

KOMMISSIONENS FEMTE DIREKTIV

af 25. marts 1974

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol af foderstoffer

(74/203/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 fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer ⁽¹⁾, senest ændret ved akten ⁽²⁾, der er knyttet til traktaten vedrørende nye medlemsstaters tiltrædelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab og Det europæiske Atomenergifællesskab ⁽³⁾, undertegnet i Bruxelles den 22. januar 1972, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ovennævnte direktiv bestemmer, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaffenhed og sammensætning, er opfyldt, skal foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

Kommissionens direktiver nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971 ⁽⁴⁾, nr. 71/393/EØF af 18. november 1971 ⁽⁵⁾, nr. 72/199/EØF af 27. april 1972 ⁽⁶⁾ og nr. 73/46/EØF af 5. december 1972 ⁽⁷⁾ har allerede fastlagt en række fællesskabsanalysemetoder; i betragtning af den hastighed, hvormed arbejdet siden da er skredet frem, er det hensigtsmæssigt at fastlægge en femte række metoder;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af foderstoffer for så vidt angår deres indhold af stivelse og af højmolekylære spaltningsprodukter af stivelse i foderstoffer, som

indeholder roesnitter, roeaffald, tørrede roeblade eller roetoppe, kartoffelaffald, tærgær, inulinholdige produkter eller fedtegrever, skal foretages efter den metode, der er beskrevet i dette direktivs bilag I.

De almindelige bestemmelser i første del (indledning) af bilaget til Kommissionens første direktiv nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971, finder anvendelse på den metode, der er beskrevet i dette direktivs bilag I.

*Artikel 2*Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af foderstoffer for så vidt angår deres indhold af amprolium, ethopabat, dinitolmid (DOT), nicarbazin og menadion (K₃—vitamin) skal foretages efter de metoder, der er beskrevet i dette direktivs bilag II.

De almindelige bestemmelser i første del (indledning) af bilaget til Kommissionens første direktiv nr. 71/250/EØF af 15. juni 1971, finder med undtagelse af den del, der vedrører tilberedelsen af analyseprøven, anvendelse på de metoder, der er beskrevet i dette direktivs bilag II.

Artikel 3

Medlemsstaterne sætter de nødvendige administrative eller ved lov fastsatte bestemmelser i kraft for senest den 1. november 1974 at efterkomme bestemmelserne i dette direktiv. De underretter omgående Kommissionen herom.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 25. marts 1974.

På Kommissionens vegne

François-Xavier ORTOLI

Formand⁽¹⁾ EFT nr. L 170 af 3. 8. 1970, s. 2.⁽²⁾ EFT nr. L 73 af 27. 3. 1972, s. 14.⁽³⁾ EFT nr. L 73 af 27. 3. 1972, s. 5.⁽⁴⁾ EFT nr. L 155 af 12. 7. 1971, s. 13.⁽⁵⁾ EFT nr. L 279 af 20. 12. 1971, s. 7.⁽⁶⁾ EFT nr. L 123 af 29. 5. 1972, s. 6.⁽⁷⁾ EFT nr. L 83 af 30. 3. 1973, s. 21.

BILAG I

BESTEMMELSE AF STIVELSE

(Efter pankreatin-metoden)

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af stivelse og af højmolekylære spaltningsprodukter af stivelse i foderstoffer, som indeholder roesnitte, roeffald, tørrede roeblade eller roetoppe, kartoffelaffald, torgær, inulinholdige produkter (f.eks. snitte og mel af jordskokker) eller fedtegrever. Bestemmelsen foretages kun, hvor en mikroskopisk undersøgelse viser et ikke ubetydeligt indhold af stivelse i prøven.

2. Princip

De i prøven forekommende sukkerarter fjernes ved ekstraktion med ethanol, hvorefter stivelsen i remanensen reduceres til sukker ved hjælp af pankreatin. De opståede sukkerarter hydrolyseres med saltsyre, og den dannede glucosemængde bestemmes efter Luff-Schoorl-metoden. Denne glucosemængde giver med multiplikation med en konstant faktor prøvens indhold af stivelse.

3. Reagenser

- 3.1. 90 % (rf.) ethanol, neutral over for fenolfthalein
- 3.2. N-amyalkohol p.a.
- 3.3. Toluen p.a.
- 3.4. Bufferopløsning: 9,078 g kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 og 11,876 g dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ opløses i vand. Der fyldes op med vand til 1 liter
- 3.5. 0,2 n natriumchloridopløsning
- 3.6. Carrez I opløsning: 21,9 g zinkacetat $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 3 g iseddikesyre opløses i vand, og der fyldes op med vand til 100 ml
- 3.7. Carrez II opløsning: 10,6 g kaliumferrocyanid $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $3\text{H}_2\text{O}$ opløses i vand, og der fyldes op med vand til 100 ml
- 3.8. 1 n saltsyre
- 3.9. Saltsyre p.a., ca. 8 n, mf. = 1,125
- 3.10. Natriumhydroxydopløsning p.a., ca. 10 n, mf. = 1,33
- 3.11. Indikator: 0,1 % (vægt) methylorangeopløsning
- 3.12. Pankreatin i pulverform, svarende til forskrifterne under punkt 8. Opbevares, beskyttet imod lys og fugtighed, i tilproppet flaske
- 3.13. Luff-Schoorl-reagens: Under forsigtig omrystning sættes citronsyreopløsningen (3.13.2) til natriumcarbonatopløsningen (3.13.3). Derefter tilsættes kobbersulfatopløsningen (3.13.1), og der fyldes op med vand til 1 liter. Blandingen henstår natten over og filtreres. Normaliteten af det således opnåede reagens kontrolleres (0,1 n Cu; 2 n Na_2CO_3). Opløsningens pH skal være ca. 9,4
 - 3.13.1. Kobbersulfatopløsning: 25 g kobbersulfat p.a., $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, opløses i 100 ml vand
 - 3.13.2. Citronsyreopløsning: 50 g citronsyre p.a., $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, H_2O , opløses i 50 ml vand
 - 3.13.3. Natriumcarbonatopløsning: 143,8 g vandfrit natriumcarbonat p.a. opløses i ca. 300 ml varmt vand, og opløsningen sættes til afkøling
- 3.14. Granuleret pimpsten, udkogt med saltsyre, vasket med vand og tørret
- 3.15. 30 % (vægt) kaliumiodidopløsning p.a.

- 3.16. Svovlsyre, ca. 6 n, mf. = 1,18
- 3.17. 0,1 n natriumthiosulfatopløsning
- 3.18. Stivelsesopløsning : en blanding af 5 g opløselig stivelse i 30 ml vand tilsættes til 1 liter kogende vand. Blandingen holdes kogende i 3 minutter og hensættes derefter til afkøling. Tilberedes umiddelbart før brugen.

4. Apparatur

- 4.1. Ekstraktionsapparat (se skitsen s. 12) bestående af :
- 4.1.1. En 500 ml konisk kolbe med vid hals
 - 4.1.2. En tilbagesvaler tilpasset til den koniske kolbe med en prop
 - 4.1.3. En glidestang igennem tilbagesvalerens midterør forsynet med en krog i den nederste ende. En klemme til at fastholde stangen med
 - 4.1.4. En metalkurv til at hænge op på glidestangens krog (4.1.3), så den kan bære filterdiglen (4.1.5);
 - 4.1.5. En hurtigfiltrerdigle på ca. 30 ml. Maks. porestørrelse : 90 — 150 μ m (f.eks. G 1);
 - 4.1.6. Filterpapir, som passer til filterdiglen (4.1.5);
- 4.2. Varmeskab, indstillet på 38 °C.
- 4.3. 200 ml målekolber med normalslip og tilbagesvaler.
- 4.4. 100 ml målekolber med normalslib og tilbagesvaler.

