

31999L0027

L 118/36

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA

1999.5.6.

A BIZOTTSÁG 1999/27/EK IRÁNYELVE

(1999. április 20.)

a takarmányokban lévő amprólium, diklazuril és karbadox meghatározására szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról, a 71/250/EGK és 73/46/EGK irányelvek módosításáról, valamint a 74/203/EGK irányelv hatályon kívül helyezéséről

(EGT vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉG BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

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

- (1) mivel 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) mivel a legutóbb a 45/1999 bizottsági rendelettel ⁽²⁾ módosított, a takarmány-adalékanyagokról szóló, 1970. november 23-i 70/524/EGK tanácsi irányelv ⁽³⁾ előírja, hogy az amprólium- és a diklazuril-tartalmat fel kell tüntetni a címkefeliraton, amennyiben ezeket az anyagokat hozzáadták az előkeverékekhez és a takarmányokhoz; mivel a takarmány-adalékanyagokról szóló 70/524/EGK tanácsi irányelvnek egyes növekedésserkentők engedélyének visszavonása tekintetében történő módosításáról szóló, 1998. december 22-i 2788/98 bizottsági rendelet ⁽⁴⁾ visszavonja a karbadox takarmány-adalékanyagként történő felhasználásának engedélyezését, valamint szükséges a tiltott anyagok esetleges illegális felhasználásának hatósági ellenőrzése;
- (3) mivel ezen anyagok ellenőrzésére közösségi analitikai módszereket kell meghatározni;
- (4) mivel a legutóbb a 98/54/EK irányelvvel ⁽⁵⁾ módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról szóló, 1971. június 15-i 71/250/EGK első bizottsági irányelv ⁽⁶⁾ megállapítja, többek között a mustárolaj és a teobromin meghatározására szolgáló analitikai módszereket; mivel az előírt módszerek a tudományos és technikai ismeretek fejlődése következtében már nem érvényesek az eredeti rendeltetési célokra; mivel ennél fogva helyénvaló ezen módszerek törlése;
- (5) mivel a legutóbb a 98/54/EK irányelvvel módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi

analitikai módszerek meghatározásáról szóló, 1972. december 5-i 73/46/EGK negyedik bizottsági irányelv ⁽⁷⁾ megállapítja, többek között a retinol (A vitamin) meghatározására szolgáló analitikai módszereket; mivel az előírt módszer a tudományos és technikai ismeretek fejlődése következtében már nem érvényes az eredeti rendeltetési célokra; mivel ennél fogva helyénvaló a retinol meghatározására szolgáló módszer törlése;

- (6) mivel a legutóbb a 81/680/EGK irányelvvel ⁽⁸⁾ módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról szóló, 1974. március 25-i 74/203/EGK ötödik bizottsági irányelv ⁽⁹⁾ megállapítja a keményítő és a nagy molekulatömegű keményítő bomlástermékek meghatározására szolgáló analitikai módszereket a répaszeletet, répa-pépet, szárított répafejet vagy levelet, burgonya-pépet, szárított élesztőt, a inulinban és töpörtyűben gazdag termékeket, ampróliumot, etopabátot, dinitolmidot, nikarbazint és menadiont (K3 vitamin) tartalmazó takarmányok esetében; mivel az említett irányelvben előírt módszerek a tudományos és technikai ismeretek fejlődése következtében már nem érvényesek az eredeti rendeltetési célokra; mivel ennél fogva helyénvaló ezen irányelv hatályon kívül helyezése;
- (7) mivel az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok és előkeverékek amprólium-, diklazuril- és karbadox-tartalmának hatósági ellenőrzése céljából történő analitikai vizsgálatokat a mellékletben megállapított módszerek szerint kell végrehajtani.

⁽¹⁾ HL L 170., 1970.8.3., 2. o.⁽²⁾ HL L 6., 1999.1.12., 3. o.⁽³⁾ HL L 270., 1970.12.14., 1. o.⁽⁴⁾ HL L 347., 1998.12.23., 31. o.⁽⁵⁾ HL L 208., 1998.7.24., 49. o.⁽⁶⁾ HL L 155., 1971.7.12., 13. o.⁽⁷⁾ HL L 83., 1973.3.30., 21. o.⁽⁸⁾ HL L 246., 1981.8.29., 32. o.⁽⁹⁾ HL L 108., 1974.4.22., 7. o.

2. cikk

A 71/250/EGK irányelv a következőképpen módosul.

1. Az 1. cikkből a „mustárolaj” és a „teobromin” szövegrészt el kell hagyni.
2. A melléklet 8. és 13. pontját el kell hagyni.

3. cikk

A 73/46/EGK irányelv a következőképpen módosul.

1. A 2. cikket el kell hagyni.
2. A II. mellékletet el kell hagyni.

4. cikk

A 74/203/EGK irányelv hatályát veszti.

5. cikk

A tagállamok legkésőbb 1999. október 31-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Ezeket az intézkedéseket 1999. november 1-jétől alkalmazzák.

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

6. cikk

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

7. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1999. április 20-án.

a Bizottság részéről

Franz FISCHLER

a Bizottság tagja

MELLÉKLET

A. RÉSZ

AMPRÓLIUM MEGHATÁROZÁSA

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinium klorid hidroklorid

1. Cél és alkalmazási terület

Ezen módszer az amprólium takarmányokban és előkeverékekben történő meghatározására szolgál. A kimutatási határérték 1 mg/kg, a meghatározás határértéke 25 mg/kg.

2. Vizsgálati alapelv

A mintát metil-alkohol és víz keverékével extraháljuk. A mozgó fázissal történő hígítás és membránszűrés után, az amprólium-tartalmat kationcserélő, nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC), UV-detektor használatával határozzuk meg.

3. Reagenssek

3.1. Metil-alkohol.

3.2. Acetonitril, HPLC minőségű.

3.3. Víz, HPLC minőségű.

3.4. Nátrium-dihidrogén-foszfát oldat, $c = 0,1$ mol/l

Oldjunk fel 13,80 g nátrium-dihidrogén-foszfát-monohidrárt vízben (3.3.), egy 1 000 ml-es mérőlombikban, töltsük fel vízzel (3.3.) jelig és keverjük össze.

3.5. Nátrium-perklorát oldat, $c = 1,6$ mol/l

Oldjunk fel 224,74 g nátrium-perklorát-monohidrárt vízben (3.3.) egy 1 000 ml-es mérőlombikban, töltsük fel vízzel (3.3.) jelig és keverjük össze.

