31971L0393

20.12.1971 *DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH* L 279/7

DRUGA DYREKTYWA KOMISJI
z dnia 18 listopada 1971 r.
ustanawiająca wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz

(71/393/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady z dnia 20 lipca 1970 r. [1] dotyczącą wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa wymaga, żeby urzędowe kontrole pasz były przeprowadzane wspólnotowymi metodami pobierania próbek i analizy w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

dyrektywa Komisji nr 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r. [2] ustanowiła już szereg wspólnotowych metod analiz; postęp prac, wykonanych od tamtego czasu wskazuje na celowość przyjęcia drugiego zestawu metod;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz;

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, żeby analizy stosowane w ramach urzędowych kontroli pasz służące do oznaczania zawartości wilgoci, lotnych zasad azotowych, całkowitej zawartości fosforu, surowych olejów i tłuszczów były przeprowadzane przy użyciu metod przedstawionych w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

Przepisy ogólne wymienione w części I Załącznika (Wstęp) do pierwszej dyrektywy Komisji 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r., ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz, stosują się do metod opisanych w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne, niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy nie później niż do dnia 1 stycznia 1973 r. i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 18 listopada 1971 r.

W imieniu Komisji
Franco M. MALFATTI
Przewodniczący

[1] Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.
[2] Dz.U. L 155 z 12.7.1971, str. 13.

ZAŁĄCZNIK

I. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WILGOCI

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości wilgoci w paszach. Nie obejmuje ona analizy produktów mlecznych, jako pasz prostych, analizy substancji mineralnych i mieszanek złożonych głównie z substancji mineralnych ani analizy nasion i, owoców oleistych zdefiniowanych w rozporządzeniu Rady nr 136/66/EWG [1] z dnia 22 września 1966 r. w sprawie ustanowienia wspólnej organizacji rynku olejów i tłuszczów.

Oznaczanie zawartości wilgoci w nasionach i owocach oleistych opisane jest w załączniku III do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 1470/68 [2] z dnia 23 września 1968 r. w sprawie pobierania i zmniejszania próbek oraz oznaczania zawartości oleju, zanieczyszczeń i wilgoci w nasionach oleistych.

2. Zasada

Próbka jest suszona w określonych warunkach, zależnych od rodzaju paszy. Ubytek masy określany jest przez ważenie. W przypadku pasz stałych o dużej zawartości wilgoci niezbędne jest przeprowadzenie wstępnego suszenia.

3. Aparatura

3.1. Rozdrabniarka z materiału nieabsorbującego wilgotności, łatwa do czyszczenia, i umożliwiająca szybkie i równomierne rozdrabnianie bez wytwarzania znacznych ilości ciepła, uniemożliwiająca kontakt z powietrzem z zewnątrz, na ile jest to możliwe i spełniająca wymagania podane w ppkt 4.1.1 i 4.1.2 (np. mikrorozdrabniarki młotkowe lub chłodzone wodą, składane młynki stożkowe, rozdrabniarki powolne lub zębate).

3.2. Waga analityczna o dokładności 0,5 mg.

3.3. Suche pojemniki z odpornego na korozję metalu lub ze szkła z pokrywkami zapewniającymi szczelne zamknięcie; powierzchnia robocza umożliwiająca rozprowadzenie około 0,3 g próbki na 1 cm^2.

3.4. Elektryczny piec izotermiczny (± 1 °C), odpowiednio wentylowany i zapewniający szybką regulację temperatury [3].

3.5. Regulowany, elektryczny piec próżniowy, wyposażony w pompę olejową i w mechanizm do wprowadzania gorącego wysuszonego powietrza albo w środek osuszający (np. tlenek wapnia).

3.6. Suszarka z grubą perforowaną płytą metalową lub porcelanową, zawierającą skuteczny środek osuszający.

4. Procedura

Uwaga: Operacje opisane w niniejszej części muszą zostać przeprowadzone natychmiast po otwarciu opakowań zawierających próbki. Analizę należy przeprowadzić, co najmniej dwukrotnie.

4.1. *Przygotowanie*

4.1.1. *Pasze inne niż wymienione w ppkt 4.1.2 i 4.1.3*

Pobrać, co najmniej 50 g próbki. W razie potrzeby rozdrobnić lub podzielić w taki sposób, aby uniknąć jakiejkolwiek zmiany zawartości wilgoci (patrz 6).

4.1.2. *Zboża i kasze*

Pobrać, co najmniej 50 g próbki. Zemleć na cząstki, z których co najmniej 50 % przejdzie przez sito o wielkości oczka 0,5 mm, a nie więcej niż 10 % resztek pozostanie na sicie z okrągłymi oczkami o średnicy 1 mm.

