31971L0393

20.12.1971 *URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI* L 279/7

DRUGA DIREKTIVA KOMISIJE
z dne 18. novembra 1971
o uvedbi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme

(71/393/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta z dne 20. julija 1970 [1] o uvedbi metod vzorčenja in analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme in zlasti člena 2 Direktive,

ker navedena direktiva zahteva, da se uradni nadzor krme izvaja z uporabo metod vzorčenja in analitskih metod Skupnosti za preverjanje skladnosti z zahtevami, določenimi z zakoni ali drugimi predpisi, ki veljajo za kakovost in sestavo krme;

ker je Direktiva Komisije 71/250/EGS z dne 15. junija 1971 [2] že določila številne analitske metode Skupnosti; ker je bil napredek dela od tedaj takšen, da je priporočljivo sprejeti drugi sklop metod;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zahtevajo, da se analize za uradni nadzor vsebnosti vlage v krmi, hlapnih dušikovih baz, skupnega fosforja ter surovih olj in masti izvajajo v skladu z metodami, opisanimi v Prilogi k tej direktivi.

Splošne določbe, navedene v delu I (Uvod) Priloge k Prvi direktivi Komisije 71/250/EGS z dne 15. junija 1971 o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme, se uporabljajo za metode, opisane v Prilogi k tej direktivi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 1. januarja 1973. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 3

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 18. novembra 1971

Za Komisijo

Predsednik

Franco M. MALFATTI

[1] UL L 170, 3.8.1970, str. 2.
[2] UL L 155, 12.7.1971, str. 13.

PRILOGA

I. **DOLOČANJE VLAGE**

1. **Namen in področje uporabe**

Z opisano metodo določamo vsebnost vlage v krmi. Ne pokriva analize mlečnih proizvodov kot posamične krme, analize mineralnih snovi in mešanic, sestavljenih predvsem iz mineralnih snovi, ali analize oljnih semen in oljnatega sadja, določenega v Uredbi Sveta 136/66/EGS ([1]) z dne 22. septembra 1966 o vzpostavitvi skupne ureditve trga za olja in masti.

Določanje vsebnosti vlage oljnih semen in oljnatega sadja je opisano v Prilogi III k Uredbi Komisije (EGS) 1470/68 ([2]) z dne 23. septembra 1968 o jemanju in zmanjševanju vzorcev in določanju vsebnosti olja, nečistoč in vlage v oljnih semenih.

2. **Princip**

Vzorec osušimo pri določenih pogojih, ki se spreminjajo glede na naravo krme. Izgubo mase določimo s tehtanjem. Pri trdni krmi z visoko vsebnostjo vlage moramo izvesti predhodno sušenje.

3. **Oprema**

3.1 Drobilec iz materiala, ki ne absorbira vlage, ki se lahko čisti, omogoča hitro in enakomerno drobljenje brez pregretja, preprečuje, kolikor je mogoče, stik z zunanjim zrakom in ustreza zahtevam, določenim v 4.1.1 in 4.1.2 (npr. udarni ali vodno hlajeni mikrodrobilci, konusni mlini, počasni drobilniki ali drobilniki na zobata kolesa).

3.2 Analitska tehtnica s točnostjo do 0,5 mg.

3.3 Suhi tehtiči iz nerjaveče kovine ali stekla s pokrovi, ki omogočajo nepredušno zapiranje; delovna površina, ki omogoča razprostrtje vzorca na približno 0,3 g/cm^2.

3.4 Električno ogrevan izotermičen sušilnik (± 1 °C), ki je primerno ventiliran in omogoča hitro uravnavanje temperature ([3]).

3.5 Nastavljiv električno ogrevan vakuumski sušilnik z vgrajeno oljno črpalko in mehanizmom ali za dovajanje suhega vročega zraka ali sušilnega sredstva (npr. kalcijevega oksida).

3.6 Eksikator z debelo kovinsko ali porcelansko perforirano ploščo, ki vsebuje učinkovito sušilno sredstvo.

4. **Postopek**

Opomba: Postopke, opisane v tem delu, moramo izvajati takoj po odpiranju posod z vzorci. Analizo moramo izvajati najmanj v dveh vzporednih določitvah.

4.1 *Priprava*

4.1.1 *Krma, razen pod 4.1.2 in 4.1.3*

Vzamemo najmanj 50 g vzorca. Po potrebi ga zdrobimo in razdelimo tako, da preprečimo spremembo vsebnosti vlage (glej 6).