3.6. Mozgó fázis a HPLC-hez (lásd a 9.1. megjegyzést).

Acetonitril (3.2.), nátrium-dihidrogén-foszfát oldat (3.4.) és nátrium-perklorát oldat (3.5.) $450 + 450 + 100$ (v + v + v) arányú keveréke. Használat előtt szűrjük át egy $0,22\ \mu\text{m}$ -es membránszűrőn (4.3.) és gázmentesítsük az oldatot (pl. ultrahangos fürdőben (4.4.) legalább 15 percig).

3.7. Standard anyag: tiszta amprólium, 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinium klorid hidroklorid, E 750 (lásd a 9.2. pontot).

3.7.1. Amprólium standard törzsoldat, 500 $\mu\text{g/ml}$

Mérjünk ki 0,1 mg-os pontossággal, 50 mg ampróliumot (3.7.) egy 100 ml-es mérőlombikba, oldjuk fel 80 ml metil-alkoholban (3.1.) és helyezzük a lombikot 10 percre egy ultrahangos fürdőbe (4.4.). Az ultrahangos kezelés után állítsuk be az oldatot szobahőmérsékletűre, töltsük fel jelig vízzel és keverjük össze. Legfeljebb 4°C -os hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil marad.

3.7.2. Amprólium standard közbenső oldat, 50 $\mu\text{g/ml}$

Pipettázzunk 5 ml standard törzsoldatot (3.7.1.) egy 50 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig az extraháló oldószerrel (3.8.) és keverjük össze. Legfeljebb 4°C -os hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil marad.

3.7.3. Kalibráló oldatok

Adagoljunk 0,5, 1 és 2 ml standard közbenső oldatot (3.7.2.) 50 ml-es mérőlombikokba. Töltsük fel a lombikokat jelig a mozgó fázissal (3.6.) és keverjük össze. Ezen oldatok külön-külön 0,5, 1 és 2 $\mu\text{g/ml}$ ampróliumnak felelnek meg. Ezen oldatokat közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

3.8. Extraháló oldószer

Metil-alkohol (3.1.) és víz 2 + 1 (v + v) arányú keveréke.

4. Eszközök

4.1. Befecskendező rendszerrel ellátott HPLC berendezés, amely alkalmas 100 µl-es mennyiség befecskendezésére.

4.1.1. 125 mm × 4 mm méretű, kationcserélő Nucleosil 10 SA folyadékkromatográfiás oszlop, 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.

4.1.2. Változtatható hullámhosszon mérő UV detektor vagy diódasoros detektor.

4.2. Membránszűrő, PTFE anyag, 0,45 µm-es.

4.3. Membránszűrő, 0,22 µm-es.

4.4. Ultrahangos fürdő.

4.5. Mechanikus vagy mágneses keverőberendezés.

5. A vizsgálat módja

5.1. Általános tudnivalók

5.1.1. Referenciaminta

A visszanyerési próba előtt végezzünk vakpróbát egy referenciamintán annak ellenőrzésére, hogy sem amprólium, sem interferáló anyagok nincsenek jelen. A referenciaminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen és ampróliumot vagy interferáló anyagokat ne tartalmazzon.

5.1.2. Visszanyerési próba

Egy, a mintában találhatóval azonos mennyiségű amprólium hozzáadásával dúsított referenciaminta analízisével végezzünk visszanyerési próbát. A 100 mg/kg szintre való dúsításhoz öntsünk át a standard törzsoldatból (3.7.1.) 10 ml-t egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba és párologtassuk az oldatot körülbelül 0,5 ml-ig. Adjunk hozzá 50 g referenciamintát, keverjük össze alaposan és hagyjuk állni 10 percig, majd keverjük össze újra néhányszor mielőtt folytatjuk a műveletet az extrahálással (5.2.).

Amennyiben a mintával azonos fajtájú referenciaminta nem áll rendelkezésre (lásd az 5.1.1. pontot), a visszanyerési próba elvégezhető a standard hozzáadással módszerrel. Ebben az esetben a vizsgált mintát az abban már jelenlévővel azonos mennyiségű ampróliummal dúsítjuk. Ezt a mintát a referenciamintával együtt elemezzük és a visszanyerést kivonással számítjuk ki.

5.2. Extrahálás

5.2.1. Előkeverékek (amprólium-tartalom < 1 %) és takarmányok

Mérjük ki 0,01 g pontossággal, az amprólium-tartalomtól függően, 5–40 g mintát egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba és adjunk hozzá 200 ml extraháló oldószer (3.8.). Helyezzük a lombikot az ultrahangos fürdőbe (4.4.) és hagyjuk benne 15 percig. Vegyük ki a lombikot az ultrahangos fürdőből és egy óráig rázassuk a rázógépen vagy keverjük a mágneses keverővel (4.5.). Oldjuk a kivonat egy aliquot részét a mozgó fázissal (3.6.) 0,5–2 µg/ml amprólium-tartalomig és keverjük össze (lásd a 9.3. megjegyzést). Szűrjük át ezen hígított oldatnak 5–10 ml-ét egy membránszűrőn (4.2.). Folytassuk a műveletet a HPLC meghatározással (5.3.).

5.2.2. Előkeverékek (amprólium-tartalom 1 %)

Mérjük ki 0,001 g pontossággal, az amprólium-tartalomtól függően, 1–4 g előkeveréket egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba és adjunk hozzá 200 ml extraháló oldószer (3.8.). Helyezzük a lombikot az ultrahangos fürdőbe (4.4.) és hagyjuk benne 15 percig. Vegyük ki a lombikot az ultrahangos fürdőből és egy óráig rázassuk a rázógépen vagy keverjük a mágneses keverővel (4.5.). Oldjuk a kivonat egy aliquot részét a mozgó fázissal (3.6.) 0,5–2 µg/ml amprólium-tartalomig és keverjük össze. Szűrjük át ezen hígított oldatnak 5–10 ml-ét egy membránszűrőn (4.2.). Folytassuk a műveletet a HPLC meghatározással (5.3.).

5.3. HPLC meghatározás

5.3.1. Paraméterek

Az alábbi vizsgálati feltételek iránymutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, amennyiben azok ezzel egyenértékű eredményt adnak.

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.1.1.):	125 mm × 4 mm méretű, kationcserélő Nucleosil 10 SA, 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.
Mozgó fázis (3.6.):	Acetonitril (3.2.), nátrium-dihidrogén-foszfát oldat (3.4.) és nátrium-perklorát oldat (3.5.) 450 + 450 + 100 (v + v + v) arányú keveréke.
Átáramlási sebesség:	0,7-1 ml/perc.
Észlelési hullámhossz:	264 nm.
Befecskendezett mennyiség:	100 µl.

