

32000L0045

L 174/32

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA

2000.7.13.

A BIZOTTSÁG 2000/45/EK IRÁNYELVE**(2000. július 6.)****a takarmányokban található A-vitamin, E-vitamin és triptofán meghatározására szolgáló közösségi analitikai módszerek létrehozásáról****(EGT vonatkozású szöveg)**

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb Ausztria, Finnország és Svédország csatlakozási okmányával⁽¹⁾ módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésénél alkalmazandó közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i 70/373/EGK tanácsi irányelvre⁽²⁾ és különösen annak 2. cikkére,

mivel:

- (1) A 70/373/EGK irányelv előírja, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzését, amelynek célja a takarmányok minőségére és összetételére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezésekből eredő követelmények betartásának ellenőrzése, közösségi mintavételi és analitikai módszerek alkalmazásával kell végrehajtani.
- (2) A legutóbb az 1999. november 17-i 2439/1999/EK bizottsági rendelettel módosított⁽³⁾, a takarmány-adalékanyagokról szóló, 1970. november 23-i 70/524/EGK tanácsi irányelv⁽⁴⁾ előírja, hogy az A- és E-vitamin-tartalmat fel kell tüntetni a címkézésen, amennyiben az említett anyagokat előkeverékekhez vagy takarmányokhoz adják hozzá.
- (3) A legutóbb a 2000/16/EK bizottsági irányelvvel⁽⁵⁾ módosított, az összetett takarmány forgalmazásáról szóló, 1979. április 2-i 79/373/EGK tanácsi irányelv⁽⁶⁾ és a legutóbb a 96/25/EK irányelvvel⁽⁷⁾ módosított, a különleges táplálkozási célra szánt takarmányokról szóló, 1993. szeptember 13-i 93/74/EGK⁽⁸⁾ tanácsi irányelv előírja, hogy az aminosavakat fel kell tüntetni a takarmány címkézésén.
- (4) Az említett anyagok ellenőrzésére közösségi analitikai módszereket kell meghatározni.
- (5) Az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A tagállamoknak előírják, hogy a takarmányok és az előkeverékek A-vitamin-, E-vitamin- és triptofán-tartalmának hatósági ellenőrzése céljából végzett analitikai vizsgálatokat az ezen irányelv mellékletében meghatározott módszerrel kell végrehajtani.

2. cikk

A tagállamok legkésőbb 2000. augusztus 31-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Az intézkedéseket 2000. szeptember 1-jétől alkalmazzák.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket az intézkedéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

3. cikk

Ez az irányelv az Európai Közösségek Hivatalos Lapjában való kihirdetését követő 20. napon lép hatályba.

4. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 2000. július 6-án.

a Bizottság részéről

David BYRNE

a Bizottság tagja

⁽¹⁾ HL C 241., 1994.8.29., 1. o.

⁽²⁾ HL L 170., 1970.8.3., 2. o.

⁽³⁾ HL L 297., 1999.11.18., 8. o.

⁽⁴⁾ HL L 270., 1970.12.14., 1. o.

⁽⁵⁾ HL L 105., 2000.5.3., 36. o.

⁽⁶⁾ HL L 86., 1979.4.6., 30. o.

⁽⁷⁾ HL L 125., 1996.5.23., 35. o.

⁽⁸⁾ HL L 237., 1993.9.22., 23. o.

MELLÉKLET

A. RÉSZ

AZ A-VITAMIN MEGHATÁROZÁSA

1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer a takarmányok és az előkeverékek A-vitamin-(retinol)-tartalmának meghatározására szolgál. Az A-vitamin magában foglalja az ezzel a módszerrel meghatározásra kerülő *all-trans*-retinyl alkoholt és annak *cis*z izomerjeit. Az A-vitamin-tartalmat nemzetközi egység (NE)/kg-ban fejezzük ki. Egy NE 0,300 µg *all-trans*-A-vitamin-alkohol, 0,344 µg *all-trans*-A-vitamin-acetát vagy 0,550 µg *all-trans*-A-vitamin-palmitát aktivitásának felel meg.

A meghatározás határértéke 2 000 NE A-vitamin/kg.

2. Vizsgálati alapelv

A mintát etanolos kálium-hidroxid oldattal hidrolizáljuk, és az A-vitamint petroléterrel extraháljuk. Az oldószert bepárlással eltávolítjuk, a maradékot metanolban oldjuk, és – szükség esetén – a kívánt koncentrációra hígítjuk. Az A-vitamin-tartalmat fordított fázisú, nagynyomású folyadék-kromatográfiával (RP-HPLC) határozzuk meg, UV- vagy fluoreszcens detektor alkalmazásával. A kromatográfiás paramétereket úgy választjuk meg, hogy az *all-trans*-A-vitamin-alkohol és annak *cis*z izomerjei ne váljanak szét.

3. Reagensek

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Petroléter, forrásponttartomány: 40–60 °C
- 3.3. Metil-alkohol
- 3.4. Kálium-hidroxid-oldat, $\beta = 50$ g/100 ml
- 3.5. Nátrium-aszkorbát-oldat, $\beta = 10$ g/100 ml (lásd Észrevételek 7.7. pont)
- 3.6. Nátrium-szulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
- 3.6.1. Nátrium-szulfid-oldat, $c = 0,5$ mol/l glicerinben, $\beta = 120$ g/l ($x = 9$ -nél) (lásd Észrevételek 7.8. pont)
- 3.7. Fenoltaleinoldat, $\beta = 2$ g/100 ml etanolban (3.1.)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Mozgó fázis a HPLC-hez: metil-alkohol (3.3.) és víz keveréke, pl. 980 + 20 (v + v). A pontos arányt az alkalmazott oszlop tulajdonságai határozzák meg.
- 3.10. Nitrogén, oxigénmentes
- 3.11. *All-trans*-A-vitamin-acetát, fokozott tisztaságú, igazolt aktivitású, pl. $2,80 \times 10^6$ NE/g
- 3.11.1. *All-trans*-A-vitamin-acetát törzsoldat: mérjük be 0,1 mg pontossággal 50 mg A-vitamin acetátot (3.11.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel 2-propanolban (3.8.), majd töltjük fel jelig ugyanazzal az oldószerezrel. Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 1 400 NE A-vitamin/ml. A pontos A-vitamin-tartalmat az 5.6.3.1. pont szerint kell meghatározni.
- 3.12. *All-trans*-A-vitamin-palmitát, fokozott tisztaságú, igazolt aktivitású, pl. $1,80 \times 10^6$ NE/g
- 3.12.1. *All-trans*-A-vitamin-palmitát törzsoldat: mérjük be 0,1 mg pontossággal 80 mg A-vitamin-acetátot (3.12.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel 2-propanolban (3.8.), majd töltjük fel jelig ugyanazzal az oldószerezrel. Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 1 400 NE A-vitamin/ml. A pontos A-vitamin-tartalmat az 5.6.3.2. pont szerint kell meghatározni.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (lásd Észrevételek 7.5. pont)

4. Eszközök

- 4.1. Rotációs vákuumbepárló
- 4.2. Sötétített üvegedények

- 4.2.1. 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikok, csiszolt üvegnyakkal
- 4.2.2. Csiszolt üveg dugós, vékony nyakú 10, 25, 100 és 500 ml-es mérőlombikok
- 4.2.3. Kónikus, 1 000 ml-es választótölcsérek, csiszolt üveg dugókkal
- 4.2.4. 250 ml-es, körte alakú lombikok, csiszolt üvegnyakkal
- 4.3. Allihn-féle hűtő, köpeny hossza 300 mm, csiszolt üvegcsatlakozóval, adapteres gázadagoló csővel
- 4.4. Redős szűrőpapír a fázisok szétválasztásához, 185 mm átmérőjű (pl. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. HPLC berendezés, befecskendező rendszerrel
- 4.5.1. Folyadék-kromatográfiás oszlop, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 vagy 10 µm töltet, vagy azzal egyenértékű (teljesítménykritérium: az alkalmazott HPLC paraméterek mellett az összes retinol-izomer csak egyetlen csúcsot adjon)
- 4.5.2. Állítható hullámhosszúságú UV- vagy fluoreszcens detektor,
- 4.6. Spektrofotométer 10 mm-es kvarcküvetékekkel
- 4.7. Vízfürdő, mágneses keverővel
- 4.8. Extraháló készülék (lásd 1. ábra), amely az alábbiakból áll:
- 4.8.1. 1 l térfogatú üveghenger, csiszolt üvegnyakkal és -dugóval
- 4.8.2. Oldalirányú bevezetőcsővel és állítható, a feltét közepén áthaladó csővel ellátott, csiszolt üvegből készült feltét. Az állítható csőnek U-alakú alsó véggel, az ellenkező oldalon pedig fűvókával kell rendelkeznie, hogy a hengerben levő felső folyadékréteg átvihető legyen a választótölcsérbe.

