

## I

(Az EK-Szerződés/Euratom-Szerződés alapján elfogadott jogi aktusok, amelyek közzététele kötelező)

## RENDELETEK

## A BIZOTTSÁG 152/2009/EK RENDELETE

(2009. január 27.)

**a takarmányok hatósági ellenőrzése során alkalmazott mintavételi és vizsgálati módszerek megállapításáról**

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a takarmány- és élelmiszerjog, valamint az állategészségügyi és az állatok kíméletére vonatkozó szabályok követelményeinek történő megfelelés ellenőrzésének biztosítása céljából végrehajtott hatósági ellenőrzésekről szóló, 2004. április 29-i 882/2004/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletre <sup>(1)</sup> és különösen annak 11. cikke (4) bekezdésének a), b) és c) pontjára,

mivel:

(1) A 70/373/EGK irányelv végrehajtása céljából a következő jogi aktusokat fogadták el, és ezek a 882/2004/EK rendelet 61. cikkének (2) bekezdése értelmében hatályban maradtak:

- a Bizottság 1971. június 15-i 71/250/EGK első irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(2)</sup>,
- a Bizottság 1971. november 18-i 71/393/EGK második irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(3)</sup>,
- a Bizottság 1972. április 27-i 72/199/EGK harmadik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(4)</sup>,

- a Bizottság 1972. december 5-i 73/46/EGK negyedik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(5)</sup>,
- a Bizottság 1976. március 1-jei 76/371/EGK első irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi mintavételi módszerek meghatározásáról <sup>(6)</sup>,
- a Bizottság 1976. március 1-jei 76/372/EGK hetedik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(7)</sup>,
- a Bizottság 1978. június 15-i 78/633/EGK nyolcadik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(8)</sup>,
- a Bizottság 1981. július 31-i 81/715/EGK kilencedik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(9)</sup>,
- a Bizottság 1984. július 25-i 84/425/EGK tizedik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(10)</sup>,
- a Bizottság 1986. április 9-i 86/174/EGK irányelve a baromfitakarmány energiaértékére vonatkozó számítási módszer meghatározásáról <sup>(11)</sup>,

<sup>(1)</sup> HL L 165., 2004.4.30., 1. o.

<sup>(2)</sup> HL L 155., 1971.7.12., 13. o.

<sup>(3)</sup> HL L 279., 1971.12.20., 7. o.

<sup>(4)</sup> HL L 123., 1972.5.29., 6. o.

<sup>(5)</sup> HL L 83., 1973.3.30., 21. o.

<sup>(6)</sup> HL L 102., 1976.4.15., 1. o.

<sup>(7)</sup> HL L 102., 1976.4.15., 8. o.

<sup>(8)</sup> HL L 206., 1978.7.29., 43. o.

<sup>(9)</sup> HL L 257., 1981.9.10., 38. o.

<sup>(10)</sup> HL L 238., 1984.9.6., 34. o.

<sup>(11)</sup> HL L 130., 1986.5.16., 53. o.

- a Bizottság 1993. július 28-i 93/70/EGK tizenegyedik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(1)</sup>,
- a Bizottság 1993. december 17-i 93/117/EK tizenkettedik irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról <sup>(2)</sup>,
- a Bizottság 1998. szeptember 3-i 98/64/EK irányelve a takarmányokban lévő aminosavak, nyersolajok és zsírok, valamint az olaquinox meghatározására szolgáló közösségi analitikai módszerek létrehozásáról és a 71/393/EGK irányelv módosításáról <sup>(3)</sup>,
- a Bizottság 1999. április 20-i 1999/27/EK irányelve 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 <sup>(4)</sup>,
- a Bizottság 1999. július 23-i 1999/76/EK irányelve a takarmányokban lévő lazalocid-nátrium meghatározására szolgáló közösségi analitikai módszer létrehozásáról <sup>(5)</sup>,
- a Bizottság 2000. július 6-i 2000/45/EK irányelve a takarmányokban található A-vitamin, E-vitamin és triptofán meghatározására szolgáló közösségi analitikai módszerek létrehozásáról <sup>(6)</sup>,
- a Bizottság 2002. július 26-i 2002/70/EK irányelve a takarmányok dioxin- és dioxinjellegű-PCB-tartalmának meghatározására vonatkozó követelmények megállapításáról <sup>(7)</sup>,
- a Bizottság 2003. december 23-i 2003/126/EK irányelve a takarmányok hatósági ellenőrzése során, az állati eredetű alkotóelemek meghatározására szolgáló analitikai módszer meghatározásáról <sup>(8)</sup>.

(2) Tekintettel arra, hogy a 70/373/EGK irányelvet felváltotta a 882/2004/EK rendelet, helyénvaló az említett irányelvet végrehajtó jogi aktusokat egyetlen rendelettel felváltani. Ugyanakkor a módszereket a tudományos és műszaki ismeretek alakulására figyelemmel ki kell igazítani. El kell hagyni az elérni kívánt cél vonatkozásában a továbbiakban már nem érvényes módszereket. A takarmányok előállítás, tárolási, szállítási és forgalmazási módja terén a közelmúltban bekövetkezett fejlődés figyelembevétele érdekében tervbe van véve a mintavételre vonatkozó rendelkezések megfelelő időben történő módosítása, mindazonáltal jelenleg a mintavételre vonatkozó meglévő rendelkezések fenntartása a helyénvaló.

(3) Ezért a 71/250/EGK, a 71/393/EGK, a 72/199/EGK, a 73/46/EGK, a 76/371/EGK, a 76/372/EGK, a 78/633/EGK, a

81/715/EGK, a 84/425/EGK, a 86/174/EGK, a 93/70/EGK, a 93/117/EK, a 98/64/EK, az 1999/27/EK, az 1999/76/EK, a 2000/45/EK, a 2002/70/EK és a 2003/126/EK irányelvet hatályon kívül kell helyezni.

(4) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak az Élelmiszerlánc- és Állat-egészségügyi Állandó Bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

#### 1. cikk

A mikroorganizmusok és a peszticidmaradványok kivételével a takarmány-összetevők, az adalékanyagok és a nemkívánatos anyagok, illetve termékek meghatározása tekintetében végzett, a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló mintavételezést az I. mellékletben előírt módszerek szerint kell végrehajtani.

#### 2. cikk

Az analitikai vizsgálat céljára szolgáló minták előkészítését és az eredmények megadását a II. mellékletben előírt módszerek szerint kell végrehajtani.

#### 3. cikk

A takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló analitikai vizsgálatokat a III. mellékletben (Analitikai módszerek a takarmány-alapanyagok és összetett takarmányok összetételének ellenőrzésére), a IV. mellékletben (Analitikai módszerek a takarmányokban lévő engedélyezett adalékanyagok szintjének ellenőrzésére), az V. mellékletben (Analitikai módszerek a takarmányokban lévő nemkívánatos anyagok ellenőrzésére) és a VI. mellékletben (A takarmányok hatósági ellenőrzése során az állati eredetű alkotóelemek meghatározására szolgáló analitikai módszerek) előírt módszerek szerint kell végrehajtani.

#### 4. cikk

Az összetett baromfitakarmány energiaértékét a VII. mellékletnek megfelelően kell kiszámítani.

#### 5. cikk

Megerősítés céljából a VIII. mellékletben a már nem engedélyezett adalékanyagok takarmányokban való illegális jelenlétének ellenőrzésére előírt analitikai módszereket kell használni.

#### 6. cikk

A 71/250/EGK, a 71/393/EGK, a 72/199/EGK, a 73/46/EGK, a 76/371/EGK, a 76/372/EGK, a 78/633/EGK, a 81/715/EGK, a 84/425/EGK, a 86/174/EGK, a 93/70/EGK, a 93/117/EK, a 98/64/EK, az 1999/27/EK, az 1999/76/EK, a 2000/45/EK, a 2002/70/EK és a 2003/126/EK irányelv hatályát veszti.

A hatályon kívül helyezett irányelvekre történő hivatkozásokat az e rendeletre történő hivatkozásoknak kell tekinteni, és a IX. mellékletben található megfelelési táblázatokkal összhangban kell értelmezni.

<sup>(1)</sup> HL L 234., 1993.9.17., 17. o.

<sup>(2)</sup> HL L 329., 1993.12.30., 54. o.

<sup>(3)</sup> HL L 257., 1998.9.19., 14. o.

<sup>(4)</sup> HL L 118., 1999.5.6., 36. o.

<sup>(5)</sup> HL L 207., 1999.8.6., 13. o.

<sup>(6)</sup> HL L 174., 2000.7.13., 32. o.

<sup>(7)</sup> HL L 209., 2002.8.6., 15. o.

<sup>(8)</sup> HL L 339., 2003.12.24., 78. o.

*7. cikk*

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő huszadik napon lép hatályba.

Ezt a rendeletet 2009. augusztus 26-tól kell alkalmazni.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2009. január 27-én.

*a Bizottság részéről*

Androulla VASSILIOU

*a Bizottság tagja*

---

## I. MELLÉKLET

## MINTAVÉTELI MÓDSZEREK

## 1. CÉL ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLET

A takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló mintavételezést az alábbiakban leírt módszerek szerint kell elvégezni. Az így nyert mintákat a mintavételi tételek reprezentatív részének kell tekinteni.

## 2. A MINTAVÉTELT VÉGZŐ SZEMÉLYZET

A mintavételezést a tagállamok által erre a feladatra felhatalmazott személyek végzik.

## 3. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Mintavételi tétel: egy egységet képező, vélelmezetten egységes tulajdonságokkal rendelkező termékmennyiség.

Elemi minta: a mintavételi tétel egy pontjából vett mennyiség.

Átlagolt minta: ugyanazon mintavételi tételből vett elemi minták összessége.

Redukált minta: az átlagolt minta reprezentatív része, amelyet osztási folyamattal nyernek az átlagolt mintából.

Végző minta: a redukált minta vagy a homogenizált átlagolt minta egy része.

## 4. ESZKÖZÖK

- 4.1. A mintavételi eszközöket olyan anyagokból kell készíteni, amelyek nem szennyezhetik a mintavételre kerülő termékeket. Ezen eszközök tekintetében a tagállamok hatósági engedélyezést írhatnak elő.

## 4.2. Szilárd takarmányok mintavételére ajánlott eszközök

## 4.2.1. Kézi mintavétel

- 4.2.1.1. Lapos fenekű, függőleges oldalú lapát.

- 4.2.1.2. Nyílással vagy rekeszekkel rendelkező mintavételi szűrőcsap. A mintavételi szűrőcsap méretének összhangban kell lennie a mintavételi tétel jellemzőivel (a tartály mélysége, a göngyöleg nagysága stb.), valamint a takarmány részecskeméretével.

## 4.2.2. Gépi mintavétel

Mozgásban lévő takarmányok mintavételére engedélyezett gépi eszközök használhatók.

## 4.2.3. Mintaosztó

A minta megközelítően egyenlő részekre való felosztására tervezett eszköz, amely elemi minták vételére, valamint redukált és végző minták elkészítésére is használható.

## 5. MENNYISÉGI KÖVETELMÉNYEK

5.A.	A takarmányban egyenletesen eloszló anyagok és termékek ellenőrzésére vonatkozóan
5.A.1.	<b>Mintavételi tétel</b> A mintavételi tételnek akkorának kell lennie, hogy minden egyes alkotórészből mintát lehessen venni.

5.A.2.	<b>Elemi minták</b>	
5.A.2.1.	Ömlesztett takarmány:	Az elemi minták minimális száma:
5.A.2.1.1.	2,5 tonnát meg nem haladó mintavételi tételek	hét
5.A.2.1.2.	2,5 tonnát meghaladó mintavételi tételek	$\sqrt{}$ a mintavételi tételt (*) kitevő tonnák számának húszszorosa, de legfeljebb 40 elemi minta
5.A.2.2.	Kiszerezelt takarmány:	Mintavételre kerülő töltött göngyölegek minimális száma (**):
5.A.2.2.1.	Egy kg-nál nagyobb tömegű csomagok esetében:	
5.A.2.2.1.1.	1–4 csomagból álló mintavételi tételek	minden csomag
5.A.2.2.1.2.	5–16 csomagból álló mintavételi tételek	4
5.A.2.2.1.3.	16-nál több csomagból álló mintavételi tételek	$\sqrt{}$ a mintavételi tételt (*) alkotó csomagok száma, de legfeljebb 20 csomag
5.A.2.2.2.	Legfeljebb egy kg-os csomagok esetében	4
5.A.2.3.	Folyékony vagy félfolyékony takarmányok:	Mintavételre szánt tartályok minimális száma (**):
5.A.2.3.1.	Egy liternél nagyobb tartályok esetében:	
5.A.2.3.1.1.	1–4 tartályból álló mintavételi tételek	minden tartály
5.A.2.3.1.2.	5–16 tartályból álló mintavételi tételek	4
5.A.2.3.1.3.	16-nál több tartályból álló mintavételi tételek	$\sqrt{}$ a mintavételi tételt (*) alkotó tartályok száma, de legfeljebb 20 tartály
5.A.2.3.2.	Legfeljebb egyliteres tartályok esetében:	4
5.A.2.4.	Takarmánytömbök és nyalósók	Mintavételre szánt tömbök és blokkok minimális száma (**): 25 egységből álló mintavételi tételenként egy tömb vagy blokk, de legfeljebb 4 tömb vagy blokk
5.A.3.	<b>Átlagolt minta</b> Mintavételi tételenként egy átlagolt minta szükséges. Az átlagolt mintát alkotó elemi minták összmenyisége nem lehet kevesebb a következőknél:	
5.A.3.1.	Ömlesztett takarmány	4 kg
5.A.3.2.	Kiszerezelt takarmány:	
5.A.3.2.1.	egy kg-nál nagyobb tömegű csomagok esetében:	4 kg
5.A.3.2.2.	legfeljebb egy kg-os csomagok esetében	4 eredeti csomag tartalmának a tömege
5.A.3.3.	Folyékony vagy félfolyékony takarmányok:	
5.A.3.3.1.	egy liternél nagyobb tartályok esetében	4 liter
5.A.3.3.2.	legfeljebb egyliteres tartályok esetében	4 eredeti tartály tartalmának térfogata
5.A.3.4.	Takarmánytömbök vagy nyalósók:	
5.A.3.4.1.	egy kg-nál nagyobb egyedi tömeg esetén	4 kg
5.A.3.4.2.	legfeljebb egy kg-os egyedi tömeg esetén	4 eredeti tömb vagy blokk tömege