1 µg/ml-es kalibráló oldat (3.7.3.) többszöri befecskendezésével ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását, amíg a csúcsok magassága és a retenciós idők stabilakká nem válnak.

5.3.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzünk be minden kalibráló oldatot (3.7.3.) néhány alkalommal és határozzuk meg az egyes koncentrációkra eső csúcsok magasságának (görbe alatti területének) átlagát. Szerkesszünk kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibrációs oldatok átlag csúcsmagassága (területe) legyen az ordináta tengelyen, a megfelelő, µg/ml-ben megadott koncentrációk pedig az abszcisszán.

5.3.3. Mintaoldat

Fecskendezzük be a mintakivonatot (5.2.) néhány alkalommal ugyanazzal mennyiséggel, amelyet a kalibráló oldatok esetében használtunk és határozzuk meg az amprólium-csúcsok átlag csúcsmagasságát (görbe alatti területét).

6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat amprólium-csúcsainak átlag magasságából (görbe alatti területéből) határozzuk meg a mintaoldat µg/ml-ben kifejezett koncentrációját a kalibrációs görbe (5.3.2.) alapján.

A minta, w mg/kg-ban kifejezett amprólium-tartalmát a következő képlettel kapjuk meg:

$$w = \frac{V \cdot \beta \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

amelyben:

V = az extraháló oldószer (3.8.) ml-ben kifejezett térfogata, az 5.2. pont szerint (azaz 200 ml)

β = a mintakivonat (5.2.) µg/ml-ben kifejezett amprólium-koncentrációja

f = hígítási faktor, az 5.2. pont szerint

m = a vizsgált adag tömege, grammban

7. Az eredmények validálása

7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítása párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektor segítségével erősíthető meg, amely során a mintakivonat (5.2.) és a 2 µg/ml-es kalibráló oldat (3.7.3.) spektrumát hasonlítjuk össze.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot (5.2.) megfelelő mennyiségű kalibráló oldattal (3.7.3.) dúsítjuk. A hozzáadott amprólium mennyisége azonos legyen a mintakivonatban található amprólium mennyiségével.

A hozzáadott mennyiségnek és a kivonat hígításának figyelembe vétele után, csak az amprólium-csúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének, magasságának felénél, a dúsítás előtti mintakivonat amprólium-csúcsa eredeti szélességének ± 10 %-án belül kell lennie.

7.1.2. Diódasoros detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- a) A minta és a standard spektrumának, a kromatogram csúcspontján mért legnagyobb abszorpciós hullámhossza, az észlelő rendszer felbontási képessége alapján meghatározott tűréshatáron belül meg kell, hogy egyezzen. A diódasoros detektálás esetében ez tipikusan ± 2 nm-es határon belül van.
- b) 210 és 320 nm között a minta és a standard, a kromatogram csúcspontján mért spektruma nem különbözhet a spektrum olyan részeinél, amelynek relatív abszorpciója 10–100 % között van. Ez a kritérium akkor teljesül, amikor ugyanazok a maximális értékek vannak jelen és a két spektrum közti eltérés egyetlen vizsgált ponton sem haladja meg a standard analízált anyag abszorpciójának 15 %-át.
- c) 210 és 320 nm között, a mintakivonat által kiváltott görbe felszálló, csúcsponti és leszálló ágának spektrumai nem különbözhetnek egymástól, a spektrumnak olyan részeinél, melynek relatív abszorpciója 10–100 %-os. Ez a kritérium akkor teljesül, amikor ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és amikor a spektrumok közötti eltérés, az összes vizsgált ponton nem haladja meg a csúcspont abszorpciós spektrumának 15 %-át.

Amennyiben ezeknek a kritériumoknak valamelyike nem teljesül, az analízált anyag jelenléte nem bizonyított.

7.2. Ismételhetőség

Az ugyanazon mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg

- 25 mg/kg és 500 mg/kg közötti amprólium-tartalom esetében a magasabb érték 15 %-át,
- 500 mg/kg és 1 000 mg/kg közötti amprólium-tartalom esetében a 75 mg/kg értéket,
- 1 000 mg/kg feletti amprólium-tartalom esetében a magasabb érték 7,5 %-át.

7.3. Visszanyerés

Dúsított (referencia-)minta esetében a visszanyerésnek legalább 90 %-osnak kell lennie.

8. Kollaborációs vizsgálat eredményei

Egy kollaborációs vizsgálatot szerveztek, amely során három baromfitakarmányt (1-3. minták) egy ásványi takarmányt (4. minta) és egy előkeveréket (5. minta) analízáltak. Az eredmények a következő táblázatban láthatóak.

	1. minta (referencia- minta)	2. minta	3. minta	4. minta	5. minta
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
átlag [mg/kg]	–	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	–	2,26	3,57	178	550
CV_r [%]	–	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	–	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	–	6,47	6,27	5,19	3,00
Nominális tartalom [mg/kg]	–	50	200	5 000	25 000

L: a laboratóriumok száma

n: az egyedi értékek száma

s_r : az ismételhetőség szórása

CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense

s_R : a reprodukálhatóság szórása

CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense

9. Észrevételek

- 9.1. Amennyiben a minta tiamint tartalmaz, akkor a tiamin-csúcs valamivel az amprólium-csúcs előtt jelenik meg a kromatogramon. Ezt a módszert követve az ampróliumot és a tiamint el kell választani. Amennyiben az ebben a módszerben használt oszlopon (4.1.1.) nem sikerül szétválasztani az ampróliumot és a tiamint, akkor a mozgó fázis (3.6.) acetonitril részének legfeljebb 50 %-át helyettesítsük metil-alkohollal.
- 9.2. A British Pharmacopoeia szerint az amprólium oldat ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) spektruma sósavban ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) 246 nm és 262 nm között ad maximum értékeket. Az abszorpció értéke 246 nm-nél 0,84, 262 nm-nél 0,80.
- 9.3. A kivonatot mindig fel kell hígítani a mozgó fázissal, mert egyébként az amprólium-csúcs retenció ideje jelentősen eltolódhat az ionizációs erőben történő változásoknak köszönhetően.

B. RÉSZ**DIKLAZURIL MEGHATÁROZÁSA**

(+)-4-klórfeńil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl) feńil] acetonitril

1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer az diklazuril, takarmányokban és előkeverékekben történő meghatározására szolgál. A kimutatási határérték 0,1 mg/kg, a meghatározás határértéke 0,5 mg/kg.