5. A vizsgálat módja

Megjegyzés: Az A-vitamin fényre (UV) és oxidációra érzékeny. Minden műveletet fénytől elzárva (sötét üvegedényekben vagy alumíniumfóliába tekert üvegedényekben), és oxigén kizárásával (nitrogénáramban) kell végezni. Az extrahálás során a folyadék feletti levegőt nitrogénnel kell eltávolítani (a dugó időszakonkénti meglazításával kerüljük el a túlzottan nagy nyomás kialakulását).

5.1. A minta előkészítése

Ügyelve a hőképződés elkerülésére, őröljük a mintát annyira, hogy az áthaladjon egy 1 mm-es szemmagyságú szitán. Az őrlést közvetlenül a súlymérés és a szappanosítás előtt kell végezni, különben A-vitamin-vesztéségh lehet fel.

5.2. Szappanosítás

Az A-vitamin-tartalomtól függően mérjük be 0,01 g pontossággal 2–25 g mintát egy 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikba (4.2.1.). Keverés közben adjunk hozzá egymást követően 130 ml etanolt (3.1.), körülbelül 100 mg BHT-t (3.13.), 2 ml nátrium-aszkorbát-oldatot (3.5.) és 2 ml nátrium-szulfid-oldatot (3.6.). Illesszünk a lombikhoz hűtőt (4.3.), és mérjük mágneses keverővel felszerelt vízfürdőbe (4.7.). Hevítjük forrásig a lombik tartalmát, majd hagyjuk visszacsepegni öt percig. Ezután a hűtőt (4.3.) át adjunk hozzá 25 ml kálium-hidroxid-oldatot (3.4.), és hagyjuk visszacsepegni újabb 25 percig, lassú nitrogénáramban történő keverés közben. Ezt követően kb. 20 ml vízzel öblítsük a hűtőt, és hűtsük le a lombik tartalmát szobahőmérsékletűre.

5.3. Extrahálás

250 ml vízzel történő átöblítéssel dekantáljuk a szappanosítási oldatot teljes mennyiségében egy 1 000 ml-es választótölcsérbe (4.2.3.) vagy az extraháló készülékbe (4.8.). Öblítsük a szappanosításhoz használt lombikot egymást követően 25 ml etanollal (3.1.) és 100 ml petroléterrel (3.2.), majd az öblítő oldószereket töltjük a választótölcsérbe vagy az extraháló készülékbe. Az egyesített oldatokban a víz és az etanol aránya körülbelül 2:1 legyen. Rázassuk erőteljesen két percig, majd két percen át hagyjuk ülepedni.

5.3.1. Extrahálás választótölcsérrel (4.2.3.)

Amikor a rétegek már elkülönültek (lásd Észrevételek 7.3. pont), vigyük át a petroléterréteget egy másik választótölcsérbe (4.2.3.). Az extrahálást ismételjük meg kétszer 100 ml petroléterrel (3.2.), kétszer pedig 50 ml petroléterrel (3.2.).

Az egyesített kivonatokat a választótölcsérben mossuk kétszer 100–100 ml vízzel, lassú keverés közben (az emulzióképződés megakadályozása céljából), majd többszöri rázatás közben további 100 ml-es vízzel adagokkal egészen addig, amíg a víz, fenoltaleinoldat (3.7.) hozzáadását követően szintelen nem marad (négyeszeri mosás rendszerint elegendő). A szuszpendált víz eltávolítása céljából, a mosott kivonatot szűrjük át a fázisok elkülönítésére szolgáló száraz, redős szűrőpapíron (4.4.) egy 500 ml-es mérőlombikba (4.2.2.). A választótölcsért és a szűrőt öblítsük 50 ml petroléterrel (3.2.), töltjük fel jelig petroléterrel (3.2.), és a tartalmát alaposan keverjük össze.

5.3.2. Extrahálás extraháló készülékkel (4.8.)

Amikor a rétegek szétváltak (lásd Észrevételek 7.3. pont), helyezzük az üveghenger (4.8.1.) dugója helyére a csiszolt üvegfeltétet (4.8.2.), és helyezzük az állítható cső U-alakú, alsó végét úgy, hogy az éppen a rétegek találkozási felülete felett legyen. Egy nitrogénvezetékől nyomást gyakorolva az oldalcsőre, vigyük át a felső petroléterreget egy 1 000 ml-es választótölcsérbe (4.2.3.). Mérjünk 100 ml petrolétert (3.2.) az üveghengerbe, zárjuk le, és alaposan rázzuk össze. Engedjük szétválni a rétegeket, majd a felső réteget vigyük át a választótölcsérbe az előbbieken ismertetett módon. Ismételjük meg az extrahálási műveletet további 100 ml petroléterrel (3.2.), majd kétszer 50 ml petroléterrel (3.2.), és vigyük át a petroléterrétegeket a választótölcsérbe.

Mossuk az egyesített petroléterkivonatokat az 5.3.1. pontban leírt módon, majd folytassuk a műveletet az ott leírtak szerint

5.4. A mintaoldat elkészítése a HPLC-hez

Pipetázzuk a petroléteroldat aliquot részét (5.3.1. vagy 5.3.2.) egy 250 ml-es, körte alakú lombikba (4.2.4.). Az oldószert pároljuk még éppen nedves állapotúra a rotációs bepárlókészüléken (4.1.), csökkentett nyomáson legfeljebb 40 °C-os vízfürdőben. Nitrogén (3.10.) bejuttatásával állítsuk vissza az atmoszferikus nyomást, és vegyük le a lombikot a rotációs bepárlókészülékről. Nitrogén beáramoltatásával (3.10.) távolítsuk el a maradék oldószert, és a maradékot azonnal oldjuk fel ismert térfogatú (10–100 ml) metil-alkoholban (3.3.) (az A-vitamin koncentrációjának 5 NE/ml és 30 NE/ml között kell lennie).

5.5. Meghatározás HPLC-vel

Az A-vitamin elválasztása fordított fázisú C_{18} oszlopon (4.5.1.) történik, koncentrációját pedig UV detektor (325 nm) vagy fluoreszcens detektor (gerjesztés: 325 nm, emisszió: 475 nm) (4.5.2.) segítségével mérjük.

Fecskendezzünk be az 5.4. lépés szerint nyert metil-alkoholos oldatból egy aliquot részt (pl. 20 µl), és eluáljuk a mozgó fázissal (3.9.). Ugyanabból a mintaoldatból többszöri befecskendezés után számítsuk ki a mintaoldathoz tartozó átlagos csúcsmagasságot (területet), valamint a kalibráló oldatból (5.6.2.) többszöri befecskendezés után számítsuk ki a kalibráló oldathoz tartozó átlagos csúcsmagasságokat (területeket).

HPLC paraméterek

A következő paraméterek útmutatásul szolgálnak; ettől eltérő paraméterek is alkalmazhatók, feltéve hogy egyenértékű eredményeket adnak.

Folyadék-kromatográfiás oszlop (4.5.1.):	250 mm × 4 mm, C_{18} , 5 vagy 10 µm töltet, vagy azzal egyenértékű
Mozgó fázis (3.9.):	Metil-alkohol (3.3.) és víz keveréke, pl. 980 + 20 (v + v)
Áramlási sebesség:	1–2 ml/perc
Detektor (4.5.2.):	UV detektor (325 nm) vagy fluoreszcens detektor (gerjesztés: 325 nm/emisszió: 475 nm)

5.6. Kalibrálás

5.6.1. A standard munkaoldatok elkészítése

Pipetázzunk az A-vitamin-acetát törzsoldatból (3.11.1.) 20 ml-t vagy az A-vitamin-palmitát törzsoldatból (3.12.1.) 20 ml-t egy 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikba (4.2.1.), és hidrolizáljuk az 5.2. pontban leírt módon, de BHT hozzáadása nélkül. Ezt követően extraháljuk petroléterrel (3.2.) az 5.3. pont szerint, és töltjük fel 500 ml-re petroléterrel (3.2.). Ebből a kivonatból 100 ml-t pároljunk még éppen nedves állapotig a rotációs bepárlókészüléken (lásd 5.4.), nitrogén áramoltatással távolítsuk el a maradék oldószert (3.10.), majd oldjuk a maradékot 10,0 ml metil-alkoholban (3.3.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 560 NE A-vitamin/ml. A pontos A-vitamin-tartalmat az 5.6.3.3. pont szerint kell meghatározni. A standard munkaoldatot felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.

Ebből a standard munkaoldatból 2,0 ml-t pipetázzunk egy 20 ml-es mérőlombikba, majd töltjük azt fel jelleg metil-alkohollal (3.3.), és keverjük össze. E hígított standard munkaoldat névleges koncentrációja 56 NE A-vitamin/ml.

5.6.2. A kalibráló oldatok és a kalibrációs görbe elkészítése

A hígított standard munkaoldatból vigyünk át 1,0, 2,0, 5,0 és 10,0 ml-t 20 ml-es mérőlombikokba, töltsük fel a lombikokat jelig metil-alkohollal (3.3.), és keverjük össze a tartalmukat. Ezeknek az oldatoknak a névleges koncentrációja 2,8, 5,6, 14,0, és 28,0 NE A-vitamin/ml.

Minden kalibráló oldatból fecskendezzünk be 20 µl-t több alkalommal, és határozzuk meg az átlagos csúcsmagasságokat (területeket). Figyelembe véve az UV ellenőrzés (5.6.3.3.) eredményeit, az átlagos csúcsmagasságokat (területeket) használva szerkesszük meg a kalibrációs görbét.

5.6.3. A standard oldatok UV hitelesítése

5.6.3.1. A-vitamin-acetát törzsoldat

Pipetázzunk az A-vitamin-acetát törzsoldatból (3.11.1.) 2,0 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba (4.2.2.), és a lombikot töltsük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 56 NE A-vitamin/ml. Ebből a hígított A-vitamin-acetát oldatból pipetázzunk 3,0 ml-t egy 25 ml-es mérőlombikba, és a lombikot töltsük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 6,72 NE A-vitamin/ml. Mérjük meg ennek az oldatnak az UV spektrumát spektrofotométeren (4.6.) 2-propanollal (3.8.) szemben, 300 nm és 400 nm között. Az extinkció maximális értékének 325 nm és 327 nm között kell lennie.

Az A-vitamin-tartalom kiszámítása:

$$\text{A-vitamin NE/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E \begin{array}{l} 1 \% \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right) \text{ az A-vitamin-acetát esetében} = 1\,530, 326 \text{ nm-nél, 2-propanolban}$$

5.6.3.2. A-vitamin-palmitát törzsoldat

Pipetázzunk az A-vitamin-palmitát törzsoldatból (3.12.1.) 2,0 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba (4.2.2.), és a lombikot töltsük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 56 NE A-vitamin/ml. Ebből a hígított A-vitamin-palmitát oldatból pipetázzunk 3,0 ml-t egy 25 ml-es mérőlombikba, és a lombikot töltsük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 6,72 NE A-vitamin/ml. Mérjük meg ennek az oldatnak az UV spektrumát spektrofotométeren (4.6.) 2-propanollal (3.8.) szemben, 300 nm és 400 nm között. Az extinkció maximális értékének 325 nm és 327 nm között kell lennie.

Az A-vitamin-tartalom kiszámítása:

$$\text{A-vitamin NE/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E \begin{array}{l} 1 \% \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right) \text{ az A-vitamin-palmitát esetében} = 957, 326 \text{ nm-nél, 2-propanolban}$$

5.6.3.3. A-vitamin standard munkaoldat

Pipetázzunk az 5.6.1. pont szerint elkészített, hígítatlan A-vitamin standard munkaoldatból 3,0 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba (4.2.2.), és a lombikot töltsük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ebből az oldatból pipetázzunk 5,0 ml-t egy 25 ml-es mérőlombikba, és a lombikot töltsük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 6,72 NE A-vitamin/ml. Mérjük meg ennek az oldatnak az UV spektrumát spektrofotométeren (4.6.) 2-propanollal (3.8.) szemben, 300 nm és 400 nm között. Az extinkció maximális értékének 325 nm és 327 nm között kell lennie.

Az A-vitamin-tartalom kiszámítása:

$$\text{A-vitamin NE/ml} = E_{325} \times 18,3$$

$$\left(E \begin{array}{l} 1 \% \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right) \text{ az A-vitamin-alkohol esetében} = 1\,821, 325 \text{ nm-nél, 2-propanolban}$$

6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat A-vitamin csúcsainak átlagos magasságából (területéből) határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját NE/ml-ben, a kalibrációs görbét (5.6.2.) használva.

Az A-vitamin-tartalmat (w) NE/kg mintában a következő képlet adja:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1\,000}{V_1 \cdot m} \text{ (IU/kg)}$$

ahol:

β = a mintaoldat (5.4.) A-vitamin-koncentrációja, NE/ml-ben

V_1 = a mintaoldat (5.4.) térfogata, ml-ben

V_2 = az 5.4. szerint vett aliquot rész térfogata, ml-ben

m = a vizsgálati mennyiség tömege, g-ban

7. Észrevételek

- 7.1. Alacsony A-vitamin-koncentrációjú minták esetében a HPLC meghatározáshoz hasznos lehet két szappanosítás (kimért mennyiség: 25 g) petroléterkivonatait egy mintaoldatban egyesíteni.
- 7.2. Az analízishoz bemért minta nem tartalmazhat 2 g-nál több zsírt.
- 7.3. Ha a fázisok nem válnak szét, adjunk az elegyhez körülbelül 10 ml etanolt (3.1.) az emulzió megbontása céljából.
- 7.4. Tőkehalmájolaj és más tiszta zsírok esetében a szappanosítási időt 45–60 percre kell meghosszabbítani.
- 7.5. BHT helyett hidrokinon is használható.
- 7.6. Normálfázisú oszlop használata esetén a retinol-izomerek szétválaszthatók.
- 7.7. Nátrium-aszkorbát-oldat helyett mintegy 150 mg aszkorbinsav is használható.
- 7.8. Nátrium-szulfid-oldat helyett mintegy 50 mg EDTA is használható.

8. Ismételhetőség

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredményének különbsége nem haladhatja meg a magasabb érték 15 %-át.

9. Kollaboratív vizsgálat eredményei ⁽¹⁾

	Előkeverék	Takarmány előkeverék	Ásványi koncentrátum	Fehérje- takarmány	Malactáp
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
átlag [NE/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [NE/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [NE/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [NE/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [NE/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: a laboratóriumok száma

n: az egyedi értékek száma

s_r : az ismételhetőség szórása

s_R : a reprodukálhatóság szórása

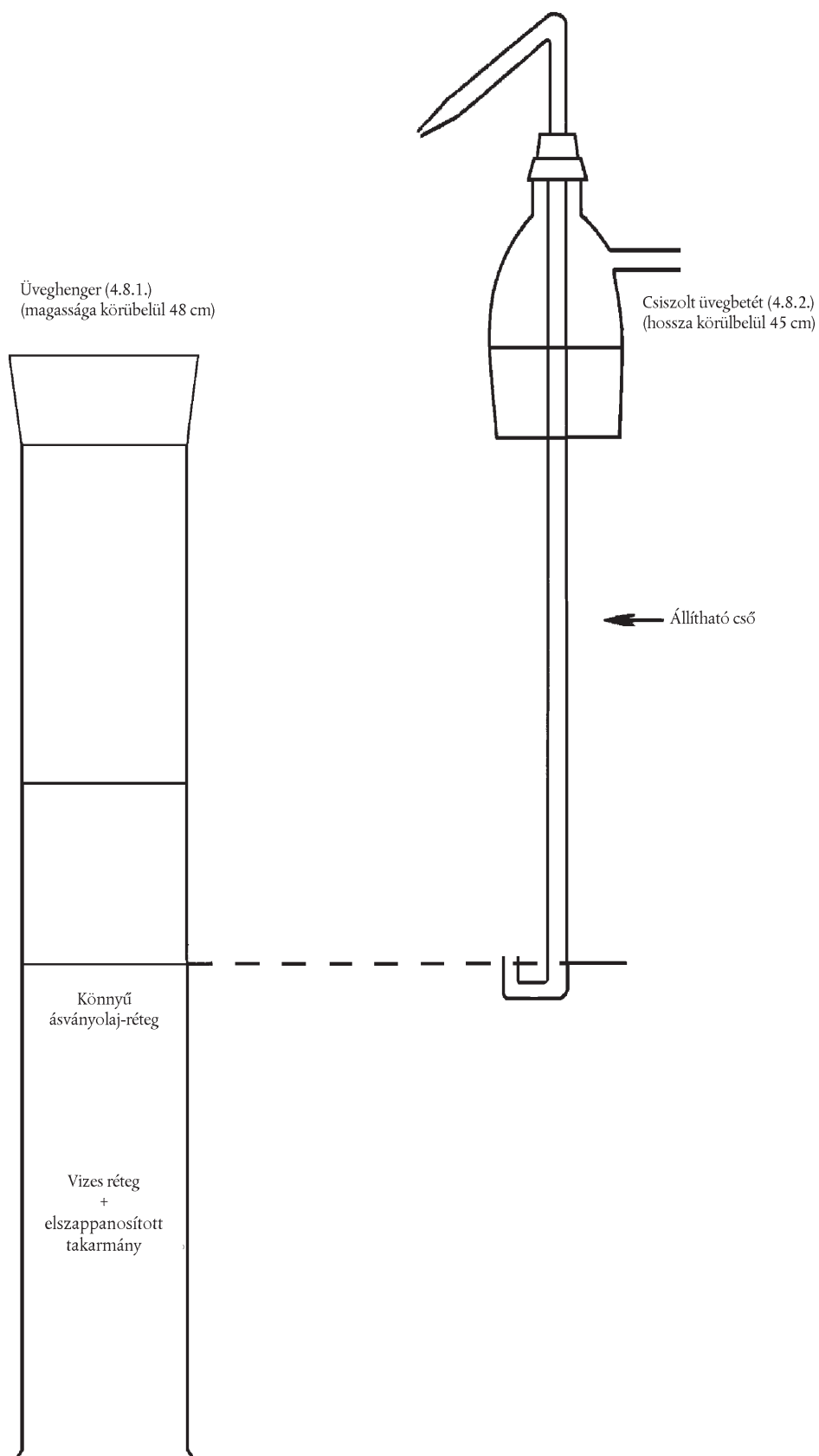
r : ismételhetőség

R : reprodukálhatóság

CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense

CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense

⁽¹⁾ A vizsgálatot a Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) takarmány-munkacsoportja végezte.

1. ábra: Extraháló készülék (4.8.)

B. RÉSZ**AZ E-VITAMIN MEGHATÁROZÁSA****1. Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer a takarmányokban és az előkeverékekben lévő E-vitamin meghatározására szolgál. Az E-vitamin-tartalmat mg DL- α -tokoferol-acetát/kg-ban fejezzük ki. Egy mg DL- α -tokoferol-acetát 0,91 mg DL- α -tokoferolnak (E-vitaminnak) felel meg.

A meghatározás határértéke 2 mg E-vitamin/kg.

2. Vizsgálati alapelv

A mintát etanolos kálium-hidroxid oldattal hidrolizáljuk, és az E-vitamint petroléterrel extraháljuk. Az oldószert bepárlással eltávolítjuk, a maradékot pedig metil-alkoholban oldjuk, és – szükség esetén – a kívánt koncentrációra hígítjuk. Az E-vitamin-tartalmat fordított fázisú, nagynyomású folyadék-kromatográfiával (RP-HPLC) határozzuk meg, fluoreszcens vagy UV detektor alkalmazásával.

3. Reagensek

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Petroléter, forrásponttartomány: 40–60 °C
- 3.3. Metil-alkohol
- 3.4. Kálium-hidroxid-oldat, $\beta = 50$ g/100 ml
- 3.5. Nátrium-aszkorbát-oldat, $\beta = 10$ g/100 ml (lásd Észrevételek 7.7. pont)
- 3.6. Nátrium-szulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
- 3.6.1. Nátrium-szulfid-oldat, $c = 0,5$ mol/l glicerinben, $\beta = 120$ g/l ($x = 9$ -nél) (lásd Észrevételek 7.8. pont)
- 3.7. Fenoltalein oldat, $\beta = 2$ g/100 ml etanolban (3.1.)
- 3.8. Mozgó fázis a HPLC-hez: metil-alkohol (3.3.) és víz keveréke, pl. 980 + 20 (v + v). A pontos arányt az alkalmazott oszlop tulajdonságai határozzák meg.
- 3.9. Nitrogén, oxigénmentes
- 3.10. DL- α -tokoferol-acetát, fokozottan tiszta, igazolt aktivitású
- 3.10.1. DL- α -tokoferol-acetát törzsoldat: mérjük be 0,1 mg-os pontossággal 100 mg DL- α -tokoferol-acetátot (3.10.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel etanolban (3.1.), majd töltjük fel jelig ugyanezzel az oldószerezrel. Ebből az oldatból 1 ml 1 mg DL- α -tokoferol-acetátot tartalmaz. (Az UV ellenőrzést lásd az 5.6.1.3. pontban; a stabilizálást lásd Észrevételek 7.4. pont).
- 3.11. DL- α -tokoferol, fokozottan tiszta, igazolt aktivitású
- 3.11.1. Mérjük be 0,1 mg-os pontossággal 100 mg DL- α -tokoferolt (3.10.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel etanolban (3.1.), majd töltjük fel jelig ugyanezzel az oldószerezrel. Ebből az oldatból 1 ml 1 mg DL- α -tokoferolt tartalmaz. (Az UV ellenőrzést lásd az 5.6.2.3. pontban; a stabilizálást lásd Észrevételek 7.4. pont).
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (lásd Észrevételek 7.5. pont)

4. Eszközök

- 4.1. Rotációs vákuumbepárló
- 4.2. Sötétített üvegedények
- 4.2.1. 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikok csiszolt üvegnyakkal

- 4.2.2. Csiszolt üvegdugós, vékony nyakú 10, 25, 100 és 500 ml-es mérőlombikok
- 4.2.3. Kónikus, 1 000 ml-es választótölcsérek csiszolt üvegdugókkal
- 4.2.4. 250 ml-es, körte alakú lombikok csiszolt üvegnyakkal
- 4.3. Allihn-féle hűtő, köpeny hossza 300 mm, csiszolt üvegcsatlakozóval, adapteres gázadagolócsővel
- 4.4. Redős szűrőpapír a fázisok szétválasztásához, 185 mm átmérőjű (pl. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. HPLC berendezés befecskendező rendszerrel
- 4.5.1. Folyadék-kromatográfiás oszlop, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 vagy 10 µm töltet, vagy azzal egyenértékű
- 4.5.2. Állítható hullámhosszúságú, fluoreszcens- vagy UV detektor,
- 4.6. Spektrofotométer 10 mm-es kvarcküvetékekkel
- 4.7. Vízfürdő mágneses keverővel
- 4.8. Extraháló készülék (lásd az 1. ábrát), amely a következőkből áll:
 - 4.8.1. 1 l térfogatú üveghenger, csiszolt üvegnyakkal és -dugóval
 - 4.8.2. Oldalirányú bevezetőcsővel és állítható, középen áthaladó csővel felszerelt csiszolatos üvegbetét. Az állítható cső alsó vége U-alakú, az ellenkező oldalon pedig kivezető nyílás legyen, hogy a hengerben levő felső folyadékréteg átvihető legyen egy választótölcsérbe.

5. A vizsgálat módja

Megjegyzés:

Az E-vitamin fényre (UV) és oxidációra érzékeny. Minden műveletet fénytől elzárva (sötét üvegedényeket vagy alumíniumfóliába tekert üvegedényeket használva) és oxigén kizárásával (nitrogénáramban) kell elvégezni. Az extrahálás során a folyadék feletti levegőt nitrogénnel kell eltávolítani (a dugó időszakonkénti meglazításával kerüljük el a túlzottan nagy nyomás kialakulását).

5.1. A minta elkészítése

Ügyelve a hőképződés elkerülésére, őröljük meg a mintát annyira, hogy az áthaladjon egy 1 mm-es szemnagyságú szitán. Az őrlést közvetlenül a súlymérés és a szappanosítás előtt kell végezni, különben E-vitamin-vesztés léphet fel.

5.2. Szappanosítás

Az E-vitamin-tartalomtól függően mérjük be 0,01 g pontossággal 2–25 g mintát egy 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikba (4.2.1.). Keverés közben adjunk hozzá egymást követően 130 ml etanolt (3.1.), körülbelül 100 mg BHT-t (3.12.), 2 ml nátrium-aszorbát-oldatot (3.5.) és 2 ml nátrium-szulfid oldatot (3.6.). Illesszük a lombikhoz a hűtőt (4.3.), és merítsük a mágneses keverővel felszerelt vízfürdőbe (4.7.). Hevítsük forrásig, majd hagyjuk visszacsepegni öt percig. Ezután a hűtőn keresztül (4.3.) adjunk hozzá 25 ml kálium-hidroxid-oldatot (3.4.), és hagyjuk visszacsepegni újabb 25 percig, lassú nitrogénáramban történő keverés közben. Ezt követően, kb. 20 ml vízzel öblítsük a hűtőt, és hűtsük le a lombik tartalmát szobahőmérsékletűre.

5.3. Extrahálás

250 ml vízzel történő átöblítéssel dekantáljuk a szappanosítási oldatot egy 1 000 ml-es választótölcsérbe (4.2.3.) vagy az extraháló készülékbe (4.8.). Öblítsük a szappanosításhoz használt lombikot egymást követően 25 ml etanollal (3.1.) és 100 ml petroléterrel (3.2.), majd vigyük át az öblítő oldószereket a választótölcsérbe vagy az extraháló készülékbe. Az egyesített oldatban a víz és az etanol aránya körülbelül 2:1 legyen. Az oldatot rázassuk erőteljesen két percig, majd két percen át hagyjuk ülepedni.

5.3.1. Extrahálás választótölcsérrel (4.2.3.)

A rétegek szétválása után (lásd Észrevételek 7.3. pont), vigyük át a petroléterréteget egy másik választótölcsérbe (4.2.3.). Az extrahálást ismételjük meg kétszer 100 ml petroléterrel (3.2.), kétszer pedig 50 ml petroléterrel (3.2.).

Az egyesített kivonatokat a választótölcsérben mossuk kétszer 100–100 ml vízzel lassú keverés közben (az emulzióképződés elkerülése céljából), majd többszöri rázatás közben további 100 ml-es vízzel egészen addig, amíg a víz, fenoltaleinoldat (3.7.) hozzáadását követően szintelen nem marad (négyeszeri mosás rendszerint elegendő). A mosott kivonatot szűrjük át a fázisok elkülönítésére szolgáló száraz, redős szűrőpapíron (4.4.) egy 500 ml-es mérőlombikba (4.2.2.) a szuszpendált víz eltávolítása céljából. A választótölcsért és a szűrőt öblítsük 50 ml petroléterrel (3.2.), töltsük fel jelig petroléterrel (3.2.), és a tartalmát alaposan keverjük össze.

5.3.2. Extrahálás extraháló készülékkel (4.8.)

A rétegek szétválása után (lásd Észrevételek 7.3. pont), helyezzük az üveghenger (4.8.1.) dugója helyére a csiszolatos üvegbetétet (4.8.2.), és helyezzük az állítható cső U-alakú alsó végét úgy, hogy az éppen a rétegek találkozási felülete felett legyen. Az oldalirányú csőre gyakorolt nitrogénnyomás segítségével vigyük át a felső petroléterréteget egy 1 000 ml-es választótölcsérbe (4.2.3.). Mérjük 100 ml petrolétert (3.2.) az üveghengerbe, helyezzük vissza a dugót, és alaposan rázzuk össze. Hagyjuk szétválni a rétegeket, majd a felső réteget vigyük át a választótölcsérbe az előbbiekből ismertetett módon. Ismételjük meg az extrahálást további 100 ml petroléterrel (3.2.), majd kétszer 50 ml petroléterrel (3.2.), és vigyük át a petroléterrétegeket a választótölcsérbe.

Mossuk az egyesített petroléterkivonatokat az 5.3.1. pontban leírt módon, majd folytassuk a műveletet az ott leírtak szerint.

5.4. A mintaoldat elkészítése a HPLC-hez

Pipetázzuk a petroléter oldat aliquot részét (5.3.1. vagy 5.3.2.) egy 250 ml-es, körte alakú lombikba (4.2.4.). Az oldószert pároljuk még éppen nedves állapotúra a rotációs bepárlókészüléken (4.1.), csökkentett nyomáson, legfeljebb 40 °C-os vízfürdőben. Nitrogén (3.9.) bejuttatásával állítsuk vissza az atmoszferikus nyomást, és vegyük le a lombikot a rotációs bepárlókészületről. Nitrogénáram (3.9.) segítségével távolítsuk el a maradék oldószert, és a maradékot azonnal oldjuk fel ismert térfogatú (10–100 ml) metil-alkoholban (3.3.) (a DL- α -tokoferol koncentrációjának 5 μ g/ml és 30 μ g/ml között kell lennie).

5.5. Meghatározás HPLC-vel

Az E-vitamin elválasztása fordított fázisú C_{18} oszlopon (4.5.1.) történik, koncentrációját fluoreszcens detektor (gerjesztés: 295 nm, emisszió: 330 nm) vagy UV detektor (292 nm) (4.5.2.) segítségével mérjük.

Fecskendezzünk be az 5.4. pont szerinti metil-alkoholos oldatból egy aliquot részt (pl. 20 μ l), és mossuk a mozgó fázissal (3.8.). Ugyanabból a mintaoldatból többször befecskendezve számítsuk ki a mintaoldathoz tartozó átlagos csúcsmagasságokat (területeket), valamint a kalibráló oldatokból (5.6.2.) többször befecskendezve a kalibráló oldatokhoz tartozó átlagos csúcsmagasságokat (területeket).

HPLC paraméterek

A következő paraméterek útmutatásul szolgálnak; más paraméterek is alkalmazhatók, feltéve hogy egyenértékű eredményeket adnak.

Folyadék-kromatográfiás oszlop (4.5.1.):	250 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , 5 vagy 10 μ m töltet, vagy azzal egyenértékű
Mozgó fázis (3.8.):	Metil-alkohol (3.3.) és víz keveréke, pl. 980 + 20 (v + v)
Áramlási sebesség:	1–2 ml/perc
Detektor (4.5.2.):	Fluoreszcens detektor (gerjesztés: 295 nm/emisszió: 330 nm) vagy UV detektor (292 nm)

5.6. Kalibrálás (DL- α -tokoferol-acetát vagy DL- α -tokoferol)

5.6.1. DL- α -tokoferol-acetát standard

5.6.1.1. A standard munkaoldat elkészítése

Pipetázzunk a DL- α -tokoferol-acetát törzsoldatból (3.10.1.) 25 ml-t egy 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikba (4.2.1.), és hidrolizáljuk az 5.2. pontban leírt módon. Ezt követően extraháljuk petroléterrel (3.2.) az 5.3. pont szerint, és töltsük fel 500 ml-re petroléterrel. Ebből a kivonatból 25 ml-t pároljunk még éppen nedves állapotúra a rotációs bepárlókészüléken (lásd 5.4.), távolítsuk el a maradék oldószert nitrogénárammal (3.9.), majd oldjuk a maradékot 25,0 ml metil-alkoholban (3.3.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 45,5 μ g DL- α -tokoferol/ml, ami egyenértékű 50 μ g DL- α -tokoferol-acetát/ml-rel. A standard munkaoldatot felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.

5.6.1.2. A kalibráló oldatok és a kalibrációs görbe elkészítése

A standard munkaoldatból vigyünk át 1,0, 2,0, 4,0 és 10,0 ml-t 20 ml-es mérőlombikokba, töltsük fel a lombikokat jelig metil-alkohollal (3.3.), és keverjük össze a tartalmukat. Ezeknek az oldatoknak a névleges koncentrációja 2,5, 5,0, 10,0 és 25,0 µg/ml DL-α-tokoferol-acetát, azaz 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml és 22,8 µg/ml DL-α-tokoferol.

Fecskendezzünk többször 20 µl-t a kalibráló oldatok mindegyikéből, és határozzuk meg az átlagos csúcsmagasságokat (területeket). Az átlagos csúcsmagasságokat (területeket) használva készítsük el a kalibrációs görbét.

5.6.1.3 A DL-α-tokoferol-acetát törzsoldat (3.10.1.) UV hitelesítése

Etanollal hígítsuk a DL-α-tokoferol-acetát törzsoldat (3.10.1.) 5,0 ml-ét 25,0 ml-re, majd mérjük meg ennek az oldatnak az UV spektrumát spektrofotométeren (4.6.) etanollal (3.1.) szemben, 250 nm és 320 nm között.

Az abszorbancia maximális értéke 284 nm kell, hogy legyen:

$$E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 43,6, 284 \text{ nm-nél etanolban}$$

Ennél a hígításnál 0,84 és 0,88 közötti extinkciós értéket kell kapni.

5.6.2. DL-α-tokoferol standard

5.6.2.1. A munkastandard-oldatok készítése

Pipetázzunk a DL-α-tokoferol törzsoldatból (3.11.1.) 2,0 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba, oldjuk fel metil-alkoholban (3.3.), és töltsük fel jelig metil-alkohollal. Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 40 µg DL-α-tokoferol/ml, ami egyenértékű 44,0 µg DL-α-tokoferol-acetát/ml-rel. A standard munkaoldatot felhasználás előtt frissen kell készíteni.

5.6.2.2. A kalibráló oldatok és a kalibrációs görbe elkészítése

A standard munkaoldatból vigyünk át 1,0, 2,0, 4,0 és 10,0 ml-t 20 ml-es mérő-lombikokba, töltsük fel a lombikokat jelig metil-alkohollal (3.3.), és keverjük össze a tartalmukat. Ezeknek az oldatoknak a névleges koncentrációja 2,0, 4,0, 8,0 és 20,0 µg/ml DL-α-tokoferol, azaz 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml és 22,0 µg/ml DL-α-tokoferol-acetát.

Fecskendezzünk többször 20 µl-t a kalibráló oldatok mindegyikéből, és határozzuk meg az átlagos csúcsmagasságokat (területeket). Az átlagos csúcsmagasságokat (területeket) használva készítsük el a kalibrációs görbét.

5.6.2.3. A DL-α-tokoferol törzsoldat (3.11.1.) UV hitelesítése

Etanollal hígítsuk a DL-α-tokoferol törzsoldat (3.11.1.) 2,0 ml-ét 25,0 ml-re, majd mérjük meg ennek az oldatnak az UV spektrumát spektrofotométeren (4.6.) etanollal (3.1.) szemben, 250 nm és 320 nm között. Az abszorbancia maximális értéke 292 nm kell, hogy legyen:

$$E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 75,8, 292 \text{ nm-nél etanolban}$$

Ennél a hígításnál 0,6-os extinkciós értéket kell kapni.

6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat E-vitamin-csúcsainak átlagos magasságából (területéből) a kalibrációs görbét (5.6.1.2. vagy 5.6.2.2.) használva határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben (α-tokoferol-acetátban számolva).

Az E-vitamin-tartalmat (w) mg/kg mintában kifejezve a következő képlet adja:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2}{V_1 \cdot m} \text{ [mg/kg]}$$

ahol:

β = a mintaoldat (5.4.) E-vitamin-koncentrációja, $\mu\text{g/ml}$ -ben

V_1 = a mintaoldat (5.4.) térfogata, ml-ben

V_2 = az 5.4. szerint vett aliquot rész térfogata, ml-ben

m = a vizsgálati mennyiség tömege, g-ban

7. Észrevételek

- 7.1. Alacsony E-vitamin-koncentrációjú minták esetében a HPLC meghatározáshoz hasznos lehet a két szappanosítás petroléterkivonatait (kimért mennyiség: 25 g) egy mintaoldattá egyesíteni.
- 7.2. Az analizálandó minta nem tartalmazhat 2 g-nál több zsírt.
- 7.3. Ha a fázisok szétválása nem történik meg, adjunk kb. 10 ml etanolt (3.1.) az emulzió megbontása céljából.
- 7.4. A DL- α -tokoferol-acetát- vagy DL- α -tokoferol-oldat 5.6.1.3., illetve 5.6.2.3. szerinti spektrofotometriás mérése után adjunk kb. 10 mg BHT-t (3.12.) az oldathoz (3.10.1. vagy 3.10.2.), és tartsuk az oldatot hűtőszekrényben (a tárolási időtartam legfeljebb négy hét).
- 7.5. BHT helyett hidrokinon is használható.
- 7.6. Normálfázisú oszlopot használva lehetséges az α -, β -, γ - és δ -tokoferol elválasztása.
- 7.7. Nátrium-aszkorbát-oldat helyett 150 mg körüli aszkorbinsav is használható.
- 7.8. Nátrium-szulfid-oldat helyett 50 mg körüli EDTA is használható.

8. Ismételhetőség

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredményének különbsége nem haladhatja meg a magasabb érték 15 %-át.

9. Kollaborációs vizsgálat eredményei ⁽¹⁾

	Előkeverék	Takarmány előkeverék	Ásványi koncentrátum	Fehérje- takarmány	Malactáp
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
átlag [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: a laboratóriumok száma

n: az egyedi értékek száma

s_r : az ismételhetőség szórása

s_R : a reprodukálhatóság szórása

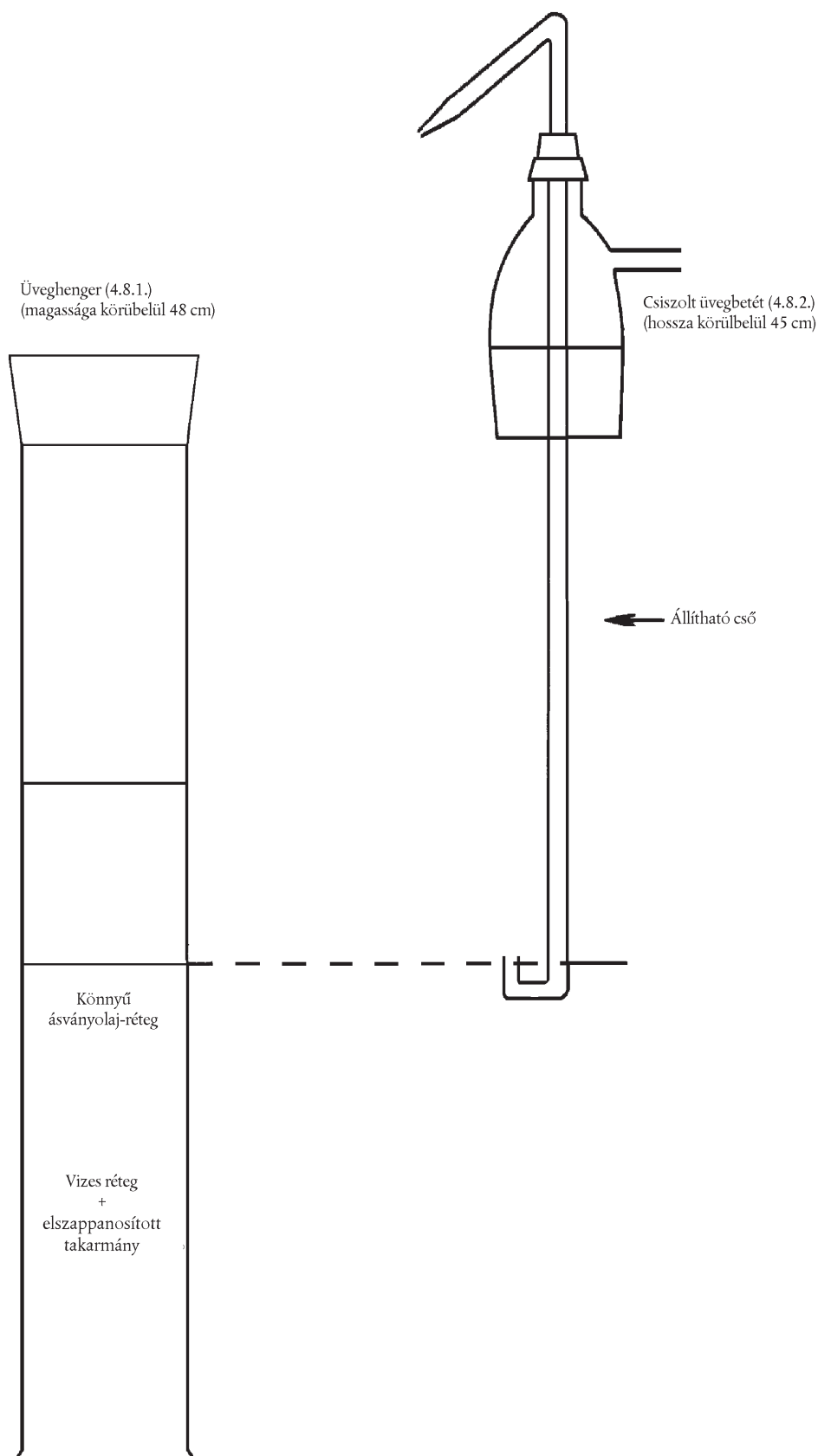
r : ismételhetőség

R : reprodukálhatóság

CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense

CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense

⁽¹⁾ A vizsgálatot a Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) takarmány-munkacsoportja végezte.

1. ábra: Extraháló készülék (4.8.)

C. RÉSZ**A TRIPTOFÁN MEGHATÁROZÁSA****1. Cél és alkalmazási terület**

A módszer a takarmányokban található összes és a szabad triptofán meghatározására szolgál. Nem különbözteti meg a D- és az L-formákat.

2. Vizsgálati alapelv

Az összes triptofán meghatározásához a mintát alkalikus körülmények között, telített bárium-hidroxid-oldattal hidrolizáljuk, majd 110 °C-ra hevítjük, és ezen a hőmérsékleten tartjuk 20 órán át. Hidrolízis után belső standardot adunk hozzá.

A szabad triptofán meghatározásához a mintát enyhén savas körülmények között extraháljuk belső standard jelenlétében.

A hidrolizátumban vagy a kivonatban található triptofánt és a belső standardot HPLC-módszerrel, fluoreszcens detektálással határozzuk meg.

3. Reagensek

- 3.1. Bideszt vagy azzal egyenértékű minőségű vizet kell használni (konduktivitás < 10 µS/cm).
- 3.2. Standard anyag: vákuumban, foszfor-pentoxid felett szárított triptofán (tisztaság/tartalom ≥ 99 %)
- 3.3. Belső standard anyag: vákuumban, foszfor-pentoxid felett szárított α-metil-triptofán (tisztaság/tartalom ≥ 99 %)
- 3.4. Bárium-hidroxid oktahidrát (BaCO_3 képződésének elkerülése érdekében ügyelnünk kell arra, hogy a $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ -t ne tegyük ki túlzott mértékben levegő hatásának, mert ez zavarhatja a meghatározást) (lásd Észrevételek 9.3. pont).
- 3.5. Nátrium-hidroxid
- 3.6. Ortofoszforsav, w = 85 %
- 3.7. Sósav, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$
- 3.8. Metil-alkohol, HPLC tisztaságú
- 3.9. Petroléter, forrásponttartomány 40–60 °C
- 3.10. Nátrium-hidroxid-oldat, c = 1 mol/l:

Oldjunk fel 40,0 g NaOH-t (3.5.) vízben, és vízzel (3.1.) töltsük fel 1 l-re.
- 3.11. Sósav, c = 6 mol/l:

Vegyünk 492 ml HCl-t (3.7.), és vízzel töltsük fel 1 l-re.
- 3.12. Sósav, c = 1 mol/l:

Vegyünk 82 ml HCl-t (3.7.), és vízzel töltsük fel 1 l-re.
- 3.13. Sósav, c = 0,1 mol/l:

Vegyünk 8,2 ml HCl-t (3.7.), és vízzel töltsük fel 1 l-re.
- 3.14. Ortofoszforsav, c = 0,5 mol/l:

Vegyünk 34 ml ortofoszforsavat (3.6.), és vízzel (3.1.) töltsük fel 1 l-re.

3.15. Triptofán (3.2.) koncentrált oldata, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:

Egy 500 ml-es mérőlombikban oldjunk fel 0,2553 g triptofánt (3.2.) sósavban (3.13.), majd az oldatot töltsük fel jelig sósavval (3.13.). Tároljuk -18°C -on maximum négy hétig.

3.16. Koncentrált belső standard oldat, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:

Egy 500 ml-es mérőlombikban oldjunk fel 0,2728 g triptofánt (3.3.) sósavban (3.13.), majd az oldatot töltsük fel jelig sósavval (3.13.). Tároljuk -18°C -on maximum négy hétig.

3.17. A triptofán kalibráló standard oldata és a belső standard:

Vegyünk 2,00 ml-t a triptofán koncentrált oldatából (3.15.) és 2,00 ml-t a koncentrált belső standard (α -metil-triptofán) oldatból (3.16.). Oldjuk fel vízben (3.1.) és metil-alkoholban (3.8.) a kész hidrolizátumával körülbelül azonos térfogatra és körülbelül azonos metil-alkohol koncentrációra (10–30 %).

Az oldatot felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.

Készítés során közvetlen napfényhatástól óvjuk.

3.18. Ecetsav

3.19. 1,1,1-triklór-2-metil-2-propanol

3.20. Etanolamin > 98 %

3.21. 1 g 1,1,1-triklór-2-metil-2-propanol (3.19.) 100 ml metil-alkoholban készített oldata (3.8)

3.22. Mozgó fázis a HPLC-hez: 3,00 g ecetsav (3.18.) + 900 ml víz (3.1.) + 1,1,1-triklór-2-metil-2-propanol (3.19.) metil-alkoholban (3.8.) készített oldatának (3.21.) 50,0 ml-e (1 g/100 ml). A pH-t állítsuk 5,00-re etanolaminnal (3.20.). Az oldatot vízzel (3.1.) töltsük fel 1 000 ml-re.

4. **Eszközök**

4.1. HPLC készülék spektrofotometriás detektorral

4.2. Folyadékkromatográfiás oszlop, 125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , 3 μm töltet, vagy azzal egyenértékű oszlop

4.3. pH-mérő

4.4. Polipropilén lombik, 125 ml térfogatú, széles nyakkal és csavaros zárókupakkal

4.5. Membránszűrő, 0,45 μm

4.6. Autokláv, 110 (± 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) bar

4.7. Mechanikus rázógépet vagy mágneses keverőt

4.8. Kémcsőkeverő (vortex)

5. **A vizsgálat módja**

5.1. A minták elkészítése

Öröljük meg a mintát annyira, hogy az áthaladjon egy 0,5 mm-es szemméretű szitán. Őrlés előtt a nagy nedveségtartalmú mintákat vagy légszáraz állapotba kell hozni 50°C -nál nem magasabb hőmérsékleten, vagy liofilizálni kell azokat. A nagy zsírtartalmú mintákat őrlés előtt petroléterrel (3.9.) extrahálni kell.

5.2. A szabad triptofán (kivonat) meghatározása

1 mg-os pontossággal mérjük be az elkészített mintából (5.1.) megfelelő mennyiséget (1–5 g) egy Erlenmeyer-lombikba. Adjunk hozzá 100,0 ml sósavat, $k = 0,1 \text{ mol/l}$ (3.13.) és 5,00 ml koncentrált belső standard oldatot (3.16.). Rázzuk vagy keverjük 60 percen át mechanikus rázógépen vagy mágneses keverőn (4.7.). Engedjük a zagyot leülepedni, majd pipettázzunk a felülúszó oldatból 10,0 ml-t főzőpohárba. Adjunk hozzá 5 ml ortofoszforsavat, $k = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14.). Nátrium-hidroxiddal, $k = 1,0 \text{ mol/l}$ (3.10.) állítsuk a pH-t 3,0-ra. Adjunk hozzá annyi metil-alkoholt (3.8.), hogy a végtérfogatra számított metil-alkohol-koncentráció 10 és 30 % között legyen. Vigyük át megfelelő űrtartalmú mérőlombikba, és vízzel hígítsuk a kromatográfiához szükséges térfogatra (körülbelül a kalibráló standard oldat (3.17.) térfogatával megegyező térfogatra).

A HPLC oszlopra való felvitel előtt szűrjük át az oldat néhány ml-ét 0,45 µm-es membránszűrőn (4.5.). A kromatográfiát az 5.4. bekezdés szerint végezzük.

A standard oldatot és a kivonatokat óvjuk a közvetlen napfényhatástól. Ha a kivonatokat nem lehet a készítés napján analizálni, azok 5 °C-on legfeljebb három napig tárolhatók.

5.3. Az összes triptofán (hidrolizátum) meghatározása

Az elkészített mintából (5.1.) mérjük be 0,2 mg-os pontossággal 0,1–1 g-ot a polipropilén lombikba (4.4.). A kimért mintamennyiség nitrogéntartalmának kb. 10 mg-nak kell lennie. Adjunk hozzá 8,4 g bárium-hidroxid-oktahidráttal (3.4.) és 10 ml vizet. Keverjük össze kémcsőkeverővel (4.8.) vagy mágneses keverőn (4.7.). A teflon-bevonatú mágneset hagyjuk a keverékben. Mossuk le 4 ml vízzel az edény falát. Helyezzük rá a csavaros zárókapot, és lazán zárjuk le a lombikot. Helyezzük autoklávba (4.6.) forró vízzel és gőzzel 30–60 percre. Zárjuk be az autoklávot, és indítsuk el 110 (±2) °C hőmérsékleten 20 órán át.

Az autokláv kinyitása előtt csökkentsük a hőmérsékletet kevéssel 100 °C alá. A Ba(OH)₂ · 8 H₂O kikristályosodásának elkerülése érdekében adjunk a meleg keverékhez 30 ml, szobahőmérsékletű vizet. Óvatosan rázzuk vagy keverjük össze. Adjunk hozzá 2,00 ml koncentrált belső standard (α-metil-triptofán) oldatot (3.16.). Hűtsük az edényeket víz- vagy jégfürdőben 15 percen át.

