

**ERSTE RICHTLINIE DER KOMMISSION****vom 15. Juni 1971****zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln**

(71/250/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln <sup>(1)</sup>, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe :

Die obengenannte Richtlinie bestimmt, daß die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die auf Grund der Rechts- und Verwaltungsvorschriften festgelegten Vorschriften hinsichtlich der Beschaffenheit und der Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt werden.

Es erscheint nunmehr geboten, schnellstmöglich zu einer Festlegung aller erforderlichen Analysemethoden zu gelangen. Einen ersten Schritt sollen dabei die Methoden für die Bestimmung von Blausäure, Calcium, Carbonaten, Rohasche, in Salzsäure unlöslicher Asche, Chlor aus Chloriden, Senföl, Lactose, Kalium, Natrium, Zucker, Theobromin und Harnstoff, die Bestimmung von Alkaloiden in Lupinen und die Bestimmung der Ureaseaktivität von Sojaprodukten bilden.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN :

*Artikel 1*

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Blausäure, Calcium, Carbonaten, Rohasche, in Salzsäure unlöslicher Asche, Chlor aus Chloriden, Senföl, Lactose, Kalium, Natrium, Zucker, Theobromin und Harnstoff, an Alkaloiden in Lupinen sowie auf die Ureaseaktivität von Sojaprodukten nach den in der Anlage zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

*Artikel 2*

Die Mitgliedstaaten setzen spätestens am 1. Juli 1972 die erforderlichen Rechts- oder Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den Bestimmungen dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

*Artikel 3*

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 15. Juni 1971

*Für die Kommission**Der Präsident*

Franco M. MALFATTI

<sup>(1)</sup> ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.

## ANLAGE

## ANALYSENMETHODEN FÜR FUTTERMITTELBESTANDTEILE

## 1. EINFÜHRUNG

Die Analysemethoden für Futtermittelbestandteile gelten allgemein für alle Einzel- und Mischfuttermittel. Allerdings erfordern manche Futtermittel wegen der Besonderheit ihrer Zusammensetzung besondere, ganz auf sie zugeschnittene Analysemethoden. Derartigen Fällen wird in der Beschreibung der Methode jeweils unter „Bemerkungen“ Rechnung getragen.

Werden zwei oder mehr Methoden zur Bestimmung ein und desselben Futtermittelbestandteils angegeben, so ist die Wahl der Methode — sofern nicht anders bestimmt — dem Kontrolllaboratorium überlassen; die schließlich angewandte Methode muß jedoch im Untersuchungsattest angegeben werden.

**Vorbereitung der Analysenprobe**

Eine chemische Analyse ist *unbedingt* an einer *homogenen Probe* vorzunehmen. Hingegen können bestimmte makroskopische oder mikroskopische Bestimmungen sowie Feuchtigkeitsbestimmungen an der Probe in dem Zustand vorgenommen werden, in dem sie im Laboratorium ankommt. Um dieser doppelten Forderung Genüge zu tun, *wird die Probe in zwei Teile geteilt. Ein Teil wird unverändert gelassen; der andere wird für die chemische Analyse wie folgt vorbereitet:*

Die Probe wird entweder mit einem mechanischen Probenteiler oder, nach Ausschütten der ganzen Probe auf eine saubere und trockene Unterlage, mit der Hand geteilt. In letzterem Fall empfiehlt sich eine Viertelungsmethode, wobei nacheinander aus den jeweils sich diagonal gegenüberliegenden Vierteln entnommen wird. Schließlich wird für die Analyse ein Probenanteil von etwa 100 g entnommen und gegebenenfalls soweit zerkleinert, daß er gänzlich durch ein Rundlochsieb mit Löchern von 1 mm Durchmesser hindurchgeht. Diese Probe wird unverzüglich in ein trockenes, luftdicht verschließbares Gefäß gefüllt und das Gefäß verschlossen.

Ist die Probe sehr feucht, so ist der Feuchtigkeitsgehalt durch Vortrocknung auf 8 — 12 v. H. herabzusetzen. Hierfür ist die Probe bei angemessener Temperatur und Zeitdauer vorzutrocknen.

**Reagenzien und Geräte**

Bei der Beschreibung der einzelnen Analysemethoden werden nur besondere oder besonderen Normen entsprechende Instrumente oder Geräte namentlich angeführt. Eine Aufzählung der Geräte und Instrumente, die zum üblichen Instrumentarium eines Kontrolllaboratoriums gehören, erübrigt sich.

Ferner handelt es sich bei der Erwähnung von *Wasser* für Verdünnungen bzw. Waschungen immer um *destilliertes Wasser*, ebenso bei Erwähnung einer *Reagenz-Lösung*, ohne sonstige Angabe, immer um eine *Lösung in destilliertem Wasser*.

**Formulierung der Ergebnisse**

Das im Untersuchungsattest angegebene Ergebnis stellt den Mittelwert aus mindestens zwei Bestimmungen dar. Von besonderen Vorschriften abgesehen, wird es in Prozentanteilen der Originalprobe, wie sie im Laboratorium eintraf, angegeben. Das Ergebnis soll nicht mit mehr Ziffern angegeben werden, als es die Genauigkeit der Analysemethode zuläßt.

## 2. BESTIMMUNG VON BLAUSÄURE

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an freier und in Glykosiden gebundener Blausäure in Futtermitteln, insbesondere in Leinsaatprodukten, Tapiokamehl und bestimmten Bohnenarten.

### 2 Prinzip

Die Probe wird in Wasser aufgeschlämmt. Die Blausäure wird unter der Einwirkung von Fermenten abgespalten, im Wasserdampfstrom abdestilliert und in einem bestimmten Volumen von angesäuerter Silbernitratlösung aufgefangen. Das Silbercyanid wird abfiltriert und der Überschuß an Silbernitrat mit einer Ammoniumthiocyanatlösung zurücktitriert.

### 3. Reagenzien

- 3.1. Aufschlammung von süßen Mandeln : 20 süße, geschälte Mandeln werden in 100 ml Wasser bei 37 bis 40 °C zerkleinert. 10 ml dieser Aufschlammung werden auf Abwesenheit von abspaltbarer Blausäure entweder mit Natriumpikratpapier oder durch einen Blindversuch, wie unter 5. letzter Absatz angegeben, geprüft.
- 3.2. Natriumacetatlösung 10 v. H. (G/V), neutralisiert gegen Phenolphthalein
- 3.3. Antischaum-Emulsion (z. B. Silicon)
- 3.4. Salpetersäure, D : 1,40
- 3.5. 0,02 N Silbernitratlösung
- 3.6. 0,02 N Ammoniumthiocyanatlösung
- 3.7. Gesättigte Ammonium-Eisen (III)-Sulfatlösung
- 3.8. Ammoniaklösung, D : 0,958

### 4. Geräte

- 4.1. Brutschrank mit Thermostat, auf 38 °C eingestellt
- 4.2. Apparatur zur Wasserdampfdestillation, deren Kühler mit einem verlängerten, gebogenen Einleitungsrohr versehen ist
- 4.3. 1 000-ml-Stehkolben mit Schliffstopfen
- 4.4. Ölbad
- 4.5. Bürette mit  $\frac{1}{20}$  ml Teilung

### 5. Ausführung

20 g der Probe werden auf 5 mg genau eingewogen und in einen 1 000-ml-Stehkolben mit 50 ml Wasser und 10 ml Aufschlammung von süßen Mandeln (3.1) gebracht. Der Kolben wird verschlossen und während 16 Std. bei 38 °C im Brutschrank stehen gelassen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 80 ml Wasser, 10 ml Natriumacetatlösung (3.2) und 1 Tropfen Antischaum-Emulsion (3.3) zugesetzt.

Der Kolben wird an die Wasserdampfdestillationsapparatur angeschlossen und in einem Ölbad, das auf eine Temperatur von etwas mehr als 100 °C vorgeheizt worden ist, erhitzt. Durch einen kräftigen Wasserdampfstrom und unter leichtem Erhitzen des Ölbad werden 200 bis 300 ml abdestilliert. Das Destillat wird in einem vor Licht geschützten Erlenmeyerkolben, der genau 50 ml 0,02 N Silbernitratlösung (3.5) und 1 ml Salpetersäure (3.4) enthält, aufgefangen. Es ist zu beachten, daß das Verlängerungsrohr des Kühlers in die Silbernitratlösung taucht.

Der Inhalt des Erlenmeyerkolbens wird in einen 500-ml-Meßkolben überführt, bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und filtriert. In 250 ml des Filtrats wird der Überschuß an

Silbernitrat nach Zusatz von ca. 1 ml Ammonium-Eisen(III)-Sulfatlösung (3.7) mit 0,02 N Ammoniumthiocyanatlösung (3.6) aus der auf  $\frac{1}{20}$  ml geteilten Bürette zurücktitriert.

*Gegebenenfalls wird ein Blindversuch* nach dem beschriebenen Verfahren mit 10 ml Aufschlämmung von süßen Mandeln (3.1) ohne Analysenprobe ausgeführt.

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Wenn der Blindversuch einen Verbrauch an 0,02 N Silbernitratlösung zeigt, dann wird dieser von dem Silbernitratverbrauch des Analysenprobedestillats abgezogen.

1 ml 0,02 N  $\text{AgNO}_3$  entspricht 0,54 mg HCN. Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

#### 7. Bemerkung

Enthält die Probe eine bedeutende Menge an Sulfiden (z. B. bei Bohnen), dann bildet sich ein schwärzlicher Niederschlag von Silbersulfid, der zusammen mit dem Niederschlag von Silbercyanid abfiltriert wird. Die Bildung dieses Niederschlags verursacht einen Verbrauch an 0,02 N Silbernitratlösung, dessen Volumen von dem Volumen abzuziehen ist, das für die Berechnung des Gehaltes an HCN berücksichtigt wird. Zu diesem Zweck wird wie folgt verfahren :

Der Niederschlag auf dem Filter wird mit 50 ml Ammoniaklösung (3.8) behandelt, wobei sich Silbercyanid löst. Nach Auswaschen mit verdünnter Ammoniaklösung wird der Silbergehalt des Rückstandes bestimmt und in ml 0,02 N Silbernitratlösung umgerechnet.