5. Fremgangsmåde

5.1. Tilberedning af prøven

Prøven findes i en sådan grad, at den i sin helhed kan gå igennem en sigte med en maskevidde på 0,5 mm.

5.2. Ekstraktion

Med en nøjagtighed på 1 mg afvejes 2 g af prøven og anbringes i filterdiglen (4.1.5), hvis bund forud dækkes med et stykke filterpapir (4.1.6), fugtet med ethanol (3.1). 55 ml ethanol (3.1) hældes sammen med nogle stykker pimpsten (3.14) i den koniske kolbe (4.1.1), og filterdiglen anbringes i metalkurven (4.1.4), som ophænges på krogen af glidestangen (4.1.3). Svaleren anbringes over den koniske kolbe, og glidestangen sænkes så meget, at bunden af diglen netop berører ethanolens overflade, hvorefter stangen ved hjælp af klemmen fastgøres i denne stilling. Ethanol bringes i kog og holdes kogende i 3 timer. Derefter henstår kolben til afkøling, idet glidestanden (4.1.3) hæves, således at diglen anbringes så højt som muligt i kolben. Proppen tages forsigtigt af kolben, og man lader 45 ml vand løbe ned langs dennes inderside, hvorefter svaleren på ny anbringes over den koniske kolbe, idet filterdiglen holdes 10 cm over væskens overflade. Væsken bringes i kog og holdes kogende i 3 timer. Derefter hensættes den til afkøling, proppen tages af, og diglen fjernes fra kurven.

5.3. Enzymatisk hydrolyse og invertering

Filterdiglen anbringes i en Büchnertragt og tørres ved sugning. Ekstraktionsremanensen findes i en morter, og pulveret overføres ved hjælp af ca. 60 ml vand til en 200 ml målekolbe med normalslib. Derefter tilsættes et par dråber amylalkohol (3.2), og en tilbagesvaler anbringes over kolben. Væsken bringes i kog og holdes kogende i 1 time, hvorefter den hensættes til afkøling, og svaleren fjernes.

Der tilsættes 25 ml bufferopløsning (3.4). 250 mg pankreatin (3.12), 2,5 ml natriumchloridopløsning (3.5) og 10 dråber toluen (3.3). Kolben rystes i 2 minutter og anbringes i varmeskabet (4.2), hvor den under lejlighedsvis omrystning opbevares i 21 timer for derpå af afkøles til stuetemperatur.

Der tilsættes 5 ml Carrez I opløsning (3.6) og omrystes i 1 minut; derefter 5 ml Carrez II opløsning (3.7), fulgt af en ny omrystning på 1 minut. Der fyldes op med vand, blandes omhyggeligt og filtreres. Med pipette overføres 50 ml af filtratet til en 100 ml målekolbe (eller 100 ml filtrat til en 200 ml målekolbe). Der tilsættes et par dråber indikatoropløsning (3.11) og derpå 8 n saltsyre (3.9) indtil omslag til rødt. Derefter tilsættes yderligere 6,25 ml 8 n saltsyre (3.9) (12,50 ml hvis der arbejdes med 100 ml filtrat), og kolben forbindes med tilbagesvaleren. Opløsningen opvarmes til kogepunktet og holdes kogende i 1 time, hvorefter den afkøles, og der neutraliseres med 10 n natriumhydroxydopløsning (3.10), indtil indikatoren slår om til gult. Derpå gøres opløsningen svagt sur ved tilsætning af en smule 1 n saltsyre (3.8), og der fyldes op med vand og blandes grundigt. Glucoseindholdet bestemmes efter Luff-Schoorl-metoden, som angivet under 5.4.

5.4. *Titration efter Luff-Schoorl-metoden*

Med en pipette anbringes 25 ml af Luff-Schoorl-reagensen (3.13) i en 300 ml konisk kolbe, og der tilsættes nøjagtigt 25 ml af den efter 5.3 fremstillede opløsning, som maksimalt må indeholde 60 mg glucose. To stykker pimpsten (3.14) hældes i kolben, som under manuel omrystning opvarmes over en middelstor flamme, således at væsken i løbet af ca. 2 minutter opvarmes til kogepunktet. Derpå anbringes kolben omgående på et trådnæt med en asbestskive, hvori er udstanset et hul med en diameter på ca. 6 cm. Forinden er der under trådnettet anbragt en flamme, indstillet således, at kun bunden af den koniske kolbe opvarmes. Så forbindes kolben med en tilbagesvaler, og væsken koges i nøjagtig 10 minutter og afkøles derpå øjeblikkeligt i koldt vand. Efter ca. 5 minutters forløb titreres på følgende måde:

Først tilsættes 10 ml kaliumiodidopløsning (3.15) og umiddelbart derefter meget forsigtigt (på grund af faren for kraftig skumdannelse) 25 ml 6 n svovlsyre (3.16). Så titreres med 0,1 n natriumthiosulfatopløsning (3.17), indtil opløsningen antager en matgul farve. Endelig tilsættes et par dråber stivelsesopløsning (3.18) som indikator, og titreringen tilendebringes.

Samme titration gennemføres med en blanding af nøjagtigt 25 ml Luff-Schoorl-reagens (3.13) og 25 ml vand efter tilsætning af 10 ml kaliumiodidopløsning (3.15) og 25 ml 6 n svovlsyre (3.16), men uden forudgående opvarmning.

5.5. *Blindprøve*

Et blindforsøg, det vil sige et forsøg uden prøve, gennemføres efter den under 5.3 og 5.4 beskrevne fremgangsmåde.

6. *Beregning*

Ved hjælp af tabellen i bilaget bestemmes den glucosemængde i mg, der svarer til forskellen imellem resultaterne af de to titreringer (udtrykt i ml 0,1 n natriumthiosulfat) såvel for prøvens som for blindprøvens vedkommende.

Prøvens stivelsesindhold i procent beregnes efter formlen:

$$0,72 (a - b)$$

hvor

a = mg glucose i prøven

b = mg glucose i blindprøven (se bemærkning 7.2).

7. *Bemærkninger*

7.1. En samtidig tilstedeværelse i prøven af lactose og af stivelse, som helt eller delvis er omdannet til dekstrin, kan føre til, at det beregnede stivelsesindhold ligger 0,5 — 3 % for højt. I sådanne tilfælde bestemmes det virkelige stivelsesindhold på følgende måde:

- Først bestemmes indholdet af reducerende sukkerarter i den efter 5.2 udvundne ethanol-ekstrakt, og resultatet udtrykkes i procent glucose.
- Dernæst bestemmes prøvens indhold af vandopløselige reducerende sukkerarter, ligeledes udtrykt i procent glucose.
- Det under a) opnåede resultat trækkes fra det under b) opnåede, og forskellen multipliceres med 0,9.
- Den under c) fremkomne værdi trækkes fra det resultat, som opnåedes ved beregningen af stivelsesindholdet efter den under 6. angivne metode.

