ml
pH 6,5 (după sterilizare)	

4.2.2. Stratul de sămânță

Ca la punctul 4.1, cu adaos de 2,0 g emulsie antispongioasă de silicon^(b).

4.3. Soluție de clorură de sodiu 0,4 % (p/v): se dizolvă 4 g de clorură de sodiu p.a. în apă și se diluează până la 1 000 ml; se sterilizează.

4.4. Metanol, pur.

4.5. Metanol 50 % (v/v): se diluează 500 ml de metanol (4.4) cu 500 ml de apă.

4.6. Metanol 80 % (v/v): se diluează 800 ml de metanol (4.4) cu 200 ml de apă.

4.7. Tri (hidroximetil) aminometan p.a.

4.8. Soluție metanolică de clorură de potasiu 1,5 % (p/v): se dizolvă 1,5 g de clorură de potasiu p.a. în 20 ml de apă, se completează până la 100 ml cu metanol (4.4).

4.9. Agentul de transfer de cationi: Dowex 50 × W 8, 20 până la 50 ochiuri, formă de Na (cat. Serva Nr. 41600) sau echivalentul.

4.10. Agentul de transfer de anioni: Dowex 1 × 2, 50 până la 100 ochiuri, formă de Cl (cat. Serva Nr. 41010) sau echivalentul. Înainte de utilizare, se păstrează timp de 12-14 ore în metanol 80 % (4.6).

4.11. Vată de sticlă.

4.12. Hârtie indicator de pH (pH de la 6,6 la 8,1).

4.13. Acid ascorbic.

4.14. Substanță standard: flavofosfolipol cu activitate cunoscută.

5. APARATURĂ

5.1. Tub de sticlă pentru cromatografie, cu diametrul intern: 9 mm, lungimea: 150-200 mm, prevăzut cu un robinet de închidere la partea îngustă a capătului inferior și o îmbinare de sticlă șlefuită [pentru a se conecta cu pâlnia de picurare (5.2.)] la capătul superior.

5.2. Pâlnie de picurare de 250 ml, prevăzută cu un robinet de închidere și cu o îmbinare de sticlă șlefuită.

5.3. Balon conic de 250 ml cu îmbinare de sticlă șlefuită.

5.4. Condensator de reflux cu îmbinare de sticlă șlefuită.

6. SOLUȚII STANDARD

Se dizolvă o cantitate de substanță standard cântărită cu precizie (4.14) în metanol 50 % (4.5) și se diluează pentru a obține o soluție-mamă

^(a) Se poate folosi orice mediu de cultură din comerț care are o compoziție asemănătoare și produce aceleași rezultate, de exemplu mediu antibiotic oxid 2 (CM 335) cu adaos de agar oxid nr. 3 (L 13).

^(b) e.g. SE 2 din Chimia Wacker GmbH, München.

▼B

conținând 100 µg flavofosfolipol pe mililitru. Păstrată în baloane închise la 4 °C, această soluție este stabilă până la două luni.

Din această soluție-mamă se prepară, prin diluare succesivă cu metanol 50 % (4.5), următoarele soluții:

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

7. PREPARAREA EXTRACTULUI

7.1. **Extracția**

7.1.1. *Concentrate, preamestecuri și alimente*

Se cântărește o cantitate de eșantion de 2,0-5,0 g și se adaugă aproximativ 150 mg de acid ascorbic (4.13). Se omogenizează cu 150 ml de metanol 50 % (4.5) într-un balon conic (5.3) și se ajustează pH-ul la 8,1-8,2 cu aproximativ 400 mg de tri (hidroximetil) aminometan (4.7). Se verifică pH-ul cu hârtia indicator (4.12). Se lasă să se stabilizeze timp de 15 minute, apoi se reajustează pH-ul la 8,1-8,2 cu tri (hidroximetil) aminometan (4.7) și se fierbe timp de 10 minute sub reflux (5.4), amestecând constant. Se lasă să se răcească, se centrifughează amestecul și se decantează extractul.

7.1.2. *Alte alimente*

Se cântărește o cantitate de eșantion de 5,0-30,0 g care conține cel puțin 30 µg flavofosfolipol. Se omogenizează cu 150 ml de metanol 50 % (4.5) într-un balon conic (5.3) și se ajustează pH-ul la 8,1-8,2 cu aproximativ 400 mg de tri (hidroximetil) aminometan (4.7). Se verifică pH-ul cu hârtie indicator (4.12). Se lasă să se stabilizeze timp de 15 minute, apoi se reajustează pH-ul la 8,1-8,2 cu tri (hidroximetil) aminometan (4.7) și se fierbe timp de 10 minute sub reflux (5.4), amestecând constant. Se lasă să se răcească, se centrifughează amestecul și se decantează extractul.