4.1.2 *Žita in zdrob*

Vzamemo najmanj 50 g vzorca. Zdrobimo ga tako, da najmanj 50 % delcev preide skozi sito z odprtinami velikosti 0,5 mm in jih bo na situ z okroglimi odprtinami velikosti 1 mm preostalo največ 10 %.

([1]) UL L 127, 30.9.1966, str. 3025/66.
([2]) UL L 239, 28.9.1968, str. 2.
([3]) Za sušenje žita, moke, zdroba in grobo mlete moke mora imeti sušilnik takšno toplotno kapaciteto, da se bo, ko je predhodno nastavljen na 131 °C, vrnil na to temperaturo v manj kot 45 minutah, potem ko je bilo vanj na sušenje hkrati postavljeno največje možno število vzorcev. Ventilacija mora biti takšna, da se, ko se v njej dve uri suši največje možno število vzorcev pšenice, rezultati razlikujejo za manj kot 0,15 % od tistih, ki so bili sušeni 4 ure.

4.1.3 *Tekoča ali kašasta krma, krma, sestavljena predvsem iz olj in masti*

Približno 25 g vzorca natehtamo s točnostjo 10 mg, dodamo primerno količino brezvodnega peska, stehtanega s točnostjo 10 mg in mešamo, da dobimo homogeno maso.

4.2 *Sušenje*

4.2.1 *Krma, razen pod 4.2.2 in 4.2.3*

Stehtamo posodo (3.3) s pokrovom s točnostjo 0,5 mg. V stehtano posodo natehtamo 5 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga enakomerno porazdelimo. Posodo brez pokrova postavimo v sušilnik, segret na 103 °C. Da temperatura v sušilniku ne bi padla, moramo posodo postaviti v sušilnik čim hitreje. Sušimo štiri ure od časa, ko je temperatura v peči ponovno 103 °C. Posodo pokrijemo s pokrovom, vzamemo iz peči, ohlajamo 30 do 45 minut v eksikatorju (3.6) in stehtamo s točnostjo 1 mg.

Krmo, sestavljeno predvsem iz olj in masti, sušimo v peči nadaljnjih 30 minut pri 130 °C. Razlika med tehtanjema ne sme presegati 0,1 % vlage.

4.2.2 *Žita, moka, zdrob in grobo mleta moka*

Stehtamo posodo (3.3) s pokrovom s točnostjo 0,5 mg. V stehtano posodo natehtamo 5 g zdrobljenega vzorca s točnostjo 1 mg in ga enakomerno porazdelimo. Posodo brez pokrova postavimo v sušilnik, segret na 130 °C. Da temperatura v sušilniku ne bi padla, moramo posodo čimprej postaviti v sušilnik. Sušimo dve uri od časa, ko je temperatura v sušilniku ponovno 130 °C. Posodo pokrijemo s pokrovom, vzamemo iz sušilnika, ohlajamo 30 do 45 minut v eksikatorju (3.6) in stehtamo s točnostjo 1 mg.

4.2.3 *Krmne mešanice, ki vsebujejo več kot 4 % saharoze ali laktoze: posamična krma, kot so rožiči, hidrolizirani žitni proizvodi, fermentirana semena, posušena mleta pesa, ribe in raztopine sladkorja; krmne mešanice, ki vsebujejo več kot 25 % mineralnih soli, vključno s kristalno vodo.*

Stehtamo tehtič (3.3) s pokrovom s točnostjo 0,5 mg. V stehtan tehtič natehtamo 5 g vzorca s točnostjo 1 mg natančno in ga enakomerno porazdelimo. Tehtič postavimo brez pokrova v vakuumski sušilnik (3.5), segret na 80 °C do 85 °C. Da temperatura v sušilniku ne bi preveč padla, moramo posodo čim hitreje postaviti v sušilnik.

Tlak naj naraste do 100 torov in pri tem tlaku naj se suši štiri ure, na vročem suhem zraku ali s sušilnim sredstvom (okoli 300 g za 20 vzorcev). V takem primeru odklopimo vakuumsko črpalko, ko je dosežen predpisani tlak. Čas sušenja računamo od trenutka, ko je temperatura v peči ponovno 80–85 °C. Tlak v peči previdno izenačimo z zračnim tlakom. Sušilnik odpremo, tehtič takoj pokrijemo s pokrovom, vzamemo iz peči, pustimo 30 do 45 minut v eksikatorju (3.6), da se ohladi, in stehtamo s točnostjo 1 mg. Sušimo še 30 minut v vakuumskem sušilniku pri 80 °C do 85 °C in ponovno stehtamo. Razlika med dvema tehtanjema ne sme presegati 0,1 % vlažnosti.