Der Gehalt an HCN der Probe kann auch durch Titration des ammoniakhaltigen Filtrats nach Ansäuern mit Salpetersäure bestimmt werden.

### 3. BESTIMMUNG VON CALCIUM

#### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Gesamt-Calcium in Futtermitteln.

#### 2. Prinzip

Die Probe wird verascht, die Asche wird mit Salzsäure behandelt und das Calcium in Form von Calcium-Oxalat gefällt. Nach Auflösung des Niederschlags in Schwefelsäure wird die gebildete Oxalsäure mit Kaliumpermanganatlösung titriert.

#### 3. Reagenzien

- 3.1. Salzsäure p.a., D : 1,14
- 3.2. Salpetersäure p.a., D : 1,40
- 3.3. Schwefelsäure p.a., D : 1,13
- 3.4. Ammoniak p.a., D : 0,98
- 3.5. Kalt gesättigte Ammonium-Oxalatlösung p.a.
- 3.6. Citronensäurelösung p.a. 30 v. H. (G/V)
- 3.7. Ammoniumchloridlösung p.a. 5 v. H. (G/V)
- 3.8. Bromkresolgrünlösung 0,04 v. H. (G/V)
- 3.9. 0,1 N Kaliumpermanganatlösung

#### 4. Geräte

- 4.1. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat
- 4.2. Veraschungsschalen aus Platin, Quarz oder Porzellan
- 4.3. Glasfiltertiegel, Porosität  $G_4$

## 5. Ausführung

Etwa 5 g der Analysenprobe (oder, wenn nötig, mehr), auf 1 mg genau gewogen, werden bei 550 °C verascht. Die Asche wird in ein 250-ml-Becherglas gebracht. Danach werden 40 ml Salzsäure (3.1), 60 ml Wasser sowie einige Tropfen Salpetersäure (3.2) hinzugefügt. Man kocht auf und hält 30 Minuten lang im Sieden. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in einen 250-ml-Meßkolben übergespült und das Becherglas ausgewaschen. Anschließend wird der Meßkolben bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, umgeschüttelt und filtriert.

Je nach dem vermuteten Gehalt der Probe an Calcium wird ein aliquoter Teil, der 10 bis 40 mg Calcium enthält, in ein 250-ml-Becherglas abpipettiert, 1 ml Citronensäurelösung (3.6) und 5 ml Ammoniumchloridlösung (3.7) hinzugefügt und auf etwa 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Nach Aufkochen werden 8 bis 10 Tropfen Bromkresolgrünlösung (3.8) sowie 30 ml heiße Ammonium-Oxalatlösung (3.5) hinzugefügt. Falls ein Niederschlag entsteht, wird dieser durch Hinzufügung einiger Tropfen Salzsäure (3.1) aufgelöst.

Anschließend wird sehr langsam und unter beständigem Schütteln mit Ammoniak (3.4) neutralisiert, bis der pH-Wert etwa zwischen 4,4 und 4,6 liegt (Umschlag des Indikators). Zum Absetzen des Niederschlags wird das Becherglas 30 Minuten lang auf ein Bad mit kochendem Wasser gesetzt. Dann wird das Becherglas vom Wasserbad heruntergestellt und sein Inhalt nach einer Stunde durch einen Filtertiegel G<sub>4</sub> filtriert. Das Becherglas und der Tiegel werden mit Wasser gewaschen, bis der überschüssige Ammonium-Oxalat entfernt ist. (Die Abwesenheit von Chlorid im Waschwasser zeigt an, daß genügend ausgewaschen wurde.)

Der Niederschlag wird auf dem Filter mit 50 ml heißer Schwefelsäure (3.3) aufgelöst, der Tiegel mit heißem Wasser ausgewaschen und das Filtrat auf etwa 100 ml aufgefüllt. Nach Erwärmen auf 70 bis 80 °C wird tropfenweise mit Kaliumpermanganatlösung (3.9) titriert, bis die Farbe 1 Min. lang rosa bleibt.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

1 ml 0,1 N Permanganatlösung entspricht 2,004 mg Calcium. Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

## 7. Bemerkungen

- 7.1. Bei einem sehr geringen Calciumgehalt wird wie folgt verfahren: Der Calcium-Oxalat-Niederschlag wird durch ein aschefreies Papierfilter filtriert. Nach dem Auswaschen wird das Filter getrocknet und in einer Platinschale bei 550 °C verascht. Der Rückstand wird mit einigen Tropfen Schwefelsäure (3.3) aufgelöst, zur Trockne verdampft, nochmals bei 550 °C verascht und gewogen. Wird das Gewicht des erhaltenen Calciumsulfats = p gesetzt, so enthält der aliquote Teil der Probe  $p \times 0,2944$  Calcium.
- 7.2. Wenn das Erzeugnis nur aus Mineralstoffen besteht, dann wird die Einwaage ohne vorherige Veraschung mit Salzsäure aufgelöst. Gewisse Erzeugnisse, wie z. B. Calciumaluminiumphosphate, sind in Säuren schwer löslich. In diesem Fall führt man vor der Auflösung einen alkalischen Aufschluß wie folgt durch: In einer Platinschale wird die Probe mit etwa der fünffachen Menge einer Mischung aus gleichen Teilen Kaliumcarbonat und Natriumcarbonat gemischt. Man erhitzt vorsichtig, bis die Mischung vollständig geschmolzen ist; anschließend wird abgekühlt und mit Salzsäure aufgelöst.
- 7.3. Wenn der Gehalt an Magnesium der Probe hoch ist, wird der Oxalatniederschlag umgefällt.

## 4. BESTIMMUNG VON CARBONATEN

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Carbonaten, konventionell ausgedrückt als Calciumcarbonat, in den meisten Futtermitteln. In bestimmten Fällen (z. B. Eisencarbonat) ist jedoch eine besondere Methode anzuwenden.

## 2. Prinzip

Die Carbonate werden mit Salzsäure zersetzt; die freigesetzte Kohlensäure wird in einem graduierten Rohr aufgefangen. Das erhaltene Gasvolumen wird mit demjenigen verglichen, welches unter den gleichen Bedingungen aus einer bekannten Menge Calciumcarbonat p.a. erhalten wird.

## 3. Reagenzien

3.1. Salzsäure, D : 1,10

3.2. Calciumcarbonat p.a.

3.3. Etwa 0,1 N Schwefelsäure, mit Methylrot angefärbt.

## 4. Gerät

Apparatur nach Scheibler-Dietrich (s. Skizze) oder gleichwertiges Gerät.

## 5. Ausführung

Je nach dem Carbonatgehalt der Probe wird eine Einwaage wie folgt eingewogen :

0,5 g bei Erzeugnissen mit 50 bis 100 v. H. Carbonaten, ausgedrückt als Calciumcarbonat ;

1 g bei Erzeugnissen mit 10 bis 50 v. H. Carbonaten, ausgedrückt als Calciumcarbonat ;

2 g bis 3 g bei anderen Erzeugnissen.

Man bringt die Einwaage in die Spezialflasche (4) der Apparatur, die mit einem Röhrchen aus unzerbrechlichem Material versehen ist, das 10 ml Salzsäure (3.1) enthält, und schließt an die Apparatur an. Dann dreht man den Drei-Weg-Hahn (5) so, daß das Rohr (1) mit der Außenluft in Verbindung steht. Mit dem beweglichen Rohr (2), das mit ausgefärbter Schwefelsäure (3.3) gefüllt und mit dem graduierten Rohr (1) verbunden ist, wird das Niveau der Flüssigkeit auf den Nullpunkt der Skala eingestellt. Der Hahn (5) wird so gedreht, daß das Rohr (1) mit dem Rohr (2) verbunden ist, dann wird der Nullpunkt kontrolliert.

Nun läßt man langsam durch Neigen der Flasche (4) die Salzsäure auf die Substanz fließen und gleicht den Druck durch Senken des Rohres (2) aus. Man bewegt die Flasche (4) so lange hin und her, bis die Kohlensäureentwicklung ganz aufgehört hat.

Der Druckausgleich erfolgt, indem die Flüssigkeit in den Rohren (1) und (2) auf gleiches Niveau gebracht wird. Bevor abgelesen wird, wartet man *einige Minuten*, bis das Volumen konstant bleibt.