7.2. **Purificarea (această etapă poate fi omisă pentru concentrate, preamestecuri și alimente minerale)**

Se amestecă 110 ml de extract cu 11 g de agent de transfer de cationi (4.9), se fierbe timp de un minut sub reflux (5.4), amestecând constant. Se separă agentul de transfer de cationi prin centrifugare sau filtrare. Se amestecă 100 ml de extract cu 150 ml de metanol (4.4) și se păstrează soluția timp de 12-15 ore la 4 °C. Se filtrează masa floculentă, cât timp este rece.

Se introduce un tampon de vată de sticlă (4.11) la capătul inferior al tubului de sticlă (5.1), se toarnă în tub 5 ml de agent de transfer de anioni (4.10) și se spală coloana cu 100 ml de metanol 80 % (4.6). Folosind pâlnia (5.2), se transferă în coloană un volum de filtrat de cel puțin 100 ml care se estimează să conțină 16 µg de flavofosfolipol (200 ml pentru un eșantion de furaje de 30 g la 1 ppm). Dacă este necesar, înainte de transferul în coloană, se diluează filtratul cu metanol 80 % (4.6) pentru a obține un conținut estimat de flavofosfolipol de 16 µg/100ml. Se ajustează debitul la aproximativ 2 ml/minut. Se îndepărtează efluentul. Apoi se spală coloana cu 50 ml de metanol 80 % (4.6) și se îndepărtează efluentul.

Se diluează flavofosfolipolul cu soluție metanolică de clorură de potasiu (4.8), păstrând debitul la aproximativ 2 ml/minut. Se colectează 50 ml de eluat într-un balon gradat, se adaugă 30 ml de apă și se amestecă. Această soluție trebuie să aibă un conținut de flavofosfolipol de 0,2 µg/ml (= U₈).

7.3. **Soluții de analiză**

Dacă este necesar (adică atunci când etapa de purificare a fost omisă), se diluează extractul obținut la punctul 7.1.1 cu metanol 50 % (4.5) pentru a obține un conținut estimat de flavofosfolipol de 0,2 µg/ml (= U₈).

Din soluția U₈ se prepară soluțiile U₄ (conținut estimat: 0,1 µg/ml), U₂ (conținut estimat: 0,05 µg/ml) și U₁ (conținut estimat: 0,025 µg/ml) prin diluare succesivă (1 + 1) cu metanol 50 % (4.5).

▼B

8. PROCEDURA DE ANALIZĂ

8.1. **Inocularea mediului de analiză**

Se inoculează mediul de analiză (4.2.2) cu suspensia bacteriană (3.2) la aproximativ 50 °C. Prin încercări preliminare pe plăcile cu mediu de analiză (4.2.2) se determină cantitatea de suspensie bacteriană necesară pentru a forma cele mai mari și mai clare zone de inhibare cu diferite concentrații de flavofosfolipol (aproximativ 30 ml/litru).

8.2. **Prepararea plăcilor**

Difuzarea prin agar este realizată în plăci cu cele patru concentrații de soluții standard (S_8, S_4, S_2, S_1) și cele patru concentrații de soluții de analiză (U_8, U_4, U_2, U_1). Aceste patru concentrații de extract și standard trebuie să fie plasate, neapărat, în fiecare placă. În acest scop, se selectează plăci suficient de mari pentru a permite formarea a cel puțin opt orificii cu diametrul de 10-13 mm și cu o distanță de cel puțin 30 mm între centrele realizate în mediu agar. Testul poate fi realizat pe plăci formate dintr-o foaie de sticlă cu o folie de aluminiu sau cu un inel de plastic plasat deasupra, cu diametrul de 200 mm și înălțimea de 20 mm.

Se toarnă pe plăci o cantitate de mediu (4.2.1) pentru a forma un strat de aproximativ 1,5 mm grosime (45 ml pentru o placă cu diametrul de 200 mm). Se lasă să se stabilizeze și se pune peste strat o cantitate de mediu (4.2.2) inoculat ca la punctul 8.1 pentru a obține un strat de 1 mm grosime (30 ml pentru o placă cu diametru de 200 mm). Se lasă să se stabilizeze din nou, se realizează orificiile și se pun în ele volume de soluții standard și de analiză măsurate cu precizie (între 0,10 și 0,15 ml per orificiu, în funcție de diametru).