4.3 *Predhodno sušenje*

4.3.1 *Krma, razen pod 4.3.2*

Trdna krma z visoko vsebnostjo vlage, ki jo je težko drobiti, mora biti predhodno sušena na naslednji način:

V primerno posodo (npr. aluminijast krožnik 20 × 12 cm z robom 0,5 cm) natehtamo 50 g *nezdrobljenega* vzorca s točnostjo 10 mg natančno (stisnjeno ali zgoščeno krmo po potrebi lahko na grobo razdelimo). V sušilniku sušimo pri temperaturi od 60 °C do 70 °C, dokler se vsebnost vlage ne zniža na 8 % do 12 %. Vzamemo iz sušilnika, eno uro ohlajamo v laboratoriju v odkriti posodi in stehtamo s točnostjo 10 mg. Takoj zdrobimo, kakor je navedeno v 4.1.1, in osušimo, kakor je navedeno v 4.2.1 ali 4.2.3, glede na vrsto krme.

4.3.2 *Žita*

Žita z vsebnostjo vlage nad 17 % morajo biti predhodno sušena na naslednji način:

V primerno posodo (npr. aluminijast krožnik 20 × 12 cm z robom 0,5 cm) natehtamo 50 g *nezdrobljenega* žita s točnostjo 10 mg. Sušimo 5 do 7 minut v sušilniku pri 130 °C. Vzamemo iz sušilnika, dve uri ohlajamo v laboratoriju v odkriti posodi in stehtamo s točnostjo 10 mg. Takoj zmeljemo, kakor je navedeno v 4.1.2, in osušimo, kakor je navedeno v 4.2.2.

5. **Izračun rezultatov**

Vsebnost vlage, izražene kot odstotni masni delež v vzorcu, izračunamo z naslednjo enačbo:

5.1 *Sušenje brez predhodnega sušenja*

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

pri čemer je:

E = začetna masa preskusnega vzorca v gramih,

m = masa suhega preskusnega vzorca v gramih.

5.2 *Sušenje s predhodnim sušenjem*

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

pri čemer je:

E = začetna masa preskusnega vzorca v gramih,

M = masa preskusnega vzorca po predhodnem sušenju v gramih,

M' = masa preskusnega vzorca po drobljenju ali mletju v gramih,

m = masa suhega preskusnega vzorca v gramih.

5.3 *Ponovljivost*

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,2 % vlage.

6. **Opomba**

Če se izkaže, da je potrebno drobljenje, in če se izkaže, da se pri tem spremeni vsebnost vlage v proizvodu, moramo rezultate analize sestavin krmil korigirati glede na vsebnost vlage v vzorcu v prvotnem stanju.

II. **DOLOČANJE HLAPNIH DUŠIKOVIH BAZ**

A. MIKRODIFUZIJA

1. **Namen in področje uporabe**

Z opisano metodo je mogoče v krmi določiti vsebnost hlapnih dušikovih baz, izraženih kot amonijak.

2. **Princip**

Vzorec ekstrahiramo z vodo, raztopino zbistrimo in filtriramo. Hlapne dušikove baze ločimo z mikrodifuzijo z uporabo raztopine kalijevega karbonata, lovimo v raztopino borove kisline in titriramo z žveplovo (VI) kislino.

3. **Reagenti**

3.1 20-odstotna (m/v) raztopina trikloroocetne kisline.

3.2 Indikator: raztopimo 33 mg bromokrezol zelenega in 65 mg metil rdečega v 100 ml 95–96 % (v/v) etanola.

3.3 Raztopina borove kisline: v litrski merilni bučki raztopimo 10 g borove kisline p. a. v 200 ml 95– 96 % (v/v) etanola in 700 ml vode. Dodamo 10 ml indikatorja (3.2). Premešamo in po potrebi spremenimo barvo raztopine v svetlordečo z dodajanjem raztopine natrijevega hidroksida. 1 ml te raztopine ustreza največ 300 µg NH_3.

3.4 Nasičena raztopina kalijevega karbonata: raztopimo 100 g kalijevega karbonata p. a. v 100 ml vrele vode. Ohladimo, filtriramo.