---

[1] Dz.U. 127 z 30.9.1966, str. 3025/66.
[2] Dz.U. 239 z 28.9.1968, str. 2.
[3] Do suszenia roślin zbożowych, mąki, kaszy, mączki. Piec musi mieć pojemność cieplną taką, żeby po wstępnym nastawieniu na temperaturę 131 °C powrócił do tej temperatury w czasie krótszym niż 45 minut po umieszczeniu w nim maksymalnej liczby próbek do jednoczesnego wysuszenia. Wentylacja musi być taka, że wyniki suszenia przez 2 godziny maksymalnej liczby próbek pszenicy pospolitej nie mogą różnić się od wyników suszenia przez 4 godziny o więcej niż o 0,15 %.

4.1.3. *Pasze w postaci cieczy lub pasty, pasze złożone głównie z olejów i tłuszczów*

Pobrać około 25 g próbki, odważyć z dokładnością do 10 mg, dodać odpowiednią ilość bezwodnego piasku, odważonego z dokładnością do 10 mg i wymieszać aż do uzyskania jednorodnego produktu.

4.2. *Suszenie*

4.2.1. *Pasze inne niż wymienione w ppkt 4.2.2 i 4.2.3*

Z dokładnością do 0,5 mg zważyć pojemnik (3.3) razem z pokrywką. Do zważonego pojemnika odważyć 5 g próbki z dokładnością do 1 mg i równomiernie rozprowadzić. Wstawić pojemnik bez pokrywki do pieca nagrzanego wstępnie do temperatury 103 °C. Pojemnik należy wstawiać w jak najkrótszym czasie, aby zapobiec spadkowi temperatury w piecu. Zostawić do wysuszenia na 4 godziny, liczone od momentu powrotu temperatury do 103 °C. Przykryć pojemnik pokrywką i wyjąć z pieca. Pozostawić do ostygnięcia przez 30-45 minut w suszarce (3.6) i zważyć z dokładnością do 1 mg.

W przypadku, gdy pasze stanowią głównie tłuszcze, należy suszyć uzupełniająco przez 30 minut w piecu o temperaturze 103 °C. Odchylenie między dwoma ważeniami nie powinna przekraczać 0,1 % wilgotności.

4.2.2. *Zboża, mąka, kasze i mączka*

Z dokładnością do 0,5 mg zważyć pojemnik (3.3) razem z pokrywką. Do zważonego pojemnika odważyć z dokładnością do 1 mg około 5 g rozdrobnionej próbki i równomiernie rozprowadzić. Wstawić pojemnik bez pokrywki do pieca nagrzanego wstępnie do temperatury 130 °C. Pojemnik należy wstawiać w jak najkrótszym czasie, aby zapobiec spadkowi temperatury w piecu. Zostawić do wysuszenia na 2 godziny, liczone od momentu osiągnięcia w piecu temperatury 130 °C. Przykryć pojemnik pokrywką i wyjąć z pieca. Pozostawić do ostygnięcia przez 30-45 minut w suszarce (3.6) i zważyć z dokładnością do 1 mg.

4.2.3. *Pasze złożone, zawierające ponad 4 % sacharozy lub laktozy; pasze proste takie jak chleb świętojański, zhydrolizowane produkty zbożowe, nasiona słodu, suszona krajanka buraczana, substancje rozpuszczone z ryb i cukrów; pasze złożone zawierające ponad 25 % soli mineralnych w tym wodę z krystalizacji*

Z dokładnością do 0,5 mg zważyć pojemnik (3.3) razem z pokrywką. Do zważonego pojemnika odważyć z dokładnością do 1 mg około 5 g rozdrobnionej próbki i równomiernie rozprowadzić. Wstawić pojemnik bez pokrywki do pieca próżniowego (3.5) nagrzanego wstępnie do temperatury 80 °-85 °C. Pojemnik należy wstawiać w jak najkrótszym czasie, aby zapobiec spadkowi temperatury w piecu.

Podwyższyć ciśnienie do 100 torów i pozostawić próbkę do wysuszenia na 4 godziny przy tym ciśnieniu, w strumieniu gorącego, suchego powietrza albo stosować środek osuszający (około 300 g dla 20 próbek). W tym ostatnim przypadku odłączyć pompę próżniową po osiągnięciu zadanego ciśnienia. Czas suszenia liczyć od momentu osiągnięcia temperatury w piecu 80 °C-85 °C. Ostrożnie przywrócić w piecu ciśnienie atmosferyczne. Otworzyć piec, natychmiast przykryć pojemnik pokrywką i wyjąć z pieca. Pozostawić do ostygnięcia przez 30-45 minut w suszarce (3.6) i zważyć z dokładnością do 1 mg. Suszyć dodatkowo przez 30 minut w piecu próżniowym w temperaturze 80 °C-85 °C i ponownie zważyć. Różnica między tymi dwoma ważeniami nie może przekroczyć 0,1 % wilgotności.