Se aplică fiecare concentrație de cel puțin patru ori astfel încât fiecare determinare să fie supusă unei evaluări a 32 de zone de inhibare.

8.3. **Incubare**

Se incubează plăcile timp de 16-18 ore la o temperatură de 28-30 °C.

9. EVALUARE

Se măsoară diametrul zonelor de inhibare cu aproximație de 0,1 mm. Se înregistrează valorile medii ale măsurătorilor pentru fiecare concentrație de hârtie milimetrică semilogaritmică indicând logaritmul concentrațiilor în raport cu diametrele zonelor de inhibare. Se trasează liniile „optime” ale soluției standard și ale extractului, ca în exemplul menționat în continuare.

Se determină punctul „optim” pentru cel mai scăzut nivel standard (SL) folosind formula:

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

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

În același mod se determină punctele „optime” pentru nivelul cel mai scăzut de extract (UL) și nivelul cel mai ridicat de extract (UH), înlocuind U_1, U_2, U_4 și U_8 cu S_1, S_2, S_4 și S_8 în formulele menționate anterior.

Valorile SL și SH se înregistrează pe aceeași hârtie milimetrică și se unesc pentru a obține linia „optimă” pentru soluția standard. În același mod se înregistrează UL și UH și se unesc pentru a obține linia „optimă” pentru extract.

În absența oricărei interfețe liniile trebuie să fie paralele. Pentru scopuri practice, liniile pot fi considerate paralele dacă valorile (SH-SL) și (UH-UL) nu diferă cu mai mult de 10 % din valoarea medie a acestora.

În cazul în care liniile nu sunt paralele, fie U_1 și S_1 , fie U_8 și S_8 se elimină și SL, SH, UL și UH calculate folosind formule alternative, pentru a obține linii alternative „optime”:

▼B

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

$$(b') \text{ SH} = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ sau } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

și în același mod pentru UL și UH. Liniile alternative „optime” se verifică pentru paralelism ca mai înainte. Se menționează în raportul final că rezultatul a fost calculat pe trei niveluri.

Atunci când liniile sunt considerate paralele, se calculează logaritmul activității relative (log. A) folosind una din următoarele formule.

Pentru patru nivele

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

Pentru trei nivele

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

sau

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

Activitatea efectivă = activitatea estimată × activitatea relativă

În cazul în care liniile nu sunt considerate a fi paralele, se repetă determinarea. Dacă paralelismul nu este încă obținut, se calculează logaritmul activității relative (log. A) folosind formula (c). Totuși, rezultatul obținut se consideră aproximativ și acest lucru se menționează în raportul final.

10. REPETABILITATE

Diferența dintre rezultatele celor două determinări realizate pe același eșantion de același analist nu trebuie să depășească:

0,5 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de flavofosfolipol de la 1 la 2 mg/kg;

25 % raportat la valoarea cea mai ridicată pentru un conținut de la 2 la 10 mg/kg;

20 % raportat la valoarea cea mai ridicată pentru un conținut de la 10 la 25 mg/kg;

5 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de la 25 la 50 mg/kg;

10 % raportat la valoarea cea mai ridicată pentru un conținut de peste 50 mg/kg.

3. DETERMINAREA ELEMENTELOR DE DETECTARE FIER, CUPRU, MANGAN ȘI ZINC

1. OBIECTIV ȘI DOMENIU DE APLICARE

Metoda permite determinarea elementelor de detectare fier, cupru, mangan și zinc din furaje. Limitele inferioare de determinare sunt:

fier (Fe): 20 mg/kg

cupru (Cu): 10 mg/kg

mangan (Mn): 20 mg/kg

▼B

zinc (Zn): 20 mg/kg

2. PRINCIPIU

Eșantionul este pus în soluție de acid clorhidric după distrugerea materiei organice, dacă aceasta este prezentă. Se determină elementele fier, cupru, mangan și zinc, după o diluare corespunzătoare, cu ajutorul spectrometriei de absorbție atomică.

3. REACTIVI

Comentarii introductive

Pentru prepararea reactivilor și a soluțiilor analitice se folosește apă fără cationii care urmează să fie determinați, obținută fie prin distilarea dublă a apei într-o sticlă borosilicată sau un distilator de cuarț, fie prin dublu tratament cu rășină schimbătoare de ioni.