7.2. Glucosemængden ligger for blindprøvens vedkommende normalt på 0,25 mg og må ikke overstige 0,50 mg.

8. *Forskrifter vedrørende pankreatin*

Tilstandsform: Gullig-hvidt amorft pulver.

Glucoseindhold: Glucosemængden for blindprøven (se 5.5) ligger normalt på 0,25 mg. Resultater på over 0,50 mg betyder, at pankreatinen ikke længere er anvendelig.

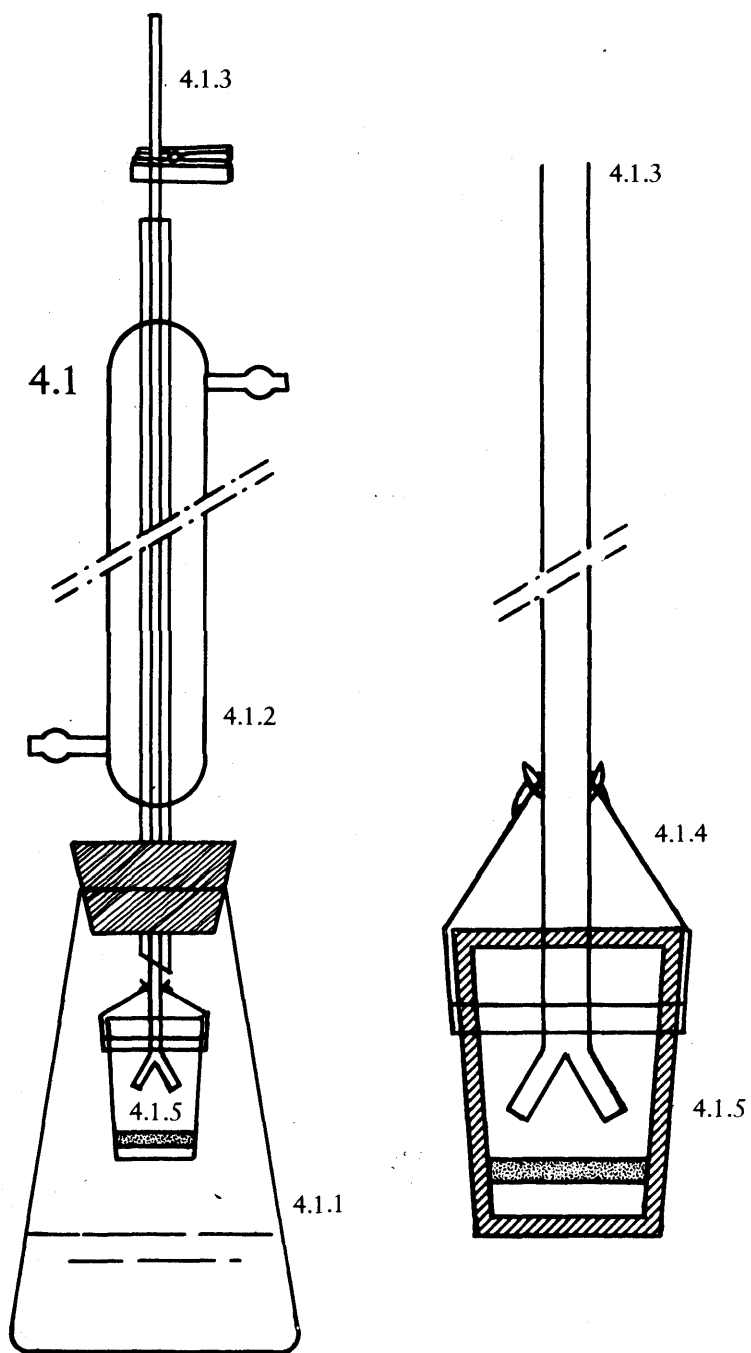
Kontrolprøve med hensyn til iodforbrug: 62,5 mg pankreatin opslemmes i ca. 50 ml vand ved en temperatur på 25 — 30 °C. Der tilsættes 1 ml 0,1 n iodopløsning og omrøres i 2 minutter. Derpå titreres med 0,1 n natriumthiosulfatopløsning efter tilsætning af stivelsesindikator. Pankreatinens forbrug af 0,1 n iodopløsning må ikke overstige 0,5 ml.

Kontrolprøve med hensyn til amylytisk reaktion: 100 ml stivelsesopløsning (3.18), 5 ml bufferopløsning (3.4) og 0,5 ml natriumchloridopløsning (3.5) blandes med 62,5 mg pankreatin, og blandingen opvarmes til 25 — 30 °C under samtidig omrøring i 2 minutter. Så tilsættes 1 ml 0,1 n iodopløsning. Den blå farve skal være forsvundet senest 15 minutter efter tilsætningen af iodopløsningen.

Tabel for 25 ml Luff-Schoorl-reagens

ml 0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ved 2 minutters opvarmning og 10 minutters kogning

0,1 n Na ₂ S ₂ O ₃	Glucose, fructose, invertsukker C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		0,1 n Na ₂ S ₂ O ₃
ml	mg	differens	mg	differens	mg	differens	ml
1	2,4		3,6		3,9		1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	3,9	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	4,0	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	3,9	6
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,8	59,8	4,1	15
16	41,3	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1	17
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2	18
19	50,0	2,9	71,7	4,0	76,5	4,3	19
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4	20
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6	23



BILAG II

1. BESTEMMELSE AF AMPROLIUM

/1-(4-amino-2-propyl-5-pyrimidylmethyl)-2-picoliniumchlorid-hydrochlorid/

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme amproliumindholdet i foderstoffer, koncentreter og forblandinger. Den mindste mængde, der kan bestemmes, er 40 ppm.

2. Princip

Prøven ekstraheres med fortyndet methanol. Ekstrakten renses på en søjle af aluminiumoxyd og behandles med en methanolopløsning af 2,7-dihydroxynaphthalen, kaliumferricyanid, kaliumcyanid og natriumhydroxyd. Der fremkommer en purpurfarvning, og amproliumindholdet bestemmes spektrofotometrisk ved 530 nm.