4.3. *Suszenie wstępne*

4.3.1. *Pasze inne niż wymienione w ppkt 4.3.2*

Pasze stałe o dużej zawartości wilgoci, trudne do rozdrobnienia, należy poddać wstępnemu suszeniu w następujący sposób.

Z dokładnością do 10 mg odważyć 50 g nierozdrobnionej próbki (pasze sprasowane lub zbrylone można w razie potrzeby rozdzielić) do odpowiedniego pojemnika (np. płytka aluminiowa 20 x 12 cm z obrzeżem o wysokości 0,5 cm). Wstawić pojemnik do pieca do wysuszenia w temperaturze od 60 °C do 70 °C, aby zawartość wody w próbce spadła z 8 % do 12 %. Wyjąć pojemnik z pieca, pozostawić bez przykrycia do ostygnięcia w laboratorium przez 1 godzinę i zważyć z dokładnością do 10 mg. Próbkę natychmiast rozdrobnić zgodnie z ppkt 4.1.1 i wysuszyć zgodnie z ppkt 4.2.1 lub 4.2.3 w zależności od rodzaju paszy.

4.3.2. *Zboża*

Ziarno o poziomie wilgoci ponad 17 % należy poddać wstępnemu suszeniu w następujący sposób:

Z dokładnością do 10 mg odważyć 50 g niezmielonego ziarna do odpowiedniego pojemnika (np. płytka aluminiowa 20 x 12 cm z obrzeżem o wysokości 0,5 cm). Wstawić pojemnik na 5- 7 minut do pieca do wysuszenia w temperaturze od 130 °C. Wyjąć pojemnik z pieca, pozostawić bez przykrycia do ostygnięcia w laboratorium przez 2 godziny i zważyć z dokładnością do 10 mg. Próbkę natychmiast zemleć zgodnie z ppkt 4.1.2 i wysuszyć zgodnie z ppkt 4.2.2.

5. **Obliczanie wyników**

Zawartość wilgoci, wyrażona jako udział procentowy w próbce, obliczana jest według następujących wzorów:

5.1. *Suszenie bez suszenia wstępnego*

$$(E-m)\times\frac{100}{E}$$

gdzie: E = masa początkowa próbki w gramach

m = masa suchej próbki w gramach

5.2. *Suszenie z suszeniem wstępnym*

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

gdzie: E = masa początkowa próbki w gramach,

M = masa próbki w gramach po wstępnym suszeniu,

M' = masa próbki w gramach po rozdrobnieniu lub zmieleniu,

m = masa suchej próbki w gramach.

5.3. *Powtarzalność*

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych na tej samej próbce nie powinna przekraczać 0,2 % wilgotności.

6. **Uwagi**

Jeśli konieczne okaże się rozdrobnienie próbki i jeśli zmieni ono zawartość wilgoci w produkcie, wyniki analizy dotyczące składników paszy należy skorygować uwzględniając zawartość wilgoci w próbce w jej stanie początkowym.

II. **OZNACZANIE LOTNYCH ZASAD AZOTOWYCH**

A. METODA MIKRODYFUZJI

1. **Cel i zakres metody**

Metoda ta umożliwia oznaczenie w paszach zawartości lotnych zasad azotowych wyrażonych zawartością amoniaku.

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana wodą, a roztwór jest klarowany i filtrowany. Lotne zasady azotowe są przemieszczane w drodze mikrodyfuzji przy pomocy roztworu węglanu potasowego, gromadzone w roztworze kwasu borowego i miareczkowane kwasem siarkowym.

3. **Odczynniki**

3.1. 20 % roztwór (procent wagowy) kwasu trójchlorooctowego,

3.2. Wskaźnik: rozpuścić 33 mg zieleni bromokrezolowej i 65 mg czerwieni metylowej w 100 ml 95 %-96 % etanolu (procent objętościowy).

3.3. Roztwór kwasu borowego: w 1-litrowej kolbie miarowej rozpuścić 10 g czystego kwasu borowego w 200 ml 95 % - 96 % etanolu (procent objętościowy) i 700 ml wody. Dodać 10 ml wskaźnika (3.2). Wymieszać i w razie potrzeby skorygować kolor roztworu do jasnoczerwonego dodając roztwór wodorotlenku sod

3.4. Nasycony roztwór węglanu potasowego: rozpuścić 100 g czystego owego. 1 ml tego roztworu wiąże maksymalnie 300 µg NH_3. węglanu potasowego w 100 ml wrzącej wody. Pozostawić do ostygnięcia i przefiltrować.