Ezután adjunk hozzá 5 ml ortofoszforsavat, k = 0,5 mol/l (3.14.). Tartsuk az edényt a hűtőfürdőben, és keverés közben semlegesítsük az oldatot sósavval, k = 6 mol/l (3.11.), majd állítsuk a pH-t 3,0-ra sósavval, k = 1 mol/l (3.12.). Adjunk hozzá annyi metil-alkoholt, hogy a végtérfogatra számított metil-alkohol-koncentráció 10 és 30 % között legyen. Vigyük át megfelelő úrtartalmú mérőlombikba, és vízzel hígítsuk a kromatográfiához szükséges térfogatra (például 100 ml-re). Ügyeljünk, hogy a metil-alkohol hozzáadása ne okozzon kicsapódást.

A HPLC oszlopra való felvitel előtt szűrjük át az oldat néhány ml-ét 0,45 µm-es membránszűrőn (4.5.). A kromatográfiát az 5.4. bekezdés szerint végezzük.

A standard oldatot és a kivonatokat óvjuk a közvetlen napfényhatástól. Ha a kivonatokat nem lehet a készítés napján analizálni, azok 5 °C-on legfeljebb három napig tárolhatók.

5.4. Meghatározás HPLC-vel

Az izokratikus elúcióra vonatkozó következő paraméterek útmutatásul szolgálnak; más paraméterek is alkalmazhatók, feltéve hogy azok egyenértékű eredményeket adnak (lásd még Észrevételek 9.1. és 9.2. pont).

Folyadék-kromatográfiás oszlop (4.2.):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 3 µm töltet, vagy azzal egyenértékű oszlop
Oszlophőmérséklet:	szobahőmérséklet
Mozgó fázis (3.22.):	3,00 g ecetsav (3.18.) + 900 ml víz (3.1.) + az 1,1,1-triklór-2-metil-2-propanol (3.19.) metil-alkohollal (3.8.) készült oldatának (3.21.) (1 g/100 ml) 50,0 ml-e. A pH-t etanolaminnal (3.20.) állítsuk 5,00-re. Vízzel (3.1.) töltsük fel 1 000 ml-re.
Áramlási sebesség:	1 ml/perc
Teljes futtatási idő:	körülbelül 34 perc
Kimutatási hullámhossz:	gerjesztés: 280 nm, emisszió: 356 nm
Befecskendezett mennyiség:	20 µl

6. Az eredmények kiszámítása

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{g triptofán} / 100 \text{ g minta}$$

- A = a belső standard, standard kalibráló oldat (3.17.) csúcsterülete
- B = a triptofán, kivonat (5.2.) vagy hidrolizátum (5.3.), csúcsterülete
- C = a kalibráló oldathoz (3.17.) hozzáadott koncentrált triptofánoldat (3.15.) térfogata, ml-ben (2 ml)
- D = a kalibráló oldathoz (3.17.) hozzáadott koncentrált triptofánoldat (3.15.) koncentrációja, $\mu\text{mol/ml}$ -ben (= 2,50)
- E = az extrahálásnál (5.2.) (= 5,00 ml) vagy a hidrolizátumhoz (5.2.) (= 2,00 ml) hozzáadott, koncentrált belső standard oldat (3.16.) térfogata, ml-ben
- F = a belső standard, kivonat (5.2.) vagy hidrolizátum (5.3.), csúcsterülete
- G = a triptofán, standard kalibráló oldat (3.17.) csúcsterülete
- H = a standard kalibráló oldathoz (3.17.) hozzáadott, koncentrált belső standard oldat (3.16.) térfogata, ml-ben (= 2,00 ml)
- W = a minta tömege, g-ban (száritott és/vagy zsírtalanított minta esetében az eredeti súlyra korrigált)
- MW = a triptofán molekulatömege (= 204,23)

7. Ismételhetőség

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredményének különbsége nem haladhatja meg a magasabb érték 10 %-át.

8. Kollaborációs vizsgálat eredményei

Közösségi kollaborációs vizsgálatra került sor (negyedik körvizsgálat), amelynek során három mintát vizsgáltak meg a hidrolízis módszerének hitelesítése céljából, 12 laboratóriumban. Mindegyik mintát többször (5) analizáltak. Az eredményeket a következő táblázat tartalmazza:

	1. minta Sertéstáp	2. minta L-triptofánnal kiegészítet sertéstáp	3. minta Takarmánykoncentrátum sertések számára
L	12	12	12
n	50	55	50
Átlag [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
s_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L: eredményeket beküldő laboratóriumok száma

n: a (Cochran által Dixon-szélsőértékpróbával azonosított) szélsőértékek kizárását követően megmaradt egyedi értékek száma

s_r : az ismételhetőség szórása

s_R : a reprodukálhatóság szórása

r : ismételhetőség

R : reprodukálhatóság

CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense, %

CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense, %

Egy másik közösségi kollaborációs vizsgálatot is végeztek (harmadik körvizsgálat), amelynek során két mintát vizsgáltak meg a szabad triptofán kivonására használt módszer hitelesítése céljából, 13 laboratóriumban. Mindegyik mintát többször (5) analizáltak. Az eredményeket a következő táblázat tartalmazza:

	4. minta Búza és szója keveréke	5. minta Búza és szója keveréke (= 4. minta), hozzáadott triptofánnal (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Átlag [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
s_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L: eredményeket beküldő laboratóriumok száma

n: a (Cochran által Dixon-szélsőértékpróbával azonosított) szélsőértékek kizárását követően megmaradt egyedi értékek száma

s_r : az ismételhetőség szórása

s_R : a reprodukálhatóság szórása

r : ismételhetőség

R : reprodukálhatóság

CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense, %

CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense, %

Egy további közösségi körvizsgálatot is végeztek, amelynek során négy mintát vizsgáltak meg a triptofán hidrolízisére használt módszer hitelesítése céljából, hét laboratóriumban. Az eredmények az alábbi táblázatban szerepelnek. Mindegyik mintát többször (5) analizáltak.

	1. minta Sertéstakarmány- keverék (CRM 117)	2. minta Alacsony zsírtar- talmú halliszt (CRM 118)	3. minta Szójaliszt (CRM 119)	4. minta Fölözött tejpor (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Átlag [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
s_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L: eredményeket beküldő laboratóriumok száma

n: a (Cochran által Dixon-szélsőértékpróbával azonosított) szélsőértékek kizárását követően megmaradt egyedi értékek száma

s_r : az ismételhetőség szórása

s_R : a reprodukálhatóság szórása

r : ismételhetőség

R : reprodukálhatóság

CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense, %

CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense, %

9. Észrevételek

- 9.1. Speciális kromatográfiás paraméterek alkalmazása a triptofán és az α -metil-triptofán jobb elválasztását teheti lehetővé.

Izokratikus elúció, majd grádiens oszlopon történő tisztítás:

Folyadékkromatográfiás oszlop: 125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , 5 μ m töltet, vagy azzal egyenértékű oszlop

Oszlophőmérséklet: 32 °C

Mozgó fázis: A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /metil-alkohol, 95 + 5 (V + V).
B: Metil-alkohol

Grádiens program:	0 perc	100 % A	0 % B
	15 perc	100 % A	0 % B
	17 perc	60 % A	40 % B
	19 perc	60 % A	40 % B
	21 perc	100 % A	0 % B
	33 perc	100 % A	0 % B

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

Teljes futtatási idő: körülbelül 33 perc

- 9.2. A kromatográfia a HPLC típusától és az oszloptöltésként alkalmazott anyagtól függően változik. A választott rendszernek képesnek kell lennie a triptofán és a belső standard alapvonalon történő elválasztására. Fontos továbbá, hogy a bomlástermékek jól elváljanak a triptofántól és a belső standardtól. A belső standard nélküli hidrolizátumokat is futtatni kell a belső standard alatti alapvonal szennyezettségének ellenőrzése céljából. Fontos, hogy a futtatási idő elég hosszú legyen az összes bomlástermék eluálásához, mert különben a későn eluálódó csúcsok zavarhatják a későbbi kromatográfiás futtatásokat.

A kromatográfiás rendszernek a működési tartományban lineáris választ kell adnia. A lineáris választ a belső standard állandó (a normális) koncentrációjával és a triptofán változó koncentrációival kell mérni. Fontos, hogy mind a triptofán-, mind a belső standard csúcsok nagysága a HPLC/fluoreszcens rendszer lineáris tartományába essen. Ha a triptofán- és/vagy a belső standard csúcs(ok) túl kicsi(k) vagy túl nagy(ok), az analízist meg kell ismételni más mintamérettel és/vagy más végtérfogattal.

9.3. Bárium-hidroxid

Állás hatására a bárium-hidroxid egyre nehezebben oldódik. Ennek következtében a HPLC meghatározáshoz használt oldat zavaros lesz, ami alacsony triptofánértékeket eredményezhet.