Ein Vergleichsversuch mit 0,5 g Calciumcarbonat (3.2) wird unter denselben Bedingungen durchgeführt.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

Der Gehalt an Carbonaten, ausgedrückt als Calciumcarbonat, in g pro Hundertteilen der Probe wird durch folgende Formel berechnet :

$$\frac{V \cdot 100}{T \cdot 2P}$$

wobei : V = ml CO<sub>2</sub> entwickelt aus der Einwaage,

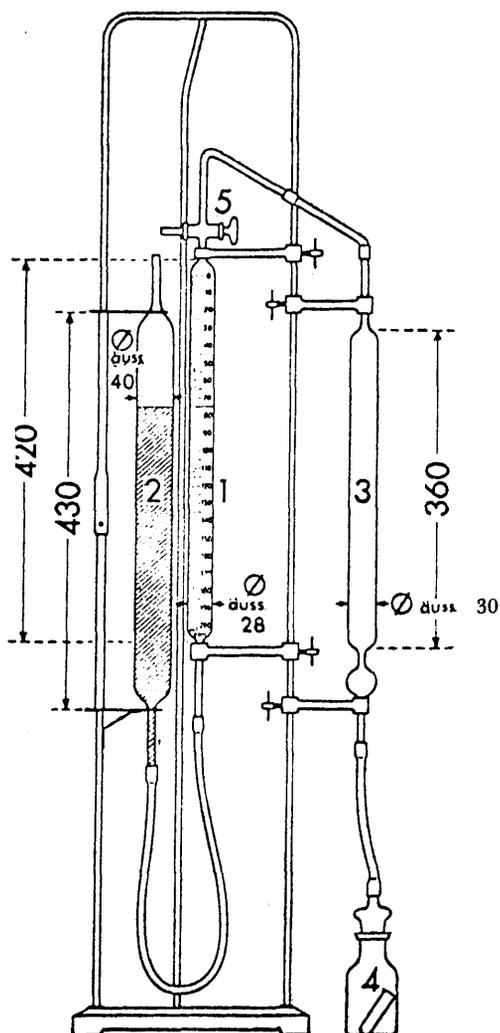
T = ml CO<sub>2</sub> entwickelt aus 0,5 g CaCO<sub>3</sub> p.a.,

P = Gewicht der Einwaage in g.

### 7. Anmerkungen

- 7.1. Wenn die Einwaage mehr als 2 g beträgt, bringt man vorher 15 ml destilliertes Wasser in die Flasche (4) und mischt den Inhalt vor Beginn des Versuchs. Man fügt dasselbe Wasservolumen bei dem Vergleichsversuch zu.
- 7.2. Wenn man einen Apparat benutzt, dessen Volumen von demjenigen von Scheibler-Dietrich abweicht, muß man die Einwaage, die Vergleichsmenge und die Berechnung entsprechend anpassen.

### APPARATUR NACH SCHEIBLER-DIETRICH ZUR BESTIMMUNG VON CO<sub>2</sub>



Maßstab: 1/8

(Messungen in mm)

## 5. BESTIMMUNG VON ROHASCHE

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Rohasche in Futtermitteln.

### 2. Prinzip

Die Probe wird bei 550 °C verascht ; der Rückstand wird gewogen.

### 3. Reagenzien

Ammoniumnitratlösung 20 v. H. (G/V).

### 4. Geräte

4.1. Heizplatte

4.2. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat

4.3. Veraschungsschalen aus Platin oder Platin-Gold-Legierung (10 v. H. Pt, 90 v. H. Au), rechteckig ( $60 \times 40 \times 25$  mm) oder kreisförmig (Durchmesser : 60 bis 75 mm, Höhe : 20 bis 25 mm).

### 5. Ausführung

Etwa 5 g (2,5 g bei Stoffen, die zur Blasenbildung neigen) der Probe werden auf 1 mg genau in eine vorher geglähte und tarierte Veraschungsschale eingewogen. Die Schale wird auf der Heizplatte allmählich bis zum Verkohlen des Stoffes erhitzt. Die Schale wird dann in den auf  $550\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  eingestellten Muffelofen gebracht und darin so lange gehalten, bis man eine weiße, hellgraue oder rötliche Asche erhält, die offensichtlich frei von Kohlepartikeln ist. Dann wird die Schale in einen Exsikkator gestellt und nach dem Abkühlen unmittelbar gewogen.

### 6. Berechnung der Ergebnisse

Das Gewicht des Rückstandes wird berechnet, indem das Leergewicht abgezogen wird. Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

### 7. Bemerkungen

7.1. Bei *schwer zerstörbaren Stoffen* werden der abgekühlten Rohasche einige Tropfen 20 v. H. Ammoniumnitratlösung nach einer Veraschung von mindestens 3 Std. zugefügt (jedoch mit Vorsicht, um ein Zerstäuben und Ankleben der Asche zu vermeiden). Nach Trocknung im Trockenschrank wird die Veraschung weitergeführt. Die Operation wird gegebenenfalls bis zur vollständigen Veraschung wiederholt.

7.2. Bei Stoffen, die der unter 7.1 beschriebenen Behandlung widerstehen, ist wie folgt vorzugehen. Nach einer Veraschung von 3 Std. wird die Asche mit heißem Wasser aufgenommen und durch ein kleines aschefreies Filter abfiltriert. In der ursprünglichen Schale werden Filter und dessen Inhalt verascht. Das Filtrat wird in die abgekühlte Schale gebracht, zur Trockne eingedampft, verascht und gewogen.

7.3. Bei *Ölen und Fetten* wird eine Einwaage von etwa 25 g in einer Schale entsprechender Abmessung genau gewogen. Es wird dann durch Anzünden des Stoffes mit einem Streifen aus aschefreiem Filterpapier verkohlt. Nach der Verkohlung wird mit einer eben ausreichenden Menge Wasser angefeuchtet. Anschließend wird getrocknet und wie unter 5. angegeben zu Ende geführt.

## 6. BESTIMMUNG VON IN SALZSÄURE UNLÖSLICHER ASCHE

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an in Salzsäure unlöslichen, mineralischen Bestandteilen der Futtermittel. Abhängig von der Art der Probe sind zwei Verfahren vorgesehen.

- 1.1. *Verfahren A*: anzuwenden bei organischen Einzelfuttermitteln und bei den meisten Mischfuttermitteln ;
- 1.2. *Verfahren B*: anzuwenden bei Mineralstoffen und Mineralstoffmischungen sowie bei allen Mischfuttermitteln, die nach Verfahren A einen Gehalt an in Salzsäure unlöslicher Asche von mehr als 1 v. H. ergeben haben.

### 2. Prinzip

- 2.1. *Verfahren A*: Die Probe wird verascht, die Asche in Salzsäure zum Sieden gebracht und der unlösliche Rückstand abfiltriert und gewogen.
- 2.2. *Verfahren B*: Die Probe wird mit Salzsäure behandelt. Die Lösung wird abfiltriert, der Rückstand wird verascht und die Asche wird dann weiter behandelt, wie unter Verfahren A beschrieben.

### 3. Reagenzien

- 3.1. 3 N Salzsäure
- 3.2. Trichloressigsäurelösung 20 v. H. (G/V)
- 3.3. Trichloressigsäurelösung 1 v. H. (G/V)

### 4. Geräte

- 4.1. Heizplatte
- 4.2. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat
- 4.3. Veraschungsschalen aus Platin oder Platin-Gold-Legierung (10 v. H. Pt, 90 v. H. Au), rechtwinklig (60 × 40 × 25 mm) oder kreisförmig (Durchmesser: 60 bis 75 mm, Höhe: 20 bis 25 mm).

### 5. Ausführung

#### 5.1. *Verfahren A*

Die Einwaage wird unter den Bedingungen, die für die Bestimmung der Rohasche beschrieben sind, verascht. Es kann auch die bei der Rohaschebestimmung erhaltene Asche verwendet werden.

Die Asche wird in ein Becherglas von 250 ml bis 400 ml Inhalt mit 75 ml 3 N Salzsäure (3.1) überführt. Man erhitzt vorsichtig zum Sieden und kocht 15 Min. gelinde weiter. Die Lösung wird heiß durch ein aschefreies Papierfilter filtriert und der Rückstand mit heißem Wasser bis zum Ausbleiben der sauren Reaktion ausgewaschen. Das Filter mit Rückstand wird nach dem Trocknen bei einer Temperatur von mindestens 550 °C und höchstens 700 °C in einer tarierten Veraschungsschale verascht. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wird gewogen.

#### 5.2. *Verfahren B*

5 g der Analysenprobe werden auf 1 mg genau eingewogen und in ein 250-ml- bis 400-ml-Becherglas gebracht. Man fügt nacheinander 25 ml Wasser und 25 ml 3 N Salzsäure (3.1) hinzu, schwenkt um und wartet bis zum Nachlassen des Aufbrausens. Dann gibt man weitere 50 ml 3 N Salzsäure (3.1) hinzu. Nach dem Nachlassen der eventuell erneut auftretenden Gasentwicklung stellt man das Becherglas 30 Min. lang in ein siedendes Wasserbad oder, wenn notwendig, länger, bis die vollständige Hydrolyse eventuell vorhandener Stärke eingetreten ist.

Man filtriert heiß durch ein aschefreies Filter und wäscht mit etwa 50 ml heißem Wasser aus (s. Bemerkung 7). Man bringt das Filter mit Rückstand in eine Veraschungsschale, trocknet und verascht bei einer Temperatur von mindestens 550 °C und höchstens 700 °C. Die Asche wird in ein 250-ml- bis 400-ml-Becherglas mit 75 ml 3 N Salzsäure (3.1) überführt und weiter verfahren wie in 5.1 Absatz 2.

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Das Gewicht des Rückstandes wird berechnet, indem das Leergewicht abgezogen wird. Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

#### 7. Bemerkung

Wenn die Filtration Schwierigkeiten bereitet, so wird die Bestimmung wiederholt. Hierbei werden an Stelle von 50 ml 3 N Salzsäure 50 ml Trichloressigsäurelösung 20 v. H. (3.2) zugegeben und das Filter mit einer heißen Trichloressigsäurelösung 1 v. H. (3.3) ausgewaschen.

### 7. BESTIMMUNG VON CHLOR AUS CHLORIDEN

#### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Chlors aus wasserlöslichen Chloriden, konventionell ausgedrückt als Natriumchlorid. Sie ist bei allen Futtermitteln anwendbar.

#### 2. Prinzip

Die Chloride werden in Wasser gelöst. Handelt es sich um Erzeugnisse, die organische Stoffe enthalten, wird eine Klärung vorgenommen. Die Lösung wird mittels Salpetersäure schwach angesäuert, und die Chloride werden mit einer Silbernitrat-Lösung als Silberchlorid gefällt. Der Silbernitrat-Überschuß wird mit einer Ammoniumthiocyanatlösung nach Methode Volhard zurücktitriert.