3.5. 0,02-normalny kwas siarkowy.

4. **Aparatura**

4.1. Mieszarka (bębnowa): około 35 do 40 obr./min.

4.2. Szklane lub plastykowe naczynia Conway'a (patrz rysunek),

4.3. Mikrobiurety wyskalowane co 1/100 ml.

5. **Procedura**

Odważyć 10 g próbki z dokładnością do 1 mg i umieścić w 200-mililitrowej kolbie miarowej dolewając 100 ml wody. Mieszać przez 30 minut w mieszarce bębnowej. Dodać 50 ml roztworu kwasu trójchlorooctowego (3.1), uzupełnić wodą do pełnej objętości, energicznie wstrząsnąć i przefiltrować przez filtr harmonijkowy.

Pipetą wprowadzić 1 ml roztworu kwasu borowego (3.3) do środkowej części naczynia Conway'a, a 1 ml filtratu próbki do części obwodowej naczynia. Częściowo przykryć komorę nasmarowaną pokrywą. Szybko wkroplić 1 ml nasyconego roztworu węglanu potasowego (3.4) do części obwodowej i zakryć naczynie pokrywą tak, aby było szczelne. Ostrożnie obrócić naczynie w płaszczyźnie poziomej, żeby zmieszać dwa reagenty. Pozostawić do inkubacji, przez co najmniej 4 godziny w temperaturze pokojowej, albo przez 1 godzinę w temperaturze 40 °C.

Mikrobiuretą (4.3) miareczkować lotne zasady w roztworze kwasu borowego 0,02-normalnym kwasem siarkowym (3.5).

Przeprowadzić ślepą próbę według tej samej procedury, lecz bez próbki przeznaczonej do analizy.

6. **Obliczanie wyników**

1 ml 0,02-normalnego H_2SO_4 odpowiada 0,34 mg amoniaku.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

Powtarzalność

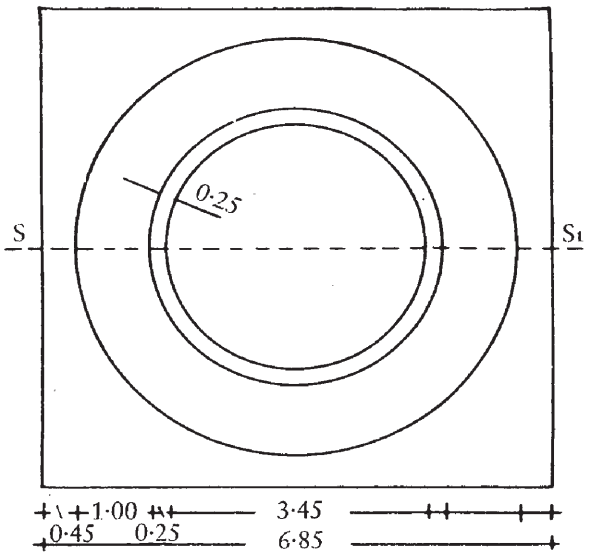
Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych w tej samej próbce nie powinna przekraczać:

10 % wartości względnej dla zawartości amoniaku mniejszej niż 1,0 %;

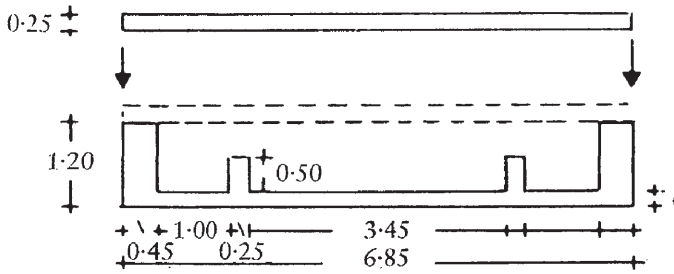
0,1 % wartości bezwzględnej dla zawartości amoniaku większej lub równej 1,0 %.