Reactivii trebuie să fie cel puțin de grad analitic (p.a.). Detașarea de elementul care urmează să fie determinat trebuie verificată într-un experiment martor. Dacă este necesar, reactivii trebuie să fie în continuare purificați.

În locul soluțiilor standard descrise anterior pot fi folosite soluțiile standard din comerț, cu condiția ca ele să fie garantate și verificate înainte de utilizare.

- 3.1. Acid clorhidric p.a. (d: 1,19).
- 3.2. Acid clorhidric p.a. (6 N).
- 3.3. Acid clorhidric p.a. (0,5 N).
- 3.4. Acid fluorhidric 38-40 % (v/v) cu un conținut de fier de mai puțin de 1 mg Fe/litru și un reziduu după evaporare de mai puțin de 10 mg (cum ar fi sulfatul)/litru.
- 3.5. Acid sulfuric p.a. (d: 1,84).
- 3.6. Peroxid de hidrogen p.a. [aproximativ 100 volume de oxigen (30 % în greutate)].
- 3.7. Soluție standard de fier de lucru (1 000 μg Fe/ml) preparată după cum urmează: se dizolvă 1 g de sârmă de fier p.a. în 200 ml de acid clorhidric 6 N (3.2), se adaugă 16 ml de peroxid de hidrogen (3.6) și se completează până la un litru de apă.
 - 3.7.1. Soluție standard de fier de lucru (100 μg Fe/ml) preparată prin diluarea soluției standard (3.7) cu apă 1 + 9.
- 3.8. Soluție standard de cupru (1 000 μg Cu/ml) preparată după cum urmează: se dizolvă 1 g de praf de cupru (p.a.) în 25 ml de acid clorhidric 6 N (3.2), se adaugă 5 ml de peroxid de hidrogen (3.6) și se completează până la un litru de apă.
 - 3.8.1. Soluție standard de cupru de lucru (10 μg/ml) preparată prin diluarea soluției standard (3.8) 1 + 9 cu apă și apoi prin diluarea soluției rezultate cu apă 1 + 9.
- 3.9. Soluție standard de mangan (1 000 μg Mn/ml) preparată după cum urmează: se dizolvă 1 g de praf de mangan (p.a.) în 25 ml de acid clorhidric 6 N (3.2) și se completează până la un litru de apă.
 - 3.9.1. Soluția standard de mangan de lucru (10 μg Mn/ml) preparată prin diluarea soluției standard (3.9) 1 + 9 cu apă și apoi prin diluarea soluției rezultate cu apă 1 + 9.
- 3.10. Soluție standard de zinc (1 000 μg Zn/ml) preparată după cum urmează: se dizolvă 1 g de zinc sub formă de fășii sau bucăți (p.a.) în 25 ml de acid clorhidric 6 N (3.2) și se completează până la un litru de apă.
 - 3.10.1. Soluția standard de zinc de lucru (10 μg Zn/ml) preparată prin diluarea soluției standard (3.10) 1 + 9 cu apă și apoi prin diluarea soluției rezultate cu apă 1 + 9.
- 3.11. Soluție de clorură de lantan preparată după cum urmează: se dizolvă 12 g de oxid de lantan în 150 ml de apă, se adaugă 100 ml de acid clorhidric 6 N (3.2) și se completează până la un litru de apă.

▼B

4. APARATURĂ
- 4.1. Cuptor închis cu reglare de temperatură și aparat de înregistrare.
- 4.2. Sticlăria trebuie să fie de tip borosilicat rezistent și se recomandă folosirea aparatelor rezervate exclusiv pentru determinarea oligoelementelor.
- 4.3. Creuzet din platină și (opțional) creuzet din cuarț.
- 4.4. Spectrofotometru de absorbție atomică care îndeplinește cerințele metodei cu privire la sensibilitatea și precizia din intervalul necesar.

5. PROCEDURA

5.1. Eșantioanele care conțin materie organică

5.1.1. Arderea și prepararea soluției pentru analiză (*)

- (i) Se introduc 5-10 grame de eșantion cântărit cu aproximație de 0,2 mg într-un creuzet de cuarț sau platină (4.3) [a se vedea nota (b)], se usucă într-un cuptor la 105 °C și se introduce creuzetul în cuptorul închis rece (4.1). Se închide cuptorul [a se vedea nota (c)] și se mărește treptat temperatura până la 450-475 °C, în aproximativ 90 minute. Se menține temperatura timp de 4-16 ore (de exemplu peste noapte) pentru a îndepărta materialul carbonic și apoi se deschide cuptorul și lasă să se răcească [a se vedea nota (d)].