3.5 Žveplova (VI) kislina 0,02 N. (0,01 M)

4. **Oprema**

4.1 Mešalec: približno 35 do 40 obr./min.

4.2 Steklene ali plastične Conwayeve celice (glej diagram).

4.3 Mikrobirete z označenim merilom 1/100 ml.

5. **Postopek**

Natehtamo 10 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga s 100 ml vode prenesemo v 200-mililitrsko merilno bučko. V mešalcu mešamo 30 minut. Dodamo 50 ml raztopine trikloroocetne kisline (3.1), dopolnimo z vodo do oznake, dobro pretresemo in filtriramo skozi naguban filter.

S pipeto dodamo 1 ml raztopine borove kisline (3.3) v srednji del Conwayeve celice in 1 ml filtriranega vzorca v zgornji del celice. Delno pokrijemo z namaščenim pokrovom. Hitro kapnemo 1 ml nasičene raztopine kalijevega karbonata (3.4) v zgornji del celice in nepredušno zapremo. Pazljivo obračamo celico v vodoravni ravnini, da se reagenta premešata. Pustimo najmanj štiri ure pri sobni temperaturi ali eno uro pri temperaturi 40 °C.

Z mikrobireto (4.3) titriramo hlapne baze v raztopini borove kisline z žveplovo kislino 0,02 N (0,01 M) (3.5).

Opravimo slepi preskus po istem postopku, vendar brez vzorca, ki ga analiziramo.

6. **Izračun rezultata**

1 ml H_2SO_4 0,02 N (0,01 M) ustreza 0,34 mg amonija.

Rezultat izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

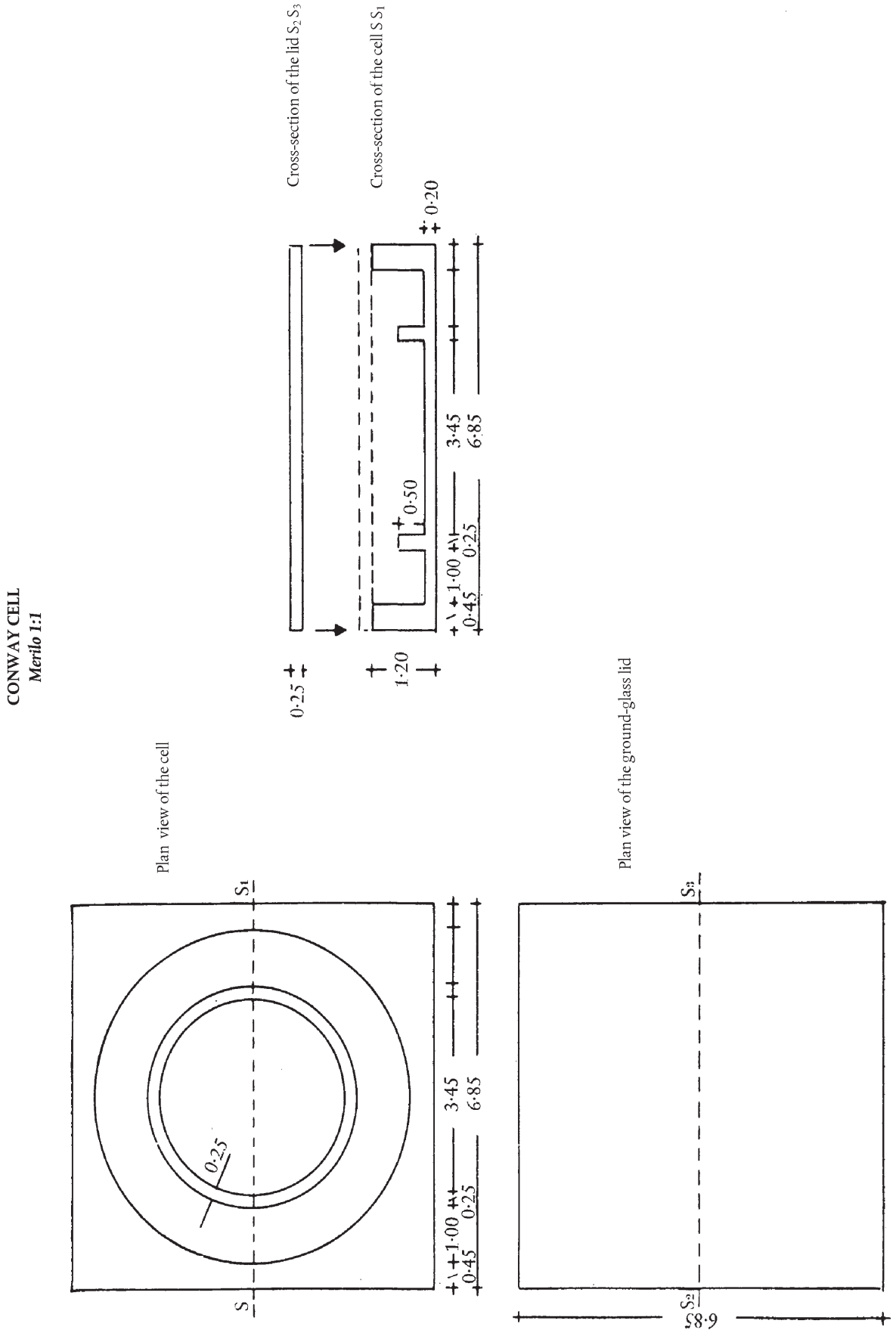
10 % relativne vrednosti, če je vsebnost amonija nižja od 1,0 %;