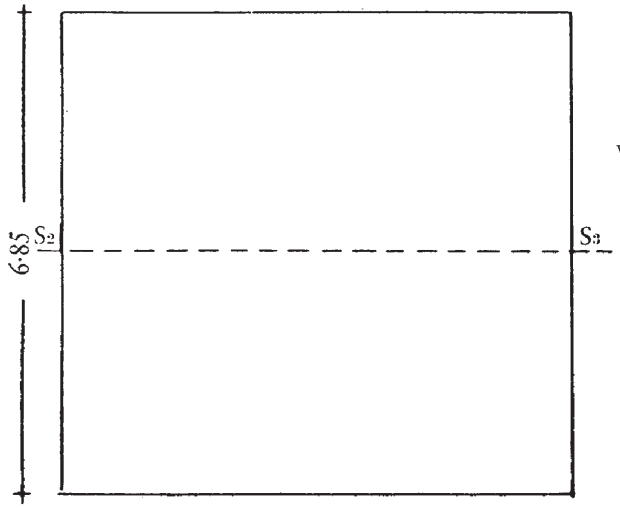
7. **Uwagi**

Jeśli zawartość amoniaku w próbce przekracza 0,6 %, należy rozcieńczyć początkowy filtrat.



Widok z góry naczynia





Widok z góry pokrywy ze szkła szlifowanego

B. METODA DESTYLACJI

1. **Cel i zakres metody**

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości lotnych zasad azotowych, wyrażonych zawartością amoniaku, w mączce rybnej praktycznie nie zawierającej mocznika. Metoda ta stosuje się tylko dla zawartości amoniaku mniejszej od 0,25 %.

2. **Zasada**

Próbka jest ekstrahowana wodą, a roztwór jest klarowany i filtrowany. Lotne zasady azotowe są przemieszczane w temperaturze wrzenia przez dodanie tlenku magnezu i gromadzone w określonej ilości kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany roztworem wodorotlenku sodowego.

3. **Odczynniki**

3.1. 20 % roztwór (procent wagowy) kwasu trójchlorooctowego,

3.2. Czysty tlenek magnezowy,

3.3. Emulsja przeciw pieniąca (np. silikon),

3.4. 0,1-normalny kwas siarkowy,

3.5. 0,1-normalny roztwór wodorotlenku sodowego,

3.6. 0,1 % roztwór (procent wagowy) czerwieni metylowej w 95 % - 96 % etanolu (procent objętościowy).

4. **Aparatura**

4.1. Mieszarka (bębnowa): około 35 do 40 obr./min.

4.2. Aparatura do destylacji typu Kjeldhala.

5. **Procedura**

Odważyć 10 g próbki z dokładnością do 1 mg i umieścić w 200-mililitrowej kolbie miarowej dolewając 100 ml wody. Mieszać przez 30 minut w mieszarce bębnowej. Dodać 50 ml roztworu kwasu trójchlorooctowego (3.1), uzupełnić wodą do pełnej objętości, energicznie wstrząsnąć i przefiltrować przez filtr harmonijkowy.

Stosownie do założonej zawartości lotnych zasad azotowych pobrać odpowiednią ilość klarownego filtratu (zwykle wystarcza 100 ml). Rozcieńczyć do 200 ml i dodać 2 g tlenku magnezu (3.2) oraz kilka kropli emulsji przeciw pieniącej (3.3). Roztwór powinien być alkaliczny przy sprawdzaniu papierkiem lakmusowym; w przeciwnym razie dodać niewielką ilość tlenku magnezu (3.2). Poddać destylacji około 150 ml roztworu w aparaturze Kjeldhala i zebrać destylat w kolbie Erlenmeyera zawierającej dokładnie odmierzoną objętość (25 ml do 50 ml) 0,1-normalnego kwasu siarkowego (3.4). Podczas destylacji unikać przegrzewania boków. Gotować przez 2 minuty roztwór kwasu siarkowego, ostudzić go, a nadmiar odmiareczkować kwasem siarkowym z 0,1-normalnym roztworem wodorotlenku sodowego (3.5) w obecności wskaźnika z czerwieni metylowej (3.6).

Przeprowadzić ślepą próbę według tej samej procedury, lecz bez próbki przeznaczonej do analizy.

6. **Obliczanie wyników**

1 ml 0,1-normalnego H_2SO_4 odpowiada 1,7 mg amoniaku.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych w tej samej próbce nie powinna przekraczać 10 % zawartości względnej amoniaku.

III. OZNACZANIE CAŁKOWITEJ ZAWARTOŚCI FOSFORU

METODA FOTOMETRYCZNA

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie całkowitej zawartości fosforu w paszach. Nadaje się ona szczególnie do analizy produktów o małej zawartości fosforu. W pewnych przypadkach (produkty bogate w fosfor), można stosować metodę grawimetryczną.

2. Zasada

Próbka jest mineralizowana albo przez suche spalanie (w przypadku pasz organicznych), albo poprzez trawienie kwasem (w przypadku związków mineralnych i pasz ciekłych) i umieszczana w roztworze kwasu. Roztwór jest traktowany odczynnikiem molibdenowo-wanadanowym. Gęstość optyczną powstałego w ten sposób żółtego roztworu mierzy się spektrofotometrem przy długości fali 430 nm.