Se spală creuzetul cu o cantitate totală de aproximativ 5 ml de acid clorhidric (3.1) și se adaugă acesta din urmă încet și cu grijă în paharul de laborator (poate determina o reacție puternică din cauza formării de CO₂). Se adaugă acid clorhidric (3.1), picătură cu picătură, agitându-se până se oprește efervescența. Se evaporă până la uscare, agitându-se din când în când cu o baghetă de sticlă.

Se adaugă 15 ml de acid clorhidric 6 N (3.2) la reziduu, apoi aproximativ 120 ml apă. Se amestecă cu o baghetă de sticlă, care trebuie lăsată în paharul de laborator, și se acoperă paharul cu o sticlă de ceas. Se aduce ușor la punctul de fierbere și se menține la punctul de fierbere până când cenușa nu mai este dizolvată. Se filtrează cu hârtia de filtru fără cenușă și se colectează filtratul într-un balon gradat de 250 ml. Se spală paharul de laborator și se filtrează cu 5 ml de acid clorhidric 6 N fierbinte (3.2) și de două ori cu apă fiartă. Se umple balonul gradat cu apă până la marcaj (concentrația de acid clorhidric de 0,5 N).

- (ii) Dacă reziduuul din filtru este negru (carbon), se așează la loc în cuptor și se arde din nou la 450-475 °C. Această ardere, care necesită numai câteva ore (aproximativ 3-5 ore), este completă când cenușa este albă sau aproape albă. Se dizolvă reziduuul cu aproximativ 2 ml de acid clorhidric (3.1), se evaporă până la uscare și se adaugă 5 ml de acid clorhidric 6 N (3.2). Se încălzește, se filtrează soluția în balonul gradat și se umple cu apă până la marcaj (concentrația HCl de aproximativ 0,5 N).

Note:

- (a) La determinarea oligoelementelor este important să se observe cu atenție riscurile de contaminare, în special cu zinc, cupru și fier. Din acest motiv, echipamentul folosit la prepararea eșantioanelor nu trebuie să conțină aceste metale.

(*) Nutrețul verde (proaspăt sau uscat) poate conține cantități mari de silice vegetală, care pot reține elemente de detectare și trebuie să fie îndepărtate. Pentru eșantioanele din aceste furaje trebuie, prin urmare, să se respecte următoarea procedură modificată.

Se realizează operația 5.1.1. (i) până la filtrare. Se spală de două ori cu apă hârtia de filtru ce conține reziduuri insolubile și se introduce într-un creuzet de platină (4.3). Se arde în cuptor închis (4.1) la o temperatură sub 550 °C până când tot materialul carbonat dispare complet. Se lasă să se răcească, se adaugă câteva picături de apă, apoi 10-15 ml de acid fluorhidric (3.4) și se evaporă până la uscare la aproximativ 150 °C. Dacă rămâne silice în reziduuri se dizolvă din nou în câțiva mililitri de acid fluorhidric (3.4) și se evaporă până la uscare. Se adaugă 5 picături de acid sulfuric (3.5) și se încălzește până când nu se mai elimină vapori albi. După adăugarea a 5 ml de acid clorhidric 6 N (3.2) și a aproximativ 30 ml de apă, se încălzește, se filtrează soluția într-un balon gradat de 250 ml și se completează până la marcaj cu apă (concentrație de HCl de aproximativ 0,5 N). Se continuă apoi determinarea de la punctul 5.1.3.

▼B

Pentru reducerea riscului general de contaminare se lucrează într-o atmosferă fără praf, cu echipament curățat cu mare atenție și cu sticlărie spălată cu grijă. Determinarea zincului este în mod special sensibilă la multe tipuri de contaminare, de exemplu pentru sticlărie, reactivi, praf etc.

- (b) Greutatea eșantionului care urmează să fie ars este calculată din cantitatea de elemente de detectare din furaje în raport cu sensibilitatea spectrofotometrului folosit. Pentru anumite tipuri de furaje, sărace în elemente de detectare, poate fi necesară pomirea de la un eșantion de 10-20 g și completarea soluției finale până la numai 100 ml.
- (c) Arderea trebuie efectuată într-un cuptor închis fără injecție de aer sau oxigen.
- (d) Temperatura indicată de pirometru nu trebuie să depășească 475 ° C.