2. Vizsgálati alapelv

Egy belső standard hozzáadását követően, a mintát savanyított metil-alkohollal extraháljuk. A takarmányok esetében, a kivonat egy aliquot részét C18 szilárdfázisú extraháló töltetben derítjük. A diklazurilt savanyított metil-alkohol és víz keverékével eluáljuk a töltetből. Bepárlás után a maradékot DMF/vízben feloldjuk. Előkeverékek esetében a kivonatot bepároljuk és a maradékot DMF/vízben feloldjuk. A diklazuril-tartalmat háromkomponensű, fordított fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzuk meg, UV detektor használatával.

3. Reagensek

- 3.1. Víz, HPLC minőségű.
- 3.2. Ammónium-acetát.
- 3.3. Tetrabutil-ammónium-hidrogén-szulfát (TBHS).
- 3.4. Acetonitril, HPLC minőségű.
- 3.5. Metil-alkohol, HPLC minőségű.
- 3.6. N,N-dimetilformamid (DMF).
- 3.7. Sósav, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.
- 3.8. Standard anyag: garantált tisztaságú diklazuril II-24: (+)-4-klórfeńil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il) feńil] acetonitril, E771.
- 3.8.1. Diklazuril standard törzsoldat, 500 µg/ml.

Mérjük ki 0,1 mg pontossággal, 25 mg diklazuril standard anyagot (3.8.) egy 50 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel DMF-ben (3.6.), töltsük fel jelig DMF-vel (3.6.) és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába vagy használjunk borostyánüveg lombikot és tároljuk hűtőben. 4 °C vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.8.2. Diklazuril standard oldat, 50 µg/ml.

Öntsünk át 5,00 ml standard törzsoldatot (3.8.1.) egy 50 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig DMF-fel (3.6.) és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába vagy használjunk borostyánüveg lombikot és tároljuk hűtőben. 4 °C vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.9. Belső standard anyag: 2,6 dikloro- α -(4-klorofenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2 (3H)-il) α -metilbenzén-acetonitril.

3.9.1. Belső standard törzsoldat, 500 µg/ml.

Mérjünk be, 0,1 mg pontossággal 25 mg belső standard anyagot (3.9.) egy 50 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel DMF-ben (3.6.), töltsük fel jelig DMF-fel (3.6.) és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába vagy használjunk borostyánüveg lombikot és tároljuk hűtőben. 4 °C vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.9.2. Belső standard oldat, 50 µg/ml.

Öntsünk át 5,00 ml belső standard törzsoldatot (3.9.1.) egy 50 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig DMF-fel (3.6.) és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába vagy használjunk borostyánüveg lombikot és tároljuk hűtőben. 4 °C vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.9.3. Belső standard oldat előkeverékekhez, p/1 000 mg/ml (p = az előkeverék mg/kg-ban kifejezett névleges diklazuril tartalma).

Mérjünk be 0,1 mg-os pontossággal p/10 mg belső standard oldatot egy 100 ml-es mérőlombikba, oldjuk fel DMF-ben (3.6.) egy ultrahangos fürdőben (4.6.), töltsük fel jelig DMF-fel és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába vagy használjunk borostyánüveg lombikot és tároljuk hűtőben. 4 °C vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.10. Kalibráló oldat, 2 µg/ml.

Pipetázzunk 2,00 ml diklazuril standard oldatot (3.8.2.) és 2,00 ml belső standard oldatot (3.9.2.) egy 50 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 16 ml DMF-et (3.6.), töltsük fel jelig vízzel és keverjük össze. Ezt az oldatot közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

3.11. C18 szilárdfázisú extraháló töltet, pl. Bond Elut, méret: 1 cm³, szorpciós tömeg: 100 mg.

3.12. Extraháló oldószer: savanyított metil-alkohol.

Pipetázzunk 5,0 ml sósavat (3.7.) 1 000 ml metil-alkoholba (3.5.) és keverjük össze.

3.13. Mozgó fázis a HPLC-hez.

A-eluens: ammónium-acetát – tetrabutilammónium-hidrogénszulfát oldat.

3.13.1. Oldjunk fel 5 g ammónium-acetátot (3.2.) és 3,4 g TBHS-t (3.3.) 1 000 ml vízben (3.1.) és keverjük össze.

3.13.2. B-eluens: acetonitril (3.4.).

3.13.3. C-eluens: metil-alkohol (3.5.).

4. Eszközök

4.1. Mechanikus rázógépet.

4.2. Felszerelés a háromkomponensű HPLC-hez.

4.2.1. Hypersil ODS folyadékkromatográfiás oszlop, 100 mm × 4,6 mm, 3 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.

4.2.2. Változtatható hullámhosszon mérő UV detektor vagy diódasoros detektor.

4.3. Vákuumos, rotációs bepárló.

4.4. 0,45 µm-es membránszűrő.

4.5. Vákuumos elosztóvezeték.

4.6. Ultrahangos fürdő.

5. A vizsgálat módja

5.1. Általános tudnivalók

5.1.1. Referenciaminta

Végezzünk vakpróbát egy referenciamintán annak ellenőrzésére, hogy sem diklazuril, sem interferáló anyagok nincsenek jelen. A referenciaminta a mintával azonos típusú takarmány legyen, amelyben az analízis során sem diklazuril, sem interferáló anyagok nem mutathatók ki.

5.1.2. Visszanyerési próba

Végezzünk visszanyerési próbát a mintában meglévővel azonos mennyiségű diklazuril hozzáadásával dúsított referenciaminta analízisével. Az 1 mg/kg szintre való dúsításhoz adjunk 0,1 ml standard törzsoldatot (3.8.1.) 50 g referenciamintához, keverjük össze alaposan és hagyjuk állni 10 percig, keverjük össze néhányszor, mielőtt folytatjuk a műveletet (5.2.).

Amennyiben nem áll rendelkezésre a mintával azonos típusú referenciaminta (lásd az 5.1.1. pontot), a visszanyerési próba a standard hozzáadási módszerrel végezhető el. Ebben az esetben a vizsgált mintát, a mintában meglévővel azonos mennyiségű diklazurillal dúsítsuk. Ezen a minta analízisét a referenciamintával együtt kell végezni és a visszanyerést kivonással kell kiszámítani.