3. Reagenser

- 3.1. Methanol p.a.
- 3.2. Fortyndet methanol: 2 dele methanol (3.1) blandes med 1 del vand.
- 3.3. 0,2 % (vægt) opløsning af kaliumferricyanid p.a., $K_3Fe(CN)_6$. Denne opløsning kan holde sig i to uger.
- 3.4. 1 % (vægt) opløsning af kaliumcyanid p.a. Opløsningen kan holde sig i to uger.
- 3.5. 1,125 % (vægt) opløsning af natriumhydroxyd p.a.
- 3.6. Methanolisk natriumhydroxydopløsning: 15 ml af (3.5)-opløsningen fyldes op med methanol til 200 ml.
- 3.7. 0,0025 % (vægt) opløsning af 2,7-dihydroxynaphthalen: 25 mg 2,7-dihydroxynaphthalen p.a. opløses i methanol (3.1), og der fyldes op med methanol (3.1) til 1000 ml.
- 3.8. Farvereagens: 90 ml 2,7-dihydroxynaphthalenopløsning (3.7) blandes i en 250 ml konisk kolbe (4.1) med 5 ml kaliumferricyanidopløsning (3.3).
Derpå tilsættes 5 ml kaliumcyanidopløsning (3.4), hvorefter kolben tilproppes og rystes grundigt. Herefter lader man kolben henstå i 30 — 35 minutter for til slut at tilsætte 100 ml methanolopløsning af natriumhydroxyd (3.6), blande godt og filtrere på en filtrerdigel (4.3). Dette reagens må anvendes i maksimalt 75 minutter efter filtreringen.
- 3.9. Aluminiumoxyd til søjlechromatografi. Umiddelbart forud for anvendelsen rystes 100 g aluminiumoxyd med 500 ml vand i 30 minutter, filtreres og vaskes tre gange med 50 ml methanol (3.1) pr. gang, tørres ved sugning, henstår natten over og vakuumtørres i 2 timer ved 100 °C for til slut af afkøles i en eksikkator. Aluminiumoxydet efterprøves ved at analysere kendt mængde standardopløsning (3.11) efter den beskrevne fremgangsmåde, begyndende ved punkt 5.2 Genfindelsesprocenten for amprolium skal være 100 % $\pm$ 4 %.
- 3.10. Standardsubstans: rent amprolium, som udviser følgende karakteristiske egenskaber: Smeltepunkt (sønderdeling): 248 °C.
Molekylær lysabsorptionskoefficient ved både 265 og 235 nm i destilleret vand: 11.0×10^3 .
- 3.11. Standardopløsning: 50 mg standardsubstans (3.10) afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg og opløses i fortyndet methanol (3.2) i en 500 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med opløsningsmiddel og blandes omhyggeligt. 10 ml af blandingen overføres til en målekolbe, fyldes op til 50 ml med fortyndet methanol (3.2) og blandes grundigt. 1 ml af denne opløsning indeholder 20 µg amprolium.

4. Apparat

- 4.1. 50 ml, 250 ml og 500 ml koniske kolber med sleben glasprop.
- 4.2. Rysteapparat.
- 4.3. Fitrerdigel, porøsitet G 3, diameter: 60 mm.
- 4.4. Chromatografirør af glas (indvendig diameter: 9 mm, længde: 400 — 500 mm).
- 4.5. Centrifuge og 25 ml centrifugeglas med sleben prop.
- 4.6. Spektrofotometer med 10 mm kuvetter.

5. Fremgangsmåde

5.1. Ekstraktion og rensning

5.1.1. Foderstoffer og forblandinger

Med en nøjagtighed på 1 mg afvejes 10 g omhyggeligt findelt og homogeniseret prøvemateriale. (Forblandinger afvejes med en nøjagtighed på 1 mg i mængder på 3 — 6 g). Prøvematerialet hældes i en 250 ml konisk kolbe (4.1), og der tilsættes nøjagtig 100 ml fortyndet methanol (3.2). Derpå omrystes i 60 minutter og filtreres. Om nødvendigt fortyndes med fortyndet methanol (3.2) for at få en opløsning, som indeholder 5 — 15 µg amprolium pr. ml.

I et chromatografirør (4.4), som i bunden er forsynet med en vatprop, hældes 5 g aluminiumoxyd (3.9) 25,0 ml ekstrakt sættes på søjlen. De første 5 ml, som løber igennem, kasseres, og de næste 12 ml opsamles i et måleglas.

5.1.2. Koncentrater

Med en nøjagtighed på 1 mg afvejes 0,5 g omhyggeligt findelt og homogeniseret prøvemateriale og hældes i en 500 ml konisk kolbe (4.1). Der tilsættes nøjagtig 250 ml fortyndet methanol (3.2), omrystes i 60 minutter og filtreres. 5,0 ml af filtratet overføres til en målekolbe og fyldes op til 200 ml med fortyndet methanol (3.2).

5.2. Farveudvikling og måling af lysabsorption

5,0 ml af den under 5.1.1 eller 5.1.2 fremstillede opløsning overføres til et centrifugeglas A (4.5) og 5,0 ml fortyndet methanol (3.2) til et andet centrifugeglas B (4.5). Til hvert af glassene A og B sættes 10,0 ml farvereagens (3.8), hvorefter glassene tilproppes, omrystes og henstår i 18 minutter. Derpå centrifugeres i 3 minutter for at opnå en klar opløsning, hvorefter opløsningerne A og B dekanteres over i to 50 ml koniske kolber (4.1).

Lysabsorptionen af opløsning A måles umiddelbart herefter i et spektrofotometer ved 530 nm og med opløsning B som blindprøve. Amproliumindholdet bestemmes på grundlag af kalibreringskurven (5.3).

5.3. Kalibreringskurve

I 5 centrifugeglas (4.5) afpipetteres henholdsvis, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 5,0 ml standardopløsning (3.11). De fire første glas fyldes derpå op til 5,0 ml med fortyndet methanol (3.2). Alle 5 glas tilsættes nu 10,0 ml farvereagens (3.8), tilproppes, omrystes og henstår i 18 minutter. Derefter centrifugeres opløsningerne i 3 minutter og dekanteres over i 50 ml koniske kolber (4.1).

Opløsningernes lysabsorption måles derpå straks i spektrofotometret ved 530 nm, idet der som blindprøve benyttes en blanding af 5 ml fortyndet methanol (3.2) og 10 ml farvereagens (3.8). Kalibreringskurven optegnes nu ved at afsætte lysabsorptionsværdierne som ordinat og de tilsvarende amproliummængder i mg som abscisse.

6. Beregning

6.1. Foderstoffer og forblandinger

Amproliumindholdet i mg pr. kg prøvemateriale beregnes efter formlen:

$$\frac{A}{P} \cdot F \cdot 20\,000$$

hvor:

A = amproliummængden i mg, bestemt ved den fotometriske måling

P = prøvens vægt i gram

F = fortyndingsgraden (således som evt. anvendt under 5.1.1).

6.2. Koncentrater

Det procentisk amproliumindhold i prøvematerialet beregnes efter formlen :

$$\frac{A}{P} \cdot 200$$

hvor :

A = amproliummængden i mg, bestemt ved den fotometriske måling

P = prøvens vægt i gram.

7. Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af dobbeltbestemmelser må ikke overstige :

10 ppm i absolut værdi for et amproliumindhold på under 100 ppm ;

10 % i relativ værdi for et indhold imellem 100 og 5 000 ppm ;

500 ppm i absolut værdi for et indhold i mellem 5 000 og 10 000 ppm ;

5 % i relativ værdi for et indhold på over 10 000 ppm.

2. BESTEMMELSE AF ETHOPABAT

(methyl-4-acetamido-2-ethoxybenzoat)

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme ethopabatindholdet i foderstoffer, koncentrat og forblandinger. Den mindste mængde, der kan bestemmes, er 2 ppm.

2. Princip

Prøven ekstraheres med fortyndet methanol. Opløsningen gøres sur og ekstraheres med chloroform. Chloroformekstrakten vaskes først med en alkalisk opløsning og derefter med vand. Den rensede ekstrakt koncentrerer, og ethopabatet hydrolyseres med fortyndet saltsyre. Det således fremkomne aminoderivat diazoteres og sammenkobles med 2-aminoethyl-1-naphthylamin. Det farvede kompleks ekstraheres med butanol, og opløsningens lysabsorption måles ved 555 nm.