3. Odczynniki

3.1. Czysty węglan wapnia,

3.2. Czysty kwas chlorowodorowy o gęstości 1,1 (w przybliżeniu 6-normalny),

3.3. Czysty kwas azotowy o gęstości 1,045,

3.4. Czysty kwas azotowy o gęstości 1,38-1,42,

3.5. Czysty kwas siarkowy o gęstości 1,84

3.6. Odczynnik molibdenowo-wanadanowy: w 1-litrowej kolbie miarowej wymieszać 200 ml roztworu heptamolibdenianu amonowego (3.6.1), 200 ml roztworu monowanadanu amonowego (3.6.2) i 134 ml kwasu azotowego (3.4). Uzupełnić do pełnej objętości wodą.

3.6.1. Roztwór heptamolibdenianu amonowego: rozpuścić w gorącej wodzie 100 g czystego heptamolibdenianu amonowego.

NH_4) $6Mo_7$ O_{24}!!! error character !!! B·4 H_2O. Dodać 10 ml amoniaku (o gęstości 0,91) i uzupełnić wodą do 1 litra.

3.6.2. Roztwór monowanadanu amonowego: 2,35 g czystego monowanadanu amonowego NH_4VO_2 rozpuścić w 400 ml gorącej wody. Ciągle mieszając powoli dodawać 20 ml rozcieńczonego kwasu azotowego (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) i uzupełnić wodą do 1 litra.

3.7. Wzorcowy roztwór 1 mg fosforu na ml: rozpuścić w wodzie 4,387 g czystego dwuwodorofosforanu potasowego KH_2PO_4. Uzupełnić wodą do 1 litra.

4. Aparatura

4.1. Kwarcowe lub porcelanowe tygle do spopielania,

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem nastawionym na 550 °C,

4.3. Kolba Kjeldahla o pojemności 250 ml,

4.4. Kolby miarowe i dokładne pipety,

4.5. Spektrofotometr

4.6. Probówki o średnicy około 16 mm i pojemności 25 ml-30 ml z korkami stopniowanymi do średnicy 14,5 mm.

5. Procedura

5.1. *Przygotowanie roztworu*

W zależności od rodzaju próbki przygotować roztwór według ppkt 5.1.1 lub 5.1.2.

5.1.1. *Typowa procedura*

Odważyć co najmniej 1 g próbki z dokładnością do 1 mg. Umieścić próbkę w kolbie Kjeldahla, dodać 20 ml kwasu siarkowego (3.5), wstrząsnąć, żeby nasycić substancję całkowicie kwasem i zapobiec jej przyklejaniu się do ścianek kolby, podgrzać i utrzymywać w stanie wrzenia przez 10 minut. Nieznacznie ostudzić, dodać 2 ml kwasu azotowego (3.4), lekko podgrzać, nieznacznie ostudzić, dodać trochę więcej kwasu azotowego (3.4) i doprowadzić ponownie do wrzenia. Powtarzać procedurę do momentu uzyskania bezbarwnego roztworu. Ostudzić roztwór, dolać trochę wody, przelać ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml płucząc kolbę Kjeldahla gorącą wodą. Pozostawić do ostygnięcia, uzupełnić do pełnej objętości wodą, poddać homogenizacji i przefiltrować.

5.1.2. *Próbki zawierające substancje organiczne i wolne od dwuwodorofosforanów wapnia i magnezu*

W tyglu do spopielania odważyć 2,5 g próbki z dokładnością do 1 mg. Próbkę mieszać aż do całkowitego połączenia się z 1 g węglanu wapniowego (3.1). Spopielać w piecu w temperaturze 550 °C ± 5 °C aż do uzyskania białego lub szarego popiołu (niewielka ilość węgla drzewnego nie ma znaczenia).Przesypać popiół do 250-mililitrowej zlewki. Dodać 20 ml wody oraz kwasu chlorowodorowego (3.2) aż do ustania pienienia. Dodać kolejne 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.2). Postawić zlewkę na łaźni piaskowej i odparować całkowicie wodę, aby uczynić krzemionkę nierozpuszczalną. Ponownie rozpuścić pozostałość w 10 ml kwasu azotowego (3.3) i gotować na łaźni piaskowej przez 5 minut do całkowitego wysuszenia bez odparowywania wody. Przelać ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml przepłukując zlewkę kilka razy gorącą wodą. Pozostawić do ostygnięcia, uzupełnić do pełnej objętości wodą, poddać homogenizacji i przefiltrować.