0,1 % absolutne vrednosti, če je vsebnost amonija 1,0 % ali več.

7. **Opomba**

Če vsebnost amonija v vzorcu presega 0,6 %, razredčimo začetni filtrat.

CONWAY CELL
Merilo 1:1



B. Z DESTILACIJO

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določiti vsebnost hlapnih dušikovih baz, izraženih kot amonijak, v ribji moki, ki praktično ne vsebuje sečnine. Uporablja se le za vsebnost amonijaka, ki je nižja od 0,25 %.

2. **Princip**

Vzorec ekstrahiramo z vodo, raztopino pa zbistrimo in filtriramo. Hlapne dušikove baze izženemo pri temperaturi vrenja z dodatkom magnezijevega oksida in lovimo v določeno količino žveplove (VI) kisline, katere presežek titriramo z raztopino natrijevega hidroksida.

3. **Reagenti**

3.1 20-odstotna (m/v) raztopina trikloroocetne kisline.

3.2 Magnezijev oksid p. a.

3.3 Emulzija proti penjenju (npr. silikon).

3.4 Žveplova (VI) kislina 0,1 N. (0,05 M)

3.5 Raztopina natrijevega hidroksida 0,1 N. (0,1 M)

3.6 0,3-odstotna (v/v) raztopina metil rdečega v 95–96-odstotnem (v/v) etanolu.

4. **Oprema**

4.1 Mešalec: približno 35 do 40 obr./min.

4.2 Aparatura za destilacijo po Kjeldahlu.

5. **Postopek**

Natehtamo 10 g vzorca s točnostjo 1 mg in z 100 ml vode prenesemo v 200-mililitrsko merilno bučko. V mešalcu mešamo 30 minut. Dodamo 50 ml raztopine trikloroocetne kisline (3.1), dopolnimo z vodo do oznake, dobro pretresemo in filtriramo skozi nagubani filter.

Odpipetiramo pričakovani vsebnosti hlapnih dušikovih baz primeren volumen (navadno zadošča 100 ml). Razredčimo na 200 ml, dodamo 2 g magnezijevega oksida (3.2) in nekaj kapljic emulzije proti penjenju (3.3). Raztopina mora biti alkalna na lakmusov papir, če ni, dodamo še malo magnezijevega oksida (3.2). Destiliramo približno 150 ml raztopine v Kjeldahlovi aparaturi in destilat lovimo v erlenmajerico, v kateri je točno določen volumen (25 do 50 ml) žveplove (VI) kisline 0,1 N (0,05 M) (3.4). Med destilacijo ne smemo pregreti stranic. Raztopino žveplove kisline pustimo vreti dve minuti, ohladimo in titriramo presežek žveplove kisline z raztopino natrijevega hidroksida 0,1 N (0,1M) (3.5) z uporabo indikatorja metil rdeč (3.6).

Opravimo *slepi preskus* po istem postopku, vendar brez vzorca, ki ga analiziramo.

6. **Izračun rezultata**

1 ml H_2SO_4 0,1 N (0,05 M) ustreza 1,7 mg amonijaka.

Rezultat izrazimo v odstotnem masnem deležu glede na vzorec.

Ponovljivost

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 % amonijaka.

III. **DOLOČANJE CELOTNEGA FOSFORJA**

FOTOMETRIČNA METODA

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je mogoče določati skupno vsebnost fosforja v krmi. Posebno primerna je za analizo proizvodov z nizko vsebnostjo fosforja. V nekaterih primerih (pri proizvodih, ki vsebujejo veliko fosforja) se lahko uporabi gravimetrična metoda.