5.2. Extrahálás

5.2.1. Takarmányok

0,01 g pontossággal, mérjük ki 50 g mintát. Öntsük át egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 1,00 ml belső standard oldatot (3.9.2.), 200 ml extraháló oldószert (3.12.) és zárjuk le a lombikot. Rázassuk a keveréket a rázógépen (4.1.) egy éjszakán át. Hagyjuk ülepedni 10 percig. A felülúszó anyag 20 ml-es aliquot részét öntsük át egy üvegedénybe és hígítsuk fel 20 ml vízzel. Öntsük át ezt az oldatot egy extraháló töltetbe (3.11.) és vákuum segítségével engedjük át rajta (4.5.). Mossuk a töltetet 25 ml extraháló oldószert (3.12.) és víz 65 + 35 (V + V) arányú keverékével. Öntsük el a felvett frakciókat és eluáljuk az alkotóelemeket 25 ml extraháló oldószert (3.12.) és víz 80 + 20 (V + V) arányú keverékével. Pároljuk be ezt a frakciót a rotációs bepárló (4.3.) segítségével 60 °C-on, amíg éppen beszárad. A maradékot oldjuk fel 1,0 ml DMF-ben (3.6.), adjunk hozzá 1,5 ml vizet (3.1.) és keverjük össze. Szűrjük át egy membránszűrőn (4.4.). Folytassuk a vizsgálatot a HPLC meghatározással (5.3.).

5.2.2. Előkeverékek

0,001 g pontossággal, mérjük ki 1 g mintát. Öntsük át egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 1,00 ml belső standard oldatot (3.9.2.), 200 ml extraháló oldószert (3.12.) és zárjuk le a lombikot. Rázassuk a keveréket a rázógépen (4.1.) egy éjszakán át. Hagyjuk ülepedni 10 percig. A felülúszó anyag egy 10 000/p ml (p = az előkeverék, mg/kg-ban kifejezett névleges diklazuril tartalma) aliquot részét öntsük át egy megfelelő méretű gömblombikba. Pároljuk be ezt a frakciót a rotációs bepárló (4.3.) segítségével 60 °C-on, csökkentett nyomáson, amíg éppen beszárad. A maradékot oldjuk fel 10,0 ml DMF-ben (3.6.), adjunk hozzá 15,0 ml vizet (3.1.) és keverjük össze. Folytassuk a műveletet a HPLC meghatározással (5.3.).

5.3. HPLC meghatározás

5.3.1. Paraméterek

Az alábbi vizsgálati feltételek iránymutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, amennyiben azok ezzel egyenértékű eredményeket adnak.

- | | | |
|---|---|--|
| – Folyadékkromatográfiás oszlop (4.2.1.): | 100 mm × 4,6 mm méretű, Hypersil ODS 3 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés | |
| – Mozgó fázis: | A-eulens (3.13.1.): | ammónium-acetát és tetrabutil-ammónium-hidrogén-szulfát vizes oldata |
| | B-eulens (3.13.2.): | acetonitril |
| | C-eulens (3.13.3.): | metil-alkohol |

- Eluálás módja:
 - lineáris grádiens
 - kiindulási feltételek: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ ($v + v + v$)
 - 10 perces grádiens eluálás után 30 percig: $A + B + C = 45 + 20 + 35$ ($v + v + v$)
- Öblítés B-eulenssel 10 percig
- Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/perc
- Befecskendezett mennyiség: 20 µl
- Észlelési hullámhossz: 280 ml

2 µg/ml-es kalibráló oldat (3.10.) többszöri befecskendezésével ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását, amíg a csúcsok magassága és a retenciók idői stabilakká nem válnak.

5.3.2. Kalibrációs oldat

Fecskendezzünk be 20 µl kalibrációs oldatot (3.10.) néhány alkalommal és határozzuk meg a diklazuril-csúcsok átlag magasságát (görbe alatti területét) és a belső standard csúcsokat.

5.3.3. Mintaoldat

Fecskendezzünk be 20 µl mintaoldatot (5.2.1. vagy 5.2.2.) néhány alkalommal és határozzuk meg a diklazuril-csúcsok átlag magasságát (görbe alatti területét) és a belső standard csúcsokat.

6. Az eredmények kiszámítása

6.1. Takarmányok

A minta, w mg/kg-ban kifejezett diklazuril-tartalmát a következő képlet segítségével kapjuk meg:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 10V}{m} [\text{mg/kg}]$$

amelyben:

$h_{d,s}$ = a mintaoldatban lévő diklazuril-csúcs magassága (területe) (5.2.1.)

$h_{i,s}$ = a mintaoldatban lévő belső standard csúcs magassága (területe) (5.2.1.)

$h_{d,c}$ = a kalibráló oldatban lévő diklazuril-csúcs magassága (területe) (3.10.)

$h_{i,c}$ = a kalibráló oldatban lévő belső standard csúcs magassága (területe) (3.10.)

$\beta_{d,c}$ = a diklazuril µg/ml-ben kifejezett koncentrációja a kalibráló oldatban (3.1.0.)

m = a vizsgált adag, grammban kifejezett tömege

V = a mintakivonat 5.2.1. pont szerinti térfogata (pl. 2,5 ml)

6.2. Előkeverékek

A minta, w mg/kg-ban kifejezett diklazuril-tartalmát a következő képlet segítségével kapjuk meg:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 0,02 \text{ V} \cdot p}{m} [\text{mg/kg}]$$

amelyben:

$h_{d,c}$ = a kalibráló oldatban lévő diklazuril-csúcs magassága (területe) (3.10.)

$h_{i,c}$ = a kalibráló oldatban lévő belső standard csúcs magassága (területe) (3.10.)

$h_{d,s}$ = a mintaoldatban lévő diklazuril-csúcs magassága (területe) (5.2.2.)

$h_{i,s}$ = a mintaoldatban lévő belső standard csúcs magassága (területe) (5.2.2.)

$\beta_{d,c}$ = a diklazuril, µg/ml-ben kifejezett koncentrációja a kalibráló oldatban (3.10.)

m = a vizsgált adag, grammban kifejezett tömege

V = a mintakivonat 5.2.2. pont szerinti térfogata (azaz 25 ml)

p = az előkeverék névleges diklazuril-tartalma, mg/kg-ban kifejezve

7. Az eredmények validálása

7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítása párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektor használatával erősíthető meg, amely során a mintakivonat (5.2.1. vagy 5.2.2.) és a kalibráló oldat (3.10.) spektrumát hasonlítjuk össze.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A minta kivonatot (5.2.1. vagy 5.2.2.) megfelelő mennyiségű kalibráló oldattal (3.10.) dúsítjuk. A hozzáadott diklazuril mennyisége azonos legyen a mintakivonatban meglévő diklazuril mennyiségével.