5.1.2. *Determinarea spectrofotometrică*

5.1.2.1. Prepararea soluțiilor de calibrare

Pentru fiecare dintre elementele care urmează să fie determinate se prepară din soluțiile standard de lucru date la punctele 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 și 3.10.1 un interval de soluții de calibrare, fiecare soluție de calibrare conținând o concentrație de HCl de aproximativ 0,5 N și (în cazul fierului, manganului și zincului) o concentrație de clorură de lantan echivalentă cu 0,1 % (p/v). Concentrațiile de elemente de detectare selectate trebuie să se situeze în intervalul sensibilității spectrofotometrului folosit. Tabelele prezentate în continuare indică, de exemplu, compozițiile intervalelor tipice ale soluțiilor de calibrare; în funcție, totuși, de tipul și sensibilitatea spectrofotometrului folosit poate fi necesar să se selecteze alte concentrații.

Fier

μg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml soluție standard de lucru (3.7.1)							
(1 ml = 100 μg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml de HCl 6 N (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la 100 ml cu apă.

Cupru

μg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,1
ml soluție standard de lucru (3.8.1)							
(1 ml = 100 μg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml HCl 6 N (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Se completează până la 100 ml cu apă.

Mangan

μg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml soluție standard de lucru (3.9.1)							
(1 ml = 10 μg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml de HCl 6 N (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la 100 ml cu apă.

▼B**Zinc**

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml soluție standard de lucru (3.10.1)							
(1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
+ ml de HCl 6 N (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la 100 ml apă.

5.1.2.2. Prepararea soluției pentru analiză

Pentru determinarea cuprului, soluția preparată la punctul 5.1.1 poate fi, în mod normal, folosită direct. Dacă este necesar să se obțină concentrația din intervalul soluțiilor de calibrare, o cotă-parte poate fi picurată într-un balon gradat de 100 ml și completată până la marcaj cu acid clorhidric 0,5 N (3.3).

Pentru determinarea fierului, manganului și zincului se picură o cotă-parte din soluția preparată la punctul 5.1.1 într-un balon gradat de 100 ml, se adaugă 10 ml de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la marcaj cu acid clorhidric 0,5 N (3.3) (a se vedea și punctul 8 „Observații”).

5.1.2.3. Experiment martor

Experimentul martor trebuie să includă toate etapele prevăzute în procedură, cu excepția faptului că materialul de eșantion este omis.

Soluția de calibrare „0” nu trebuie să fie folosită ca martor.

5.1.2.4. Măsurarea absorbției atomice

Se măsoară absorbția atomică a soluțiilor de calibrare și a soluției care urmează să fie analizată folosind o flacără de oxidare a acetilenei în aer, la următoarele lungimi de undă:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Fiecare măsurătoare se realizează de patru ori.

5.2. **Furajele minerale**

Dacă eșantionul nu conține materie organică, arderea prealabilă nu este necesară. Se procedează conform descrierii de la punctul 5.1.1 (i), începând de la al doilea paragraf. Evaporarea cu acid fluorhidric poate fi omisă.

6. **CALCULAREA REZULTATELOR**

Folosind o curbă de calibrare, se calculează concentrația de elemente de detectare în soluția care urmează să fie analizată și se exprimă rezultatul în mg de elemente de detectare pe kg de eșantion (ppm).

7. **REPETABILITATE**

Diferența dintre rezultatele celor două determinări paralele efectuate pe același eșantion de către același analist nu trebuie să depășească:

— 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de oligoelemente în cauză până la 50 mg/kg;

— 10 % din cel mai ridicat rezultat pentru un conținut de elemente de detectare în cauză de la 50 până la 100 mg/kg;

— 10 % mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de elemente de detectare în cauză de la 100 până la 200 mg/kg;

▼B

— 5 % din cel mai ridicat rezultat pentru un conținut de elemente de detectare în cauză de peste 200 mg/kg.

8. OBSERVAȚIE

Prezența cantităților mari de fosfați poate interfera cu determinarea fierului, manganului și zincului. O astfel de interferență trebuie să fie corectată prin adăugarea de soluție de clorură de lantan (3.11). Dacă, totuși, în eșantion raportul de greutate este $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}} > 2$, adăugarea de soluție de clorură de lantan (3.11) în soluția de analiză și în soluțiile de calibrare poate fi omisă.