#### 3. Reagenzien

- 3.1. 0,1 N Ammoniumthiocyanatlösung
- 3.2. 0,1 N Silbernitratlösung
- 3.3. Gesättigte Ammonium-Eisen(III)-Sulfatlösung
- 3.4. Salpetersäure, D : 1,38
- 3.5. Diäthyläther p.a.
- 3.6. Aceton p.a.
- 3.7. Carrez-Lösung I : 24 g Zinkacetat,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.
- 3.8. Carrez-Lösung II : 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat (II),  $\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.
- 3.9. Aktivkohle p.a., chloridfrei und keine Chloride adsorbierend.

#### 4. Gerät

Mechanischer Schüttelapparat, ungefähr 35 bis 40 U/Min.

#### 5. Ausführung

##### 5.1. Herstellung der Lösung

Je nach der Art der Probe wird, wie unter 5.1.1, 5.1.2 oder 5.1.3 beschrieben, eine Lösung hergestellt.

Im Vergleich muß ein Blindversuch ohne Analysenprobe durchgeführt werden.

5.1.1. *Probe, frei von organischen Stoffen*

Eine Menge (nicht mehr als 10 g) der Analysenprobe mit einem Gehalt von höchstens 3 g Chlor in Form von Chloriden wird auf 1 mg genau abgewogen und in einen 500-ml-Meßkolben mit 400 ml Wasser von etwa 20 °C gebracht. Dann wird 30 Min. lang in dem Schüttelapparat rotiert, bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und filtriert.

5.1.2. *Probe, die organische Stoffe enthält, mit Ausnahme von den in 5.1.3 angeführten*

5 g der Analysenprobe werden auf 1 mg genau eingewogen und mit 1 g Aktivkohle in einen 500-ml-Meßkolben gebracht. Hierzu werden 400 ml Wasser von etwa 20 °C und 5 ml Carrez-Lösung I (3.7) gegeben, umgeschüttelt und 5 ml Carrez-Lösung II (3.8) zugesetzt. Dann wird 30 Min. lang in dem Schüttelapparat rotiert, bis zur Marke aufgefüllt, gemischt und filtriert.

5.1.3. *Backfutter, Leinkuchen und Leinmehl, Erzeugnisse mit einem hohen Leinmehlgehalt oder sonstige Erzeugnisse mit einem hohen Gehalt an Pflanzenschleim oder kolloidalen Stoffen (z. B. verkleisterte Stärke)*

Die Lösung wird wie unter 5.1.2 beschrieben zubereitet, ausgenommen das Filtrieren. Es wird dekantiert (falls erforderlich, zentrifugiert); dann werden 100 ml des oberen Teils der Lösung in einen 200-ml-Meßkolben pipettiert. Es wird mit Aceton (3.6) zunächst gemischt und sodann mit Aceton bis zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert.

5.2. *Titration*

25 bis 100 ml des Filtrats (je nach dem zu erwartenden Chlorgehalt), das nach 5.1.1, 5.1.2 oder 5.1.3 erhalten wurde, werden in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Die aliquote Menge darf nicht mehr als 150 mg Chlor (Cl) enthalten. Falls erforderlich, wird mit Wasser auf mindestens 50 ml verdünnt. Dann werden 5 ml Salpetersäure (3.4), 20 ml Ammonium-Eisen-Sulfatlösung (3.3) und 2 Tropfen Ammoniumthiocyanatlösung (3.1) aus einer bis zum Nullpunkt gefüllten Bürette hinzugesetzt. Anschließend wird aus einer Bürette Silbernitratlösung (3.2) zugegeben, bis ein Überschuß von 5 ml vorhanden ist. Dann werden 5 ml Diäthyläther (3.5) zugegeben und kräftig geschüttelt, um den Niederschlag zum Ausflocken zu bringen.

Der Überschuß an Silbernitrat wird mit Ammoniumthiocyanatlösung (3.1) titriert, bis eine rotbraune Farbe auftritt, die eine Min. beständig ist.

6. **Berechnung**

Die Menge Chlor (p), ausgedrückt als Natriumchlorid, die in dem Volumen des für die Titration entnommenen Filtrats vorhanden ist, wird nach folgender Formel berechnet :

$$p = 5,845 (V_1 - V_2) \text{ mg}$$

wobei :  $V_1$  = ml der zugegebenen 0,1 N Silbernitratlösung,

$V_2$  = ml der 0,1 N Ammoniumthiocyanatlösung, die für die Titration verbraucht werden.

Falls der Blindversuch einen Verbrauch an 0,1 N Silbernitratlösung anzeigt, wird dieser Wert von dem ( $V_1 - V_2$ ) Volumen abgezogen.

Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

7. **Bemerkungen**

7.1. Man kann auch die potentiometrische Titration anwenden.

7.2. Bei sehr fettreichen Erzeugnissen ist eine vorherige Entfettung mit Diäthyläther oder Petroläther durchzuführen.

7.3. Bei Fischmehl kann die Titration nach der Methode Mohr durchgeführt werden.

## 8. BESTIMMUNG VON SENFÖL

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an wasserdampfflüchtigen Senfölen, berechnet als Allylthiocyanat, in Kuchen von Brassica und Sinapis-Arten, sowie in senföhlhaltigen Mischfuttermitteln.

### 2. Prinzip

Die Probe wird in Wasser aufgeschlämmt. Die Senföle werden unter der Einwirkung von Fermenten abgespalten, nach Zusatz von Äthanol abdestilliert und in verdünnter Ammoniaklösung aufgenommen. Die Lösung wird mit einem bestimmten Volumen Silbernitratlösung erhitzt, abgekühlt und filtriert. Der Überschuß an Silbernitrat wird mit einer Ammoniumthiocyanatlösung zurücktitriert.

### 3. Reagenzien

- 3.1. Weiße Senfsaat (*Sinapis alba*)
- 3.2. Äthanol, 95 bis 96 v. H. (V/V)
- 3.3. Antischaum-Emulsion (z. B. Silicon)
- 3.4. Ammoniaklösung, D : 0,958
- 3.5. 0,1 N Silbernitratlösung
- 3.6. 0,1 N Ammoniumthiocyanatlösung
- 3.7. Salpetersäure, D : 1,40
- 3.8. Gesättigte Ammonium-Eisen(III)-Sulfatlösung.

### 4. Geräte

- 4.1. 500-ml-Stehkolben mit Schliffstopfen
- 4.2. Destillationsapparatur mit Kühler und Destillieraufsatz, der verhindert, daß Flüssigkeitstropfen mitgerissen werden.

### 5. Ausführung

10 g der Probe werden auf 1 mg genau eingewogen und in einem 500-ml-Stehkolben mit 2 g fein zerriebener weißer Senfsaat (3.1) (Fermentträger) und 200 ml Wasser von 20 °C versetzt. Der Kolben wird verschlossen und während 2 Std. unter häufigem Schütteln auf etwa 20 °C gehalten. Dann werden nach Zugabe von 40 ml Äthanol (3.2) und einem Tropfen Antischaum-Emulsion (3.3) etwa 150 ml abdestilliert und das Destillat in einem 250-ml-Meßkolben, der 20 ml Ammoniak enthält, aufgefangen, wobei das Ende des Kühlers in die Flüssigkeit eintauchen muß. Nach Zusatz von 50 ml 0,1 N Silbernitratlösung (3.5) (oder, wenn nötig, mehr) wird dem Meßkolben ein kleiner Trichter aufgesetzt und die Mischung 1 Std. lang auf einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. 100 ml des klaren Filtrats werden entnommen, und nach Zusatz von 5 ml Salpetersäure (3.7) und etwa 5 ml Ammonium-Eisen(III)-Sulfatlösung (3.8) wird der Überschuß an Silbernitrat mit 0,1 N Ammoniumthiocyanatlösung (3.6) zurücktitriert.

Ein *Blindversuch* wird unter Anwendung desselben Verfahrens mit 2 g fein zerriebener weißer Senfsaat ohne Analysenprobe ausgeführt.

### 6. Berechnung der Ergebnisse

Das Volumen an 0,1 N Silbernitratlösung, das im Blindversuch verbraucht wird, wird von dem Verbrauch der Analysenprobenlösung abgezogen. Der so erhaltene Wert gibt den Verbrauch in ml 0,1 N Silbernitratlösung durch das Senföl der Analysenprobe an.

1 ml 0,1 N AgNO<sub>3</sub> entspricht 4,956 mg Allylthiocyanat. Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

## 9. BESTIMMUNG VON LACTOSE

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Lactose in Futtermitteln, die mehr als 0,5 v. H. Lactose enthalten.

## 2. Prinzip

Die Zucker werden in Wasser gelöst. Die Lösung wird mit Hefe — *Saccharomyces cerevisiae* — vergoren, wobei die Lactose nicht angegriffen wird. Nach Klärung und Filtration wird der Gehalt an Lactose nach Luff-Schoorl im Filtrat bestimmt.

## 3. Reagenzien

3.1. *Saccharomyces cerevisiae*-Suspension : 25 g frische Hefe werden in 100 ml Wasser suspensiert. Im Kühlschrank ist die Suspension höchstens eine Woche lang haltbar.

3.2. Carrez-Lösung I: 24 g Zinkacetat  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$  und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

3.3. Carrez-Lösung II : 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat(II),  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$  werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

3.4. Reagenz nach Luff-Schoorl :

Unter vorsichtigem Umschwenken wird die Zitronensäurelösung (3.4.2) in die Natriumcarbonatlösung (3.4.3) gegossen, dann wird die Kupfersulfatlösung (3.4.1) hinzugefügt und zu 1 l mit Wasser aufgefüllt. Man läßt über Nacht stehen und filtriert. Die Normalität des so erhaltenen Reagenzes muß nachgeprüft werden (0,1 N Cu ; 2 N  $Na_2CO_3$ ). Der pH-Wert beträgt etwa 9,4.