A hozzáadott mennyiségnek és a kivonat hígításának figyelembe vételét követően csak a diklazuril csúcs és a belső standard csúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének, magassága felénél, a dúsítás előtti mintakivonat diklazuril csúcsa vagy belső standard csúcsa eredeti szélességének $\pm 10\%$ -án belül kell lennie.

7.1.2. Diódasoros detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- a) A minta, valamint a standard spektrumának a kromatogram csúcsán rögzített legnagyobb elnyelési hullámhossza az észlelőrendszer felbontási képessége alapján meghatározott tűréshatáron belül meg kell egyezzen. A diódasoros detektálás esetében ez tipikusan ± 2 nm határon belül van.
- b) 230 és 320 nm között a mintának, valamint standardnak a kromatogram csúcsán rögzített spektruma, a spektrum ezen részeinél nem térhet el egymástól a relatív elnyelési tartomány 10-100 % között. Ez a kritérium akkor teljesül, amikor ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a standard analizált anyag abszorpciójának 15 %-ánál nagyobb mértékben egymástól.
- c) 230 és 320 nm között a mintakivonat által kiváltott görbe felszálló ága, csúcsa és leszálló ága a spektrumnak ezen a részén a relatív abszorpció 10 és 100 %-a közötti tartományban nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és ha a spektrumok egyetlen észlelési pontnál sem térnek el a csúcs abszorpció spektrumának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezeknek a kritériumoknak valamelyike nem teljesül, akkor az analizált anyag jelenléte nem bizonyított.

7.2. Ismételhetőség

Az ugyanazon mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

- 0,5 mg/kg és 2,5 mg/kg közötti diklazuril-tartalom esetén a magasabb érték 30 %-át,
- 2,5 mg/kg és 5 mg/kg közötti diklazuril-tartalom esetén a 0,75 mg/kg értéket,
- 5 mg/kg feletti diklazuril-tartalom esetén a magasabb érték 15 %-át,

7.3. Visszanyerés

Dúsított (referencia-)minta esetében a visszanyerésnek legalább 80 %-osnak kell lennie.

8. Kollaborációs vizsgálat eredményei

Egy kollaborációs vizsgálatot szerveztek, amely során öt mintát elemeztek 11 laboratóriumban. A minták két előkeverékből álltak; az egyiket egy szerves mátrix-szal (O 100), a másikat egy szervesetlen mátrix-szal (A 100) keverték össze. Az elméleti diklazuril-tartalom 100 mg/kg. A három baromfi takarmánykeverék három különböző gyártótól származott (NL) (L1/Z1/K1). Az elméleti diklazuril-tartalom 1 mg/kg. A laboratóriumokat utasították, hogy a vizsgálatokat egyszer, vagy kétszeres ismétléssel vizsgálják. (Erről az együttműködési tanulmányról részletesebb információk olvashatók: *Journal of AOAC International*, Volume 77, No 6, 1994, p. 1359-1361). Az eredmények a következő táblázatban láthatók:

	1. minta A 100	2. minta O 100	3. minta L1	4. minta Z1	5. minta K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
átlag [mg/kg]	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r [mg/kg]	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r [%]	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R [mg/kg]	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R [%]	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nominális tartalom [mg/kg]	100	100	1	1	1

L: a laboratóriumok száma

n: az egyedi értékek száma

S_r: az ismételhetőség szórása

CV_r: az ismételhetőség variációs koefficiense

S_R: a reprodukálhatóság szórása

CV_R: a reprodukálhatóság variációs koefficiense

9. Észrevételek

A diklazuril-reakciót korábban lineárisnak találták a mért koncentrációk sávja felett.

C. RÉSZ

KARBADOX MEGHATÁROZÁSA

Metil 3-(2-kinoxalin-2-ilmetilén)karbazát N¹,N⁴-dioxid

1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer a karbadox, takarmányokban, előkeverékekben és készítményekben történő meghatározására szolgál. A kimutatási határérték 1 mg/kg. A meghatározás határértéke 10 mg/kg.

2. Vizsgálati alapelv

A mintát vízzel stabilizáljuk és metil-alkohol – acetonitril keverékével extraháljuk. Takarmányok esetében, a leszűrt kivonat egy aliquot részét alumínium-oxid oszlopon tisztítjuk. Előkeverékek és készítmények esetében, a leszűrt kivonat egy aliquot részét megfelelő koncentrációra hígítjuk vízzel, metil-alkohollal és acetonitrillel. A karbadox-tartalmat fordított fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzuk meg, UV detektor felhasználásával.

3. Reagensok

3.1. Metil-alkohol.

3.2. Acetonitril, HPLC minőségű.

3.3. Sósav, w = 100 %.

3.4. Alumínium-oxid: neutrális, I. aktivitási fokozat.

3.5. Metil-alkohol – acetonitril 1 + 1 (v + v).

Keverjük össze 500 ml metil-alkoholt (3.1.) 500 ml acetonitrillel (3.2.).

3.6. Ecetsav, σ = 10 %.

Hígítsunk fel 10 ml ecetsavat (3.3.) vízzel 100 ml-ig.

3.7. Nátrium-acetát, CH₃COONa.

3.8. Víz, HPLC minőségű.

3.9. Acetát pufferoldat, $c = 0,01$ mol/l, $pH = 6,0$.

Oldjunk fel 0,82 g nátrium-acetátot (3.7.) 700 ml vízben (3.8) és állítsuk be a pH-t 6,0 ra ecetsavval (3.6.). Öntsük át egy 1 000 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig vízzel (3.8.) és keverjük össze.

3.10. Mozgó fázis a HPLC-hez.

Keverjünk össze 825 ml acetát pufferoldatot (3.9.) 175 ml acetonitrillel (3.2.). Szűrjük át egy 0,22 μm -es szűrőn (4.5.) és gázmentesítsük az oldatot (pl. 10 percig tartó ultrahangos kezeléssel).

3.11. Standard anyag

Tiszta karbadox: Metil 3-(2-kinoxalin-2-ilmetilén)karbazát N^1, N^4 -dioxid, E 850.