5.2. *Wywołanie zabarwienia i pomiar gęstości optycznej*

Rozcieńczyć podwielokrotność filtratu uzyskanego w ppkt 5.1.1 lub 5.1.2 w celu uzyskania stężenia fosforu nie większego niż 40 µg na ml. Wlać 10 ml tego roztworu do probówki (4.6) i dodać 10 ml odczynnika molibdenowo-wanadanowego (3.6). Poddać homogenizacji i pozostawić do odstania, na co najmniej 10 minut w temperaturze 20 °C. Spektrofotometrem, przy długości fali 430 nm, zmierzyć gęstość optyczną roztworu uzyskanego przez dodanie 10 ml odczynnika molibdenowo-wanadanowego (3.6) do 10 ml wody.

5.3. *Krzywa wzorcowania*

Na bazie roztworu wzorcowego (3.7) sporządzić roztwory zawierające odpowiednio 5, 10, 20, 30 i 40 µg fosforu na ml. Pobrać po 10 ml każdego z tych roztworów i do każdej porcji dodać 10 ml odczynnika molibdenowo-wanadanowego (3.6). Poddać homogenizacji i pozostawić do odstania na co najmniej 10 minut w temperaturze 20 °C. Zmierzyć gęstość optyczną zgodnie z ppkt 5.2.

Sporządzić krzywą wzorcowania wykreślając gęstości optyczne w funkcji odpowiadających im stężeń fosforu. Dla stężeń w przedziale od 0 do 40 µg/ml krzywa będzie liniowa.

6. **Obliczanie wyników**

Oznaczyć ilość fosforu w próbce korzystając z krzywej wzorcowania.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych na tej samej próbce nie powinna przekraczać:

3 % wartości względnej dla zawartości fosforu mniejszej niż 5 %;

0,15 % wartości bezwzględnej dla zawartości fosforu większej lub równej 5 %.

IV. **OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SUROWYCH OLEJÓW I TŁUSZCZÓW**

1. **Cel i zakres metody**

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości surowych olejów i tłuszczów w paszach. Nie obejmuje ona analizy nasion i owoców oleistych zdefiniowanych w rozporządzeniu Rady 136/66/EWG z dnia 22 września 1966 r. Oznaczenie zawartości oleju w tych produktach opisane jest w załączniku V do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 1470/68 z dnia 23 września 1968 r.

W zależności od rodzaju paszy można stosować jedną z dwóch metod.

1.1. *Metoda A(ekstrakcja eterem)*: stosowana do wszystkich pasz oprócz wymienionych w ppkt 1.2.

1.2. *Metoda B*: stosowana do pasz, z których olejów lub tłuszczy nie można całkowicie wyekstrahować eterem etylowym bez uprzedniej hydrolizy, do pasz pochodzenia zwierzęcego, glutenów, suszonych papek ziemniaczanych, suszonych osadów i odpadków browarnianych i destylacyjnych, suszonych drożdży, odpadków z sucharów, chleba i potraw gotowanych, produktów mlecznych i pasz o dużej ich zawartości, (co najmniej 40 %) i do pasz złożonych, wzbogacanych tłuszczami.

2. **Zasada**

2.1. *Metoda A*: Oleje i tłuszcze są ekstrahowane eterem etylowym. Rozpuszczalnik jest eliminowany, a pozostałość suszona i ważona.

2.2. *Metoda B*: Próbka jest hydrolizowana na ciepło kwasem chlorowodorowym. Roztwór jest chłodzony i filtrowany. Pozostałość jest wymywana, suszona i ekstrahowana eterem etylowym zgodnie z metodą A.

3. **Odczynniki**

3.1. Bezwodny eter etylowy o gęstości 0,720, temperatura wrzenia 34,5 °C, rzeczywiście pozbawiony nadtlenków,

3.2. Czysty, bezwodny siarczan sodowy,

3.3. 3-normalny kwas chlorowodorowy,

3.4. Pomocniczy materiał filtracyjny, np. Kieselgur, Hyflo-supercel,

3.5. Czysty czterochlorek węgla.

4. **Aparatura**

4.1. Ekstraktor typu Soxhlet lub równoważny,

4.2. Aparatura przeciwwybuchowa z regulacją temperatury,

4.3. Piec próżniowy do suszenia (poniżej 100 torów).

5. **Procedura**

5.1. *Metoda A:* (patrz 7.1)

Odważyć 5 g próbki z dokładnością do 1 mg i wymieszać 2 g-3 g (lub w razie potrzeby z większą ilością) siarczanu sodowego (3.2). Mieszaninę umieścić w gilzie do ekstrakcji wolnej od olejów i tłuszczów i przykryć odtłuszczonym zwitkiem waty. (Mieszanie można przeprowadzić w gilzie do ekstrakcji).