5.A.4.	<b>Végső minták</b> Szükség esetén az átlagolt minta csökkentésével kapjuk meg a végső mintákat. Legalább egy végső minta elemzése szükséges. Az analizálásra szolgáló végső minta nem lehet kisebb a következőknél:	
	Szilárd takarmányok	500 g
	Folyékony vagy félfolyékony takarmányok	500 ml
5.B.	A takarmányban feltételezhetően egyenetlenül eloszló nemkívánatos anyagok, illetve termékek, mint pl. az aflatoxinok, az anyarozs, a ricinus és a kenderfélék ellenőrzésére vonatkozóan a takarmány-alapanyagokban (***)	
5.B.1.	<b>Mintavételi tétel:</b> lásd az 5.A.1. pontot	
5.B.2.	<b>Elemi minták</b>	
5.B.2.1.	Ömlesztett takarmányok: lásd az 5.A.2.1. pontot	
5.B.2.2.	Kiszert takarmányok:	Mintavételre szánt csomagok minimális száma:
5.B.2.2.1.	1–4 csomagból álló mintavételi tételek	minden csomag
5.B.2.2.2.	5–16 csomagból álló mintavételi tételek	4
5.B.2.2.3.	16-nál több csomagból álló mintavételi tételek	$\sqrt{\quad}$ a mintavételi tételt (*) kitevő csomagok száma, legfeljebb 40 csomag
5.B.3.	<b>Átlagolt minták</b> Az átlagolt minták száma a mintavételi tétel méretének megfelelően változik. Az alábbiakban megadásra kerül a mintavételi tételenkénti átlagolt minták minimális száma. Az átlagolt mintát alkotó elemi minták teljes tömege nem lehet kevesebb 4 kg-nál.	
5.B.3.1.	Ömlesztett takarmány	
	A mintavételi tétel tömege tonnában:	Az átlagolt minták minimális száma mintavételi tételenként:
	legfeljebb 1	1
	1-nél több, de legfeljebb 10	2
	10-nél több, de legfeljebb 40	3
	40-nél több	4
5.B.3.2.	Kiszert takarmányok:	
	A mintavételi tétel mérete csomagok számában megadva:	Az átlagolt minták minimális száma mintavételi tételenként:
	1–16	1
	17–200	2
	201–800	3
	800-nál több	4
5.B.4.	<b>Végső minták</b> Az egyes átlagolt minták osztásával kapjuk meg a végső mintákat. <i>Átlagolt mintánként</i> legalább egy végső minta elemzése szükséges. Az analizálásra szolgáló végső minta tömege nem lehet kisebb 500 g-nál.	

(\*) Amennyiben az eredmény törtszám, fel kell kerekíteni a legközelebbi egész számra.

(\*\*) Az 1 kg-ot vagy 1 litert meg nem haladó csomagok vagy tartályok vagy az egyenként legfeljebb 1 kg tömegű blokkok vagy tömbök esetében az elemi minta egy eredeti csomag vagy tartály tartalma, egy blokk vagy egy tömb.

(\*\*\*) Az 5.A. pontban megadott módszerek szolgálnak a teljes és kiegészítő takarmányokban az aflatoxinok, anyarozs, ricinus és a kenderfélék ellenőrzésére.

## 6. A MINTAVÉTELRE, A MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSÉRE ÉS CSOMAGOLÁSÁRA VONATKOZÓ UTASÍTÁSOK

### 6.1. Általános szabályok

A mintákat a lehető leggyorsabban kell vételezni és előkészíteni, mindvégig ügyelve a szükséges óvintézkedések betartására, amelyek biztosítják azt, hogy a termék ne változzon meg, illetve ne szennyeződjön. A mintákkal közvetlenül érintkező eszközök, felületek és tartályok tiszták és szárazak legyenek.

### 6.2. Elemi minták

#### 6.2.A. A takarmányban egyenletesen eloszló anyagok és termékek ellenőrzésére vonatkozóan

A teljes mintavételi tételből véletlenszerűen, körülbelül egyforma nagyságú elemi mintákat kell venni.

##### 6.2.A.1. Ömlesztett takarmány

A mintavételi tételt képzeletben több, megközelítően egyenlő részre kell felosztani. Az elemi minták számáról rendelkező 5.A.2. pontban meghatározott számú részt véletlenszerűen ki kell választani, és minden egyes részből legalább egy mintát kell venni.

Adott esetben, a mintavételi tétel mozgatása közben (berakodáskor, illetve kirakodáskor) is végre lehet hajtani a mintavételt.

##### 6.2.A.2. Kiszerezelt takarmány

Miután a mintavétel elvégzésére az 5.A.2. pont szerint kiválasztottuk az előírt számú csomagot, minden csomag tartalmának egy részét szűrőcsap vagy lapát segítségével ki kell venni. Ha szükséges, a csomagok egyenkénti kiürítése után is lehet mintákat venni. Az esetlegesen előforduló csomókat össze kell törni az egyes átlagolt mintákban külön-külön (ha kell, ki is lehet venni a csomókat, majd porlasztás után visszatenni a mintába).

##### 6.2.A.3. Homogén vagy homogenizálható folyékony vagy félfolyékony takarmányok

Miután a mintavétel elvégzésére az 5.A.2. pont szerint kiválasztottuk az előírt számú tartályt, a tartályok tartalmát szükség esetén homogenizálni kell, és minden egyes tartályból ki kell venni egy bizonyos mennyiséget.

Az elemi mintákat a tartályok kiürítésekor is lehet vételezni.

##### 6.2.A.4. Nem homogenizálható, folyékony vagy félfolyékony takarmányok

Miután a mintavétel elvégzésére az 5.A.2. pont szerint kiválasztottuk az előírt számú tartályt, mintákat kell venni a különböző rétegekből.

A tartályok tartalmának kiürítésekor is lehet mintákat venni, ám ebben az esetben az első frakciókat el kell önteni.

A minta összesített űrtartalmának mindkét esetben legalább 10 liternek kell lennie.

##### 6.2.A.5. Takarmánytömbök és nyalósók

Miután a mintavétel elvégzésére az 5.A.2. pont szerint kiválasztottuk a kívánt számú blokkot vagy tömböt, minden blokk vagy tömb egy részét kell venni.

#### 6.2.B. A takarmányokban feltételezhetően egyenletlenül eloszló nemkívánatos anyagok, illetve termékek, mint pl. az aflatoxinok, az anyarozs, a ricinus és a kenderfélék ellenőrzésére vonatkozóan a takarmány-alapanyagokban

A mintavételi tételt az átlagolt mintákról szóló 5.B.3. pontban meghatározott számnak megfelelően több, megközelítően egyenlő részre kell felosztani. Amennyiben ez a szám nagyobb egynél, az 5.B.2. pontban meghatározott elemi minták összes számát megközelítőleg egyenlően kell elosztani a különböző részekben. Ezután körülbelül egyenlő nagyságú mintákat kell venni<sup>(1)</sup> oly módon, hogy az egyes részekből vett minták összmenyisége ne legyen kevesebb az egyes átlagolt mintákra nézve előírt minimális 4 kg-nál. A különböző részekből vett elemi mintákat nem kell összesíteni.

<sup>(1)</sup> Kiszerezelt takarmányok esetében a mintavételre kerülő anyagok tartalmának egy részét szűrőcsap vagy lapát segítségével ki kell venni, miután – szükség esetén – a csomagokat egyenként kiürítettük.

### 6.3. **Átlagolt minták elkészítése**

#### 6.3.A. *A takarmányokban egyenletesen eloszló anyagok, illetve termékek ellenőrzésére vonatkozóan*

Az elemi minták összekeverésével kapunk egységes átlagolt mintát.

#### 6.3.B. *A takarmányokban feltételezhetően egyenetlenül eloszló nemkívánatos anyagok, illetve termékek, mint pl. az aflatoxinok, az anyarozs, a ricinus és a kenderfélék ellenőrzésére vonatkozóan a takarmány-alapanyagokban*

A mintavételi tétel egyes részeitől vett elemi mintákat össze kell keverni, majd el kell készíteni az 5.B.3. pontban meghatározott számú mintát, ügyelve arra, hogy minden egyes átlagolt minta eredete feljegyzésre kerüljön.

### 6.4. **Végső minták elkészítése**

Minden egyes átlagolt minta anyagát óvatosan össze kell keverni, hogy homogenizált mintát kapjunk <sup>(1)</sup>. Ha szükséges, az átlagolt mintát mechanikus vagy automatikus osztó, illetve a negyedelő módszer segítségével le kell csökkenteni minimum 2 kg-ra vagy 2 literre (redukált minta).

Ezt követően legalább három, megközelítőleg azonos mennyiségű, az 5.A.4. vagy 5.B.4. pont mennyiségi követelményeihez igazodó végső mintát kell elkészíteni. Minden egyes vizsgálati mintát egy, a célnak megfelelő külön tartályba kell tenni. Minden szükséges óvintézkedést meg kell tenni a minta összetételének a szállítás vagy tárolás során előforduló esetleges megváltozásának, illetve a minta beszennyeződésének vagy meghamisításának elkerülése érdekében.

### 6.5. **Végső minták csomagolása**

A tartályokat, illetve csomagokat le kell pecsételni és címkével kell ellátni – a pecsétnek magában kell foglalnia a teljes címkét – oly módon, hogy a pecsét felsértése nélkül ne lehessen kinyitni azokat.

## 7. MINTAVÉTELI JEGYZŐKÖNYV

Minden egyes mintavételről jegyzőkönyvet kell vezetni, amely lehetővé teszi az egyes mintavételi tételek egyértelmű azonosítását.

## 8. A MINTÁK CÉLÁLLOMÁSA

Minden egyes átlagolt minta esetében legalább egy végső mintát késedelem nélkül el kell küldeni az erre kijelölt vizsgálati laboratóriumba, a vegyelemző számára szükséges információkkal együtt.

---

<sup>(1)</sup> Az esetlegesen előforduló csomókat az egyes átlagolt mintákban külön-külön össze kell törni (a csomókat szükség esetén ki is lehet venni, porlasztás után pedig visszatenni a mintába).



## II. MELLÉKLET

## A TAKARMÁNYANALITIKAI MÓDSZEREKRE VONATKOZÓ ÁLTALÁNOS RENDELKEZÉSEK

## A. MINTÁK ANALITIKAI VIZSGÁLATRA TÖRTÉNŐ ELŐKÉSZÍTÉSE

## 1. Cél

Az alábbiakban leírt vizsgálati módszerek az I. mellékletben megállapított rendelkezéseknek megfelelő mintavételezés után, az ellenőrző laboratóriumoknak megküldött végső minták analitikai vizsgálat céljából történő előkészítésére vonatkoznak.

A mintákat oly módon kell előkészíteni, hogy az analitikai módszerekben előírt kimért mennyiségek homogének és a végső mintákra jellemzőek legyenek.

## 2. Szükséges óvintézkedések

A követendő minta-előkészítési eljárás függ az alkalmazott analitikai módszertől. Ezért elsőrendű fontosságú annak biztosítása, hogy a követett minta-előkészítési eljárás megfelelően az alkalmazott analitikai módszernek.

Minden szükséges műveletet oly módon kell elvégezni, hogy minimális legyen a minta beszennyeződésének és összetétele megváltozásának lehetősége.

Az őrlést, keverést és rostálást a lehető leggyorsabban kell végrehajtani, hogy a minta a lehető legrövidebb ideig érintkezzen a levegővel és a fényvel. Kerülni kell az olyan daráló- és őrlőgépek használatát, amelyek a mintát érzékelhetően felmelegítik.

A különösen hőérzékeny takarmányok esetében a kézi őrlés alkalmazása javasolt. Figyelmet kell fordítani annak biztosítására is, hogy az eszköz maga ne lehessen nyomelemekkel történő szennyezés forrása.

Ha az előkészítést nem lehet a minta nedvességtartalmának jelentős megváltozása nélkül elvégezni, akkor a nedvességtartalmat az előkészítés előtt és után is meg kell határozni a III. melléklet A. részében meghatározott módszer szerint.

## 3. A vizsgálat módja

Megfelelő osztási módszer alkalmazásával – például váltakozó lapátolással, álló vagy forgó mintaosztóval – osszuk fel a mintát megfelelő, analitikai vizsgálat céljára és referenciaként szolgáló részmintákra. Az átlós negyedeléssel történő mintavétel nem ajánlott, mivel magas eloszlási hibát tartalmazó részmintákat eredményezhet. A referenciamintát tegyük egy megfelelően tiszta, száraz, légmentesen záródó edénybe, majd készítsük elő az analitikai vizsgálatra szolgáló részt, legalább 100 grammot, az alábbiak szerint.

## 3.1. Előkészítés nélküli őrlhető takarmányok

Amennyiben az analitikai módszerekben másképp nem írják elő, szükség esetén őrlés után, rostáljuk át a minta teljes mennyiségét egy 1 mm szemátmérőjű, négyzetes szemű rostán (az ISO R565 ajánlásának megfelelően). Kerüljük a túlőrlést.

Keverjük össze az átrostált mintát, és vegyük fel egy megfelelően tiszta, száraz, légmentesen záródó edénybe. Közvetlenül az analízisre szánt mennyiség kimérése előtt keverjük össze újra.

## 3.2. Szárítás után őrlhető takarmányok

Amennyiben az analitikai módszerekben másképp nem írják elő, a III. melléklet A. részében említett nedvességmeghatározási módszer 4.3. pontja szerint leírt előzetes szárítási eljárásnak megfelelően szárítsuk ki a mintát 8–12 %-os nedvességtartalmúra. Ezt követően a 3.1. szakaszban leírtak szerint járjunk el.

## 3.3. Folyékony vagy félfolyékony takarmányok

Vegyük fel a mintát egy megfelelően tiszta, száraz, légmentesen záródó edénybe. Közvetlenül az analízisre szánt mennyiség kimérése előtt alaposan keverjük össze.