3. Reagenser

- 3.1. Methanol p.a.
- 3.2. 50 % (rf.) methanol : blanding af lige dele methanol (3.1) og vand.
- 3.3. Saltsyre p.a. mf. = 1,19.
- 3.4. 1/10 fortyndet saltsyre : 10,0 ml saltsyre (3.3) fyldes op med vand til 100 ml.
- 3.5. Ca. 0,3 n saltsyre : 25,0 ml saltsyre (3.3) fyldes op med vand til 1000 ml.
- 3.6. Chloroform p.a.
- 3.7. 4 % (vægt) natriumcarbonatopløsning : 40,0 g vandfrit natriumcarbonat p.a. opløses i vand, og der fyldes op med vand til 1000 ml.
- 3.8. 0,2 % (vægt) natriumnitritopløsning : 100 mg analyserent natriumnitrit p.a. opløses i vand, og der fyldes op med vand til 50 ml. Tilberedes umiddelbart før anvendelsen.
- 3.9. 1,0 % (vægt) ammoniumamidsulfonatopløsning : 500 mg amidsulfonat p.a. opløses i vand i en målekolbe, og der fyldes op med vand til 50 ml. Tilberedes umiddelbart før anvendelsen.
- 3.10. 0,2 % (vægt) 2-aminoethyl-1-naphthylaminopløsning : 100 mg 2-aminoethyl-1-naphthylamin p.a. opløses i vand i en målekolbe, og der fyldes op med vand til 50 ml. Tilberedes umiddelbart før anvendelsen.
- 3.11. Vandfrit natriumchlorid p.a.
- 3.12. n-butanol p.a.
- 3.13. Standardsubstans : rent ethopabat.
- 3.14. Standardopløsninger :
 - 3.14.1. Ethopabatopløsning på 0,040 mg/ml : 40 mg standardsubstans (3.13) afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg og opløses i fortyndet methanol (3.2) i en 100 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og blandes omhyggeligt. 10,0 ml af denne opløsning overføres til en anden målekolbe, fortyndes med methanol (3.2) til 100 ml og blandes godt. Denne opløsning kan kun holde sig i en måned.
 - 3.14.2. Ethopabatopløsning på 0,016 mg/20 ml : 5,0 ml af (3.14.1)-opløsningen fortyndes i en målekolbe med fortyndet methanol (3.2) til 250 ml og blandes grundigt. Tilberedes frisk før anvendelsen.

4. Apparatur

- 4.1. 250 ml koniske kolber med slæben prop.
- 4.2. 100 ml skilletrægte med slæben prop.
- 4.3. Rysteapparat.

- 4.4. Vakuum-rotations-fordamper med 250 ml kolber.
- 4.5. Vandbad.
- 4.6. Centrifuge og 15 ml og 50 ml centrifugeglad med normalslib og glasprop.
- 4.7. Luftkøler med normalslib.
- 4.8. Spektrofotometer med 10 mm kuvetter.

5. Fremgangsmåde

5.1. Ekstraktion

Med en nøjagtighed på 1 mg afvejes en omhyggeligt findelt og homogeniseret prøvemængde, som indeholder ca. 80 mg ethopabat. Prøven fyldes i en 250 ml konisk kolbe (4.1) og blandes med 100,0 ml fortyndet methanol (3.2), hvorefter kolben tilproppes og omrystes i 1 time på rysteapparatet (4.3). Efter bundfældelse filtreres, idet de første ml af filtratet kasseres.

5.2. Rensning

NB. De arbejdsoperationer, som er beskrevet under dette punkt, skal udføres hurtigt.

20,0 ml af den klare ekstrakt hældes i en 100 ml skilletragt (4.2), og der tilsættes 5,0 ml 1/10 fortyndet saltsyre (3.4) og 20,0 ml chloroform (3.6). Derpå omrystes først forsigtigt og dernæst kraftigt i 3 minutter. Blandingen henstår, indtil faserne er adskilt, og chloroformfasen opsamles derpå i en anden 100 ml skilletragt (4.2).

Den sure fase ekstraheres to gange med 20,0 ml chloroform (3.6) pr. gang, og chloroformekstrakterne opsamles begge i den anden skilletragt, medens den sure fase bortkastes. Chloroformopløsningen tilsættes 10 ml natriumcarbonatopløsning (3.7), omrystes i 3 minutter og henstår, indtil faserne er adskilt. Chloroformfasen opsamles i en tredje 100 ml skilletragt (4.2), og vandfasen kastes bort. Chloroformopløsningen tilsættes 10 ml natriumcarbonatopløsning (3.7), omrystes i 3 minutter og henstår, indtil faserne er adskilt.

Chloroformfasen opsamles i en fjerde 100 ml skilletragt (4.2), og vaskes to gange med 25 ml vand pr. gang. Vandfaserne hældes sammen og chloroformekstrakten overføres kvantitativt til en 250 ml kolbe (4.4). De tømte skilletragte renses med nogle ml chloroform (3.6), hvorefter vandfasen vaskes med denne chloroform. Chloroformfasen skilles fra og overføres ligeledes til 250 ml kolben.

5.3. Hydrolyse

Chloroformekstrakten inddampes ved hjælp af vakuum-rotations-fordamperen (4.4). Vandbadets temperatur skal være 50 °C. Remanensen opløses i 2-3 ml methanol (3.1) og overføres ved hjælp af to 10 ml portioner og en 5 ml portion på ca. 0,3 n saltsyre (3.5) til et 50 ml centrifugerglas (4.6). Der blandes godt og tilsættes nogle stykker pimpsten, hvorefter luftkøleren (4.7) sættes på, og glasset nedsænkes i kogende vand i 45 minutter. Til slut afkøles det under rindende vand.

5.4. Farveudvikling og måling af lysabsorption

Man tilsætter 1,0 ml natriumnitritopløsning (3.8), omryster og lader henstå i 2 minutter. Så tilsætter man 1,0 ml ammoniumsulfamatopløsning (3.9), omryster og lader henstå i 2 minutter. Derpå tilsætter man 1,0 ml 2-aminoethyl-1-naphthylaminopløsning (3.10), omryster og lader henstå i 10 minutter. Endelig tilsætter man 5,0 g natriumchlorid (3.11) og 10,0 ml n-butanol (3.12) og omryster kraftigt, indtil natriumchloridet er fuldsætndigt opløst.

Med en pipette overføres butanolfasen, som ligger øverst (øverste fase), til et 15 ml centrifugeglas (4.6) og centrifugeres. Derpå måles lysabsorptionen E_A med et spektrofotometer ved 555 nm, idet n-butanol (3.12) bruges som blindprøve.

5.5. Blindforsøg

Efter samme fremgangsmåde, begyndende ved punkt 5.2, gennemføres et blindforsøg med 20,0 ml fortyndet methanol (3.2), idet lysabsorptionen E_B måles ved 555 nm med n-butanol (3.12) som blindprøve.

5.6. Standardforsøg

Efter samme fremgangsmåde, begyndende ved punkt 5.2, gennemføres et standardforsøg med 20,0 ml standardopløsning (3.14.2), idet lysabsorptionen E_C måles ved 555 nm med n-butanol (3.12) som blindprøve.

6. Beregning

Ethopabatindholdet i prøvematerialet i mg/kg beregnes efter formlen :

$$\frac{(E_A - E_B)}{(E_C - E_B)} \cdot \frac{80}{P}$$

hvor :

E_A = lysabsorptionen for opløsningen af prøvematerialet

E_B = lysabsorptionen for blindprøveopløsningen

E_C = lysabsorptionen for standardopløsningen

P = prøvens vægt i gram.

7. Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af dobbeltbestemmelser må ikke overstige :

20 % i relativ værdi for et ethopabatindhold på under 7,5 ppm ;

1,5 ppm i absolut værdi for et indhold på mellem 7,5 og 10 ppm ;

15 % i relativ værdi for et indhold på over 10 ppm.

3. BESTEMMELSE AF DINITOLMID (DOT)

(3,5-dinitro-o-toluamid)

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af dinitolmid (DOT) i foderstoffer, koncenter og forblandinger. Nitrofuranderivater påvirker analyseresultaterne. Den mindste mængde, der kan bestemmes, er 40 ppm.

2. Princip

Prøven ekstraheres med acetonitril. Ekstrakten renses ved hjælp af aluminiumoxyd og filtreres. En alikvot del af filtratet inddampes til tørhed, og remanensen opløses i dimethylformamid og behandles med ethylendiamin, hvorved der fremkommer en purpurfarvning. Dinitolmidindholdet bestemmes spektrofotometrisk ved 560 nm.

3. Reagenser

- 3.1. 85 % (rf) acetonitril : 850 ml ren acetonitril blandes med 150 ml vand. Blandingen destilleres forud for anvendelsen, og den fraktion, der har kogepunkt imellem 75 og 77 °C, opsamlles.
- 3.2. Aluminiumoxyd til søjlechromatografi. Det opvarmes i mindst 2 timer ved 750 °C, afkøles i eksikkator og opbevares i brun glasflaske med sleben prop. Fugtes før brugen på følgende måde : i en brun glasflaske hældes 10 g aluminiumoxyd og 0,7 ml vand. Flasken lukkes hermetisk og opvarmes i 5 minutter i kogende vand under kraftig omrystning, hvorefter den afkøles under fortsat omrystning. Aluminiumoxydet efterprøves ved at en bestemt mængde standardopløsning (3.6) analyseres efter den beskrevne fremgangsmåde, begyndende med punkt 5.1. Genfindelsesprocenten for dinitolmid skal være 100 % $\pm$ 2 %.
- 3.3. 95 % (rf) N,N-dimethylformamid : 95,0 ml N,N-dimethylformamid p.a. blandes med 5,0 ml vand.
- 3.4. Ethylendiamin p.a., maksimalt vandindhold : 2,0 %.
- 3.5. Standardsubstans : 3,5-dinitro-o-toluamid, ren, med følgende egenskaber :
Smeltepunkt : 177 °C ;
Molekylær lysabsorptionskoefficient ved 248 nm i acetonitril : $13,1 \times 10^3$;
Molekylær lysabsorptionskoefficient ved 266 nm i N,N-dimethylformamid : $10,1 \times 10^3$.
- 3.6. Standardopløsning : 40 mg standardsubstans (3.5) afvejet med en nøjagtighed på 0,1 mg opløses i acetonitril (3.1) i en 200 ml målekolbe, som fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og omrystes. 20,0 ml af denne opløsning fyldes i en målekolbe med acetonitril (3.1) til 100 ml og blandes godt. 1 ml af denne opløsning indeholder 40 µg dinitolmid.

4. Apparatur

- 4.1. 250 ml konisk kolbe med normalslib.
- 4.2. Tilbagesvaler med normalslib.
- 4.3. Filtrerdigel, porøsitet G 3, diameter : 60 mm.
- 4.4. Vakuumfilter (f.eks. Witts apparat).
- 4.5. Vandbad, indstillet på 50 °C.
- 4.6. Spektrofotometer med 10 mm kuvetter.

5. Fremgangsmåde

5.1. Ekstraktion og rensning

10 g omhyggeligt findelt og homogeniseret prøvemateriale afvejes med en nøjagtighed på 1 mg. For koncenter og forblandingers vedkommende afvejes 1 g med en nøjagtighed på 1 mg. Prøven blandes i en 250 ml konisk kolbe (4.1) med 65 ml acetonitril (3.1), hvorefter kolben forbindes med en tilbagesvaler (4.2) og opvarmes på vandbad (4.5) i 30 minutter under stadig omrystning. Derefter afkøles under rindende vand, hvorpå der tilsættes 20 g aluminiumoxyd (3.2), omrystes i 3 minutter og dekanteres.

En 100 ml målekolbe anbringes i vakuumfilteret (4.4), hvorefter filtrerdiglen anbringes ovenover, og opløsningen filtreres under sugning. Bundfaldet overføres ved hjælp af nogle få ml acetonitril (3.1) til diglen under fortsat sugning. Vakuumsugning afbrydes, og remanensen opslemmes i nogle få ml acetonitril (3.1), og der suges på ny. Disse sidste operationer gentages, indtil filtratet når et rumfang på ca. 95 ml. Derpå fyldes op til 100 ml med acetonitril (3.1) og blandes omhyggeligt. Om nødvendigt fortyndes en alikvot mængde af opløsningen med acetonitril for at opnå en opløsning, som indeholder 5-15 µg dinitolmid pr. ml.

5.2. *Farveudvikling og måling af lysabsorption*

Til tre 50 ml bægerglas A, B og C afpippetteres 4,0 ml af den under 5.1 opnåede opløsning. Desuden tilsættes, *kun i bægerglas C*, 1,0 ml standardopløsning (3.6). De tre bægerglas anbringes i vandbad i et stinkskab med god ventilation, og der inddampes til tørhed i en luftstrøm. Derefter afkøles de til stuetemperatur. Til bæger A sættes nu 10,0 ml N,N-dimethylformamid, medens der til B og C sættes 2,0 ml af dette opløsningsmiddel. Man lader opløsningsmidlet virke i nogle minutter under svag omrystning, indtil bundfaldet er fuldstændig opløst. Derefter tilsættes 8,0 ml ethylendiamin (3.4) til bægrene B og C, og der blandes grundigt. Nøjagtigt 5 minutter efter tilsætningen af ethylendiamin måles lysabsorptionen af de tre opløsninger i spektrotometret (4.6) ved 560 nm, idet N,N-dimethylformamid (3.3) benyttes som blindprøve.

6. **Beregning**

Dinitolmidindholdet i prøvematerialet i mg/kg beregnes efter formlen

$$\frac{(E_B - E_A)}{(E_C - E_B)} \cdot \frac{F}{P} \cdot 1\,000$$

hvor

E_A = lysabsorption af opløsning A (blindprøve)

E_B = lysabsorption af opløsning B (prøve)

E_C = lysabsorption af opløsning C (intern standard)

P = prøvens vægt i gram

F = fortyndingsgraden (således som evt. anvendt under 5.1).

7. **Reproducerbarhed**

Forskellen imellem resultaterne af dobbeltbestemmelser må ikke overstige:

10 ppm i absolut værdi for et dinitolmidindhold på under 100 ppm;

10 % i relativ værdi for et indhold på mellem 100 og 5 000 ppm;

500 ppm i absolut værdi for et indhold på mellem 5 000 og 10 000 ppm;

5 % i relativ værdi for et indhold på over 10 000 ppm.

4. BESTEMMELSE AF NICARBAZIN

(ækvimolekylær blanding af 4,4-dinitrocarbanilid og 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidin)

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme nicarbazinindholdet i foderstoffer, koncentrater og forblandinger, som ikke indeholder mere end 5 % grønmel. Nitrofuranderivater, acetylenheptin og carba-dox påvirker analyseresultaterne. Den mindste mængde, der kan bestemmes, er 20 ppm.

2. Princip

Prøven ekstraheres med N,N-dimethylformamid. Ekstrakten renses ved søjlechromatografi på aluminiumoxyd, og nicarbazinen elueres med ethanol. Eluatet behandles med en ethanolopløsning af natriumhydroxyd, hvorved der fremkommer en gulvfarvning. Nicarbazinen bestemmes spektrofotometrisk ved 430 nm.

3. Reagenser

- 3.1. N,N-dimethylformamid p.a.
- 3.2. Aluminiumoxyd til søjlechromatografi. Det opvarmes i mindst 2 timer ved 750 °C, afkøles i eksikator og opbevares i en brun glasflaske med sleben prop. Før brugen kontrolleres aluminiumoxydet ved analyse af en bestemt mængde standardopløsning (3.8.3), begyndende ved punkt 5.2. Genfindelsesprocenten for nicarbazin skal være 100 % $\pm$ 2 %.
- 3.3. 95 % (rf) ethanol.
- 3.4. 80 % (rf) ethanol.
- 3.5. 50 % (vægt) opløsning af natriumhydroxyd p.a.
- 3.6. 1 % (vægt) opløsning af natriumhydroxyd i ethanol :
1 ml natriumhydroxydopløsning (3.5) hældes i en 50 ml målekolbe, og der fyldes op med 80 % ethanol (3.4). Tilberedes umiddelbart før anvendelsen.
- 3.7. Standardsubstans : ren nicarbazin, molekylær lysabsorptionskoefficient ved 362 nm i N,N-dimethylformamid : $37,8 \times 10^3$.
- 3.8. Standardopløsninger :
 - 3.8.1. Nicarbazinopløsning på 1,25 mg/ml : 125 mg standardsubstans (3.7) afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg og opløses i N,N-dimethylformamid (3.1) i en 100 ml målekolbe under svag opvarmning. Efter afkøling fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og blandes omhyggeligt. Skal opbevares lysbeskyttet.
 - 3.8.2. Nicarbazinopløsning på 0,125 mg/ml : 10,0 ml af (3.8.1)-opløsningen hældes i en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med N,N-dimethylformamid (3.1) og blandes grundigt.
 - 3.8.3. Nicarbazinopløsning på 0,025 mg/ml : 20,0 ml af (3.8.2)-opløsningen hældes i en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med N,N-dimethylformamid (3.1) og blandes grundigt.

4. Apparatur

- 4.1. 250 ml koniks kolbe med normalslib.
- 4.2. Tilbagesvaler med normalslib.
- 4.3. Kogende vandbad.
- 4.4. Centrifuge og 120 ml centrifugeglas.
- 4.5. Chromatografirør af glas (indvendig diameter : 25 mm, længde : 300 mm).
- 4.6. Spektrofotometret med 10 mm kuvetter.
- 4.7. Burette med inddelinger på 1/10 ml.

5. Fremgangsmåde

5.1. Ekstraktion

10 g omhyggelig findelt og homogeniseret prøvemateriale afvejes med en nøjagtighed på 1 mg. For koncentraters og forblandingers vedkommende afvejes 1 g med en nøjagtighed på 1 mg. Prøven anbringes i en 250 ml konisk kolbe (4.1), og der tilsættes nøjagtigt 100 ml N,N-

dimethylformamid (3.1) og blandes omhyggeligt. Tilbagesvaleren (4.2) sættes på, og der opvarmes i kogende vandbad (4.3) i 15 minutter under lejlighedsvis omrystning. Derefter afkøling under rindende koldt vand. Den øverste fase overføres til et centrifugeglas (4.4) og centrifugeres i ca. 3 minutter. Om nødvendigt fortyndes 25 ml af den øverste fase med N,N-dimethylformamid (3.1) for at opnå en opløsning, som indeholder 2,0-10,0 µg nicarbazin pr. ml.

5.2. *Chromatografi*

30 g aluminiumoxyd (3.2) opslemmet i N,N-dimethylformamid (3.1) hældes i et chromatografirør (4.5), og når væskenniveauet er sunket til 1 cm over aluminiumoxydsøjlen sættes 25,0 ml af ekstrakten, der er opnået under punkt 5.1, på søjlen. Man lader væsken løbe igennem, uden at søjlen må blive tør, og vasker derpå søjlen tre gange med 10 ml N,N-dimethylformamid (3.1) pr. gang. Derefter elueres med 70 ml 95 % ethanol (3.3), idet de første 10 ml af eluatet kasseres, medens resten opsamles i følgende fraktioner:

- en fraktion (a) på 5 ml;
- en fraktion (b) på 50 ml i en målekolbe;
- en fraktion (c) på 5 ml.

Det kontrolleres, at fraktionerne (a) og (c) ikke viser nogen gulfarvning ved tilsætning af natriumhydroxyd opløst i ethanol (3.6). Fraktion (b) viderebehandles som angivet under punkt 5.3.

5.3. *Farveudvikling og måling af lysabsorption*

I hver af to 25 ml målekolber A og B hældes 20,0 ml af eluatfraktion (b). Derpå tilsættes til kolbe A 5,0 ml natriumhydroxyd opløst i ethanol (3.6) og til kolbe B 5,0 ml 95 % ethanol (3.3), og begge kolber rystes grundigt.

Inden for de næste fem minutter måles de to opløsningers lysabsorption ved 430 nm, idet der som blindprøve anvendes en blanding af 20,0 ml 95 % ethanol (3.3) og 5,0 ml natriumhydroxyd opløst i ethanol (3.6).

Lysabsorptionsværdien for opløsning B trækkes fra værdien for opløsning A, og på grundlag heraf bestemmes nicarbazinmængden ud fra kalibreringskurven (5.4).

5.4. *Kalibreringskurve*

25,0 ml af standardopløsningen (3.8.3) chromatograferes som beskrevet under punkt 5.2. Eluatfraktionen (b) overføres til en burette (4.7), og i 5 målekolber a 25 ml aftappes henholdsvis 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 ml (svarende til et nicarbazinindhold på henholdsvis 0,025, 0,050, 0,075, 0,100 og 0,125 mg). Til hver kolbe tilsættes 5,0 ml ethanolopløsning af natriumhydroxyd (3.6), og der fyldes op med 95 % ethanol og omrystes.

Inden for de næste fem minutter måles opløsningernes lysabsorption ved 430 nm, idet der som blindprøve anvendes en blanding af 20,0 ml 95 % ethanol (3.3) og 5,0 ml ethanolopløsning af natriumhydroxyd (3.6).

Kalibreringskurven optegnes ved at afsættes lysabsorptionsværdierne som ordinat og de tilsvarende nicarbazinmængder i mg som abscisse.

6. *Beregning*

Nicarbazinindholdet i prøvematerialet i mg/kg beregnes efter formlen:

$$\frac{A}{P} \cdot F \cdot 10\,000$$

hvor

A = nicarbazinmængden i mg, bestemt ved fotometri;

P = prøvens vægt i gram;

F = fortyndingsgraden (således som evt. anvendt under punkt 5.1).