Umieścić gilzę w ekstraktorze (4.1) i ekstrahować przez 6 godzin eterem etylowym (3.1). W razie użycia ekstraktora typu Soxhlet, wyregulować ogrzewanie, aby uzyskać co najmniej 15 syfonowań na godzinę. Zebrać ekstrakt eteru w suchej, zważonej kolbie, zawierającej kawałki pumeksu ([1]).

Oddestylować eter i wysuszyć pozostałość po odparowaniu przez półtorej godziny w próżniowym piecu do suszenia (4.3) w temperaturze 75 °C. Ostudzić w suszarce i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut, aby sprawdzić, czy masa olejów i tłuszczy pozostaje stała (ubytek masy musi być mniejszy niż 1 mg).

5.2. *Metoda B*

Odważyć 2,5 g próbki z dokładnością do 1 mg (patrz 7.2) i umieścić w 400-mililitrowej zlewce lub 300-mililitrowej kolbie Erlenmeyera. Dodać 100 ml 3-normalnego kwasu chlorowodorowego (3.3) i kawałki pumeksu. Przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym lub wyposażyć kolbę Erlenmeyera w chłodnicę zwrotną. Doprowadzić mieszaninę do słabego wrzenia nad wolnym ogniem lub płytą grzejną i utrzymywać w tym stanie przez jedną godzinę. Nie dopuścić do przyklejania się produktu do ścianek pojemnika.

([1]) Jeśli olej lub tłuszcz musi zostać poddany późniejszym próbom badania jakości, kawałki pumeksu należy zastąpić paciorkami szklanymi.

Ostudzić i dodać pewną ilość pomocniczego materiału filtracyjnego (3.4), wystarczającą, aby zapobiec ubytkowi oleju i tłuszczu podczas filtracji. Filtrować przez zwilżoną, odtłuszczoną, podwójną bibułę filtracyjną. Pozostałość wymywać zimną wodą, dopóki nie ustanie reakcja z kwasem. Sprawdzić, czy filtrat nie zawiera olejów lub tłuszczów. Ich obecność w filtracie wskazuje na konieczność ekstrakcji próbki, przed hydrolizą, eterem etylowym metodą podaną w ppkt 5.1.

Położyć podwójną bibułę filtracyjną z pozostałością pofiltracyjną na szkiełku zegarkowym i suszyć przez półtorej godziny w piecu w temperaturze 95 °C-98 °C.

Umieścić podwójną bibułę filtracyjną z pozostałością pofiltracyjną w gilzie ekstrakcyjnej, ekstrahować eterem etylowym i postępować zgodnie z ppkt 5.1 akapit drugi.

6. **Obliczanie wyników**

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych w tej samej próbce nie powinna przekraczać 0,3 % oleju lub tłuszczu.

7. **Uwagi**

7.1. W przypadku produktów o dużej zawartości olejów i tłuszczów oraz trudnych do rozdrobnienia lub pobrania jednorodnej, zmniejszonej próbki, należy postępować w następujący sposób. Odważyć 20 g próbki z dokładnością do 1 mg i wymieszać z 10 g lub większą ilością bezwodnego siarczanu sodowego (3.2). Ekstrahować eterem etylowym (3.1) zgodnie z ppkt 5.1. Uzyskany ekstrakt uzupełnić do 500 ml czterochlorkiem węgla (3.5) i poddać homogenizacji. Pobrać 50 ml roztworu i nalać do małej, suchej, zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu [1]. Oddestylować rozpuszczalnik, wysuszyć i postępować według ppkt 5.1 akapit ostatni. Usunąć rozpuszczalnik z pozostałości ekstrakcji w gilzie ekstrakcyjnej i rozdrobnić pozostałość tak, aby uzyskać stopień rozdrobnienia 1 mm. Ponownie wrzucić produkt do gilzy ekstrakcyjnej (nie dodawać siarczanu sodowego), ekstrahować eterem etylowym i postępować według ppkt 5.1 akapit drugi i trzeci.

Wynik obliczyć jako udział procentowy w próbce, uwzględniając podwielokrotność użytą do pierwszej ekstrakcji, według następującego wzoru:

$$(10\,a + b) \times 5$$

gdzie:

a = masa ekstraktu eteru podwielokrotności próbki po pierwszej ekstrakcji, w gramach

b = masa ekstraktu eteru po drugiej ekstrakcji, w gramach

7.2. W przypadku produktów o małej zawartości olejów i tłuszczów masę próbki można zwiększyć do 5 g.

[1] Jeśli olej lub tłuszcz musi zostać poddany późniejszym próbom badania jakości, kawałki pumeksu należy zastąpić paciorkami szklanymi.