3.4.1. Kupfersulfatlösung : 25 g Kupfersulfat p.a.,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , eisenfrei, werden in 100 ml Wasser gelöst.

3.4.2. Zitronensäurelösung : 50 g Zitronensäure p.a.,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , werden in 50 ml Wasser gelöst.

3.4.3. Natriumcarbonatlösung : 143,8 g Natriumcarbonat p.a., wasserfrei, werden in ungefähr 300 ml warmem Wasser gelöst. Die Lösung wird abgekühlt.

3.5. Bimssteinkörner mit Salzsäure ausgekocht, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

3.6. Kaliumjodidlösung 30 v. H. (G/V)

3.7. 6 N Schwefelsäure

3.8. 0,1 N Natriumthiosulfatlösung

3.9. Stärkelösung ; eine Aufschlammung von 5 g löslicher Stärke in 30 ml Wasser wird zu 1 l siedendem Wasser hinzugefügt und 3 Min. lang im Sieden gehalten ; dann wird abgekühlt und gegebenenfalls als Konservierungsmittel 10 mg Quecksilberjodid hinzugefügt.

## 4. Gerät

Wasserbad mit Thermostat auf 38 bis 40 °C eingestellt.

## 5. Ausführung

1 g der Probe wird auf 1 mg genau eingewogen und mit 25 bis 30 ml Wasser in einen 100-ml-Meßkolben gebracht. Der Kolben wird 30 Min. lang in kochendem Wasser stehen gelassen und danach auf etwa 35 °C abgekühlt. 5 ml Hefesuspension (3.1) werden hinzugefügt. Dann wird der Kolben umgeschüttelt, 2 Std. lang in einem Wasserbad bei 38 ° bis 40 °C stehen gelassen und danach auf etwa 20 °C abgekühlt.

Sodann werden 2,5 ml Carrez-Lösung I (3.2) hinzugefügt, es wird 30 Sek. lang geschüttelt ; dann werden 2,5 ml Carrez-Lösung II (3.3) hinzugefügt und wieder 30 Sek. lang geschüttelt ; nun wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Vom

Filtrat wird eine Menge von höchstens 25 ml, die möglichst 40 bis 80 mg Lactose enthält, in einen 300-ml-Erlenmeyerkolben abpipettiert und, wenn nötig, mit Wasser auf 25 ml ergänzt.

Es wird auf dieselbe Weise *ein Blindversuch* mit 5 ml Hefesuspension (3.1) ausgeführt.

Dann wird der Gehalt an Lactose nach Luff-Schoorl wie folgt bestimmt: Nach Zugabe von genau 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl (3.4) und von 2 Körnchen Bimsstein (3.5) wird unter Schütteln mit der Hand über freier Flamme von mittlerer Höhe erhitzt, so daß die Flüssigkeit in etwa 2 Min. zum Sieden kommt. Anschließend wird der Erlenmeyerkolben sofort auf ein Drahtnetz mit einer Asbestscheibe, in die ein Loch von etwa 6 cm Durchmesser gestanzt wurde, gestellt; vorher wird unter dem Drahtnetz eine Flamme entzündet und so eingestellt, daß der Kolben nur am Boden erhitzt wird; dann wird der Kolben mit einem Rückflußkühler verbunden. Von diesem Augenblick an läßt man genau 10 Min. sieden, kühlt dann sofort in kaltem Wasser ab und titriert nach etwa 5 Min. wie folgt:

Zu der Flüssigkeit werden 10 ml Kaliumjodidlösung (3.6) und anschließend sofort, aber vorsichtig (wegen der Gefahr des übermäßigen Schäumens), 25 ml 6 N Schwefelsäure (3.7) hinzugegeben. Dann wird mit 0,1 N Natriumthiosulfatlösung (3.8) zunächst bis zum Auftreten einer mattgelben Farbe titriert und nach Zugabe von Stärkelösung (3.9) als Indikator die Titration zu Ende geführt.

Die gleiche Titration wird in einer Mischung aus genau 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl (3.4) und 25 ml Wasser durchgeführt nach Zugabe von 10 ml Kaliumjodidlösung (3.6) und 25 ml 6 N Schwefelsäure (3.7), jedoch ohne vorheriges Erhitzen.

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der beigefügten Tabelle wird diejenige Menge Lactose in mg abgelesen, die der Differenz der Ergebnisse beider Titrationen, ausgedrückt in ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung, entspricht.

Das Ergebnis entspricht dem Gehalt an wasserfreier Lactose und wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

#### 7. Bemerkungen

Wenn mehr als 40 v. H. vergärbare Zucker vorhanden sind, werden mehr als 5 ml Hefesuspension (3.1) benutzt.

**Tabelle für 25 ml des Reagenzes nach Luff-Schoorl**  
ml 0,1 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  bei 2 Min. Anheizen, 10 Min. Sieden

0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Glukose, Fruktose, invertierter Zucker $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Lactose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
	ml	mg	Differenz	mg	Differenz	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	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	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

## 10. BESTIMMUNG VON KALIUM

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Kalium in Futtermitteln.

## 2. Prinzip

Die Probe wird verascht und die Asche in Salzsäure gelöst. Der Kaliumgehalt der Lösung wird flammenphotometrisch in Gegenwart von Caesiumchlorid und Aluminiumnitrat bestimmt. Durch den Zusatz dieser Substanzen wird eine Beeinflussung der Bestimmung durch Störelemente weitgehend verhindert.

## 3. Reagenzien

3.1. Salzsäure p.a., D : 1,12

3.2. Caesiumchlorid, p.a.

3.3. Aluminiumnitrat,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ , chemisch rein

3.5. Kaliumchlorid, p.a., wasserfrei

3.5. Pufferlösung : 50 g Caesiumchlorid (3.2) und 250 g Aluminiumnitrat (3.3) werden in Wasser gelöst, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und umgeschüttelt. Die Lösung wird in Plastikflaschen aufbewahrt.

3.6. Kalium-Standardlösung : 1,907 g Kaliumchlorid (3.4) werden in Wasser unter Zusatz von 5 ml Salzsäure (3.1) gelöst, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und umgeschüttelt. Die Lösung wird in Plastikflaschen aufbewahrt. 1 ml dieser Lösung enthält 1,00 mg Kalium.

## 4. Geräte

4.1. Veraschungsschalen aus Platin, Quarz oder Porzellan, eventuell mit Deckel

4.2. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat

4.3. Flammenphotometer

## 5. Ausführung

## 5.1. Analysengang der Probe

Im allgemeinen werden 10 g der Probe, auf 10 mg genau, in eine Veraschungsschale eingewogen und die Substanz bei 450 °C etwa 3 Std. lang verascht. Nach dem Abkühlen spült man den Veraschungsrückstand quantitativ mit etwa 250 bis 300 ml Wasser, gefolgt von 50 ml Salzsäure (3.1), in einem 500-ml-Meßkolben über. Nach Aufhören einer eventuellen Kohlendioxidentwicklung erhitzt man die Lösung und hält sie anschließend 2 Std. lang, unter gelegentlichem Umschütteln, auf einer Temperatur von etwa 90 °C. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur füllt man mit Wasser zur Marke auf, schüttelt um und filtriert. Ein aliquoter Teil des Filtrats, der höchstens 1,0 mg Kalium enthalten darf, wird in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, man gibt 10,0 ml Pufferlösung (3.5) zu, füllt mit Wasser zur Marke auf und schüttelt um. Bei höheren Kaliumgehalten muß die Analysenlösung vor Zugabe der Pufferlösung im geeigneten Verhältnis verdünnt werden. Als Richtlinie bei einer Einwaage von etwa 10 g kann die folgende Tabelle dienen :

Vermutlicher Kaliumgehalt der Probe (% K)	Verdünnungsverhältnis	Aliquoter Teil der Lösung in ml
bis 0,1	—	50
0,1 — 0,5	—	10
0,5 — 1,0	—	5
1,0 — 5,0	1 : 10	10
5,0 — 10,0	1 : 10	5
10,0 — 20,0	1 : 20	5

Die Messung erfolgt flammenphotometrisch bei einer Wellenlänge von 763 nm.

Das Ergebnis wird mit Hilfe der Eichkurve berechnet.

### 5.2. Eichkurve

10 ml der Standardlösung (3.6) werden in einen 250-ml-Meßkolben pipettiert, dann wird mit Wasser aufgefüllt und umgeschüttelt. Von dieser Lösung werden 5, 10, 15, 20 und 25 ml, entsprechend 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 mg Kalium, in 100-ml-Meßkolben pipettiert. Der Reihe wird ein 100-ml-Meßkolben ohne Zusatz von Standardlösung beigegeben. Man fügt in jedem Kolben 10,0 ml der Pufferlösung (3.5) hinzu, füllt mit Wasser zur Marke auf und schüttelt um. Die Messungen werden wie unter 5.1 durchgeführt. Der Verlauf der Eichkurve ist im allgemeinen bis zu einer Konzentration von 1 mg Kalium in 100 ml Lösung linear.

### 6. Berechnung der Ergebnisse

Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

### 7. Bemerkungen

Zusatz von Pufferlösung (3.5) zur Ausschaltung der Störelemente ist nicht immer notwendig.

## 11. BESTIMMUNG VON NATRIUM

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Natrium in Futtermitteln.

### 2. Prinzip

Die Probe wird verascht und die Asche in Salzsäure gelöst. Der Natriumgehalt der Lösung wird flammenphotometrisch in Gegenwart von Caesiumchlorid und Aluminiumnitrat bestimmt. Durch den Zusatz dieser Substanzen wird eine Beeinflussung der Bestimmung durch Störelemente weitgehend verhindert.

### 3. Reagenzien

3.1. Salzsäure p.a., D : 1,12

3.2. Caesiumchlorid, p.a.

3.3. Aluminiumnitrat,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ , chemisch rein

3.4. Natriumchlorid, p.a., wasserfrei

3.5. Pufferlösung : 50 g Caesiumchlorid (3.2) und 250 g Aluminiumnitrat (3.3) werden in Wasser gelöst, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und umgeschüttelt. Die Lösung wird in Plastikflaschen aufbewahrt.

3.6. Natrium-Standardlösung : 2,542 g Natriumchlorid (3.4) werden in Wasser unter Zusatz von 5 ml Salzsäure (3.1) gelöst, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und umgeschüttelt. Die Lösung wird in Plastikflaschen aufbewahrt. 1 ml dieser Lösung enthält 1,00 mg Natrium.

### 4. Geräte

4.1. Veraschungsschalen aus Platin, Quarz oder Porzellan, eventuell mit Deckel

4.2. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat

4.3. Flammenphotometer

### 5. Ausführung

#### 5.1. Analysengang der Probe

Im allgemeinen werden 10 g der Probe, auf 10 mg genau, in eine Veraschungsschale eingewogen und die Substanz bei 450 °C etwa 3 Std. lang verascht. Ein Überhitzen (Aufglühen) muß vermieden werden. Nach dem Abkühlen spült man den Veraschungsrückstand quantitativ mit etwa 250 bis 300 ml Wasser, gefolgt von 50 ml

Salzsäure (3.1), in einen 500-ml-Meßkolben über. Nach Aufhören einer eventuellen Kohlendioxidentwicklung erhitzt man die Lösung und hält sie anschließend 2 Std. lang, unter gelegentlichem Umschütteln, auf einer Temperatur von etwa 90 °C. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur füllt man mit Wasser zur Marke auf, schüttelt um und filtriert. Ein aliquoter Teil des Filtrats, der höchstens 1,0 mg Natrium enthalten darf, wird in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, man gibt 10,0 ml Pufferlösung (3.5) zu, füllt mit Wasser zur Marke auf und schüttelt um. Bei höheren Natriumgehalten muß die Analysenlösung vor Zugabe der Pufferlösung im geeigneten Verhältnis verdünnt werden. Als Richtlinie bei einer Einwaage von etwa 10 g kann die folgende Tabelle dienen :

Vermutlicher Natriumgehalt: der Probe (% Na)	Verdünnungsverhältnis	Aliquoter Teil der Lösung in ml
bis 0,1	—	50
0,1 — 0,5	—	10
0,5 — 1,0	—	5
1,0 — 5,0	1 : 10	10
5,0 — 10,0	1 : 10	5
10,0 — 20,0	1 : 20	5

Die Messung erfolgt flammenphotometrisch bei einer Wellenlänge von 589 nm.

Das Ergebnis wird mit Hilfe der Eichkurve berechnet.

#### 5.2. Eichkurve

10 ml der Standardlösung (3.6) werden in einen 250-ml-Meßkolben pipettiert, dann wird mit Wasser aufgefüllt und umgeschüttelt. Von dieser Lösung werden 5, 10, 15, 20 und 25 ml, entsprechend 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 mg Natrium, in 100-ml-Meßkolben pipettiert. Der Reihe wird ein 100-ml-Meßkolben ohne Zusatz von Standardlösung beigegeben. Man fügt in jeden Kolben 10,0 ml der Pufferlösung (3.5) hinzu, füllt mit Wasser zur Marke auf und schüttelt um. Die Messungen werden wie unter 5.1 durchgeführt. Der Verlauf der Eichkurve ist im allgemeinen bis zu einer Konzentration von 1 mg Natrium in 100 ml Lösung linear.

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

#### 7. Bemerkungen

- 7.1. Bei Produkten mit einem Gehalt von mehr als 4 v. H. Natrium empfiehlt es sich, die Substanz 2 Std. lang in einer mit Deckel versehenen Schale zu veraschen. Nach dem Abkühlen fügt man Wasser hinzu, verteilt den Rückstand mit Hilfe eines Platindrahts bis zur Bildung einer Suspension, trocknet und verascht nochmals 2 Std. lang in der bedeckten Schale.
- 7.2. Wenn das Produkt nur aus Mineralstoffen besteht, dann wird die Einwaage ohne vorherige Veraschung aufgelöst.

## 12. BESTIMMUNG VON ZUCKER

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung von reduzierenden Zuckern und des Gesamtzuckers nach Inversion, berechnet als Glukose oder gegebenenfalls multipliziert mit dem Faktor 0,95 als Saccharose. Sie ist anwendbar bei Mischfuttermitteln. Für andere Futtermittel sind besondere Verfahren zu beachten. Gegebenenfalls muß der Gehalt an Lactose getrennt bestimmt werden und das Ergebnis bei der Berechnung berücksichtigt werden.

## 2. Prinzip

Die Zucker werden in verdünntem Äthanol gelöst; die Lösung wird mit den Reagenzien Carrez I und II geklärt. Nach dem Verdunsten des Äthanol werden vor und nach der Inversion die Bestimmungen nach der Methode Luff-Schoorl durchgeführt.

## 3. Reagenzien

- 3.1. Äthanol 40 v.H. (V/V), D: 0,948 bei 20 °C, auf den Umschlagpunkt von Phenolphthalein eingestellt
- 3.2. Carrez-Lösung I: 24 g Zinkacetat  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$  und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt
- 3.3. Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat(II),  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$  werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt
- 3.4. Methylorangelösung 0,1 v. H. (G/V)
- 3.5. 4 N Salzsäure
- 3.6. 0,1 N Salzsäure
- 3.7. 0,1 N Natriumhydroxidlösung
- 3.8. Reagenz nach Luff-Schoorl:  
Unter vorsichtigem Umschwenken wird die Zitronensäurelösung (3.8.2) in die Natriumcarbonatlösung (3.8.3) gegossen, dann wird die Kupfersulfatlösung (3.8.1) hinzugefügt und zu 1 l mit Wasser aufgefüllt. Man läßt über Nacht stehen und filtriert. Die Normalität des so erhaltenen Reagenzes muß nachgeprüft werden (0,1 N Cu; 2 N  $Na_2CO_3$ ). Der pH-Wert beträgt etwa 9,4.
  - 3.8.1. Kupfersulfatlösung: 25 g Kupfersulfat p.a.,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , eisenfrei, werden in 100 ml Wasser gelöst.
  - 3.8.2. Zitronensäurelösung: 50 g Zitronensäure p.a.,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , werden in 50 ml Wasser gelöst.
  - 3.8.3. Natriumcarbonatlösung: 143,8 g Natriumcarbonat p.a., wasserfrei, werden in ungefähr 300 ml warmem Wasser gelöst. Die Lösung wird abgekühlt.
- 3.9. 0,1 N Natriumthiosulfatlösung
- 3.10. Stärkelösung; eine Aufschlämmung von 5 g löslicher Stärke in 30 ml Wasser wird zu 1 l siedendem Wasser hinzugefügt und 3 Min. lang im Sieden gehalten; dann wird abgekühlt und gegebenenfalls als Konservierungsmittel 10 mg Quecksilberjodid hinzugefügt.
- 3.11. 6 N Schwefelsäure
- 3.12. Kaliumjodidlösung 30 v. H. (G/V)
- 3.13. Bimssteinkörner mit Salzsäure ausgekocht, mit Wasser gewaschen und getrocknet
- 3.14. Isopentanol

## 4. Geräte

Mechanischer Schüttelapparat, ungefähr 35 bis 40 U/min.

## 5. Ausführung

### 5.1. Auflösung

2,5 g der Probe werden auf 1 mg genau in einen 250-ml-Meßkolben eingewogen. Nach Zugabe von 200 ml Äthanol (3.1) wird der Kolben 1 Std. lang im Schüttelapparat geschüttelt. Sodann werden 5 ml Carrez-Lösung I (3.2) hinzugefügt, und es wird 1 Min. lang geschüttelt; dann werden 5 ml Carrez-Lösung II (3.3) hinzugefügt und wieder 1 Min. lang geschüttelt; nun wird mit Äthanol (3.1) zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. 200 ml des Filtrats werden abpipettiert und auf ungefähr die Hälfte des Volumens eingedampft, wobei der größte Teil des Äthanol verdunstet. Der Abdampfrückstand wird mit heißem Wasser in einen 200-ml-Meßkolben übergespült, abgekühlt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und, falls erforderlich, filtriert. Diese Lösung wird für die Bestimmung der reduzierenden Zucker und nach Inversion zur Bestimmung des Gesamtzuckers verwendet.

### 5.2. *Bestimmung der reduzierenden Zucker*

Eine Menge von höchstens 25 ml der Lösung, die weniger als 60 mg reduzierende Zucker, ausgedrückt als Glukose, enthält, wird abpipettiert, falls erforderlich mit destilliertem Wasser auf 25 ml aufgefüllt und der Gehalt an reduzierendem Zucker nach Luff-Schoorl bestimmt. Das Ergebnis wird in Hundertteilen Glukose ausgedrückt.

### 5.3. *Bestimmung des Gesamtzuckers nach Inversion*

50 ml der Lösung werden in einen 100-ml-Meßkolben abpipettiert, einige Tropfen MethylorangeLösung (3.4) hinzugefügt und sodann vorsichtig unter Schütteln 4 N Salzsäure (3.5) bis zum eindeutigen Umschlag nach Rot hinzugegeben. Dann werden 15 ml 0,1 N Salzsäure (3.6) hinzugefügt, der Kolben wird 30 Min. lang in ein Bad mit kräftig siedendem Wasser gestellt, schnell auf die Temperatur von etwa 20°C abgekühlt und 15 ml 0,1 N NatriumhydroxidLösung (3.7) hinzugefügt. Der Kolben wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt, umgeschüttelt und eine Menge von höchstens 25 ml entnommen, die weniger als 60 mg reduzierende Zucker, ausgedrückt als Glukose, enthält, falls erforderlich, wird mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt und der Gehalt an reduzierenden Zuckern nach Luff-Schoorl bestimmt. Das Ergebnis wird in Hundertteilen Glukose angegeben oder gegebenenfalls nach Multiplikation mit dem Faktor 0,95 als Saccharose.

### 5.4. *Titration nach Luff-Schoorl*

25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl (3.8) werden in einen 300-ml-Erlenmeyerkolben pipettiert und anschließend genau 25 ml der geklärten Zuckerlösung hinzugefügt. Nach Zugabe von 2 Körnchen Bimsstein (3.13) wird unter Schütteln mit der Hand über freier Flamme von mittlerer Höhe erhitzt, so daß die Flüssigkeit in etwa 2 Min. zum Sieden kommt. Anschließend wird der Erlenmeyerkolben sofort auf ein Drahtnetz mit einer Asbestscheibe, in die ein Loch von etwa 6 cm Durchmesser gestanzt wurde, gestellt; vorher wird unter dem Drahtnetz eine Flamme entzündet und so eingestellt, daß der Kolben nur am Boden erhitzt wird; dann wird der Kolben mit einem Rückflußkühler verbunden. Von diesem Augenblick an läßt man genau 10 Min. sieden, kühlt dann sofort in kaltem Wasser ab und titriert nach etwa 5 Min. wie folgt:

Zu der Flüssigkeit werden 10 ml Kaliumjodidlösung (3.12) und anschließend sofort, aber vorsichtig (wegen der Gefahr des übermäßigen Schäumens), 25 ml 6 N Schwefelsäure (3.11) hinzugegeben. Dann wird mit 0,1 N Natriumthiosulfatlösung (3.9) zunächst bis zum Auftreten einer mattgelben Farbe titriert und nach Zugabe von Stärkelösung (3.9) als Indikator die Titration zu Ende geführt.

Die gleiche Titration wird in einer Mischung aus genau 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl (3.8) und 25 ml Wasser nach Zugabe von 10 ml Kaliumjodidlösung (3.12) und 25 ml 6 N Schwefelsäure (3.11) durchgeführt, jedoch ohne vorheriges Erhitzen.

## 6. **Berechnung der Ergebnisse**

Aus der beigefügten Tabelle wird diejenige Menge Glukose in mg abgelesen, die der Differenz der Ergebnisse beider Titrations, ausgedrückt in ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung, entspricht.

Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

## 7. **Besondere Verfahren**

7.1. Bei sehr stark melassehaltigen Futtermitteln und anderen wenig homogenen Futtermitteln werden 20 g in einen 1-l-Meßkolben eingewogen, 500 ml Wasser hinzugefügt und 1 Std. lang geschüttelt. Danach wird mit jeweils der vierfachen Menge der Carrez-Lösungen I (3.2) und II (3.3) wie bei 5.1 geklärt. Sodann wird mit Äthanol 80 v. H. (V/V) zur Marke aufgefüllt, gemischt und filtriert. In diesem Fall wird das Äthanol wie bei 5.1 entzogen. Bei Abwesenheit dextransierter Stärke wird mit Wasser aufgefüllt.

7.2. Bei Melasse und bei Futtermitteln, die reich an Zucker, aber praktisch stärkefrei sind (Johannisbrot, Zuckerrübenschnitzel usw.), werden 5 g in einen 250-ml-Meßkolben eingewogen, 200 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und 1 Std. lang oder, falls erforderlich, länger geschüttelt. Danach wird mit den Carrez-Lösungen I (3.2) und II (3.3) wie bei 5.1 geklärt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Zur Bestimmung des Gesamtzuckers verfährt man wie bei 5.3.

## 8. Bemerkungen

- 8.1. Es wird empfohlen, vor dem Erhitzen mit dem Luff-Schoorl-Reagenz etwa 1 ml Isopentanol (3.14) hinzuzufügen (ohne das Volumen zu berücksichtigen), um die Schaumbildung zu vermeiden.
- 8.2. Die Differenz zwischen den Hundertteilen des Gesamtzuckers, nach Inversion, ausgedrückt als Glukose, und den Hundertteilen der reduzierenden Zucker, ausgedrückt als Glukose, ergibt mit 0,95 multipliziert das Ergebnis in Hundertteilen Saccharose.
- 8.3. Wenn man den Gehalt an reduzierendem Zucker mit Ausnahme von Milchezucker (Laktose) bestimmen will, kann man zwei Wege einschlagen :
- 8.3.1. Zur annähernden Berechnung multipliziert man den aus einer getrennten Bestimmung gefundenen Gehalt an Laktose mit 0,675. Das Ergebnis wird von dem Gehalt an reduzierendem Zucker abgezogen.
- 8.3.2. Für eine genaue Berechnung des reduzierenden Zuckers mit Ausnahme von Laktose ist es aber notwendig, daß bei den beiden endgültigen Bestimmungen die gleiche Menge der Einwaage zugrunde liegt. Die eine Bestimmung wird in einem Teil der Lösung nach 5.1., die zweite Bestimmung wird in einem Teil der Lösung, die man bei der Bestimmung der Laktose nach der diesbezüglichen Methode erhält (nach Vergärung der anderen Zuckerarten und Klärung) ausgeführt.

In beiden Fällen wird der anwesende Zucker nach Luff-Schoorl bestimmt und in Milligramm Glukose berechnet. Diese beiden Werte werden voneinander abgezogen und die Differenz wird auf Hundertteile der Probe umgerechnet.

*Beispiel*

Die beiden abpipettierten Mengen entsprechen bei jeder Bestimmung einer Probeneinwaage von 250 mg.

Im ersten Fall werden 17 ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung verbraucht, entsprechend 44,2 mg Glukose, im zweiten Fall werden 11 ml verbraucht, entsprechend 27,6 mg Glukose. Die Differenz beträgt also 16,6 mg Glukose.

Der Gehalt an reduzierendem Zucker ohne Laktose, berechnet als Glukose, ist demnach : 
$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \text{ v. H.}$$

Tabelle für 25 ml des Reagenzes nach Luff-Schoorl

ml 0,1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bei 2 Min. Anheizen, 10 Min. Sieden

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

**13. BESTIMMUNG VON THEOBROMIN****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an Theobromin in Nebenerzeugnissen aus der Verarbeitung von Kakaobohnen.

**2. Prinzip**

Theobromin wird mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird zur Trockne eingedampft, in Wasser gelöst und mit einem bestimmten Volumen von Silbernitratlösung behandelt. Die freigesetzte Salpetersäure wird mit einer Natriumhydroxidlösung titriert.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Chloroform p.a.
- 3.2. Ammoniaklösung, D : 0,958
- 3.3. Natriumsulfat p.a., wasserfrei
- 3.4. 0,1 N Natriumhydroxidlösung
- 3.5. 0,1 N Silbernitratlösung
- 3.6. Äthanolische Phenolrotlösung 1 v. H. (G/V)
- 3.7. Diäthyläther

**4. Gerät**

500-ml-Stehkolben mit Schliffstopfen

**5. Ausführung**

Eine Einwaage von höchstens 10 g, die auf 1 mg genau abgewogen ist und nicht mehr als 80 mg Theobromin enthält, wird in einen 500-ml-Stehkolben mit Schliffstopfen gegeben. 270 ml Chloroform (3.1) und 10 ml Ammoniaklösung (3.2) werden hinzugefügt. Der Kolben wird verschlossen und 5 Min. lang kräftig geschüttelt. Dann werden 12 g wasserfreies Natriumsulfat (3.3) hinzugefügt, nochmals geschüttelt und bis zum nächsten Morgen stehengelassen. Dann wird in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben abfiltriert und der Rückstand mit 100 ml Chloroform (3.1) gewaschen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und die letzten Spuren auf einem kochenden Wasserbad beseitigt. Der Extrakt wird mit 50 ml Wasser versetzt und aufgeköcht.

Nach dem Abkühlen wird mit Natriumhydroxidlösung (3.4) nach Zusatz von 0,5 ml Phenolrotlösung (3.6) genau neutralisiert und 20 ml Silbernitratlösung (3.5) zugegeben. Die freigesetzte Salpetersäure wird mit Natriumhydroxidlösung (3.4) bis zum Umschlag des Indikators (pH 7,4) titriert.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

1 ml 0,1 N NaOH entspricht 18 mg Theobromin.

Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

**7. Bemerkung**

Produkte, deren Rohfettgehalt 8 v. H. übersteigt, sind durch eine 6 Std. lange Extraktion mit Petroläther (Kp. 40 °C) zu entfetten.

## 14. BESTIMMUNG VON HARNSTOFF

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehaltes an Harnstoff in Futtermitteln.

## 2. Prinzip

Die Probe wird unter Zusatz eines Klärungsmittels mit Wasser geschüttelt. Die Suspension wird filtriert. Nach Zugabe von 4-Dimethylaminobenzaldehyd (4-DMAB) wird der Gehalt an Harnstoff im Filtrat durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt.