3.11.1. Karbadox standard törzsoldat, 100 $\mu g/ml$ (lásd 5. pont, A vizsgálat módja):

Mérjünk ki 0,1 mg-os pontossággal, 25 mg karbadox standard anyagot (3.11.) egy 250 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel metil-alkohol – acetonitril keverékében (3.5.) ultrahangos kezeléssel (4.7.). Az ultrahangos kezelést követően állítsuk az oldatot szobahőmérsékletűre, töltsük fel jelig metil-alkohol – acetonitril keverékével (3.5.) és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába vagy használjunk borostyánüveg lombikot és tároljuk hűtőben. 4 °C, vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.11.2. Kalibráló oldatok

Töltsünk át 2,0, 5,0, 10,0 és 20,0 ml standard törzsoldatot (3.11.1.) 100 ml-es mérőlombikokba. Adjunk hozzájuk 30 ml vizet, töltsük fel jelig metil-alkohol – acetonitril keverékével (3.5.) és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába. Ezek az oldatok külön-külön 2,0, 5,0, 10,0 és 20,0 $\mu g/ml$ karbadoxnak felelnek meg. A kalibráló oldatokat közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

Megjegyzés: A 10 mg/kg-nál kevesebb karbadoxot tartalmazó takarmányoknál történő meghatározásnál, 2,0 $\mu g/ml$ -nél alacsonyabb koncentrációjú kalibráló oldatokat kell készíteni.

3.12. Víz-[metil-alkohol – acetonitril] keveréke (3.5.), 300 + 700 (v + v)

Keverjünk össze 300 ml vizet 700 ml metil-alkohol – acetonitril keverékkel (3.5.).

4. Eszközök

4.1. Laboratóriumi rázógép vagy mágneses keverő.

4.2. Üvegszálás szűrőpapír (Whatman GF/A vagy azzal egyenértékű).

4.3. Üvegoszlop (300-400 mm hosszúságú, belső átmérője körülbelül 10 mm), perforált üveglemezzel és leeresztő csappal ellátva.

Megjegyzés: elzárócsappal ellátott üvegoszlop vagy kúpos üvegcső szintén használható; ebben az esetben helyezzünk egy kis üveggyapot dugót a cső alsó végébe és egy üvegpálcával tömködjük le.

4.4. HPLC berendezés befecskendező rendszerrel, amely alkalmas 20 μl mennyiség befecskendezésére.

4.4.1. Folyadékkromatográfiás oszlop: C 18, 300 mm $\times$ 4 mm, 10 μm -es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.

4.4.2. Változtatható hullámhosszon mérő UV detektor vagy 225-400 nm között mérő diódasoros detektor.

4.5. 0,22 μm -es membránszűrő.

4.6. 0,45 μm -es membránszűrő.

4.7. Ultrahangos fürdő.

5. A vizsgálat módja

Megjegyzés: A karbadox fényérzékeny. Az összes műveletet csökkentett fény mellett végezzük vagy használjunk borostyánüvegből készült, illetve alumíniumfóliába tekert üvegeszközöket.

5.1. Általános tudnivalók

5.1.1. Referenciaminta

A visszanyerési próba elvégzése előtt, végezzünk vakpróbát egy referenciamintán annak ellenőrzésére, hogy sem karbadox, sem interferáló anyagok nincsenek jelen. A referenciaminta ugyanolyan típusú takarmány legyen, mint a minta és az analízis során karbadox vagy interferáló anyagok ne legyenek kimutathatók benne.

5.1.2. Visszanyerési próba

A mintában meglévővel megegyező mennyiségű karbadox hozzáadásával dúsított referenciaminta (5.1.1.) analízisével végezzünk visszanyerési próbát. Az 50 mg/kg szinten való dúsításhoz öntsünk át 5,0 ml standard törzsoldatot (3.11.1.) egy 200 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Pároljuk be az oldatot körülbelül 0,5 ml-ig nitrogén áramban. Adjunk hozzá 10 g referenciamintát, keverjük össze és hagyjuk állni 10 percig mielőtt folytatjuk a műveletet az extrahálással (5.2.).

Amennyiben a mintával megegyező takarmányfajtából vett referenciaminta nem áll rendelkezésre (lásd az 5.1.1. pontot), a visszanyerési próbát a standard hozzáadási módszerrel lehet elvégezni. Ebben az esetben, a mintát, a mintában már meglévővel megegyező mennyiségű karbadox-szal dúsítjuk. Ezt a mintát a nem dúsított mintával együtt elemezzük és a visszanyerést kivonással számítsuk ki.

5.2. Extrahálás

5.2.1. Takarmányok.

Mérjük ki 0,01 g pontossággal, 10 g mintát és tegyük bele egy 200 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Adjunk hozzá 15,0 ml vizet, keverjük össze és stabilizáljuk 5 percig. Adjunk hozzá 35,0 ml metil-alkohol – acetonitril keveréket (3.5.), dugaszoljuk le és 30 percig rázzuk a rázógépen vagy keverjük a mágneses keverővel (4.1.). Szűrjük át az oldatot az üvegszálás szűrőpapíron (4.2.). Ezt az oldatot használjuk a derítésnél (5.3.)

5.2.2. Előkeverékek (0,1-2,0 %).

Mérjük ki 0,01 g pontossággal, 1 g öröletlen mintát és tegyük át egy 200 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Adjunk hozzá 15,0 ml vizet, keverjük össze és stabilizáljuk 5 percig. Adjunk hozzá 35,0 ml metil-alkohol – acetonitril keveréket (3.5.), dugaszoljuk le, és 30 percig rázzuk a rázógépen vagy keverjük a mágneses keverővel (4.1.). Szűrjük át az oldatot az üvegszálás szűrőpapíron (4.2.). A szűrlet egy aliquot részét pipettázzuk át egy 50 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 15,0 ml vizet, töltsük fel jelig metil-alkohol – acetonitril keverékkel (3.5.) és keverjük össze. A végső oldat karbadox koncentrációjának körülbelül 10 µg/ml kell lennie. Egy aliquot részt szűrjük át egy 0,45 µm-es szűrőn (4.6.). Folytassuk a műveletet a HPLC meghatározással (5.4.).

5.2.3. Készítmények (> 2 %).

Mérjük ki 0,001 g pontossággal, 0,2 g öröletlen mintát és tegyük át egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Adjunk hozzá 45,0 ml vizet, keverjük össze és stabilizáljuk 5 percig. Adjunk hozzá 105,0 ml metil-alkohol – acetonitril keveréket (3.5.), dugaszoljuk le és homogenizáljuk. Kezeljük a mintát ultrahanggal (4.7.) 15 percig, majd ezt követően rázassuk vagy keverjük (4.1.) 15 percig. Szűrjük át az oldatot egy üvegszálás szűrőpapíron (4.2.). A szűrlet egy aliquot részét hígítsuk fel víz – metil-alkohol – acetonitril keverékkel (3.12.) 10–15 µg/ml-es végső karbadox koncentrációig (egy 10 %-os készítmény esetében a hígítási faktor 10). Egy aliquot részt szűrjük át egy 0,45 µm-es szűrőn (4.6.). Folytassuk a műveletet a HPLC meghatározással (5.4.).