7. *Reproducerbarhed*

Forskellen mellem resultaterne af dobbeltbestemmelser må ikke overstige:

10 ppm i absolut værdi for et nicarbazinindhold på under 100 ppm;

10 % i relativ værdi for et indhold på mellem 100 og 5 000 ppm;

500 ppm, i absolut værdi for et indhold på mellem 5 000 og 10 000 ppm;

5 % i relativ værdi for et indhold på over 10 000 ppm.

5. BESTEMMELSE AF MENADION (K₃-VITAMIN)

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden gør det muligt at bestemme indholdet af menadion (K₃-vitamin) i foderstoffer, koncentreter og forblandinger. Den mindste mængde, der kan bestemmes, er 1 ppm.

2. Princip

Prøven ekstraheres med fortyndet ethanol, og blandingen gøres klar med en tanninopløsning og centrifugeres. Ekstrakten behandles med en natriumcarbonatopløsning, og den frigjorte menadion ekstraheres med 1,2-dichlorethan. Dichlorethanekstrakten behandles, afhængigt af menadionindholdet, enten direkte eller efter inddampning, med 2,4-dinitrophenylhydrazin opløst i ethanol og gjort sur med saltsyre. Af det dannede hydrazon opstår efter tilsætning af ammoniak i overskud et blågrønt farvekompleks, hvis lysabsorption måles ved 635 nm.

3. Reagenser

- 3.1. 96 % (rf.) ethanol.
- 3.2. ethanol (3.1) fortyndet med vand til 40 %.
- 3.3. 10 % (vægt) tanninopløsning, fremstillet af ren tannin i pulverform.
- 3.4. 1,2-dichlorethan p.a.
- 3.5. 10 % (vægt) opløsning af vandfrit natriumcarbonat p.a.
- 3.6. 37 % (vægt) saltsyre, mf. = 1,19.
- 3.7. absolut ethanol p.a.
- 3.8. 2,4-dinitrophenylhydrazin-reagens : 40 mg 2,4-dinitrophenylhydrazin p.a. opløses i ca. 40 ml kogende absolut ethanol (3.7), afkøles og overføres til en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 1 ml saltsyre (3.6) og fyldes op med absolut ethanol (3.7). Tilberedes umiddelbart før anvendelsen.
- 3.9. 25 % (vægt) ammoniakvand, mf. = 0,91.
- 3.10. Ethanol-ammoniakopløsning : blanding af lige volumendele ethanol (3.7) og ammoniakvand (3.9).
- 3.11. Standardopløsninger af menadion : 20 mg menadion (K₃-vitamin) opløses i 1,2-dichlorethan (3.4), og der fyldes op til 200 ml. Alikvote mængder af denne opløsning fortyndes med 1,2-dichlorethan (3.4) for at få en række opløsninger, hvis indhold af menadion er på mellem 2 og 10 µg/ml. Opløsningerne skal fremstilles umiddelbart før brugen.

4. Apparatur

- 4.1. Mekanisk rysteapparat.
- 4.2. Centrifuge (3 000-5 000 o/min.).
- 4.3. 100 ml og 250 ml skilletragte med sleben prop.
- 4.4. Vakuumparationsfordamper med 250 ml kolber.
- 4.5. Vandbad.
- 4.6. Spektrofotometer med 10 mm kuvetter.

5. Fremgangsmåde

NB: Alle arbejdsoperationer må foregå i dæmpet belysning, evt. ved benyttelse af apparatur af brunt glas.

5.1. Prøveudtagning

Af det omhyggeligt findelte prøvemateriale afvejes en prøve, svarende til det formodede indhold af menadion, f.eks.:

0,1-5,0 g af koncentreter og forblandinger;
20-30 g af foderstoffer.

Prøven overføres straks til en 250 ml kolbe med sleben glasprop.

5.2. *Ekstraktion*

Der tilsættes nøjagtigt 96 ml fortyndet ethanol (3.2) og omrystes mekanisk i 15 minutter ved stuetemperatur. Derpå tilsættes 4,0 ml tanninopløsning (3.3) og der blandes godt, hvorefter ekstrakten overføres til et centrifugeglas, der centrifugeres (3 000-5 000 0./min). og dekanteres.

En nøje afmålt ekstraktmængde på 20-40 ml hældes i en 250 ml skilletragt, og der tilsættes med pipette 50 ml 1,2-dichlorethan (3.4), der omrystes og tilføres med pipette 20 ml natriumcarbonatopløsning (3.5). Derpå rystes kraftigt i 30 sekunder, hvorefter dichlorethanfasen opsamles i en 100 ml skilletragt. Der tilsættes 20 ml vand, rystes i endnu 15 sekunder, hvorefter dichlorethanfasen opsamles, og vandrester fjernes med strimler af filterpapir.

For koncentraters og forblandingers vedkommende fortyndes en alikvot ekstraktmængde med 1,2-dichlorethan (3.4), så der opnås en menadionkoncentration på 2-10 µg/ml. For forstofferens vedkommende inddampes en alikvot ekstraktmængde til tørhed ved formindsket tryk og i en kvælstofatmosfære over et vandbad ved 40 °C. Remanensen behandles hurtigt med så meget 1,2-dichlorethan (3.4), at der opnås en opløsning, som indeholder 2-10 µg menadion pr. ml.

5.3. *Hydrazondannelse*

2,0 ml af dichlorethanekstrakten under punkt 5.2 anbringes i en 10 ml målekolbe og tilsættes 3,0 ml 2,4-dinitrophenylhydrazin-reagens (3.8), hvorefter kolben lukkes med en kork- eller teflonprop på en sådan måde, at enhver fordampning undgås. Blandingen opvarmes i vandbad ved 70 °C i 2 timer, afkøles og tilsættes 3,0 ml ethanol-ammoniakopløsning (3.10), blandes godt, fyldes op med absolut ethanol og blandes igen.

5.4. *Måling af lysabsorption*

Lysabsorptionen af det blågrønne farvekompleks måles på spektrofotometret ved 635 nm over for en blindprøve fremstillet ved at behandle 2,0 ml 1,2-dichlorethan (3.4) som angivet under punkt 5.3. Menadionmængden bestemmes på grundlag af en kalibreringskurve, som optegnes for hver enkelt analyserække.

5.5. *Kalibreringskurve*

2,0 ml af menadion-standardopløsningerne (3.11) behandles som angivet under punkt 5.3 og lysabsorptionen måles som beskrevet under punkt 5.4. Derpå optegnes kalibreringskurven ved at afsætte lysabsorptionsværdierne som ordinat og de tilsvarende menadionmængder i µg som abscisse.

6. *Beregning*

Prøvens menadionindhold beregnes under hensyntagen til prøvens vægt og til de fortyndingsgrader, der er arbejdet med i analysen. Resultatet udtrykkes i mg menadion pr. kg.

7. *Reproducerbarhed*

Forskellen mellem resultaterne af dobbeltbestemmelser må ikke overstige :

- 20 % i relativ værdi for et menadionindhold på under 10 ppm ;
- 2 ppm i absolut værdi for et indhold på mellem 10 og 14 ppm ;
- 15 % i relativ værdi for et indhold på mellem 14 og 100 ppm ;
- 15 ppm i absolut værdi for et indhold på mellem 100 og 150 ppm ;
- 10 % i relativ værdi for et indhold på over 150 ppm.