## 3. Reagenzien

- 3.1. 4-Dimethylaminobenzaldehydlösung: 1,6 g 4-DMAB werden in 100 ml Äthanol p.a. 96 v. H. gelöst und 10 ml Salzsäure p.a. (D : 1,19) hinzugefügt. Das Reagenz hält sich nur zwei Wochen.
- 3.2. Carrez-Lösung I: 24 g Zinkacetat  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.
- 3.3. Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat (II),  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.
- 3.4. Aktivkohle p.a., keinen Harnstoff adsorbierend (zu prüfen).
- 3.5. Harnstofflösung p.a. 0,1 v. H. (G/V).

## 4. Geräte

- 4.1. Mechanischer Schüttelapparat, ungefähr 35 bis 40 U/Min.
- 4.2. Reagenzgläser:  $160 \times 16$  mm, mit Schliffstopfen
- 4.3. Spektralphotometer

## 5. Ausführung

5.1. *Analysengang der Probe*

2 g der Probe werden auf 1 mg genau eingewogen und mit 1 g Aktivkohle (3.4) in einen 500-ml-Meßkolben gebracht. Hierzu werden 400 ml Wasser und je 5 ml Carrez-I- und -II-Lösungen (3.2) (3.3) gegeben und 30 Min. lang in dem Schüttelapparat rotiert. Dann wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Von den klaren und farblosen Filtraten werden je 5 ml in je ein Reagenzglas mit Schliffstopfen pipettiert, 5,0 ml 4-DMAB-Lösung (3.1) zugesetzt und gemischt. Die Gläser werden in einem Wasserbad bei 20 °C temperiert. Nach 15 Min. wird die Extinktion der Probelösung im Vergleich mit der Blindprobelösung der Reagenzien im Spektralphotometer bei 420 nm gemessen.

5.2. *Eichkurve*

Volumen von 1, 2, 4, 5 und 10 ml Harnstofflösung (3.5) werden entnommen, in 100-ml-Meßkolben gebracht und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. 5 ml jeder Lösung werden mit je 5 ml 4-DMAB-Lösung (3.1) gemischt. Die Extinktion wird im Vergleich mit einer Lösung, frei von Harnstoff, die 5 ml 4-DMAB und 5 ml Wasser enthält, wie oben angegeben, gemessen. Eine Eichkurve wird aufgestellt.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

Mit Hilfe der Eichkurve ist die Menge an Harnstoff der Versuchsprobe zu bestimmen. Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

**7. Bemerkungen**

- 7.1. Bei einem Gehalt an Harnstoff, höher als 3 v. H., ist die Einwaage auf 1 g zu erniedrigen bzw. die Anfangslösung soweit zu verdünnen, daß in 500 ml nicht mehr als 50 mg Harnstoff enthalten sind.
- 7.2. Bei niederen Gehalten an Harnstoff soll die Einwaage erhöht werden, soweit man ein Filtrat klar und farblos herstellen kann.
- 7.3. Enthält die Substanz einfache Stickstoffformen, insbesondere Aminosäuren, so ist die Messung der Extinktion bei 435 nm zu empfehlen.

---

**15. BESTIMMUNG VON ALKALOIDEN IN LUPINEN****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Alkaloidgehalts in Lupinensamen.

**2. Prinzip**

Die Alkaloide werden in einer Mischung von Diäthyläther und Chloroform gelöst und mit Salzsäure extrahiert. Die Alkaloide werden mit Kieselwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wird verascht und der Rückstand gewogen.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Diäthyläther
- 3.2. Chloroform
- 3.3. 4 N Natriumhydroxidlösung
- 3.4. 0,3 N Salzsäure
- 3.5. Natriumchlorid p.a.
- 3.6. Kieselwolframsäurelösung,  $\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ , 10 v. H. (G/V)

**4. Geräte**

- 4.1. Mechanisches Rührgerät
- 4.2. Veraschungsschalen aus Platin, Quarz oder Porzellan
- 4.3. Elektrischer Muffelofen

**5. Ausführung**

15 g der Probe werden auf 5 mg genau eingewogen und in ein Gefäß (z. B. Scheidetrichter) von ungefähr 200 ml Fassungsvermögen mit Schliffstopfen gebracht. Danach werden genau 100 ml Diäthyläther (3.1) und 50 ml Chloroform (3.2) und mittels einer Bürette 10 ml Natriumhydroxidlösung (3.3) zugefügt und kräftig geschüttelt, damit eine Klumpenbildung der Substanz vermieden wird.

Es wird mehrmals kräftig geschüttelt und bis zum nächsten Tag das Gefäß stehengelassen. Ist die überstehende Flüssigkeit nicht vollkommen klar, werden einige Tropfen Wasser hinzugefügt. Die Äther-Chloroformschicht wird filtriert, ein 50-ml-Meßkolben mit dem Filtrat aufgefüllt und mit 50 ml Diäthyläther (3.1) in einen Scheidetrichter von 150 ml

Inhalt quantitativ hinübergespült. Es wird dreimal mit je 20 ml Salzsäure (3.4) extrahiert, dekantiert und die Säureschicht nach jeder Extraktion aufgefangen. Die Säure-Extrakte werden in einem 250-ml-Becherglas gesammelt. Durch leichtes Erhitzen wird die Lösung von den letzten Spuren Diäthyläther und Chloroform befreit. Man fügt etwa 1 g Natriumchlorid (3.5) hinzu, läßt abkühlen, fällt die Alkaloide mit der Kieselwolframsäurelösung (3.6) und rührt 30 Min. lang mechanisch. Nach Stehenlassen über Nacht wird durch ein aschefreies Filter filtriert und der Niederschlag zweimal mit je 10 ml und zweimal mit je 5 ml Salzsäure (3.4) ausgewaschen.

Das Filter mit dem Niederschlag wird in einer Veraschungsschale bei 900 °C verascht und nach dem Abkühlen gewogen.

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Der Alkaloidgehalt der Einwaage wird durch Multiplikation des Gewichts des Veraschungsrückstands mit dem Faktor 0,2 errechnet.

Das Ergebnis wird in Hundertteilen der Probe ausgedrückt.

---

## 16. BESTIMMUNG DER UREASEAKTIVITÄT VON SOJAPRODUKTEN

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung der Ureaseaktivität in Sojaprodukten. Der Test dient zur Feststellung eines ungenügenden Toastungsgrades.

### 2. Prinzip

Man bewertet die Ureaseaktivität durch die Menge Ammoniak-Stickstoff, die von 1 g Substanz pro Min. bei 30 °C aus einer Harnstofflösung freigesetzt wird.

### 3. Reagenzien

3.1. 0,1 N Salzsäure

3.2. 0,1 N Natriumhydroxidlösung

3.3. 0,05 M Phosphatpufferlösung, enthaltend 4,45 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) und 3,40 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in 1000 ml.

3.4. Gepufferte Harnstofflösung, frisch hergestellt, enthaltend 30,0 g Harnstoff in 1 000 ml Phosphatpufferlösung (3.3) ; pH-Wert 6,9 — 7,0.

### 4. Geräte

4.1. Titrierautomat für potentiometrische Titration oder hochempfindliches pH-Meter (0,02 pH) mit Magnetrührer

4.2. Wasserbad mit Thermostat auf 30 °C genau eingestellt

4.3. Reagenzgläser : 150 × 18 mm, mit Schliffstopfen.

### 5. Ausführung

Etwa 10 g der Probe werden so fein zerkleinert (z. B. mit einer Mokka-Mühle), daß sie durch ein Sieb von 0,2 mm Maschenweite hindurchgehen. 0,2 g dieser Probe werden auf 1 mg genau in ein Reagenzglas mit Schliffstopfen eingewogen und mit 10 ml gepufferter Harnstofflösung (3.4) versetzt. Das Reagenzglas wird sogleich verschlossen und nach kräftigem Schütteln in das genau auf 30 °C eingestellte Wasserbad gebracht, worin man es genau 30 Min. lang beläßt. Unmittelbar danach gibt man 10 ml 0,1 N Salzsäure (3.1) hinzu, kühlt schnell auf 20 °C ab und überführt den Inhalt des Reagenzglases quantitativ in ein Titriergefäß, wobei man zweimal mit je 5 ml Wasser nachspült. Dann wird sofort

und schnell mit 0,1 N Natriumhydroxidlösung (3.2) bis pH 4,7 elektrometrisch mit Hilfe einer Glaselektrode titriert.

Ein *Blindversuch* wird wie folgt durchgeführt :

Man gibt in ein Reagenzglas mit Schliffstopfen schnell hintereinander 0,2 g der auf 1 mg genau gewogenen Probe, 10 ml 0,1 N Salzsäure (3.1) und 10 ml gepufferte Harnstofflösung (3.4), kühlt sofort in Eiswasser ab und beläßt das Glas 30 Min. darin. Sodann wird der Inhalt des Reagenzglases unter den oben genannten Bedingungen in das Titriergefäß überführt und mit 0,1 N Natriumhydroxidlösung (3.2) bis pH 4,7 titriert.

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Die Ureaseaktivität ist nach folgender Formel zu berechnen :

$$\frac{1,4 (b - a)}{30 \cdot E} = \frac{\text{mg N}}{\text{g} \cdot \text{Min.}} \text{ bei } 30^\circ\text{C}$$

wobei a = verbrauchte ml 0,1 N Natriumhydroxidlösung im Versuch,

b = verbrauchte ml 0,1 N Natriumhydroxidlösung im Blindversuch,

E = Einwaage in g.

#### 7. Bemerkungen

- 7.1. Die Methode ist auf eine Ureaseaktivität von höchstens 1 mg N/g · Min. bei 30 °C abgestellt. Bei Produkten mit höherer Aktivität kann die Einwaage bis auf 50 mg herabgesetzt werden.
  - 7.2. Produkte, deren Rohfettgehalt 10 v. H. übersteigt, sind vorher durch kalte Extraktion zu entfetten.
-