5.3. Derítés

5.3.1. Az alumínium-oxid oszlop elkészítése.

Mérjük le 4 g alumínium-oxidot (3.4.) és helyezzük az üvegoszlopra (4.3.).

5.3.2. A minta derítése.

Tegyük rá az alumínium-oxid oszlopra 15 ml leszűrte kivonatot (5.2.1.) és öntsük el az első 2 ml eluátumot. Vegyük fel a következő 5 ml-t és egy aliquot részét szűrjük át egy 0,45 µm-es szűrőn (4.6.). Folytassuk a műveletet a HPLC meghatározással (5.4.).

5.4. HPLC meghatározás

5.4.1. Paraméterek

A következő vizsgálati feltételek iránymutatóként szolgálnak, egyéb feltételek is használhatók, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményeket adnak.

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.1.1.):	300 mm × 4 mm, C18, 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.
Mozgó fázis (3.10.):	Acetát pufferoldat (3.9.) és acetonitril (3.2.) 825 + 175 (v + v) arányú keveréke.
Átáramlási sebesség:	1,5-2 ml/perc.
Észlelési hullámhossz:	365 nm.
Befecskendezett mennyiség:	20 µl.

5 µg/ml-es kalibráló oldat (3.11.2.) többszöri befecskendezésével ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását, amíg csúcsok magassága (görbe alatti területe) és a retenciós idők stabilakká nem válnak.

5.4.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzünk be minden kalibráló oldatot (3.11.2.) többször egymás után és határozzuk meg az átlag csúcsmagasságokat (görbe alatti területeket) minden egyes koncentráció esetében. Szerkesszünk kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibráló oldatok átlag csúcsmagasságai (görbe alatti területei) legyenek az ordináta tengelyen, a hozzájuk tartozó, µg/ml-ben kifejezett koncentrációk pedig az abszcisszán.

5.4.3. Mintaoldat

Fecskendezzük be a mintakivonatot [(5.3.2.) a takarmányok, (5.2.2.) az előkeverékek és (5.2.3.) a készítmények esetében] többször egymás után és határozzuk meg a karbadox átlag csúcsmagasságát (görbe alatti területét).

6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat karbadox-csúcsainak átlag magasságából (görbe alatti területéből) határozzuk meg a mintaoldat µg/ml-ben kifejezett koncentrációját a kalibrációs görbe (5.4.2.) alapján.

6.1. Takarmányok:

A minta, w mg/kg-ban kifejezett karbadox-tartalmát a következő képlet segítségével kapjuk meg:

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

amelyben:

β = a mintakivonat (5.3.2.) µg/ml-ben kifejezett karbadox koncentrációja.

V_1 = a ml-ben kifejezett extrahált térfogat (pl. 50).

m = a vizsgált adag g-ban kifejezett tömege.

6.2. Előkeverékek és készítmények.

A minta, w mg/kg-ban kifejezett karbadox-tartalmát a következő képlet segítségével kapjuk meg:

$$w = \frac{\beta \times V_1 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

amelyben:

β = a mintakivonat (5.2.2. vagy 5.2.3.) µg/ml-ben kifejezett karbadox koncentrációja.

V_2 = a ml-ben kifejezett extrahált térfogat (azaz 50 az előkeverékek esetében; 150 a készítmények esetében).

f = hígítási faktor az 5.2.2. pont szerint (előkeverékek) vagy az 5.2.3. pont szerint (készítmények).

m = a vizsgált adag g-ban kifejezett tömege.

7. Az eredmények validálása

7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítása párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektor használatával erősíthető meg, amely során a mintakivonat és a 10 µg/ml-es kalibrációs oldat (3.11.2.) spektrumát hasonlítjuk össze.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot megfelelő mennyiségű kalibráló oldattal (3.11.2.) dúsítjuk. A hozzáadott karbadox mennyisége azonos legyen a mintakivonatban található karbadox mennyiségével.

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat hígítását egyaránt figyelembe véve, csak a karbadox-csúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének, a legnagyobb magasságának felénél, az eredeti szélesség $\pm 10\%$ -án belül kell lennie.

7.1.2. Diódasoros detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- a minta, valamint a standard spektrumának a kromatogram csúcsán rögzített legnagyobb elnyelési hullámhossza észlelőrendszer felbontási képességének alapján meghatározott tűréshatáron belül meg kell egyezzen. A diódasoros detektálás esetében ez tipikusan ± 2 nm-en belül van;
- 225 és 400 nm között a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsán rögzített spektruma a spektrum ezen részein nem térhet el egymástól a relatív elnyelési tartomány 10 és 100 % között. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a standard analizált anyag abszorpciójának 15 %-ánál nagyobb mértékben;
- 225 és 400 nm között a mintakivonat által kiváltott görbe felszálló ága, csúcspontja és leszálló ága a spektrumnak ezen részein a relatív abszorpció 10 és 100 %-a közötti tartományban nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, amikor ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és amikor a spektrumok egyetlen észlelési pontnál sem térnek el a csúcs abszorpció spektrumának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezeknek a kritériumoknak valamelyike nem teljesül, akkor a analizált anyag jelenléte nem bizonyított.

7.2. Ismételhetőség

A 10 mg/kg vagy magasabb karbadox-tartalmú anyagok esetében, az ugyanazon mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg a magasabb értékhez viszonyított 15 %-ot.

7.3. Visszanyerés

Dúsított (referencia-)minta esetében a visszanyerésnek legalább 90 %-osnak kell lennie.

8. Kollaborációs vizsgálat eredményei

Egy kollaborációs vizsgálatot szerveztek, amely során hat takarmányt, négy előkeveréket és három készítményt analizáltak nyolc laboratóriumban. Minden mintán kettős analízist végeztek. (Erről a kollaborációs vizsgálatról részletesebb információk olvashatók a: *Journal of AOAC, Volume 71, 1988, p. 484-490*). Az eredmények a következő táblázatokban láthatók:

1. táblázat A takarmányokon végzett kollaborációs vizsgálat eredményei

	1. minta	2. minta	3. minta	4. minta	5. minta	6. minta
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
átlag (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Névleges tartalom (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

2. táblázat Az előkeverékeken és a készítményeken végzett kollaborációs vizsgálat eredményei

	Előkeverékek				Készítmények		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
átlag (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Névleges tartalom (mg/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: a laboratóriumok száma

N: az egyedi értékek száma

 S_r : az ismételhetőség szórása CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense S_R : a reprodukálhatóság szórása CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense