

20.12.71

De Europæiske Fællesskabers Tidende

Nr. L 279/7

KOMMISSIONENS ANDET DIREKTIV

af 18. november 1971

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer

(71/393/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsregler for prøveudtagning og fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol af foderstoffer¹⁾, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ovennævnte direktiv fastsætter, at officielle kontrolforanstaltninger af foderstoffer med henblik på at konstatere, om de i medfør af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser foreskrevne betingelser med hensyn til foderstoffers kvalitet og sammensætning er opfyldt, foretages under anvendelse af fællesskabsregler for prøveudtagning og fællesskabsanalysemetoder;

ved Kommissionens direktiv nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971²⁾ er allerede en række fællesskabsanalysemetoder fastsat; det arbejde, der siden da er udført, er nu så vidt fremskredet, at en ny række analysemetoder bør fastsættes;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra den stående Foderstofkomité,

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyser til officiel kontrol af foderstoffer med hensyn til disses indhold af vand, flygtige kvælstofholdige baser, totalfosfor og råfedt udføres efter de i bilaget til dette direktiv beskrevne metoder.

De almindelige bestemmelser i første del (indledning) af bilaget til Kommissionens første direktiv nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971 om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer finder anvendelse på de i bilaget til dette direktiv beskrevne metoder.

Artikel 2

Senest 1. januar 1973 bringer medlemsstaterne de nødvendige administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser i anvendelse for at efterkomme dette direktivs bestemmelser. De underretter straks Kommissionen herom.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 18. november 1971.

På Kommissionens vegne

Franco M. MALFATTI

Formand

¹⁾ EFT nr. L 170 af 3.8.1970, s. 2.

²⁾ EFT nr. L 155 af 12.7.1971, s. 13.

BILAG

1. BESTEMMELSE AF VANDINDHOLD

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme vandindholdet i foderstoffer. Den er ikke beregnet på undersøgelse af mejeriprodukter, der anvendes selvstændigt som foderstoffer, mineralske stoffer og blandinger, der overvejende består af mineralske stoffer, ej heller på undersøgelse af olieholdige frø og olieholdige frugter i henhold til Rådets forordning nr. 136/66 EØF af 22. september 1966 om oprettelsen af en fælles markedsorganisation for fedtstoffer¹⁾.

Metoden til bestemmelse af vandindholdet i olieholdige frø samt olieholdige frugter er fastlagt i bilag III til Kommissionens forordning (EØF) nr. 1470/68 af 23. september 1968 om udtagning og findeling af prøver samt bestemmelse af indholdet af olie, urenheder og vand²⁾ i olieholdige frø.

2. Princip

Prøven tørres under nærmere angivne betingelser, som er afhængige af foderstoffets art. Vægttabet udregnes. Ved faste foderstoffer med højt vandindhold er yderligere en fortlørring nødvendig.

3. Apparatur

- 3.1 Findelingsapparat bestående af et materiale, som ikke er fugtabsorberende, og som er let at gøre rent, muliggør en hurtig og ensartet findeling uden mærkbar varmeudvikling, så vidt muligt forhindrer kontakt med den omgivende luft og opfylder de under 4.1.1 og 4.1.2 stillede krav (f. eks. mikrohammermøller, mikrofindelingsapparater med vandkøling, demontable keglemøller, langsomtløbende keglemøller og tandskivemøller).
- 3.2 Analysevægt med 0,5 mg aflæsningsnøjagtighed.
- 3.3 Tørre vejekar af korrosionsbestandigt metal eller glas, med lufttæt sluttende låg; nyttearealet skal muliggøre en fordeling af prøven med ca. 0,3 g pr. 1 cm².
- 3.4 Elektrisk opvarmet, temperaturreguleret tørreskab ($\pm 1^\circ \text{C}$), som sikrer hurtig regulering af temperaturen og med god ventilation¹⁾.
- 3.5 Elektrisk opvarmet justerbart vakuomtørreskab med oliepumpe, som enten er forsynet med en anordning for tilførsel af tørret varmluft eller med et tørringsmiddel (f. eks. kalciumoxid).
- 3.6 Ekssikkator med tyk, perforeret plade af metal eller porcelæn indeholdende et virksomt tørringsmiddel.

4. Fremgangsmåde

NB: De i dette afsnit beskrevne arbejdsprocesser skal udføres straks efter åbningen af de pakninger, som indeholder prøverne.

Analyserne skal foretages mindst to gange.

4.1 Forberedelse

4.1.1 Foderstoffer, bortset fra de under 4.1.2 og 4.1.3 nævnte

Der udtages mindst 50 g af prøven, som – om nødvendigt – findeles på fornøden vis, for at undgå varierende fugtighedsgrader (se punkt 6).

4.1.2 Korn og gryn

Der udtages mindst 50 g af prøven. Den formales på en sådan måde, at kornstørrelsen ved sigtning med masker på 0,5 mm tillader passage af mindst 50 %, og at der ved sigtning med runde masker på 1 mm bliver højst 10 % tilbage.

4.1.3 Flydende eller grødagtige foderstoffer; foderstoffer, overvejende bestående af fedt

Der udtages ca. 25 g af prøven, afvejet med 10 mg nøjagtighed, som blandes med en tilsvarende mængde vandfrit sand, afvejet med 10 mg nøjagtighed, indtil der fremkommer en homogen vare.

4.2 Tørring

4.2.1 Foderstoffer, bortset fra de under 4.2.2 og 4.2.3 nævnte

Et vejekar med låg (3.5) vejes med 0,5 mg nøjagtighed. Ca. 5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i det tærede kar og fordeles jævnt. Karret stilles efter

¹⁾ EFT nr. 172 af 30.9.1966, s. 3025/66.

²⁾ EFT nr. L 239 af 28.9.1968, s. 2.

¹⁾ Til tørring af korn, mel, gryn og grutning skal tørreskabet have en sådan varmekapacitet, at det, når det er indstillet på en temperatur på 131° C, igen når op på denne temperatur på mindre end 45 minutter, efter at det maksimale antal af prøver, som skal tørres samtidig, er indsat i skabet. Ventilationen skal være af en sådan beskaffenhed, at hvis samtlige prøver af blød hvede, som skabet kan rumme, tørres samtidig i to timer, må resultaterne sammenlignet med de efter 4 timers tørring opnåede resultater differere maksimalt med 0,15 %.

aftagning af låget ind i et til 103° C opvarmet tørreskab. For at temperaturen ikke skal falde for stærkt i tørreskabet, skal karret stilles hurtigt ind i skabet. Der tørres i 4 timer, idet tørringstiden regnes fra det tidspunkt, hvor temperaturen i tørreskabet atter er kommet op på 103° C. Efter åbning af tørreskabet lukkes karret med låget, tages ud af skabet, henstilles til afkøling i 30 til 45 minutter i eksikkatoren og vejes derefter med 1 mg nøjagtighed.

Ved prøver overvejende bestående af fedt foretages yderligere en tørring på 30 minutter i tørreskabet ved 103° C. Forskellen mellem de to vejerresultater må ikke overstige mere end 0,1 % vandindhold.

4.2.2 Korn, mel, gryn og grutning

Et vejekar (3.3) med låg vejes med 0,5 mg nøjagtighed. Ca. 5 g af den findelte prøve afvejes med 1 mg nøjagtighed i det tarerede kar og fordeles jævnt. Karret stilles efter aftagning af låget ind i et til 130° C opvarmet tørreskab. For at temperaturen i tørreskabet ikke skal falde for stærkt, skal karret stilles hurtigt ind i skabet. Der tørres i 2 timer, idet tørringstiden regnes fra det tidspunkt, hvor temperaturen i tørreskabet atter er nået op på 103° C. Efter åbning af tørreskabet lukkes karret med låget, tages ud af skabet, henstilles til afkøling i 30 til 45 minutter i eksikkatoren (3.6) og vejes derefter med 1 mg nøjagtighed.

4.2.3 Foderblandinger indeholdende mere end 4 % saccharose eller laktose samt følgende ublandede foderstoffer: Johannesbrødskrå, hydrolyserede kornprodukter, maltspirer, sukkerroesnitte, fiskepressevand, og sukker, samt foderblandinger med mineralske stoffer indeholdende mere end 25 % krystalvand.

Et vejekar (3.3) med låg vejes med 0,5 mg nøjagtighed. Ca. 5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i det tarerede kar og fordeles jævnt. Karret stilles efter aftagning af låget ind i et til 80–85° C opvarmet vakuomtørreskab (3.5). For at temperaturen i vakuomtørreskabet ikke skal falde for stærkt, skal karret stilles hurtigt ind i skabet.

Trykket indstilles til 100 torr, og prøven tørres i 4 timer ved dette tryk enten under tilførsel af varm, tør luft eller ved hjælp af et tørringsmiddel (ca. 300 g til 20 prøver). I sidstnævnte tilfælde afbrydes forbindelsen til vakuumpumpen, så snart det foreskrevne tryk er nået. Tørringstiden regnes fra det tidspunkt, hvor temperaturen i tørreskabet atter er kommet op på 80 til 85° C. Efter tørringstidens udløb bringes vakuomtørreskabet forsigtigt op på atmosfærisk tryk. Efter åbning af vakuomtørreskabet lukkes karret straks med låget, tages ud af skabet, henstilles til afkøling i 30 til 45 minutter i eksikkatoren (3.6) og vejes derefter med 1 mg nøjagtighed. Der tørres i yderligere 30 minutter under vakuum i tørreskabet ved 80 til 85° C, og derefter vejes på ny. Forskellen mellem de to vejerresultater må ikke overstige mere end 0,1 % vandindhold.

4.3 Fortørring

4.3.1 Foderstoffer, bortset fra de under 4.3.2 nævnte

Fortørring af faste foderstoffer med højt vandindhold, og hvis findeling er vanskelig, foretages som følger:

50 g, afvejet med 10 mg nøjagtighed, af den uformalede prøve (en grov findeling foretages – om nødvendigt – ved pressede eller klumpede foderstoffer) afvejes i en egnet beholder (f. eks. en aluminiumskål på 20×12 cm med en kant på 0,5 cm). Der tørres i tørreskab ved en temperatur på 60 til 70° C, indtil vandindholdet har nået en værdi på mellem 8 og 12 %. Beholderen tages ud af tørreskabet, og der afkøles i 1 time ved henstand i luften, hvorefter der vejes med 10 mg nøjagtighed. Alt efter foderstoffets art foretages, som beskrevet under 4.1.1, derefter straks en findeling, og der tørres som beskrevet under 4.2.1 eller 4.2.3.

4.3.2 Korn

Korn, hvis vandindhold er mere end 17 %, skal fortørres som følger:

50 g af de uformalede korn afvejes med 10 mg nøjagtighed i en egnet beholder (f. eks. en aluminiumskål på 20×12 cm med en kant på 0,5 cm), tørres i tørreskab i 5 til 7 minutter ved en temperatur på 130° C, hvorefter prøven tages ud af tørreskabet. Der afkøles i 2 timer ved henstand i luften, hvorefter der vejes med 10 mg nøjagtighed. Straks efter formales som under 4.1.2 og tørres som beskrevet under 4.2.2.

5. Beregning af resultaterne

Prøvens vandindhold i procent udregnes efter følgende formler:

5.1 Tørring uden fortørring

$$(E - M) \cdot \frac{100}{E}$$

hvor:

E = prøvens begyndelsesmasse i gram,
m = den tørre prøves masse i gram,

5.2 *Tørring med fortørring*

$$\left| \frac{(M' - m) M}{M'} + E - M \right| \cdot \frac{100}{E} = 100 \left(1 - \frac{Mm}{EM'} \right)$$

hvor:

- E = prøvens begyndelsesmasse i gram,
 M = prøvens masse i gram efter fortørringen,
 M' = prøvens masse i gram efter findelingen og formalingen,
 m = den tørre prøves masse i gram.

5.3 *Reproducerbarhed*

Differencen mellem to parallelbestemmelser må for én og samme prøve ikke overstige 0,2 % vandindhold.

6. **Bemærkning**

Hvis det viser sig at være nødvendig med en findeling og der i den forbindelse må regnes med en ændring af materialets vandindhold, skal de øvrige analyseresultater for foderstofets bestanddele omregnes til originalprøvens vandindhold.

2. BESTEMMELSE AF FLYGTIGE KVÆLSTOFHOLDIGE BASER

A. BESTEMMELSE VED MIKRODIFFUSION

1. **Formål og anvendelsesområde**

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af flygtige kvælstofholdige baser, udtrykt som ammoniak, i foderstoffer.

2. **Princip**

Prøven ekstraheres med vand, opløsningen klares og filtreres. De flygtige kvælstofholdige baser udskilles efter tilsætning af kaliumkarbonatopløsning ved mikrodifusion, opfanges i en borsyreopløsning og titreres med svovlsyre.

3. **Reagenser**

- 3.1 Trikløreddikesyreopløsning 20 % (w/v)
 3.2 Indikator: 33 mg bromkresolgrønt og 65 mg metylrødt opløses i 100 ml ethanol 95 til 96 % (v/v).
 3.3 Borsyreopløsning: 10 g borsyre p.a. opløses i en 1 liter målekolbe indeholdende 200 ml ethanol 95 til 96 % og 700 ml vand. Det tilsættes 10 ml af indikatoren (3.2). Opløsningen blandes og bringes om nødvendigt under tilsætning af natriumhydroxydopløsning til at antage en lyserrød farve. 1 ml af denne opløsning kan binde op til 300 µg NH₃.
 3.4 Mættet kaliumkarbonatopløsning: 100 g kaliumkarbonat p.a. opløses i 100 ml kogende vand; efter afkøling filtreres opløsningen.
 3.5 0,02 N svovlsyre.

4. **Apparatur**

- 4.1 Mekanisk rysteapparat: cirka 35 til 40 omdr./min.
 4.2 Conwayskåle (se skitse) af glas eller plastic.
 4.3 Mikroburetteer $\frac{1}{100}$ ml aflæsningsnøjagtighed.

5. **Fremgangsmåde**

10 g af prøven, afvejet med 1 mg nøjagtighed, kommes sammen med 100 ml vand i en 200 ml målekolbe og omrystes i 30 minutter i rysteapparatet. Derefter tilsættes 50 ml trikløreddikesyreopløsning (3.1), og der fyldes op med vand til mærket, rystes kraftigt og filtreres gennem et foldefilter.

1 ml borsyreopløsning (3.3) afpipetteres i Conwayskålens midte, derefter 1 ml af prøvefiltratet over i skålens ring. Skålen tildækkes delvist med det let indfedtede låg, derpå kommer man hurtigt 1 ml af den mættede kaliumkarbonatopløsning (3.4) ned i ringen og lukker skålen lufttæt. For med sikkerhed at få en blanding af de to reagenser drejes skålen forsigtigt i vandret stilling. Derpå lader man det hele henstå i mindst 4 timer ved stuetemperatur eller 1 time ved 40° C.

De i borsyreopløsningen indeholdte flygtige baser titreres derefter med 0,02 N svovlsyre (3.5) ved anvendelse af en mikroburette (4.3).

På samme måde udføres et blindforsøg under udeladelse af analyseprøven.

6. Beregning af resultaterne

1 ml 0,02 N svovlsyre svarer til 0,34 mg ammoniak.

Resultatet udtrykkes i % af prøven.

Reproducerbarhed.

Differencen mellem to parallelbetemmelser må for én og samme prøve ikke være over:

10 % i relativ værdi ved indhold på mindre end 1,0 % ammoniak;

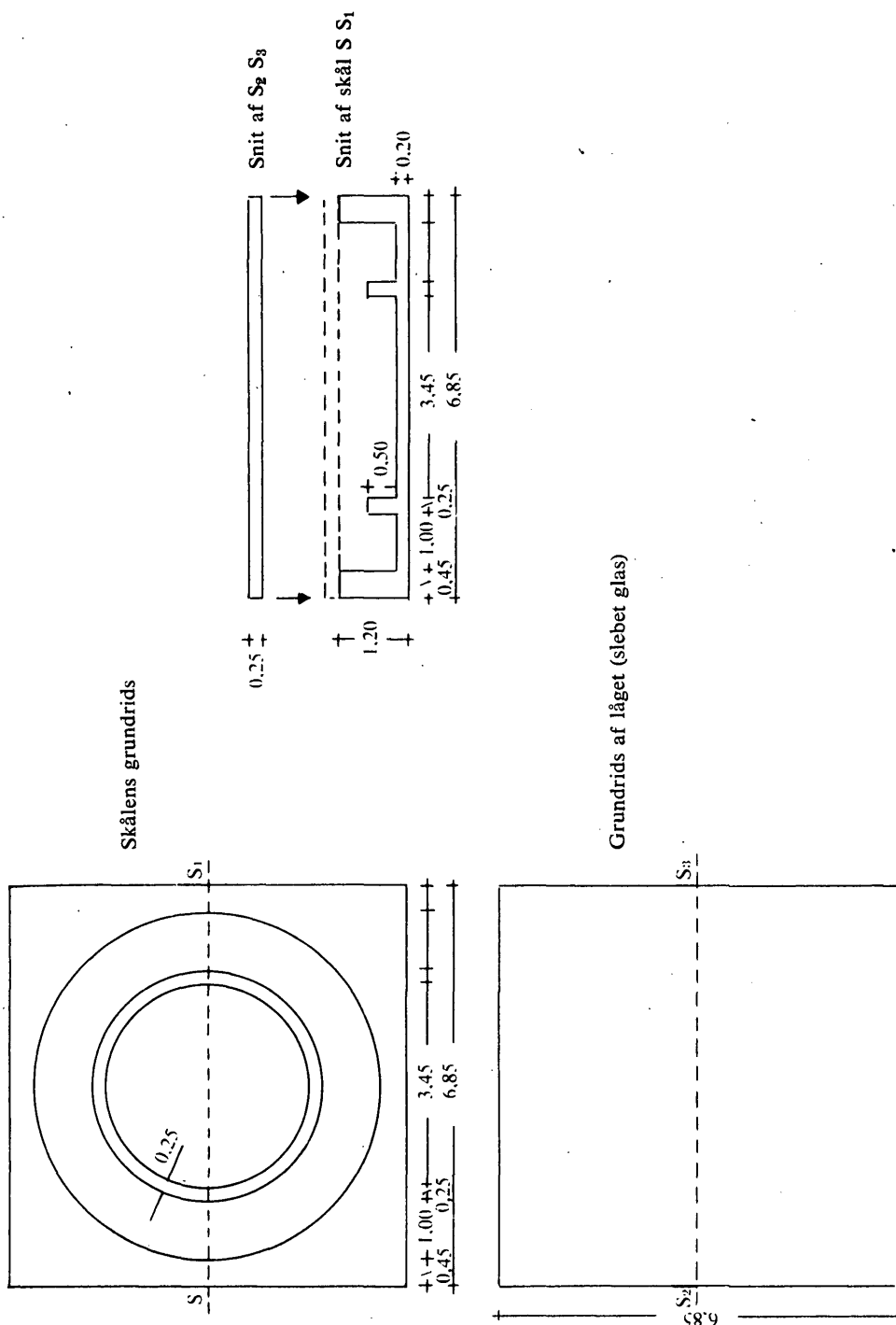
0,1 % i absolut værdi ved indhold på 1,0 % ammoniak og derover.

7. Bemærkning

Har prøven et indhold på mere end 0,6 % ammoniak, skal det oprindelige filtrat fortyndes.

CONWAY-SKÅL

Målestok 1/1



B. BESTEMMELSE VED DESTILLATION

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af flygtige kvælstofholdige baser, udtrykt som ammoniak, i fiskemel, som praktisk taget ikke indeholder urinstof. Metoden er kun anvendelig ved indhold på mindre end 0,25 % ammoniak.

2. Princip

Prøven ekstraheres med vand, opløsningen klares og filtreres. De flygtige kvælstofholdige baser udskilles efter tilsætning af magnesiumoxyd ved kogetemperatur og opfanges i en bestemt mængde svovlsyre, hvis overskud tilbagetitreres med natriumhydroxydopløsning.

3. Reagenser

- 3.1 Triklorredikesyreopløsning 20 % (w/v).
- 3.2 Magnesiumoxyd p.a.
- 3.3 Antiskumemulsion (f. eks. silikone).
- 3.4 0,1 N svovlsyre.
- 3.5 0,1 N natriumhydroxydopløsning.
- 3.6 Metylrødtopløsning 0,3 % (w/v) i ethanol 95 – 96 % (v/v).

4. Apparatur

- 4.1 Mekanisk rysteapparat, cirka 35 til 40 omdr./min.
- 4.2 Destillationsapparat af Kjeldahl-typen.

5. Fremgangsmåde

10 g af prøven, afvejnet med 1 mg nøjagtighed, hældes sammen med 100 ml vand i en 200 ml målekolbe og omrystes i 30 minutter i rysteapparatet.

Derpå tilsættes 50 ml triklorredikeopløsning (3.1), fyldes op med vand til mærket, rystes kraftigt og filtreres gennem et foldefilter.

Afhængigt af det formodede indhold af flygtige kvælstofholdige baser udtages en mængde af det klare filtrat (normalt 100 ml). Det fortyndes til 200 ml, og der tilsættes 2 g magnesiumoxyd (3.2) samt nogle dråber antiskumemulsion (3.3). Opløsningen skal reagere alkalisk over for lakmuspapir; i modsat fald tilsættes yderligere magnesiumoxyd (3.2). I Kjeldahl-apparatet destilleres ca. 150 ml af opløsningen, og destillatet opfanges i en Erlenmeyerkolbe, som indeholder en nøje afmålt mængde (mellem 25 og 50 ml) 0,1 N svovlsyre (3.4). Ved destillationen skal overophedning af kolbevæggen undgås. Den svovlsure opløsning koges i 2 minutter, derpå afkøles; overskuddet af svovlsyre tilbagetitreres med 0,1 N natriumhydroxydopløsning (3.5) efter tilsætning af metylrødt (3.6) som indikator.

På samme måde udføres et blindforsøg under udeladelse af analyseprøven.

6. Beregning af resultaterne

1 ml 0,1 N svovlsyre svarer til 1,7 mg ammoniak.

Resultatet udtrykkes i procent af prøven.

Reproducerbarhed

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ikke overstige 10 % (relativt) ammoniak.

3. BESTEMMELSE AF TOTALFOSFOR

Fotometrisk metode

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af totalfosfor i foderstoffer. Metoden er specielt egnet til undersøgelse af foderstoffer med et ringe fosforindhold. I bestemte tilfælde (fosforrige produkter) kan der anvendes en gravimetrisk metode.

2. Princip

Prøven destrueres enten i tør tilstand (især ved organiske foderstoffer) eller i våd tilstand (især ved mineralske stoffer og flydende foderstoffer) og opløses i syre. Opløsningen behandles med vanadatmolybdat-reagenset. Ekstinktionen af den gulfarvede opløsning måles ved 430 nm i spektrofotometeret.

3. Reagenser

- 3.1 Kalciumkarbonat p.a.
- 3.2 Saltsyre p.a., mf. 1,1 (ca. 6 N).
- 3.3 Salpetersyre p.a., mf. 1,045.
- 3.4 Salpetersyre p.a., mf. 1,38 til 1,42.
- 3.5 Svovlsyre p.a., mf. 1,84.
- 3.6 Vanadatmolybdat-reagens: 200 ml ammoniumheptamolybdatopløsning (3.6.1) blandes med 200 ml ammoniummonovandtopløsning (3.6.2) og 134 ml salpetersyre (3.4) i en 1 liter målekolbe, hvorefter der fyldes op med vand til mærket.
 - 3.6.1 Ammoniumheptamolybdatopløsning: 100 g ammoniumheptamolybdat p.a. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ opløses i varmt vand. 10 ml ammoniak (mf. 0,91) tilsættes, og der fyldes op med vand til 1 liter.
 - 3.6.2 Ammoniummonovanadatopløsning: 2,35 g ammoniummonovanadat p.a. NH_4VO_3 , opløses i 400 ml varmt vand. 20 ml fortyndet salpetersyre (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) tilsættes langsomt under omrøring, og der fyldes op med vand til 1 liter.
- 3.7 Fosfor-standardopløsning 1 mg pr. ml: 4,387 g kaliumdihydrogenfosfat p.a. KH_2PO_4 , opløses i vand, og der fyldes op med vand til 1 liter.

4. Apparatur

- 4.1 Digler af kvarts eller porcelæn.
- 4.2 Elektrisk muffelovn med termostat indstillet på 550° C.
- 4.3 Kjeldahlkolber, 250 ml.
- 4.4 Målekolber og mikromålepipette.
- 4.5 Spektrofotometer.
- 4.6 Reagensglas, ca. 16 mm diameter med NS 14,5; rumindhold: 25–30 ml.

5. Fremgangsmåde

5.1 Tilberedning af opløsningen

Alt efter prøvens art tilberedes opløsningen som angivet under 5.1.1 eller 5.1.2.

5.1.1 Normal metode

1 g eller mere af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og hældes i en Kjeldahlkolbe. Der tilsættes 20 ml svovlsyre (3.5); derpå omrystes der, for at gennemvæde materialet med syren og for at forhindre at materialet sætter sig fast på kolbens inderside; derpå opvarmes blandingen og holdes i kog i 10 minutter. Efter en let afkøling tilsættes der 2 ml salpetersyre (3.4); der opvarmes svagt og afkøles atter noget. Herefter tilsættes på ny lidt salpetersyre (3.4), opvarmes til kogetemperatur, og dette gentages, indtil opløsningen er farveløs. Derpå afkøles der; der tilsættes lidt vand, og væsken overføres kvantitativt til en 500 ml målekolbe ved skylling af Kjeldahlkolben med varmt vand. Efter afkøling fyldes op med varmt vand til mærket, omrystes og filtreres.

5.1.2 Metode for prøver, som indeholder organiske stoffer, men er fri for kalcium- resp. magnesium-dihydrogenfosfater.

Ca. 2,5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed i en digel og blandes omhyggeligt med 1 g kalciumkarbonat (3.1). I muffelovnen foraskes der ved 550° C $\pm 5^\circ$ C, indtil asken er hvid eller grå (små mængder kul skader ikke).

Asken hældes i et 250 ml bægerglas; der tilsættes 20 ml vand og saltsyre, indtil opbrusningen ophører; til slut tilsættes et overskud på 10 ml saltsyre (3.2). Derpå stilles bægerglasset i et sandbad, og der inddampes til fuldstændig tørhed for at gøre kisel syren uopløselig. Resten optages i 10 ml salpetersyre (3.3) og opvarmes til kogetemperatur i 5 minutter i sandbadet, idet dog resten ikke skal tørre helt. Væsken overføres til en 500 ml målekolbe, idet bægerglasset gentagne gange skylles med varmt vand. Efter afkøling fyldes der op med vand til mærket, omrystes og filtreres.

5.2 Udvikling af farvningen og måling af ekstinktionen

En alikvot del af det ifølge 5.1.1 eller 5.1.2 udvundne filtrat fortyndes, for at få en koncentration af fosfor på højst 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 10 ml af denne opløsning afpipetteres i et reagensglas (4.6), og der tilsættes 10 ml vanadatmolybdat-reagens (3.6). Blandingen rystes og henstilles i mindst 10 minutter ved en temperatur på 20° C. Derpå måles ekstinktionen i spektrofotometeret ved 430 nm i forhold til en opløsning af 10 ml vand og 10 ml vanadatmolybdat-reagens.

5.3 Standardkurve

Af standardopløsningen (3.7) fremstilles opløsninger, som indeholder 5, 10, 20, 30 og 40 μg fosfor pr. ml. Til hver 10 ml af disse opløsninger sættes 10 ml vanadatmolybdat-

reagens (3.6). Der omrystes, og blandingen henstilles mindst 10 minutter ved en temperatur på 20° C. Derpå måles ekstinktionen under de ovenfor under 5.2 beskrevne betingelser. Standardkurven opstilles, idet ekstinktionsværdierne indtegnes i ordinaten og den tilsvarende fosformængde i abscissen. Kurven er lineær for koncentrationen af fosfor fra 0 til 40 µg/ml.

6. Beregning af resultaterne

Indholdet af fosfor i analyseprøven bestemmes ved benyttelse af standardkurven.

Resultatet udtrykkes i procent af prøven.

Reproducerbarhed:

Differencen mellem to parallelbestemmelser må for én og samme prøve ikke være over:

3 % i relativ værdi ved indhold på mindre end 5 % fosfor;

0,15 % i absolut værdi ved indhold på 5 % fosfor og derover.

4. BESTEMMELSE AF RÅFEDT

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden tjener til bestemmelse af råfedtindholdet i foderstoffer. Den er ikke beregnet på undersøgelse af olieholdige frø og olieholdige frugter i henhold til Rådets forordning nr. 136/66/EØF af 22. september 1966. Bestemmelsen af olieindholdet i disse varer er fastlagt i bilag V til Kommissionens forordning (EØF) nr. 1470/68 af 23. september 1968. Alt efter foderstoffets art anvendes to metoder.

1.1 *Metode A (æterekstrakt)*: Skal anvendes ved alle foderstoffer, med undtagelse af de i 1.2 nævnte.

1.2 *Metode B*: Skal anvendes ved foderstoffer, hvis fedt ikke kan ekstraheres fuldstændigt med diætylæter uden forudgående hydrolyse, foderstoffer af animalsk oprindelse, gluten, tørret kartoffelpulp, tørret bryggeri- og brænderimask, tørgær, rester af kiks, brød og kogte næringsmidler, mejeriprodukter samt ved foderblandinger med højt indhold af sådanne varer (mindst 40 %) og ved foderblandinger, som er beriget med fedt.

2. Princip

2.1 *Metode A*: Fedtet ekstraheres med diætylæter. Opløsningsmidlet afdestilleres, og æterekstrakten tørres og vejes.

2.2 Prøven hydrolyseres ved varme med saltsyre. Opløsningen afkøles og filtreres. Den vaskede og tørrede rest ekstraheres ved hjælp af diætylæter som anført under metode A.

3. Reagenser

3.1 Diætylæter, vandfri, mf. 0,720, kp. 34,5° C, praktisk taget fri for peroxyder.

3.2 Natriumsulfat p.a., vandfrit.

3.3 3 N saltsyre.

3.4 Filtreringsmiddel, f. eks. kiselgur, Hyflo-supercel.

3.5 Tetraklorkulstof p.a.

4. Apparatur

4.1 Soxhlet's ekstraktionsapparat eller tilsvarende apparat.

4.2 Varmekilde med temperaturregulering, eksplosionssikker.

4.3 Vakuumpørreskab (under 100 torr).

5. Fremgangsmåde

5.1 *Metode A* (se bemærkninger 7.1)

5 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og blandes med 2 til 3 g (om nødvendigt mere) vandfrit natriumsulfat (3.2). Blandingen fyldes i en fedtfri ekstraktionshætte, som tildækkes med en affedt vatprop.

Hætten anbringes i ekstraktionsapparatet (4.1), og der ekstraheres i seks timer med diætylæter (3.1). Ved anvendelse af Soxhlet's ekstraktionsapparat skal varmekilden indstilles således, at der sker overløb fra ekstraktionsrøret mindst 15 gange i timen. Ekstrakten opfanges i en tør, tareret kolbe indeholdende nogle stykker pimpsten¹⁾.

Æteren fradestilleres, og destillationsresten tørres derpå i halvtanden time i vakuumpørreskabet (4.3) ved 75° C. Efter afkøling i ekssikator vejes resten. Ved en yderligere tørring på 30 minutter kontrolleres, om fedtets vægt er ændret (vægttabet skal ligge under 1 mg).

¹⁾ Såfremt fedtet senere skal undersøges kvalitativt, skal pimpstenen erstattes af glasperler.

5.2 Metode B

2,5 g af prøven (se bemærkninger 7.2) afvejes med 1 mg nøjagtighed og hældes i et 400 ml bægerglas eller en 300 ml Erlenmeyerkolbe. Derpå tilsættes 100 ml 3 N saltsyre (3.3) og nogle stykker pimpsten. Bægerglasset tildækkes med et urglas, eller hvis der anvendes en Erlenmeyerkolbe, forsynes denne med en tilbageløbskøler.

Blandingen bringes over en lille flamme eller på en varmeplade til let kogning i ca. en time. Materialet må ikke sætte sig fast på glassets væg.

Derpå afkøles, og der tilsættes så meget filtreringsmiddel (3.4), at der ikke optræder noget fedttab ved filtreringen.

Der filtreres under anvendelse af et fugtigt, fedtfri dobbelt papirfilter. Resten udvaskes med koldt vand, indtil den sure reaktion forsvinder. Derefter kontrolleres, at filtratet ikke indeholder noget fedt. Tilstedeværelse af fedt i filtratet viser, at der før hydrolysen skal foretages en ekstraktion af prøven med diætylæter efter den under 5.1 beskrevne metode.

Det dobbelte filter med filtreringsresten lægges på et urglas og tørres i tørreskab ved 95 til 98° C i halvanden time.

Den tørre filtreringsrest og det dobbelte filter anbringes i en ekstraktionshætte og ekstraheres med diætylæter. Derefter fortsættes som beskrevet under 5.1, andet afsnit.

6. Beregning af resultaterne

Resultatet udtrykkes i % af prøven.

Reproducerbarhed.

Differencen mellem to parallelbestemmelser må ved én og samme prøve ikke overstige 0,3 % fedt.

7. Bemærkninger

7.1 Ved varer med højt fedtindhold, som er vanskelige at finde, eller som ikke egner sig til udtagning af en reduceret homogen prøve, anvendes følgende fremgangsmåde: 20 g af prøven afvejes med 1 mg nøjagtighed og blandes med 10 g eller mere af vandfrit natriumsulfat (3.2). Derpå ekstraheres med diætylæter (3.1) som beskrevet under 5.1. Den herved opfangede ekstrakt suppleres med tetraklorkulstof (3.5) til 500 ml og blandes. Af opløsningen udtages 50 ml, som hældes i en lille, tør og tættet kolbe indeholdende pimpsten¹⁾. Opløsningsmidlet fradestilleres; derpå tørres og fortsættes som beskrevet under 5.1, sidste afsnit. Ekstraktionsresten i hættens befries for opløsningsmidlet og findeles til en kornstørrelse på 1 mm. Materialet hældes tilbage i ekstraktionshætten (der tilsættes ikke natriumsulfat) og ekstraheres med diætylæter; derpå fortsættes der som beskrevet under 5.1, andet og tredje afsnit.

Slutresultatet findes under hensyntagen til den alikvote del ved den første ekstraktion og udtrykkes i procent af prøven som følger:

$$(10 a + b) \cdot 5$$

a = æterekstrakt i gram efter den første ekstraktion i den alikvote del,

b = æterekstrakt i gram efter den anden ekstraktion.

7.2 Ved fedtfattige varer kan der arbejdes med en afvejning på 5 g.