2. **Princip**

Vzorec mineraliziramo s suhim sežigom (pri organski krmi) ali z raztapljanjem s kislino (pri mineralnih mešanicah in tekoči krmi) ter ga prenesemo v raztopino kisline. Raztopini dodamo molibdovanadatnim reagent. Optično gostoto rumene raztopine, ki pri tem nastane, merimo s spektrofotometrom pri 430 nm.

3. **Reagenti**

3.1 Kalcijev karbonat p. a.

3.2 Klorovodikova kislina p. a., d: 1,1 (približno 6 M).

3.3 Dušikova (V) kislina p. a., d: 1,045.

3.4 Dušikova (V) kislina p. a., d: od 1,38 do 1,42.

3.5 Žveplova (VI) kislina p. a., d: 1,84.

3.6 Molibdovanadatni reagent: V litrski merilni bučki zmešamo 200 ml raztopine amonijevega heptamolibdata (3.6.1), 200 ml raztopine amonijevega monovanadata (3.6.2) in 134 ml dušikove (V) kisline (3.4). Z vodo dopolnimo do oznake.

3.6.1 Raztopina amonijevega heptamolibdata: v vroči vodi raztopimo 100 g amonijevega heptamolibdata p. a.

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$. Dodamo 10 ml amonijaka (d: 0,91) in dopolnimo do 1 litra.

3.6.2 Raztopina amonijevega monovanadata: v 400 ml vroče vode raztopimo 2,35 g amonijevega monovanadata p. a. NH_4VO_3. Počasi dodamo 20 ml razredčene dušikove (V) kisline (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) in med neprestanim mešanjem dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.7 Standardna raztopina 1 mg fosforja na 1 ml: v vodi raztopimo 4,387 g kalijevega dihidrogen fosfata p. a. KH_2PO_4. Z vodo dopolnimo do 1 litra.

4. **Oprema**

4.1 Žarilni lončki iz kvarca ali porcelana.

4.2 Električna žarilna peč s termostatom, nastavljenim na 550 °C.

4.3 4.3 250-mililitrska Kjeldahlova bučka.

4.4 Merilne bučke in precizijske pipete.

4.5 Spektrofotometer.

4.6 Epruvete s premerom približno 16 mm, z brušenimi zamaški 14,5 mm; prostornina: od 25 do 30 ml.

5. **Postopek**

5.1 *Priprava raztopine*

Glede na naravo vzorca pripravimo raztopino, kakor je navedeno v 5.1.1 ali 5.1.2.

5.1.1 *Standardni postopek*

Natehtamo 1 g ali več vzorca s točnostjo 1 mg. Vzorec prenesemo v Kjeldahlovo bučko, dodamo 20 ml žveplove (V) kisline (3.5), pretresemo, da se vzorec popolnoma prepoji s kislino in da se ne prijema stranic buče, segrejemo in pustimo vreti 10 minut. Nekoliko ohladimo, dodamo 2 ml dušikove (V) kisline (3.4), pazljivo segrejemo, nekoliko ohladimo, dodamo še nekaj dušikove (V) kisline (3.4) in ponovno segrejemo do vrenja. Postopek ponavljamo toliko časa, da dobimo brezbarvno raztopino. Ohladimo, dodamo nekaj vode, prelijemo tekočino v 500-mililitrsko merilno bučko in Kjeldahlovo bučko speremo z vročo vodo. Ohladimo, dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

5.1.2 *Vzorci, ki vsebujejo organske snovi in ne vsebujejo kalcijevih in magnezijevih dihidrogen fosfatov*

V žarilni lonček natehtamo približno 2,5 g vzorca s točnostjo 1 mg. Dodamo 1 g kalcijevega karbonata (3.1) in mešamo, da se snovi popolnoma premešata. Žarimo v pečici pri 550 °C ± 5 °C, da dobimo bel ali siv pepel (majhna količina oglja ni problematična). Pepel prenesemo v 250- mililitrsko čašo. Dodamo 20 ml vode in dodajamo klorovodikovo kisline (3.2) do prenehanja izhajanja mehurčkov. Dodamo še 10 ml klorovodikove kisline (3.2). Čašo postavimo na peščeno kopel in izparevamo do suhega, da dobimo netopen SiO_2. Preostanek raztopimo v 10 ml dušikove (V) kisline (3.3) in na peščeni kopeli pustimo vreti 5 minut, da raztopina ne izpari. Tekočino prelijemo v 500-mililitrsko merilno bučko in čašo nekolikokrat speremo z vročo vodo. Ohladimo, z vodo dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

5.2 *Razvijanje barve in merjenje optične gostote*

Alikvot filtrata iz 5.1.1 ali 5.1.2 razredčimo tako, da dobimo koncentracijo fosforja do 40 μg/ml. 10 ml te raztopine odpipetiramo v epruveto (4.6) in dodamo 10 ml molibdovanadatnega reagenta (3.6). Premešamo in pustimo stati najmanj 10 minut pri 20 °C. Izmerimo optično gostoto s spektrofotometrom pri 430 nm proti raztopini, ki vsebuje 10 ml molibdovanadatnega reagenta (3.6) v 10 ml vode.

5.3 *Umeritvena krivulja*

Iz standardne raztopine (3.7) pripravimo raztopine, ki vsebujejo 5, 10, 20, 30 in 40 μg fosforja na 1 ml. V 10 ml vsake izmed teh raztopin dodamo 10 ml molibdovanadatnega reagenta (3.6), premešamo in pustimo stati najmanj 10 minut pri 20 °C. Izmerimo optično gostoto, kakor je navedeno v 5.2.

Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da v diagram vnesemo izmerjene optične gostote proti ustreznim količinam fosforja. Za koncentracije med 0 in 40 μg/ml bo krivulja linearna.

6. **Izračun rezultatov**

Množino fosforja v preskusnem vzorcu določimo iz umeritvene krivulje.

Rezultat izrazimo kot odstotni masni delež glede na vzorec.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

3 % relativne vrednosti, če je vsebnost fosforja nižja od 5 %;

0,15 % absolutne vrednosti, če je vsebnost fosforja 5 % ali več.

IV. **DOLOČANJE SUROVIH OLJ IN MASTI**

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo je možno določanje vsebnosti surovih olj in masti v krmi. Ne uporablja se za analize oljnih semen in oljnatega sadja, ki so določeni v Uredbi Sveta 136/66/EGS z dne 22. septembra 1966. Določanje vsebnosti olja v takšnih proizvodih je opisano v Prilogi V k Uredbi Komisije (EGS) 1470/68 z dne 23. septembra 1968.

Uporablja se eden izmed dveh postopkov, glede na naravo krme.

1.1 *Postopek A*: (ekstrakcija z etrom): uporablja se za vso krmo, razen za 1.2

1.2 *Postopek B*: uporablja se za vso krmo, iz katere ni mogoče popolnoma ekstrahirati olj in masti z dietiletrom brez predhodne hidrolize, za krmo živalskega izvora, glutene, sušeno krompirjevo kašo, sušene ostanke pri varjenju in destiliranju, sušen kvas, ostanke pri proizvodnji piškotov, kruha in kuhane hrane, mlečne izdelke in krmo, ki vsebuje velik delež takšnih proizvodov (najmanj 40 %), ter za krmne mešanice, obogatene z mastmi.

2. **Princip**

2.1 *Postopek A*: (glej 7.1) Olja in masti ekstrahiramo z dietiletrom. Topilo oddestiliramo, ostanek pa posušimo in stehtamo.

2.2 *Postopek B*: Vroč vzorec hidroliziramo s klororovodikovo kislino. Raztopino ohladimo in filtriramo. Ostanek speremo, osušimo in ekstrahiramo z dietiletrom z uporabo metode A.

3. **Reagenti**

3.1 Brezvodni dietileter, d: 0,720, vrelišče: 34,5 °C, skoraj brez peroksidov

3.2 Brezvodni natrijev sulfat p. a.

3.3 Klorovodikova kislina 3 M.

3.4 Filtrirna sredstva, npr. Kieselgur, Hyflo-supercel.

3.5 Ogljikov tetraklorid p. a.

4. **Oprema**

4.1 Ekstraktor vrste Soxhlet ali podobna aparatura.

4.2 Grelna naprava, odporna proti eksplozijam, z možnostjo uravnavanja temperature.

4.3 Vakuumska sušilna peč (manj kot 100 torov).

5. **Postopek**

5.1 *Metoda A: (glej 7.1)*

5 g vzorca natehtamo s točnostjo 1 mg in mu dodamo 2 g do 3 g (po potrebi tudi več) brezvodnega natrijevega sulfata (3.2). Mešanico postavimo v ekstrakcijsko kartušo, ki ne vsebuje olja in masti ter prekrijemo z zamaškom iz surovega bombaža, ki tudi ne vsebuje masti. (Mešamo lahko v kartuši.)

Kartušo postavimo v ekstraktor (4.1) in šest ur ekstrahiramo z dietiletrom (3.1). Če uporabljamo ekstraktor vrste Soxhlet, naravnamo gretje tako, da dobimo najmanj 15 prelivanj na uro. Eterni ekstrakt etra lovimo v suho merilno bučko, ki vsebuje drobce plovca ([1]).

Eter oddestiliramo in nato uro in pol sušimo ostanke po izhlapevanju v vakuumskem sušilniku (4.3) pri 75 °C. Ohladimo v eksikatorju in stehtamo. Ponovno sušimo 30 minut, da ostane masa olja in masti konstantna (izguba mase ne sme presegati 1 mg).

5.2 *Metoda B*

Natehtamo 2,5 g vzorca s točnostjo 1 mg (glej 7.2) in ga prenesemo v 400-mililitrsko čašo ali 300 mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 100 ml klorovodikove kisline 3 M (3.3) in drobce plovca. Čašo prekrijemo z urnim steklom ali pa opremimo erlenmajerico s povratnim hladilnikom. Mešanico pustimo, da rahlo vre nad nizkim plamenom ali na vroči plošči eno uro. Pazimo, da se vzorec ne oprijema sten posode.

([1]) UL L 127, 30.9.1966, str. 3025/66.

Ohladimo in dodamo toliko filtrirnega sredstva (3.4), da med filtracijo ne pride do izgub olja in masti. Filtriramo skozi navlažen, dvojni filtrirni papir, ki ne vsebuje masti. Ostanek spiramo s hladno vodo do prenehanja kisle reakcije. Preverimo, ali filtrat ne vsebuje olja in masti. Vsebnost olj ali masti v filtratu pomeni, da je treba vzorec pred hidrolizo ekstrahirati z dietiletrom, in sicer s postopkom, navedenim pod 5.1.

Dvojni filtrirni papir, na katerem je ostanek, prenesemo na urno steklo in ga poldrugo uro sušimo v sušilniku pri 95 °C do 98 °C.

Dvojni filtrirni papir, na katerem je suhi ostanek, postavimo v ekstrakcijsko kartušo, ekstrahiramo z dietiletrom in nadaljujemo, kakor je opisano v drugem odstavku 5.1.

6. **Izračun rezultata**

Rezultat izrazimo kot odstotni masni delež glede na vzorec.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,3 % olja ali masti.

7. **Opombe**

7.1 Pri proizvodih z visoko vsebnostjo olj in masti, ki jih je težko drobiti ali so neprimerni za pripravo zmanjšanih (reduciranih) homogenih vzorcev, ravnamo na naslednji način. Natehtamo 20 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga zmešamo z 10 g ali več brezvodnega natrijevega sulfata (3.2). Z dietiletrom (3.1) izvedemo ekstrakcijo, kakor navaja 5.1. Z ogljikovim tetrakloridom (3.5) dobljeni ekstrakt dopolnimo do 500 ml in ga premešamo. 50 ml te raztopine prenesemo v majhno, suho tarirano bučko, ki vsebuje drobce plovca ([1]). Topilo oddestiliramo, osušimo in nadaljujemo, kakor je navedeno v zadnjem odstavku 5.1. Iz ostanka po ekstrakciji, ki je ostal v kartuši, odstranimo ostanek topila in ostanek zdrobimo do velikosti zrn 1 mm. Vzorec vrnemo v ekstrakcijsko kartušo (ne smemo dodati natrijevega sulfata). Ekstrahiramo z dietiletrom in nadaljujemo skladno z drugim in tretjim odstavkom 5.1.

Z naslednjo enačbo izračunamo rezultat kot odstotni masni delež glede na vzorec in pri tem upoštevamo alikvot, ki smo ga uporabili pri prvi ekstrakciji:

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

pri čemer je:

a = ekstrakt etra, v gramih, v alikvotu po prvi ekstrakciji;

b = ekstrakt etra, v gramih, po drugi ekstrakciji.

7.2 Pri proizvodih z nizko vsebnostjo olj in masti se preskusni vzorec lahko poveča na 5 g.

([1]) UL L 239, 28.9.1968, str. 2.