## 3.4. Egyéb takarmányok

Azok a minták, amelyek a fent említett eljárások egyikével sem készíthetők elő, bármely egyéb, olyan eljárással kezelhetők, amelyek biztosítják, hogy az analízisre kimért mennyiségek homogének és a végső mintákra jellemzőek legyenek.

#### 4. A minták tárolása

A mintákat olyan hőmérsékleten kell tárolni, amely nem változtatja meg az összetételüket. A vitaminok vagy fényre különösen érzékeny anyagok analizésére szánt mintákat barna üvegedényben kell tárolni.

#### B. AZ ANALITIKAI MÓDSZEREK SORÁN HASZNÁLT REAGENSEKRE ÉS ESZKÖZÖKRE VONATKOZÓ RENDELKEZÉSEK

1. Amennyiben az analitikai módszerekben másképp nem írják elő, minden analitikai reagensnek analitikai tisztaságúnak (a. t.) kell lennie. Nyomelem-analízis végrehajtásakor a reagensek tisztaságát vakpróbával kell ellenőrizni. Az így kapott eredmények a reagens esetleges további tisztítását teszik szükségessé.
2. Az analitikai módszerek leírásakor említett bármely oldatkészítési, hígítási, öblítési vagy mosási művelet esetében, ahol az alkalmazott oldószer vagy hígítószer fajtáját nem tüntetik fel, vizet kell használni. Általános szabályként ioncserélt vagy desztillált vizet kell használni. Az analitikai módszerekben jelzett különleges esetekben a vizet speciális tisztítási eljárásokkal kell kezelni.
3. Az ellenőrző laboratóriumokban megtalálható alapfelszerelésre való tekintettel, az analitikai módszerek leírásakor csak a speciális vagy speciális használatot megkövetelő eszközök és készülékek kerülnek említésre. Ezeknek tisztának kell lenniük, különösen nagyon kis anyagmennyiségek meghatározása esetén.

#### C. AZ ANALITIKAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA ÉS AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

##### 1. Extrahálási eljárás

Számos módszer egy bizonyos extrahálási eljárást határoz meg. Főszabályként a módszerben említettől eltérő extrahálási eljárást is lehet követni, feltéve, ha az alkalmazott extrahálási eljárás hatékonysága az analizált mátrix tekintetében bizonyítottan egyenértékű a módszerben említett eljárás extrahálási hatékonyságával.

##### 2. Tisztítási eljárás

Számos módszer egy bizonyos tisztítási eljárást határoz meg. Főszabályként a módszerben említettől eltérő tisztítási eljárást is lehet követni feltéve, ha az alkalmazott tisztítási eljárás az analizált mátrix tekintetében bizonyítottan a módszerben említett eljárással egyenértékű analitikai eredményt ad.

##### 3. Jelentés a használt analitikai módszerrel

Általában a takarmányokban található minden anyag meghatározására egyedi analitikai módszer kerül bevezetésre. Amennyiben több módszer adott, az ellenőrző laboratórium által alkalmazott konkrét módszert fel kell tüntetni az analitikai bizonylaton.

##### 4. Meghatározások száma

Az analitikai bizonylatban közölt eredménynek, a minta elkülönített részein, kielégítő ismételtetőséggel elvégzett, legalább két meghatározásból nyert átlagértéknek kell lennie.

Nemkívánatos anyagokra végzett analízis esetében azonban, ha az első meghatározás eredménye jelentősen (> 50 %) alacsonyabb, mint a megengedett határérték, nincs szükség további meghatározásokra, feltéve, hogy a megfelelő minőségügyi eljárásokat alkalmazzák.

Valamely feltüntetett anyagra vagy összetevőre végzett analízis esetében, ha az első meghatározás eredménye igazolja a feltüntetett tartalom jelenlétét, azaz az analitikai eredmény a feltüntetett tartalom elfogadható szórási tartományába esik, nincs szükség további meghatározásokra, feltéve, hogy a megfelelő minőségügyi eljárásokat alkalmazzák.

Egyes esetekben ezt az elfogadható szórási tartományt a jogszabályok – úgymint a 79/373/EGK tanácsi irányelv <sup>(1)</sup> – határozzák meg.

##### 5. Az analitikai eredmények jelentése

Az analitikai eredményt az analitikai módszerben meghatározott módon és megfelelő helyiérték-számmal kell kifejezni, és ha szükséges, akkor a végső minta előkészítés előtti nedvességtartalmára kell korrigálni.

<sup>(1)</sup> HL L 86., 1979.4.6., 30. o.

**6. Mérési bizonytalanság és visszanyerési arány nemkívánatos anyagokra végzett analízis esetében**

A 2002/32/EK irányelv értelmében vett nemkívánatos anyagok – többek között a dioxinok és a dioxinszerű PCB-k – tekintetében valamely állati takarmányozásra szánt termék akkor minősül nem felelőnek a megengedett határérték szempontjából, ha úgy ítélik meg, hogy az analitikai eredmény – figyelembe véve a kiterjesztett mérési bizonytalanságot és a visszanyerési korrekciót – meghaladja a megengedett határértéket. A megfelelés megállapítására az elemzett koncentrációt alkalmazzák a visszanyerés alapján végzett korrekció, valamint a kiterjesztett mérési bizonytalanságnak az elemzés eredményéből történő kivonása után. Ezt az eljárást csak olyan esetekben lehet alkalmazni, amikor az analitikai módszer lehetővé teszi a mérési bizonytalanság becslését és a visszanyerési korrekciót (pl. mikroszkópos elemzésnél nem lehetséges).

Az analitikai eredményt a következők szerint kell jelteni (amennyiben az alkalmazott analitikai módszer lehetővé teszi a mérési bizonytalanság és a visszanyerés becslését):

- a) visszanyerésre korrigáltan, ebben az esetben fel kell tüntetni a visszanyerés mértékét. Nem szükséges feltüntetni a visszanyerési korrekciót, ha a visszanyerés aránya 90–110 % közötti;
- b)  $x \pm U$  formában, ahol  $x$  a vizsgálati eredmény,  $U$  a kiterjesztett mérési bizonytalanság, a kiterjesztési tényező 2, amely körülbelül 95 %-os konfidenciaszintet eredményez.

Ha azonban az analízis eredménye jelentősen (> 50 %) alacsonyabb, mint a megengedett határérték, és feltéve, hogy megfelelő minőségi eljárásokat alkalmaznak és az analízis célja kizárólag a jogszabályi rendelkezéseknek való megfelelés ellenőrzése, az analitikai eredményeket lehet visszanyerési korrekció nélkül jelteni, és ezekben az esetekben el lehet hagyni a visszanyerés arányának és a mérési bizonytalanságnak a jelölését.

## III. MELLÉKLET

ANALITIKAI MÓDSZEREK A TAKARMÁNY-ALAPANYAGOK ÉS ÖSSZETETT TAKARMÁNYOK  
ÖSSZETÉTELÉNEK ELLENŐRZÉSÉRE

## A. A NEDVESSÉGTARTALOM MEGHATÁROZÁSA

## 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányok nedvességtartalmának meghatározását. Illóanyagokat (mint például szerves savakat) tartalmazó takarmányok esetében figyelembe kell venni, hogy a nedvességtartalommal együtt jelentős mennyiségű illóanyag meghatározása történik.

Nem vonatkozik a tejtermékek mint takarmány-alapanyagok analízisére, az ásványi anyagok és a túlnyomórészt ásványi anyagokból álló keverékek analízisére, az állati és növényi zsírok és olajok és olajos magvak és olajtartalmú gyümölcsök analízisére.

## 2. Vizsgálati alapelv

A mintát, a takarmány jellege szerint, meghatározott körülmények között szárítjuk. A tömegvesztés mértékét meghatározzuk meg. Amennyiben magas nedvességtartalmú, szilárd takarmányokkal dolgozunk, előzetes szárítást kell végezni.

## 3. Eszközök

- 3.1. Nem nedvszívó anyagból készült, könnyen tisztítható aprítógép, amelynek használata gyors és egyenmő őrlést tesz lehetővé anélkül, hogy észrevehető mennyiségű hőtermeléssel járna, a lehető legnagyobb mértékben megakadályozza a külső levegővel történő érintkezést, és megfelel a 4.1.1. és 4.1.2. pontban foglalt követelményeknek (pl. kalapácsos törő vagy vízűtéses mikroaprítók, összecsukható kúpos malmok, finommozgású-lassú fordulatú vagy fogaskerekes aprítók).
- 3.2. 1 mg pontosságú analitikai mérleg.
- 3.3. Nem rozsdásodó fémből vagy üvegből készült, légmentes záródást biztosító fedéllel ellátott száraz tartályok; megfelelő munkafelület, amely lehetővé teszi a vizsgálati minta 0,3 g/cm<sup>2</sup> körüli mennyiségben történő terítését.
- 3.4. Elektromos fűtésű izotermikus, megfelelően szellőztethető kemence ( $\pm 2$  °C), amely gyors hőfokszabályozást tesz lehetővé <sup>(1)</sup>.
- 3.5. Szabályozható, elektromos fűtésű vákuumkemence olajszivattyúval és forró, száraz levegő vagy szárítóanyag (pl. kalcium-oxid) bejuttatására alkalmas szerkezettel ellátva.
- 3.6. Megfelelő szárítóanyagot tartalmazó, vastag, perforált fém- vagy porcelánlemez exszikkátor.

## 4. A vizsgálat módja

Megjegyzés: Az ebben a szakaszban leírt műveleteket a mintacsomagok kibontása után azonnal el kell végezni. Az elemzést legalább egyszer meg kell ismételni.

## 4.1. Előkészítés

## 4.1.1. A 4.1.2. és a 4.1.3. pont alatt nem szereplő takarmányok

Vegyünk legalább 50 g-ot a mintából. Szükség esetén aprítsuk fel vagy oszlassuk el úgy, hogy a nedvességtartalma egyenletes legyen (lásd 6. pont).

## 4.1.2. Gabona- és darafélék

Vegyünk legalább 50 g-ot a mintából. Őröljük le úgy, hogy a kapott részecskék legalább 50 %-a átjusson egy 0,5 mm-es szembőségű szitán, és ne maradjon vissza 10 %-nál több egy kerek szemű, 1 mm-es szembőségű szitán.

<sup>(1)</sup> A gabonafélék, lisztek, darafélék és derce szárítására szolgáló kemence olyan hőkapacitású legyen, hogy 131 °C-ra beállítva kevesebb mint 45 perc alatt visszaálljon a beállított hőfokra, azt követően, hogy a maximális számú vizsgálati mintát elhelyezték benne egyidejű szárítás céljából. A szellőztetése olyan legyen, hogy amikor a maximális befogadóképességnek megfelelő számú közönséges búzaminát elhelyezünk benne és két órán át szárítjuk, akkor az így kapott eredmény mindössze kevesebb mint 0,15 %-kal térjen el attól az eredménytől, amelyet a négy órán át folytatott szárítással kapunk.

- 4.1.3. Folyékony vagy kenőcsös állagú takarmányok, túlnyomórészt olajokból és zsírokból álló takarmányok

Mérjük ki 25 g mintát 10 mg pontossággal, adjunk hozzá megfelelő mennyiségű vízmentes homokot, 10 mg pontossággal kimérve, és keverjük addig, amíg homogén masszát nem kapunk.

- 4.2. Szárítás

- 4.2.1. A 4.2.2. és a 4.2.3. pont alatt nem szereplő takarmányok

Fedelével együtt mérjük le egy tartályt (3.3.) 1 mg pontossággal. Mérjük a lemért tartályba 5 g mintát 1 mg pontossággal, és terítsük el egyenletesen. Helyezzük a tartályt fedél nélkül 103 °C-ra előmelegített kemencébe. Annak megakadályozása érdekében, hogy a kemence hőfoka a kívánatos érték alá süllyedjen, a tartályt a lehető leggyorsabban helyezzük a kemencébe. Hagyjuk száradni négy órán át attól az időponttól számítva, amikor a kemence hőfoka újból elérte a 103 °C-ot. Helyezzük vissza a tartályra a fedelet, a tartályt vegyük ki a kemencéből, hagyjuk hűlni 30–45 percig az exsikkátorban (3.6.), és mérjük le 1 mg pontossággal.

Túlnyomórészt olajokból és zsírokból álló takarmányok esetén szárítsuk további 30 percen át 130 °C-on a kemencében. A két mérés különbsége nem haladhatja meg a nedvességtartalom 0,1 %-át.

- 4.2.2. Gabonafélék, liszt, darafélék és derce

Fedelével együtt mérjük le egy tartályt (3.3.) 0,5 mg pontossággal. Mérjük a lemért tartályba 5 g aprított mintát 1 mg pontossággal, és terítsük el egyenletesen. Helyezzük a tartályt fedél nélkül 130 °C-ra előmelegített szárítókemencébe. Annak megakadályozása érdekében, hogy a kemence hőfoka a kívánatos érték alá süllyedjen, a tartályt a lehető leggyorsabban helyezzük a kemencébe. Hagyjuk száradni két órán át attól az időponttól számítva, amikor a kemence hőfoka újból elérte a 130 °C-ot. Helyezzük vissza a tartályra a fedelet, a tartályt vegyük ki a kemencéből, hagyjuk hűlni 30–45 percig az exsikkátorban (3.6.), és mérjük le 1 mg pontossággal.

- 4.2.3. Több mint 4 % szacharózt vagy laktózt tartalmazó összetett takarmányok: takarmány-alapanyagok, mint a szentjánoskenyér, a hidrolizált gabonatermékek, a malátamagvak, a szárított répaszelet, a hal- és cukorlevek; a 25 %-nál több ásványi sót (beleértve a kristályvíztartalmat is) tartalmazó összetett takarmányok.

Fedelével együtt mérjük le egy tartályt (3.3.) 0,5 mg pontossággal. Mérjük a lemért tartályba 5 g mintát 1 mg pontossággal, és terítsük el egyenletesen. Helyezzük a tartályt fedél nélkül 80–85 °C-ra előmelegített vákuumkemencébe (3.5.). Annak megakadályozása érdekében, hogy a kemence hőfoka a kívánatos érték alá süllyedjen, a tartályt a lehető leggyorsabban helyezzük a kemencébe.

Emeljük a nyomást 100 torr-ra, és hagyjuk a mintát száradni ezen a nyomáson négy órán át száraz, forró levegő áramoltatásával vagy szárítóanyag (20 mintához kb. 300 g) felhasználásával. Utóbbi esetben a kívánt nyomás elérésekor kapcsoljuk le a vákuumszivattyút. A szárítási időt attól a pillanattól kell számítani, amikor a kemence hőmérséklete visszaáll 80–85 °C-ra. Óvatosan állítsuk vissza a kemencében a légköri nyomást. Nyissuk ki a kemencét, azonnal helyezzük vissza a tartály fedelét, vegyük ki a tartályt a kemencéből, hagyjuk hűlni 30–45 percen át az exsikkátorban (3.6.), és mérjük le 1 mg-os pontossággal. Szárítsuk további 30 percen át a vákuumkemencében 80–85 °C-on, és mérjük le újra. A két mérés különbsége nem haladhatja meg a nedvességtartalom 0,1 %-át.

- 4.3. Előszárítás

- 4.3.1. A 4.3.2. pont alatt nem szereplő takarmányok

A magas nedvességtartalmú szilárd takarmányokat, amelyek nehezen apríthatók fel, előszárításnak kell alávetni az alábbiak szerint:

Mérjük le 50 g-ot az *aprítatlan* mintából 10 mg pontossággal (a préselt vagy agglomerált mintákat kissé fel is lazíthatjuk, ha szükséges) egy megfelelő tartályba (pl. 20×12 cm-es, 0,5 cm-es peremmel ellátott alumíniumtálca). Hagyjuk száradni 60–70 °C-os kemencében, amíg a nedvességtartalom 8–12 % körüli értékre csökken. Vegyük ki a kemencéből, hagyjuk fedél nélkül hűlni a laboratóriumban egy órán át, és mérjük le 10 mg pontossággal. Ezután aprítsuk fel azonnal a 4.1.1. pontban feltüntetett módon, és szárítsuk a 4.2.1. vagy a 4.2.3. pontban feltüntetett módon, a takarmány jellege szerint.

- 4.3.2. Gabonafélék

A 17 %-nál magasabb nedvességtartalmú gabonaféléket előszárításnak kell alávetni az alábbiak szerint:

Mérjük le 50 g-ot az aprítatlan gabonából 10 mg pontossággal egy megfelelő tartályba (pl. 20×12 cm-es, 0,5 cm-es peremmel ellátott alumíniumtálca). Hagyjuk száradni 5–7 percen át 130 °C-os kemencében. Vegyük ki a kemencéből, hagyjuk fedél nélkül hűlni a laboratóriumban két órán át, és mérjük le 10 mg pontossággal. Óröljük meg azonnal a 4.1.2. pontban feltüntetett módon, és szárítsuk a 4.2.2. pontban feltüntetett módon.

## 5. Az eredmények kiszámítása

A minta százalékosan kifejezett nedvességtartalmát (X) az alábbi képletek segítségével számítjuk ki:

### 5.1. Szárítás előszárítás nélkül

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

ahol:

m = a vizsgálati minta eredeti tömege, grammban;  
m<sub>0</sub> = a száraz vizsgálati minta tömege, grammban.

### 5.2. Szárítás előszárítással

$$X_p = \left[ \frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left( 1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

ahol:

m = a vizsgálati minta eredeti tömege, grammban,  
m<sub>1</sub> = a vizsgálati minta tömege, grammban, előszárítás után,  
m<sub>2</sub> = a vizsgálati minta tömege, grammban, aprítás vagy őrlés után,  
m<sub>0</sub> = a száraz vizsgálati minta tömege, grammban.

### 5.3. Ismételhetőség

Az ugyanazon mintán elvégzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg a nedvességtartalom abszolút értékének 0,2 %-át.

## 6. Észrevételek

Ha az aprítás szükségesnek bizonyul, és úgy tűnik, hogy ez befolyásolja a termék nedvességtartalmát, a takarmány-alkotóelemek analízisének eredményét az eredeti minta nedvességtartalmának megfelelően korrigálni kell.

## B. AZ ÁLLATI ÉS NÖVÉNYI ZSÍROK ÉS OLAJOK NEDESSÉGTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA

### 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi az állati és növényi zsírok és olajok víz- és illóanyag-tartalmának meghatározását.

### 2. Vizsgálati alapelv

A mintát 103 °C-on, a tömegállandóság eléréséig szárítjuk (két egymást követő mérés közötti tömegveszteségnek 1 mg-nál kevesebbnek kell lennie). A tömegveszteséget méréssel határozzuk meg.

### 3. Eszközök

- 3.1. Rozsdamentes anyagból készült, 8–9 cm átmérőjű és körülbelül 3 cm magas, lapos fenekű edény.
- 3.2. Rögzített üveggömbbel és a felső végén kiterjedési csővel rendelkező hőmérő, amely körülbelül 80 °C-tól legalább 110 °C-ig beosztással rendelkezik és körülbelül 10 cm hosszú.
- 3.3. Homokfürdő vagy elektromos főzőlap.

- 3.4. Hatékony szárítóközeget tartalmazó exsikkátor.
- 3.5. Analitikai mérleg.

#### 4. A vizsgálat módja

Mérjük ki mg pontossággal 20 g homogenizált mintát a hőmérőt (3.2.) tartalmazó száraz, lemért edénybe (3.1.). A hőmérővel folyamatosan kevergetve hevítjük a homokfürdőn vagy a főzőlapon (3.3.) úgy, hogy a hőmérséklet körülbelül hét perc alatt érje el a 90 °C-ot.

Csökkentsük a hőt, ügyelve az edény aljáról felszálló buborékok gyakoriságára. A hőmérséklet nem haladhatja meg a 105 °C-ot. Folytassuk az edény alján lévő anyag keverését, amíg a buborékképződés le nem áll.

A teljes kiszáritás érdekében hevítjük az edényt néhányszor 103 ± 2 °C-ra, miközben két hevítés között 93 °C-ra hűtjük tartalmát. Ezután hagyjuk szobahőmérsékletre lehűlni az exsikkátorban (3.4.), és mérjük le. Ismételjük addig a műveletet, amíg a két egymást követő mérés közötti tömegvesztés már nem haladja meg a 2 mg-ot.

*Megjegyzés:* A minta tömegének növekedése a többszöri hevítést követően a zsír oxidációját jelzi, ebben az esetben az eredményt a tömeg növekedését közvetlenül megelőző mérés alapján kell kiszámítani.

#### 5. Az eredmények kiszámítása

A mintára vonatkoztatott, százalékosan kifejezett nedvességtartalmat (X) a következő képlettel lehet kiszámítani:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

ahol:

m = a vizsgálati minta tömege, grammban;

m<sub>1</sub> = az edény hevítés előtti tömege, grammban, a tartalmával együtt;

m<sub>2</sub> = az edény hevítés utáni tömege, grammban, a tartalmával együtt.

A 0,05 %-nál kisebb eredményeket a „0,05 %-nál kisebb” megnevezéssel kell feljegyezni.

#### *Ismételhetőség*

Az ugyanazon mintán elvégzett két párhuzamos meghatározás eredményeként kapott nedvességtartalmak eltéréseinek abszolút értéke nem haladhatja meg a 0,05 %-ot.

### C. A NYERSFEHÉRJE-TARTALOM MEGHATÁROZÁSA

#### 1. Cél és alkalmazási terület

E módszer lehetővé teszi a takarmányok nyersfehérje-tartalmának meghatározását a Kjeldahl-módszer szerint meghatározott nitrogéntartalom alapján.

#### 2. Vizsgálati alapelv

A mintát katalizátor jelenlétében kénsavval roncsoljuk. A savas oldatot nátrium-hidroxid-oldattal lúgosítjuk. Az ammóniát lepároljuk, és ismert mennyiségű kénsavban vesszük fel, amelynek feleslegét nátrium-hidroxid standardoldatával titráljuk.

Alternatív megoldásként a felszabadult ammóniát bőszéges bórsavoldatba desztilláljuk, majd sósav- vagy kénsavoldattal titráljuk.

#### 3. Reagensok

- 3.1. Kálium-szulfát.

- 3.2. Katalizátor: réz(II)-oxid, CuO vagy réz(II)-szulfát-pentahidrát,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 3.3. Granulált cink.
- 3.4. Kénsav,  $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$ .
- 3.5. Kénsav, normál mérőoldat,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mól/l}$ .
- 3.6. Kénsav, normál mérőoldat,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mól/l}$ .
- 3.7. Kénsav, normál mérőoldat,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mól/l}$ .
- 3.8. Metilvörösindikátor; oldjunk fel 300 mg metilvöröst 100 ml etanolban,  $\sigma = 95\text{--}96 \%$  (v/v)
- 3.9. Nátrium-hidroxid-oldat (technikai minőségű is használható)  $\beta = 40 \text{ g/100 ml}$  (m/v: 40 %).
- 3.10. Nátrium-hidroxid, normál mérőoldat,  $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mól/l}$ .
- 3.11. Nátrium-hidroxid, normál mérőoldat,  $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mól/l}$ .
- 3.12. Granulált horzsakő, sósavban mosott és meggyújtott.
- 3.13. Acetanilid (olvadáspont =  $114 \text{ }^\circ\text{C}$ , N-tartalom = 10,36 %).
- 3.14. Szacharóz (nitrogénmentes).
- 3.15. Bórsav ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).
- 3.16. Metilvörösindikátor-oldat: oldjunk fel 100 mg metilvöröst 100 ml etanolban vagy metil-alkoholban.
- 3.17. Brómkrezol-zöld-oldat: oldjunk fel 100 mg brómkrezol-zöldet 100 ml etanolban vagy metil-alkoholban.
- 3.18. Bórsavas oldat (10 g/l – 40 g/l, a használt eszköztől függően).

Kolorimetriás végpont-meghatározás alkalmazásakor a metilvörös és a brómkrezol indikátort a bórsavas oldathoz kell adni. Ha 1 liter bórsavas oldatot készítünk, a térfogat kiigazítása előtt 7 ml metilvörösindikátor-oldatot (3.16.) és 10 ml brómkrezol-zöld oldatot (3.17.) kell hozzáadni.

A használt víztől függően a bórsavas oldat pH-ja tételenként változhat. Pozitív vakpróbához gyakorta szükség lehet kis mennyiségű lúg hozzáadására.

*Megjegyzés:* Rendszerint jó eredményt ad körülbelül 3–4 ml NaOH-nak (3.11.) 1 liter 10 g/l bórsavas oldathoz való hozzáadása. Tároljuk az oldatot szobahőmérsékleten, és tárolás közben védjük a fénytől és az ammóniagáz-forrásoktól.

- 3.19 Sósav, normál mérőoldat,  $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mól/l}$ .

*Megjegyzés:* A normál mérőoldatok más koncentrációi (3.5., 3.6., 3.7., 3.10., 3.11. és 3.19.) is használhatók, ha ezt a számításokban korrigáljuk. A koncentrációt mindig négytizedes pontossággal kell megadni.

#### 4. **Eszközök**

A Kjeldahl-eljárás szerinti roncsolás, desztillálás és titrálás elvégzésére alkalmas készülék.

#### 5. **A vizsgálat módja**

##### 5.1. *Roncsolás*

Mérjünk ki 0,001 g pontossággal 1 g mintát, és helyezzük be a roncsoló lombikjába. Adjunk hozzá 15 g kálium-szulfátot (3.1.), megfelelő mennyiségű katalizátort (3.2.) (0,3–0,4 g réz(II)-oxidot vagy 0,9–1,2 g réz(II)-szulfát-pentahidrátot), 25 ml kénsavat (3.4.) és szükség szerint néhány szemcse horzsakövet (3.12.), majd keverjük össze.



Először mérsékelten hevítsük a lombikot, szükség esetén időnként keverjük meg annak tartalmát, egészen addig, amíg a massa karbonizálódik és a hab eltűnik; ezt követően erősebben hevítsük, amíg a folyadék erős forrásba nem jön. A hevítés akkor megfelelő, ha a forrásban levő sav a lombik falán lecsapódik. Kerüljük a lombik oldalának túlhevítését és azt, hogy ahhoz szerves részecskék tapadjanak.

Amikor az oldat feltisztult és világoszöld színűvé vált, folytassuk a forralást további két órán át, majd hagyjuk lehűlni az oldatot.

## 5.2. *Lepárlás*

Óvatosan adjunk hozzá annyi vizet, amennyi a szulfátok teljes feloldódásához elegendő. Engedjük lehűlni, majd szükség szerint adjunk hozzá néhány szemcsényi cinket (3.3.). Folytassuk az 5.2.1. vagy az 5.2.2. pont szerint.

### 5.2.1. *Lepárlás kénsavba*

A lepárlókészülék gyűjtőlombikjába mérjük be pontosan 25 ml kénsavat (3.5. vagy 3.7.), a feltételezett nitrogéntartalomtól függően. Adjunk hozzá néhány csepp metilvörösindikátort (3.8.).

Kapcsoljuk össze a Kjeldahl-lombikot a lepárlókészülék hűtőjével, és legalább 1 cm mélyen merítsük be a hűtő végét a gyűjtőlombikban lévő folyadékba (lásd a 8.3. észrevételt). Lassan, ammóniaveszteség nélkül öntsünk 100 ml nátrium-hidroxid oldatot (3.9.) a Kjeldahl-lombikba (lásd a 8.1. észrevételt). Hevítsük a lombikot az ammónia lepárlódásáig.

### 5.2.2. *Lepárlás bórsavba*

Amennyiben a párlat ammóniatartalmának titrálását manuálisan végezzük, az alább megadott eljárást kell alkalmazni. Amennyiben a lepárlóegység teljesen automatikusan a párlat ammóniatartalmát is titrálja, kövessük a gyártó utasításait a lepárlóegység működtetése tekintetében.

Tegyünk a hűtő kifolyójához 25–30 ml bórsavas oldatot (3.18.) tartalmazó gyűjtőlombikot úgy, hogy az adagolócső a bórsavas oldat szintje alatt legyen. Állítsuk be a lepárlóegységet 50 ml nátrium-hidroxid oldat (3.9.) adagolására. A lepárlóegységet a gyártó utasításainak megfelelően működtessük, és pároljuk le a nátrium-hidroxid oldat hozzáadásával felszabadult ammóniát. Gyűjtsük össze a párlatot a bórsavas fogadóoldatban. A párlat mennyisége (a gőzlepárlás ideje) a minta nitrogéntartalmától függ. Kövessük a gyártó utasításait.

*Megjegyzés:* Félautomata lepárlóegység esetében a nátrium-hidroxid felesleg hozzáadása és a gőzlepárlás automatikusan történik.

## 5.3. *Titrálás*

Folytassuk az 5.3.1. vagy a 5.3.2. pont szerint.

### 5.3.1. *Kénsav*

A gyűjtőlombikban levő kénsavfelesleget a végpont eléréséig titráljuk nátrium-hidroxid oldattal (3.10. vagy 3.11.) az alkalmazott kénsav-koncentrációtól függően.

### 5.3.2. *Bórsav*

A gyűjtőlombik tartalmát a normál sósavmérőoldattal (3.19.) vagy normál kénsavmérőoldattal (3.6.) titráljuk büretta segítségével, és olvassuk le a használt párlat mennyiségét.

Kolorimetriás végpont-meghatározás alkalmazásakor a végpont elérése akkor történik, amikor a rózsaszín első jele megjelenik a tartalomban. Becsüljük meg a büretta eredményét 0,05 ml pontossággal. Egy megvilágított mágneses keverőlemez vagy fotometrikus detektor segíthet a végpont megjelenítésében.

Ez történhet automatikusan automata titrálóval felszerelt gőzlepárló használatával.

Kövessük a gyártó utasításait az adott lepárló vagy lepárló/titráló működtetésekor.

Megjegyzés: Automata titrálórendszer használatakor a titrálás a lepárlás kezdetekor rögtön megkezdődik és 1 %-os bórsavas oldatot (3.18.) használunk.

Teljesen automatikus lepárlórendszer használatakor az ammónia automatikus titrálása potenciometrikus pH-rendszer alkalmazásával végpont-meghatározással is elvégezhető.

Ebben az esetben pH-mérővel felszerelt automata titrálót használunk. A pH-mérőt a szokásos laboratóriumi pH-kalibrálási eljárásokat követve megfelelően kalibrálni kell a 4–7 közötti pH tartományra.

A titrálás pH-végpontjának elérése 4,6-os pH értéknél következik be, ami a titrációs görbe legmeredekebb pontja (inflexiós pont).

#### 5.4. Vakpróba

A reagensek nitrogénmentességének igazolására végezzünk vakpróbát (roncsolás, lepárlás és titrálás) a minta helyett 1 g szacharózt (3.14.) használva.

### 6. Az eredmények kiszámítása

A számításokat a 6.1. vagy a 6.2. pont szerint végezzük.

#### 6.1. Számítás az 5.3.1. pont szerinti titrálás esetén

A tömegszázalékban kifejezett nyersfehérje-tartalom kiszámítása a következő képlettel történik:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

ahol:

$V_0$  = a vakpróbában használt NaOH (3.10. vagy 3.11.) térfogata (ml).

$V_1$  = a minta titrálásához használt NaOH (3.10. vagy 3.11.) térfogata (ml).

$c$  = a nátrium-hidroxid (3.10. vagy 3.110.) koncentrációja (mól/l).

$m$  = a minta tömege (g).

#### 6.2. Számítás az 5.3.2. pont szerinti titrálás esetén

##### 6.2.1. Sósavas titrálás

A tömegszázalékban kifejezett nyersfehérje-tartalom kiszámítása a következő képlettel történik:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

ahol:

$m$  = a vizsgált adag g-ban kifejezett tömege;

$c$  = a normál sósav-mérőoldat (3.19.) koncentrációja (mól/l);

$V_0$  = a vakpróbában használt sósav térfogata (ml);

$V_1$  = a vizsgált adaghoz használt sósav térfogata (ml).

##### 6.2.2. Kénsavas titrálás

A tömegszázalékban kifejezett nyersfehérje-tartalom kiszámítása a következő képlettel történik:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

ahol:

$m$  = a vizsgált adag g-ban kifejezett tömege

$c$  = a normál kénsav-mérőoldat (3.6.) koncentrációja (mól/l)

$V_0$  = a vakpróbában használt kénsav (3.6.) térfogata (ml)

$V_1$  = a vizsgált adaghoz használt kénsav (3.6.) térfogata (ml)

## 7. A módszer validálása

### 7.1. Ismételhetőség

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

- 20 %-nál alacsonyabb nyersfehérje-tartalom esetén a 0,2 %-ot abszolút értékben,
- 20 % és 40 % közötti nyersfehérje-tartalom esetén a magasabb érték 1,0 %-át,
- 40 %-nál magasabb nyersfehérje-tartalom esetén a 0,4 %-ot abszolút értékben.

### 7.2. Pontosság

Végezzük el az analízist (roncsolás, lepárlás és titrálás) 1,5–2,0 g acetaniliden (3.13.) 1 g szacharóz (3.14.) jelenlétében; 1 g acetanilid 14,80 ml kénsavat (3.5.) fogyaszt. A visszanyerés mértékének legalább 99 %-osnak kell lennie.

## 8. Észrevételek

- 8.1. A készülék lehet kézi, félautomata vagy automata típusú. Ha az alkalmazott készülék esetében a roncsolási és a lepárlási lépések között mintaátvitelre van szükség, ezt anyagvesztés nélkül kell végrehajtani. Ha a lepárlókészülék lombikja nincs felszerelve csepegtetőtölcsérrel, a nátrium-hidroxidot közvetlenül a lombik és a hűtő összekapcsolása előtt kell hozzáadni, a folyadékot lassan az edény belső oldala mentén folytatva.
- 8.2. Ha a roncsolt anyag megszilárdul, a fent megadottnál nagyobb mennyiségű kénsavval (3.4.) kezdjük újra a meghatározást.
- 8.3. Alacsony nitrogéntartalmú termékek esetén a gyűjtőlombikba mérendő kénsav (3.7.) térfogata szükség esetén 10 vagy 15 ml-re csökkenthető, és vízzel 25 ml-re feltölthető.
- 8.4. Rutinanalízishez más analitikai módszerek is használhatóak a nyersfehérje meghatározására, de a C. részben leírt Kjeldahl-módszer a referencia-módszer. Minden mátrix esetében egyedileg kell igazolni, hogy az alternatív (pl. DUMAS) módszerrel kapott eredmények egyenértékűek a referenciamódszerrel kapott eredményekkel. Mivel az alternatív módszerrel kapott eredmények – még az egyenértékűség igazolását követően is – eltérhetnek kissé a referenciamódszerrel kapott eredményektől, az analitikai jelentésben meg kell említeni a nyersfehérje meghatározására használt analitikai módszert.

## D. A KARBAMID MEGHATÁROZÁSA

### 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányokban lévő karbamid szintjének meghatározását.

### 2. Vizsgálati alapelv

A mintát vízben szuszpendáljuk egy derítőszerrel. A szuszpenziót leszűrjük. A szűrlet karbamidtartalmát, 4-dimetil-amino-benzaldehid (4-DMAB) hozzáadása után, az optikai sűrűség 420 nm-es hullámhosszon való megméréseivel határozzuk meg.

### 3. Reagensok

- 3.1. 4-dimetil-amino-benzaldehid-oldat: oldjunk fel 1,6 g 4-DMAB -t 100 ml 96 %-os etanolban, és adjunk hozzá 10 ml sósavat ( $\rho_{20}$  1,19 g/ml). A reagens legfeljebb kéthetes időtartamon keresztül áll el.
- 3.2. Carrez I. oldat: oldjunk fel vízben 21,9 g cink-acetátot,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  és 3 g jégacetet. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.3. Carrez II. oldat: vízben oldjunk fel 10,6 g kálium-[hexaciano-ferrát(II)]-ot,  $\text{K}_4 \text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.4. Aktív szén, amely nem abszorbeálja a karbamidot (ezt ellenőrizni kell).

3.5. Karbamid, 0,1 %-os oldat (w/v).

#### 4. **Eszközök**

4.1. Billenődobos keverőgép: kb. 35–40 fordulatszám/perc teljesítménnyel.

4.2. Kémcsövek: 160 × 16 mm, csiszolt üveg dugóval.

4.3. Spektrofotométer.

#### 5. **A vizsgálat módja**

##### 5.1. *A minta elemzése*

Mérjük ki a mintából 2 g-ot mg-nyi pontossággal, és 1 g aktív szénrel (3.4.) együtt helyezzük egy 500 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 400 ml vizet és 5 ml Carrez I. oldatot (3.2.), keverjük kb. 30 másodpercig, majd adjunk hozzá 5 ml Carrez II. oldatot (3.3.). Keverjük a forgódobon harminc percig. Töltsük térfogatra vízzel, rázzuk fel, és szűrjük le.

Vegyünk el 5 ml-t az áttetsző, színtelen szűrletekből, öntsük csiszolt üveg dugóval ellátott kémcsövekbe, adjunk hozzájuk 5 ml 4-DMAB oldatot (3.1.), és keverjük fel. Helyezzük a kémcsöveket vízfürdőbe 20 °C-on (+/- 4 °C). Tizenöt perc elteltével a spektrofotométer segítségével, 420 nm-en mérjük meg a mintaoldat optikai sűrűségét, és ezt hasonlítjuk össze a vakpróbához a reagensekből készített oldattal.

##### 5.2. *Kalibrációs görbe*

Vegyünk el a karbamid oldatból (3.5.) 1, 2, 4, 5 és 10 ml-t, öntsük 100 ml-es mérőlombikokba, és töltsük fel őket térfogatra vízzel. Vegyünk el 5 ml-t minden egyes oldatból, és mindegyikhez adjunk 5 ml 4-DMAB oldatot (3.1.), homogenizáljuk, és a fentiek szerint mérjük meg az optikai sűrűséget összehasonlítva az 5 ml 4-DMAB oldatot és 5 ml vizet tartalmazó karbamidmentes kontrolloldattal. Szerkesszük meg a kalibrációs görbét.

#### 6. **Az eredmények kiszámítása**

A kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg a mintában lévő karbamidmennyiséget.

Az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

#### 7. **Észrevételek**

7.1. 3 %-ot meghaladó karbamidtartalom esetén, csökkentjük a minta nagyságát 1 g-ra vagy hígítsuk az eredeti oldatot úgy, hogy 500 ml-ben ne legyen több 50 mg karbamidnál.

7.2. Alacsony karbamidtartalom esetén növeljük a minta nagyságát mindaddig, amíg a szűrlet áttetsző és színtelen marad.

7.3. Ha a minta olyan egyszerű nitrogéntartalmú elegyket tartalmaz, mint az aminosavak, akkor az optikai sűrűséget 435 nm-en kell mérni.

### E. AZ ILLÓ NITROGÉNBAZISOK MEGHATÁROZÁSA

#### I. **MIKRODIFFÚZIÓVAL**

##### 1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányok ammóniában kifejezett illó nitrogénbázis-tartalmának meghatározását.

##### 2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát vízzel extraháljuk, majd az oldatot derítjük és szűrjük. Az illó nitrogénbázisokat mikrodifúzióval, kálium-karbonát oldat használatával kiszorítjuk, bórsavas oldatban fogjuk fel, és kénsavval titráljuk.

### 3. Reagensok

- 3.1. 20 %-os (w/v) triklór-ecetsav oldat.
- 3.2. Indikátor: oldjunk fel 33 mg brómkrezol-zöldet és 65 mg metilvöröst 100 ml 95–96 %-os (v/v) etanolban.
- 3.3. Bórsavas oldat: 1 literes mérőlombikban oldjunk fel 10 g bórsavat 200 ml, 95–96 %-os (v/v) etanolban és 700 ml vízben. Adjunk hozzá 10 ml indikátort (3.2.). Keverjük össze, és ha szükséges, állítsuk be az oldat színét világos vörösre nátrium-hidroxid oldat hozzáadásával. Ezen oldat 1 ml-je maximum 300 µg NH<sub>3</sub>-t fog megkötni.
- 3.4. Telített kálium-karbonát oldat: oldjunk fel 100 g kálium-karbonátot 100 ml forrásban lévő vízben. Hagyjuk lehűlni, majd szűrjük le.
- 3.5. 0,1 mól/liter koncentrációjú kénsav.

### 4. Eszközök

- 4.1. Billenődobos keverőgép: kb. 35–40 fordulatszám/perc teljesítménnyel.
- 4.2. Üveg vagy műanyag Conway-küveták (lásd az ábrát).
- 4.3. 1/100 ml-es fokbeosztásos mikrobüretták.

### 5. A vizsgálat módja

Mérjük le 10 g mintát 1 mg pontossággal és tegyük egy 100 ml vizet tartalmazó 200 ml-es mérőlombikba. Keverjük a keverőgépben 30 percen át. Adjunk hozzá 50 ml triklór-ecetsavas oldatot (3.1.), töltsük fel térfogatra vízzel, rázzuk össze alaposan, majd szűrjük át hajtogatott szűrőn.

Pipetázzunk 1 ml bórsavas oldatot (3.3.) a Conway-küvetta középső részébe és 1 ml mintaszűrletet a küvetta koronarészébe. Fedjük le részlegesen a bezsírozott fedéllel. Tegyük 1 ml telített kálium-karbonát oldatot (3.4.) gyorsan a küvetta koronarészébe, majd zárjuk le légmentesen a küvetta fedéllel. Forgassuk el a küvetta óvatosan a vízszintes síkban úgy, hogy a két reagens összekeveredjen. Hagyjuk inkubálódni legalább négy órán át szobahőmérsékleten vagy egy órán át 40 °C-on.

Mikrobüretta (4.3.) segítségével titráljuk az illó bázisokat a bórsavoldatban kénsavval (3.5.).

Végezzünk vakpróbát ugyanezzel az eljárással, de az analizálandó minta hozzáadása nélkül.

### 6. Az eredmények kiszámítása

1 ml 0,01 mól/liter koncentrációjú H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,34 mg ammóniának felel meg.

Az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

#### *Ismételhetőség*

Az ugyanazon mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredményének különbsége nem haladhatja meg:

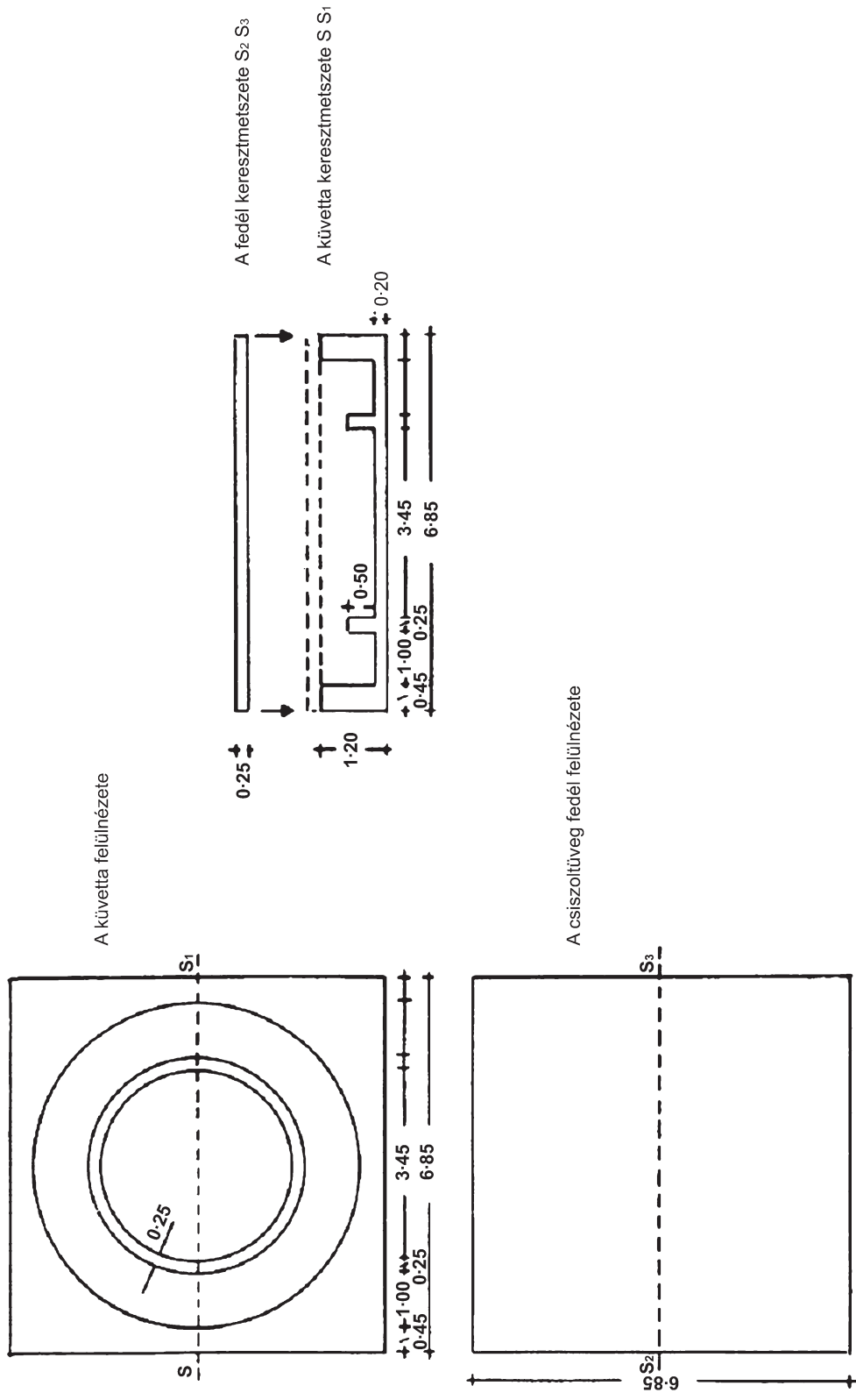
- 1,0 %-osnál alacsonyabb ammóniatartalom esetén relatív értékben a 10 %-ot,
- 1,0 %-os vagy annál magasabb ammóniatartalom esetén abszolút értékben a 0,1 %-ot.

### 7. Észrevételek

Ha a minta ammóniatartalma meghaladja a 0,6 %-ot, az eredeti szűrletet hígítani kell.

CONWAY CELL

Scale 1/1



## II. DESZTILLÁLÁSSAL

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a karbamidot gyakorlatilag nem tartalmazó halliszt ammóniában kifejezett illó nitrogénbázis-tartalmának meghatározását. Csak 0,25 %-nál alacsonyabb ammóniatartalom esetén alkalmazható.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát vízzel extraháljuk, majd az oldatot derítjük és szűrjük. Az illó nitrogénbázist forrásponton szorítjuk ki magnézium-oxid hozzáadásával, és meghatározott mennyiségű kénsavban fogjuk fel, amelynek feleslegét nátrium-hidroxid oldattal titráljuk vissza.

3. **Reagensek**

- 3.1. 20 %-os (w/v) triklór-ecetsav oldat.
- 3.2. Magnézium-oxid.
- 3.3. Habzásgátló emulzió (pl. szilikon).
- 3.4. 0,5 mól/liter koncentrációjú kénsav.
- 3.5. 0,5 mól/liter koncentrációjú nátrium-hidroxid oldat.
- 3.6. 0,3 %-os metilvörös-oldat 95–96 % (v/v) etanolban.

4. **Eszközök**

- 4.1. Billenődobos keverőgép: kb. 35–40 fordulatszám/perc teljesítménnyel.
- 4.2. Kjeldahl-féle lepárlókészülék.

5. **A vizsgálat módja**

Mérjük le 10 g mintát 1 mg pontossággal, és tegyük egy 100 ml vizet tartalmazó 200 ml-es mérőlombikba. Keverjük a keverőgépben 30 percen át. Adjunk hozzá 50 ml triklór-ecetsavas oldatot (3.1.), töltsük fel térfogatra vízzel, rázzuk össze alaposan, majd szűrjük át hajtogatott szűrőn.

Vegyünk a tiszta szűrletből elegendő mennyiséget, hogy a feltételezett illó nitrogénbázis-tartalmat meg tudjuk határozni (100 ml mennyiség rendszerint megfelel a célnak). Hígítsuk fel 200 ml-re, és adjunk hozzá 2 g magnézium-oxidot (3.2.), valamint néhány csepp habzásgátló emulziót (3.3.). Az oldatnak lakmuszpapírral mérve lúgos kémhatásúnak kell lennie; ha nem az, adjunk hozzá egy kevés magnézium-oxidot (3.2.). Folytassuk a nyersfehérje meghatározására az 5.2. vagy 5.3. pontban ismertetett módszer szerint (e melléklet C. része).

Végezzünk *vakpróbát* ugyanezzel az eljárással, de az analizálandó minta hozzáadása nélkül.

6. **Az eredmények kiszámítása**

1 ml 0,05 mól/liter koncentrációjú H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,7 mg ammóniának felel meg.

Az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

*Ismételhetőség*

Az ugyanazon mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg relatív értékben az ammóniatartalom 10 %-át.

## F. AZ AMINOSAVAK MEGHATÁROZÁSA (A TRIPTOFÁN KIVÉTELÉVEL)

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer a takarmányok szabad (szintetikus és természetes) és összes (peptidhez kötött és szabad) aminosav-tartalmának meghatározását teszi lehetővé, aminosav-analizátort használatával. A módszer a következő

aminosavakra alkalmazható: cisztein, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, aszparaginsav, glutaminsav, glicin, hisztidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, szerin, tirozin és valin.

A módszer nem tesz különbséget az aminosav sói között, és nem különbözteti meg az aminosavak D és L formáit. A módszer nem érvényes triptofán vagy az aminosavak hidroxil analógjainak meghatározására.

## 2. Vizsgálati alapelv

### 2.1. Szabad aminosavak

A szabad aminosavakat híg sósavval extraháljuk. Az együtt extrahált nitrogéntartalmú makromolekulákat szulfoszalicilsavval csapjuk ki, és szűréssel távolítjuk el. A szűrt oldat kémhatását pH = 2,20 értékre állítjuk be. Az aminosavakat ioncserés kromatográfiával választjuk szét, és ninhidrines reakcióval, 570 nm-en végzett fotometriás detektálással határozzuk meg.

### 2.2. Összes aminosav

A választott eljárás függ a vizsgált aminosavaktól. A ciszteint és a metionint a hidrolízis előtt ciszteinsavvá, illetve metionin-szulfonná kell oxidálni. A tirozint az oxidálatlan minták hidrolizátumaiból kell meghatározni. Az (1) bekezdésben felsorolt összes többi aminosav akár oxidált, akár oxidálatlan mintából meghatározható.

Az oxidálást 0 °C-on végezzük perhangyasav/fenol keverékével. A oxidálószer-felesleget nátrium-diszulfittal bontjuk le. Az oxidált vagy oxidálatlan mintát sósavval (3.20.) hidrolizáljuk 23 órán keresztül. A hidrolizátum kémhatását pH = 2,20 értékre állítjuk be. Az aminosavakat ioncserés kromatográfiával választjuk szét, és ninhidrines reakcióval, 570 nm-en (prolin esetében 440 nm-en) végzett fotometriás detektálással határozzuk meg.

## 3. Reagensok

Kétszer desztillált vizet vagy ezzel egyenértékű minőségű vizet kell használni (vezetőképessége < 10 µS).

- 3.1. Hidrogén-peroxid, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Hangyasav, w (w/w) = 98–100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Nátrium-diszulfid.
- 3.5. Nátrium-hidroxid.
- 3.6. 5-szulfo-szalicilsav-dihidrát.
- 3.7. Sósav, sűrűsége megközelítőleg 1,18 g/ml.
- 3.8. tri-nátrium-citrát-dihidrát.
- 3.9. 2,2'-Tiodietanol (tiodiglikol).
- 3.10. Nátrium-klorid.
- 3.11. Ninhidrin.
- 3.12. Petroléter, forráspont-tartomány: 40–60 °C.
- 3.13. Norleucin vagy más, belső standardként történő használatra alkalmas vegyület.
- 3.14. Nitrogéngáz (10 ppm-nél kevesebb oxigénnel).
- 3.15. 1-oktanol.



- 3.16. Aminosavak.
- 3.16.1. Az 1. pontban felsorolt standard anyagok. Tiszta vegyületek kristályvíztartalom nélkül. Használat előtt egy hétig szárítsuk vákuumban  $P_2O_5$  vagy  $H_2SO_4$  felett.
- 3.16.2. Ciszteinsav.
- 3.16.3. Metionin-szulfon.
- 3.17. Nátrium-hidroxid-oldat,  $c = 7,5$  mól/l:  
Oldjunk fel 300 g NaOH-t (3.5.) vízben, és vízzel töltjük fel 1 l-re.
- 3.18. Nátrium-hidroxid-oldat,  $c = 1$  mól/l:  
Oldjunk fel 40 g NaOH-t (3.5.) vízben, és vízzel töltjük fel 1 l-re.
- 3.19. Hangyasav-fenol oldat:  
Elegyítsünk 889 g hangyasavat (3.2.) 111 g vízzel és adjunk hozzá 4,73 g fenolt (3.3.).
- 3.20. Hidrolízis keverék  $c = 6$  mól HCl /l 1 g fenol/l tartalommal:  
Adjunk egy g fenolt (3.3.) 492 ml HCl-hez (3.7.), és vízzel töltjük fel 1 l-re.
- 3.21. Extraháló keverék,  $c = 0,1$  mól HCl/l 2 %-os tioidiglikol tartalommal: Vegyünk 8,2 ml HCl-t (3.7.), hígítsuk megközelítőleg 900 ml vízzel, adjunk hozzá 20 ml tioidiglikolt (3.9.), és vízzel töltjük fel 1 l-re (ne keverjük össze közvetlenül a 3.7.-et és 3.9.-et).
- 3.22. 5-szulfo-szalicilsav  $\beta = 6$  %:  
Oldjunk fel 60 g 5-szulfo-szalicilsavat (3.6.) vízben, és vízzel töltjük fel 1 l-re.
- 3.23. Oxidáló keverék (perhangyasav-fenol):  
Elegyítsünk 0,5 ml hidrogén peroxidot (3.1.) 4,5 ml hangyasav-fenol oldattal (3.19.) egy kis főzőpohárban. Inkubáljuk 20–30 °C-on egy órán át a perhangyasav keletkezéséhez, majd hűtsük le jeges vízfürdőben (15 percig), mielőtt a mintához adnánk.  
Figyelem: Kerüljük a bőrrel való érintkezést, és viseljünk védőruházatot.
- 3.24. Citrátpuffer,  $c = 0,2$  mól  $Na^+$ /l, pH 2,20:  
Oldjunk fel 19,61 g nátrium-citrátot (3.8.), 5 ml tioidiglikolt (3.9.), 1 g fenolt (3.3.) és 16,50 ml HCl-t (3.7.) megközelítőleg 800 ml vízben. Állítsuk be a pH-t 2,20-re. Töltjük fel vízzel 1 literre.
- 3.25. Eluáló pufferek, a használt analizátor feltételei szerint készítve (4.9.).
- 3.26. Ninhidrin reagens, a használt analizátor feltételei szerint készítve (4.9.).
- 3.27. Aminosavak standardoldata. Ezeket az oldatokat 5 °C alatt kell tárolni.
- 3.27.1. Aminosavak standard törzsoldata (3.16.1.).  
 $c = 2,5$   $\mu$ mól/l, mindegyik sósavban.  
Kereskedelmi forgalomban kapható.
- 3.27.2. Ciszteinsav és metionin-szulfon standard törzsoldata,  $c = 1,25$   $\mu$ mól/ml.  
1 literes mérőlombikban citrátpufferban (3.24.) oldjunk fel 0,2115 g ciszteinsavat (3.16.2.) és 0,2265 g metionin szulfont (3.13.), majd az oldatot töltjük fel jelig citrátpufferrel. Legfeljebb 12 hónapig tároljuk 5 °C alatt. Nem használjuk ezt az oldatot, ha a standard törzsoldat (3.27.1.) tartalmaz ciszteinsavat és metionin szulfont.

- 3.27.3. Belső standard pl. norleucin standard törzsoldata,  $c = 20 \mu\text{mol/ml}$ .

Mérőlombikban oldjunk fel 0,6560 g norleucint (3.13.) citrátpufferben (3.24.), majd az oldatot töltsük fel 250 ml-re citrátpufferrel. Legfeljebb 6 hónapig tároljuk  $5^\circ\text{C}$  alatt.

- 3.27.4. Standard aminosavak kalibrálóoldata hidrolizátumokkal való használatra,  $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  ciszteinsav és metionin szulfon és  $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  más aminosav. Egy 100 ml-es főzőpohárban oldjunk fel 30 ml citrátpufferben (3.24.) 2,2 g nátrium-kloridot (3.10.). Adjunk hozzá 4,00 ml standard aminosav-törzsoldatot (3.27.1.), 4,00 ml ciszteinsav és metionin szulfon standard törzsoldatot (3.27.2.) és 0,50 ml-t a belső standard (3.27.3.) standard törzsoldatából, ha ilyet használunk. A pH-t állítsuk 2,20-re nátrium-hidroxiddal (3.18.).

Öntsük át a teljes mennyiséget egy 50 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig citrátpufferrel (3.24.), és keverjük össze.

Legfeljebb 3 hónapig tároljuk  $5^\circ\text{C}$  alatt.

Lásd még az Észrevételek 9.1. pontját.

- 3.27.5. Standard aminosavak kalibrálóoldata hidrolizátumokkal való használatra, az 5.3.3.1. pont szerint készítve és a kivonatokkal való használatra (5.2.). A kalibrálóoldat a 3.27.4. pont szerint készül, de elhagyjuk a nátrium-kloridot.

Legfeljebb 3 hónapig tároljuk  $5^\circ\text{C}$  alatt.

#### 4. Eszközök

- 4.1. 100 vagy 250 ml-es visszafolyós hűtővel ellátott gömblombik.
- 4.2. 100 ml-es, csavaros tetejű, gumi/teflon bélésű bór-szilikát üveglombik (pl. Duran, Schott) kemencében történő használatra.
- 4.3. Intenzív szellőztetésű és  $+2^\circ\text{C}$ -nál nagyobb pontosságú hőmérséklet-szabályozóval ellátott kemence.
- 4.4. pH-mérő (három tizedesjegyre)
- 4.5.  $0,22 \mu\text{m}$ -es membránszűrő.
- 4.6. Centrifuga.
- 4.7. Rotációs vákuumbepárló.
- 4.8. Mechanikus vagy mágneses keverőberendezés.
- 4.9. Aminosav-analizátor vagy HPLC-berendezés ioncserélő oszloppal, készülék ninhidrinhez, utókolonnás derivatizáláshoz és fotometriás detektor.

A kolonna szulfonált polisztirol gyantával van töltve, amely képes az aminosavak egymástól és más ninhidrin-pozitív anyagoktól való elválasztására. A puffer és ninhidrin vonal áramlását  $\pm 0,5\%$ -os áramlási stabilitású szivattyúk biztosítják a standard kalibrálás és a minta analízisének időszakában.

Néhány aminosav-analizátornál olyan hidrolízises eljárások is alkalmazhatók, amelyekben a hidrolizátum nátriumkoncentrációja  $k = 0,8 \text{ mol/l}$ , és amelyek tartalmazzák az oxidációs lépésből származó valamennyi hangyasavmaradékot. Más analizátorok nem biztosítanak megfelelő elválasztást bizonyos aminosavak esetében, ha a hidrolizátum feleslegben tartalmaz hangyasavat, és/vagy magas benne a nátrium-ion koncentráció. Ebben az esetben a sav térfogatát a hidrolízis után és a pH-beállítás előtt mintegy 5 ml-re való bepárlással csökkentjük. A bepárlást vákuum alatt és maximum  $40^\circ\text{C}$ -on kell végezni.

#### 5. A vizsgálat módja

- 5.1. A minta előkészítése

A mintát úgy őröljük meg, hogy átjusson egy  $0,5 \text{ mm}$ -es szitán. Őrlés előtt a nagy nedvességtartalmú mintákat vagy légszáraz állapotba kell hozni  $50^\circ\text{C}$ -nál nem magasabb hőmérsékleten, vagy liofilizálni kell azokat. A nagy zsírtartalmú mintákat őrlés előtt petroléterrel (3.12.) extrahálni kell.

## 5.2. *A szabad aminosavak meghatározása takarmányokban és előkeverékekben*

Az előkészített mintából (5.1.) megfelelő mennyiséget (1–5 g) mérjük be 0,2 mg pontossággal egy Erlenmeyer-lombikba, és adjunk hozzá 100,0 ml extraháló keveréket (3.21.). Rázassuk a keveréket 60 percig mechanikus rázógéppel vagy mágneses keverő segítségével (4.8.). Hagyjuk leülepedni az üledéket, és a felülúszó oldatból pipettázzunk 10,0 ml-t egy 100 ml-es főzőpohárba.

Keverés közben adjunk hozzá 5,0 ml szulfoszalicilsavat (3.22.), és folytassuk a keverést mágneses keverő segítségével 5 percig. A felülúszó folyadékot szűrjük le, vagy centrifugáljuk a csapadék leválasztása céljából. A kapott oldat 10,0 ml-ét tegyük egy 100 ml-es főzőpohárba, és állítsuk be a pH-t 2,20-ra nátrium-hidroxid-oldattal (3.18.), majd töltsük át egy megfelelő térfogatú mérőlombikba citrát-puffer segítségével (3.24.), és a lombikot töltsük fel jelig a pufferoldattal (3.24.).

Ha belső standardot használunk, adjunk 1,00 ml belső standardot (3.27.3.) minden 100 ml végső oldathoz, és a lombikot töltsük fel jelig a pufferoldattal (3.24.).

Folytassuk a műveletet a kromatográfiával, az 5.4. pont szerint.

Ha a kivonatok vizsgálatára nem ugyanazon a napon kerül sor, akkor azokat 5 °C alatt kell tárolni.

## 5.3. *Összes aminosav meghatározása*

### 5.3.1. *Oxidáció*

0,2 mg pontossággal mérjük ki 0,1–1 g-ot az előkészített mintából (5.1.):

- egy 100 ml-es gömblombikba (4.1.) nyitott hidrolízishez (5.3.2.3.), vagy
- egy 250 ml-es gömblombikba (4.1.), ha alacsony nátriumkoncentrációra van szükség (5.3.3.1.), vagy
- egy csavaros tetejű 100 ml-es palackba (4.2.), (zárt hidrolízishez 5.3.2.4.).

A kimért mintamennyiségnek hozzávetőlegesen 10 mg nitrogéntartalommal és legfeljebb 100 mg nedvességtartalommal kell rendelkeznie.

Helyezzük a lombikot/palackot jeges vízfürdőbe, és hűtsük le 0 °C-ra, adjunk hozzá 5 ml oxidációs keveréket (3.23.), és keverjük össze egy hajlított végű üvegszpatulával. Zárjuk le légmentesen a spatulát is magában foglaló lombikot/palackot, tegyük a lezárt tartályt tartalmazó jeges vízfürdőt 0 °C-os hűtőszekrénybe, és hagyjuk állni 16 órán keresztül. 16 óra múlva vegyük ki a hűtőszekrényből, és a feleslegben lévő oxidáló reagenst 0,84 g nátrium-diszulfit (3.4.) adagolásával bontsuk le.

Folytassuk a műveletet az 5.3.2.1. pont szerint.

### 5.3.2. *Hidrolízis*

#### 5.3.2.1. *Az oxidált minták hidrolízise*

Az 5.3.1. pont szerint elkészített oxidált mintához adjunk 25 ml hidrolíziskeveréket (3.20.), ügyelve arra, hogy lemoszuk az edény falára és a spatulára tapadt mintamaradékot.

Az alkalmazott hidrolízis-eljárástól függően az 5.3.2.3. vagy az 5.2.3.4. pont szerint folytassuk a műveletet.

#### 5.3.2.2. *A nem oxidált minta hidrolízise*

Mérjük be egy 100 ml-es vagy egy 250 ml-es gömblombikba (4.1.) vagy egy 100 ml-es csavaros fedelű palackba (4.2.) 0,1–1 g-ot az előkészített mintából (5.1.) 0,2 mg pontossággal. A mintából bémért adagnak hozzávetőlegesen 10 mg nitrogéntartalommal kell rendelkeznie. Óvatosan adjunk hozzá 25 ml hidrolíziskeveréket (3.20.), és keverjük őket össze. Az 5.3.2.3. vagy az 5.3.2.4. pont szerint folytassuk a műveletet.

#### 5.3.2.3. *Nyitott hidrolízis*

Tegyünk 3 üvegyöngyöt a lombikban lévő keverékbe (ami az 5.3.2.1. vagy az 5.3.2.2. pont szerint készült), és forraljuk folyamatos buborékolás mellett, reflux alatt, 23 órán keresztül. Amikor a hidrolízis befejeződött, mossuk ki a hűtőt 5 ml citrát-pufferrel (3.24.). Vegyük le a lombikot, és hűtsük le jeges vízfürdőben.

Az 5.3.3. pont szerint folytassuk a műveletet.

#### 5.3.2.4. Zárt hidrolízis

Tegyük az 5.3.2.1. vagy az 5.3.2.2. pont szerint elkészített keveréket tartalmazó palackot egy 110 °C-os kemencébe (4.3.). A (gázfejlődésnek tulajdonítható) nyomás kialakulásának megelőzése és a robbanás elkerülése érdekében az első órában helyezük a csavaros fedelet az edény nyílására. Ne zárjuk le az edényt a fedővel. Egy óra elteltével zárjuk le az edényt a fedővel, és hagyjuk a kemencében (4.3.) 23 órán keresztül. Amikor a hidrolízis befejeződött, vegyük ki az edényt a kemencéből, óvatosan nyissuk fel a palack fedelét, és tegyük a palackot jeges vízfürdőbe. Hagyjuk lehűlni.

A pH beállításához alkalmazott eljárástól függően (5.3.3.) a palack tartalmát teljes egészében vigyük át egy 250 ml-es főzőpohárba vagy egy 250 ml-es gömblobikba citrát-puffer segítségével (3.24.).

Az 5.3.3. pont szerint folytassuk a műveletet.

#### 5.3.3. A pH beállítása

Az aminosav-analizátor (4.9.) nátriummal szembeni tűrőképességétől függően az 5.3.3.1. vagy az 5.3.3.2. pont szerint végezzük el a pH beállítását.

##### 5.3.3.1. Alacsony nátriumkoncentrációt igénylő kromatográfiai rendszerek (4.9.) esetén:

Tanácsos belső standard törzsoldatot (3.27.3.) használni alacsony nátriumkoncentrációt igénylő aminosav-analizátorok alkalmazása esetén (amikor a sav térfogatát csökkenteni kell).

Ebben az esetben bepárlás előtt adjunk 2,00 ml belső standard törzsoldatot (3.27.3.) a hidrolizátumhoz.

Adjunk 2 csepp 1-oktanolt (3.15.) az 5.3.2.3. vagy az 5.2.3.4. pont szerint nyert hidrolizátumhoz.

Rotációs bepárló segítségével (4.7.) csökkentjük a térfogatot 5–10 ml-re vákuum alatt, 40 °C-on. Ha a térfogat véletlenül 5 ml alá csökken, akkor a hidrolizátumot ki kell önteni, és az analízist újra kell kezdeni.

Nátrium-hidroxid-oldattal (3.18.) állítsuk be a pH-t 2,20-re, és az 5.3.4. ponttal folytassuk a műveletet.

##### 5.3.3.2. Minden más típusú aminosav-analizátor (4.9.) esetén:

Az 5.3.2.3. vagy az 5.3.2.4. pont szerint kapott hidrolizátumokat részlegesen semlegesítsük úgy, hogy keverés közben óvatosan hozzáadunk 17 ml nátrium-hidroxid-oldatot (3.17.), mialatt a hőmérsékletet 40 °C alatt tartjuk.

Szobahőmérsékleten állítsuk be a pH-t 2,20-re a 3.17. pont alatti nátrium-hidroxid-oldattal és végül a 3.18. pont alatti nátrium-hidroxid-oldattal. Folytassuk a műveletet az 5.3.4. pont szerint.

#### 5.3.4. Mintaoldat a kromatográfiához

A beállított pH-jú hidrolizátumot (5.3.3.1. vagy 5.3.3.2.) maradék nélkül, citrát-pufferrel vigyük át egy 200 ml-es mérőlobikba, és töltsük fel jelig a pufferrel (3.24.).

Ha még nem használtunk belső standardot, adjunk hozzá 2,00 ml belső standardot (3.27.3.), és töltsük fel jelig citrát-pufferrel (3.24.). Keverjük össze alaposan.

Folytassuk a műveletet a kromatográfiával (5.4.).

Ha a mintaoldatok vizsgálatára nem ugyanazon a napon kerül sor, 5 °C alatt kell őket tárolni.

#### 5.4. Kromatográfia

Kromatográfiai vizsgálat előtt a kivonatot (5.2.) vagy a hidrolizátumot (5.3.4.) állítsuk be szobahőmérsékletre. Rázzuk fel a keveréket, és szűrjük át megfelelő mennyiséget egy 0,2 µm-es membránszűrőn (4.5.). A kapott tiszta oldatot vessük alá ioncserés kromatográfiának aminosav-analizátor segítségével (4.9.).

Az injektálást lehet kézzel vagy automatikusan végezni. Ügyeljünk arra, hogy  $\pm 0,5\%$ -os eltéréssel – azonos mennyiségű oldatot tegyünk az oszlopra a standardok és minták analíziséhez, kivéve, amikor belső standardot használunk, valamint, hogy a nátrium-aminosav arányok, amennyire csak lehet, megegyezzenek a standardban és a mintában.

A kalibrálás gyakorisága általában a ninhidrin reagens és az analitikai rendszer stabilitásától függ. A standardot vagy a mintát citrát-pufferrel (3.24.) hígítjuk annak érdekében, hogy a standard csúcsterülete a minta aminosav csúcsterületének 30–200 %-a legyen.

Az aminosavak kromatográfiás vizsgálata az alkalmazott analizátor és a használt gyanta típusától függően némiképp eltérhet. A választott rendszernek képesnek kell lennie arra, hogy az aminosavakat elválassza egymástól és a ninhidrin-pozitív anyagoktól. A működési tartományban a kromatográfiás rendszer reakciójának egyenesen arányosnak kell lennie a kolonnára felvitt aminosavak mennyiségével.

A kromatográfiás lépésnél az alábbiakban említett csúcs-mélyponti arányt alkalmazzuk, amikor (a meghatározandó aminosavak vonatkozásában) ekvimoláris oldatot analizálunk. Az ekvimoláris oldatnak az aminosav-analizátor rendszerrel (4.9.) pontosan mérhető aminosavak maximális mennyiségének legalább 30 %-át tartalmaznia kell.

A treonin-szerin szétválasztásánál a kromatogramon a két egymást átfedő aminosav közül a kisebb csúcs-mélyponti aránya ne haladja meg a 2:10 értéket (ha csak cisztein, metionin, treonin és lizin meghatározásáról van szó, a szomszédos csúcsok nem megfelelő elválása hátrányosan befolyásolja a meghatározást). Minden más aminosav esetében a szétválasztásnak jobbnak kell lennie, mint 1:10.

A rendszernek el kell tudnia választani a lizint a „mesterséges lizin képződményektől” és az ornitintól.

## 6. Az eredmények kiszámítása

Minden aminosavra megmérjük a minta és a standard csúcsterületét, és kiszámítjuk a minta egy kg-jában lévő aminosav g-ban kifejezett mennyiségét (X).

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

Ha belső standardot használunk, szorozzuk meg  $\frac{D}{C}$  -vel.

A = a hidrolizátum vagy a kivonat csúcsterülete

B = a kalibráló standardoldat csúcsterülete

C = a hidrolizátumban vagy a kivonatban lévő belső standard csúcsterülete

D = a belső standard, kalibráló standardoldat csúcsterülete

M = a meghatározandó aminosav móltömege

c = a standard koncentrációja  $\mu\text{mol/l}$ -ben

m = a minta tömege (g) (ha szárított vagy zsírtalanított, akkor az eredeti tömegre korrigálva)

V = ml összes hidrolizátum (5.3.4.) vagy ml kivonat (6.1.) számított teljes hígítási térfogata

Mind a cisztin, mind a cisztein mint cisztein-sav kerül meghatározásra az oxidált minta hidrolizátumaiban, de cisztinként kerül kiszámításra ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ , MW 240,30 g/mol), ha MW 120,15 g/mol (=  $0,5 \times 240,30$  g/mol) használunk.

A metionin metionin-szulfonként kerül meghatározásra az oxidált minta hidrolizátumaiban, de metioninként kerül kiszámításra a metionin molekulatömegének (MW = 149,21 g/mol) használatával.

A hozzáadott szabad metionin extrahálás után metioninként kerül meghatározásra, és a számításához ugyanezt a molekulatömeget (M) használjuk.

- 6.1. A szabad aminosavak (5.2.) meghatározása esetén a kivonatok teljes hígítási térfogatát (F) a következőképpen számítjuk ki:

$$F = \frac{100 \text{ ml} \times (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V}{10}$$

V = a végső kivonat térfogata

## 7. A módszer értékelése

A módszert nemzetközi összehasonlító vizsgálat során ellenőrizték, amelyet 1990-ben végeztek négy különböző takarmány (kevert sertéstáp, brojlertápkeverék, fehérjekoncentrátum, előkeverék) felhasználásával. A szélsőértékek kizárásával kapott átlagértékeket és standard szórásokat az ebben a pontban található táblázatok mutatják be:

## Átlagértékek g/kg-ban

Referenciaanyag	Aminosav			
	Treonin	Ciszt(e)in	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 N = 17	9,55 n = 13
Brojlertápkeverék	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 N = 18	13,93 n = 16
Fehérjekoncentrátum	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 N = 17	47,74 n = 15
Előkeverék	58,42 n = 16	—	90,21 N = 16	98,03 n = 16

n = a részt vevő laboratóriumok száma

## 7.1. Ismételhetőség

A fent említett összehasonlító vizsgálat ismételhetőségét „laboratóriumon belüli szórásként” kifejezve az alábbi táblázatok mutatják:

Laboratóriumon belüli szórás ( $S_r$ ) g/kg

Referenciaanyag	Aminosav			
	Treonin	Ciszt(e)in	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Brojlertápkeverék	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Fehérjekoncentrátum	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Előkeverék	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = a részt vevő laboratóriumok száma

A laboratóriumon belüli szórás ( $S_r$ ) relatív szórása (%)

Referenciaanyag	Aminosav			
	Treonin	Ciszt(e)in	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Brojlertápkeverék	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Fehérjekoncentrátum	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15

Referenciaanyag	Aminosav			
	Treonin	Ciszt(e)in	Metionin	Lizin
Előkeverék	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = a részt vevő laboratóriumok száma

## 7.2. Reprodukálhatóság

A fent említett összehasonlító vizsgálatra vonatkozóan, a különböző laboratóriumok közötti szórásértékeket az alábbi táblázat adja meg:

### Laboratóriumon belüli szórás ( $S_R$ ) g/kg

Referenciaanyag	Aminosav			
	Treonin	Ciszt(e)in	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Brojlertápkeverék	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Fehérjekoncentrátum	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Előkeverék	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = a részt vevő laboratóriumok száma

### A laboratóriumon belüli szórás ( $S_R$ ) relatív szórása (%)

Referenciaanyag	Aminosav			
	Treonin	Ciszt(e)in	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Brojlertápkeverék	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Fehérjekoncentrátum	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Előkeverék	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = a részt vevő laboratóriumok száma

## 8. Referenciaanyagok használata

A módszer helyes alkalmazását lehetőség szerint hitelesített referenciaanyagokon végzett ismételt mérésekkel kell ellenőrizni. Hitelesített aminosav-kalibrálóoldattal végzett kalibrálás javasolt.

## 9. Észrevételek

- 9.1. Az aminosav-analizátorok közötti különbségek miatt a standard aminosavak (lásd 3.27.4. és 3.27.5.) és a hidrolizátumok (lásd 5.3.4.) kalibrálóadatainak végső koncentrációit irányadónak kell tekinteni.

A berendezés lineáris reakciójának tartományát valamennyi aminosavra ellenőrizni kell.

A standardoldatot citrát-pufferrel hígítjuk, hogy a csúcsterületek a tartomány közepére essenek.

- 9.2. Amennyiben nagy teljesítményű folyadékkromatográfias berendezést használunk a hidrolizátumok elemzéséhez, a gyártó ajánlásainak megfelelően kell a kísérleti körülményeket optimalizálni.
- 9.3. Ha 1 %-nál több kloridot tartalmazó takarmányokra (koncentrátum, ásványi takarmányok, kiegészítő takarmányok) alkalmazzuk a módszert, előfordulhat a metionin alulértékelése, és ezért speciális kezelést kell végezni.

## G. 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<sub>3</sub> képződésének elkerülése érdekében ügyelnünk kell arra, hogy a Ba(OH)<sub>2</sub> · 0,8 H<sub>2</sub>O-t ne tegyük ki túlzott mértékben levegő hatásának, mert ez zavarhatja a meghatározást) (lásd az Észrevételek 9.3. pontját).
- 3.5. Nátrium-hidroxid.
- 3.6. Ortofoszforsav, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Sósav, ρ<sub>20</sub> = 1,19 g/ml.
- 3.8. Metil-alkohol, HPLC minőségű.
- 3.9. Petroléter, forráspont-tartomány: 40–60 °C.
- 3.10. Nátrium-hidroxid-oldat, c = 1 mól/l:  
Oldjunk fel 40,0 g NaOH-t (3.5.) vízben, és vízzel (3.1.) töltsük fel 1 literre.
- 3.11. Sósav, c = 6 mól/l:

Vegyünk 492 ml HCl-t (3.7.), és vízzel töltsük fel 1 literre.



- 3.12. Sósav,  $c = 1$  mól/l:  
Vegyünk 82 ml HCl-t (3.7.), és vízzel töltjük fel 1 literre.
- 3.13. Sósav,  $c = 0,1$  mól/l:  
Vegyünk 8,2 ml HCl-t (3.7.), és vízzel töltjük fel 1 literre.
- 3.14. Ortofoszforsav,  $c = 0,5$  mól/l:  
Vegyünk 34 ml ortofoszforsavat (3.6.), és vízzel (3.1.) töltjük fel 1 literre.
- 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 töltjük fel jelíg sósavval (3.13.). Tároljuk  $-18$  °C-on maximum négy hétig.
- 3.16. Koncentrált belső standardoldat,  $c = 2,50$   $\mu\text{mol/ml}$ :  
Egy 500 ml-es mérőlombikban oldjunk fel 0,2728 g  $\alpha$ -metil-triptofánt (3.3.) sósavban (3.13.), majd az oldatot töltjük fel jelíg sósavval (3.13.). Tároljuk  $-18$  °C-on maximum négy hétig.
- 3.17. A triptofán kalibráló standardoldata és a belső standard:  
Vegyünk 2,00 ml-t a triptofán koncentrált oldatából (3.15.) és 2,00 ml-t a koncentrált belső standard ( $\alpha$ -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  $w$  (w/w) > 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. Mozgófázis 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 etanolammal (3.20.). Az oldatot vízzel (3.1.) töltjük fel 1 000 ml-re.
4. **Eszközök**
- 4.1. HPLC-berendezés spektrofluorometriás detektorral
- 4.2. Folyadékkromatográfias oszlop, 125 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$ , 3  $\mu\text{m}$  töltet, vagy azzal egyenértékű oszlop
- 4.3. pH-mérő
- 4.4. Polipropilén lombik, 125 ml térfogatú, széles nyakkal és csavaros zárókupakkal
- 4.5. 0,45  $\mu\text{m}$ -es membránszűrő
- 4.6. Autokláv, 110 ( $\pm 2$ ) °C, 1,4 ( $\pm 0,1$ ) bar
- 4.7. Mechanikus vagy mágneses keverőberendezés
- 4.8. Kémcsőkeverő (vortex).

## 5. A vizsgálat módja

### 5.1. A minták elkészítése

Őröljük meg a mintát annyira, hogy az átjusson egy 0,5 mm-es szemméretű szitán. Őrlés előtt a nagy nedvességtartalmú mintákat vagy légszáras állapotba kell hozni 50 °C-nál nem magasabb hőmérsékleten, vagy liofilizálni kell azokat. A nagy zsirtartalmú 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,  $k = 0,1$  mol/l (3.13.) és 5,00 ml koncentrált belsei standardoldatot (3.16.). Rázzuk vagy keverjük 60 percen át mechanikus rázógépen vagy mágneses keverőn (4.7.). Engedjük a zagot leülepedni, majd pipettázzunk a felülúszó oldatból 10,0 ml-t főzőpohárba. Adjunk hozzá 5 ml ortofoszforsavat (3.14.). Nátrium-hidroxiddal (3.10.) állítsuk a pH-t 3,0-ra. Adjunk hozzá annyi metil-alkoholt (3.8.), hogy a végtérfgatra számított metil-alkohol-koncentráció 10 és 30 % között legyen. Vigyük át megfelelő úrtartalmú mérőlombikba, és vízzel hígítsuk a kromatográfiához szükséges térfogatra (körülbelül a kalibráló standardoldat (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 standardoldatot 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-oktahidrátot (3.4.) és 10 ml vizet. Keverjük össze kémsókeverővel (4.8.) vagy mágneses keverőn (4.7.). A teflonbevonatú mágneset hagyjuk a keverékben. Mossuk le 4 ml vízzel az edény falát. Helyezzük rá a csavaros zárókupakot, és lazán zárjuk le a lombikot. Helyezzük autoklávba (4.6.) forró vízzel, és gőzöljük 30–60 percig. Zárjuk be az autoklávot, és autoklávozzuk 110 (±2) °C hőmérsékleten 20 órán át.

Az autokláv kinyitása előtt csökkentjük a hőmérsékletet kevéssel 100 °C alá. A Ba(OH)<sub>2</sub> · 0,8 H<sub>2</sub>O kikristályosodásának elkerülése érdekében adjunk a meleg keverékhez 30 ml, szobahőmérsékletű vizet. Óvatosan rázzuk vagy keverjük össze. Adjunk hozzá 2,00 ml koncentrált belsei standard (α-metil-triptofán) oldatot (3.16.). Hűtsük az edényeket víz- vagy jégfürdőben 15 percen át.

Ezután adjunk hozzá 5 ml ortofoszforsavat (3.14.). Tartsuk az edényt a hűtőfürdőben, és keverés közben semlegesítsük az oldatot sósavval (3.11.), majd állítsuk a pH-t 3,0-ra sósavval (3.12.). Adjunk hozzá annyi metil-alkoholt, hogy a végtérfgatra 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 standardoldatot és a kivonatokat óvjuk a közvetlen napfényhatástól. Ha a hidrolizátumokat 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 ezzel egyenértékű eredményeket adnak (lásd még az Észrevételek 9.1. és 9.2. pontját).

Folyadékkromatográfias oszlop (4.2.):	C <sub>18</sub> , 125 mm × 4 mm, 3 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.
Oszlophőmérséklet:	szobahőmérséklet
Mozgófázis (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. Töltsük fel vízzel (3.1.) 1 000 ml-re.
Átáramlási sebesség:	1 ml/perc.
Teljes futásidő:	körülbelül 34 perc
Kimutatási hullámhossz:	gerjesztés: 280 nm, emisszió: 356 nm.
Befecskendezett mennyiség:	20 µl.

## 6. Az eredmények kiszámítása

100 g mintában lévő triptofán grammban kifejezett mennyiségét (X) az alábbiak szerint számítjuk.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = a belső standard, standard kalibrálóoldat (3.17.) csúcsterülete

B = a triptofán -kivonat (5.2.) vagy -hidrolizátum (5.3.) csúcsterülete

V<sub>1</sub> = a kalibrálóoldathoz (3.17.) hozzáadott koncentrált triptofánoldat (3.15.) térfogata ml-ben (2 ml)

c = a kalibrálóoldathoz (3.17.) hozzáadott koncentrált triptofánoldat (3.15.) koncentrációja, µmol/ml-ben (= 2,50)

V<sub>2</sub> = az extrahálásnál (5.2.) (= 5,00 ml) vagy a hidrolizátumhoz (5.2.) (= 2,00 ml) hozzáadott, koncentrált belső standardoldat (3.16.) térfogata ml-ben

C = a belső standard, kivonat (5.2.) vagy hidrolizátum (5.3.) csúcsterülete

D = a triptofán, standard kalibrálóoldat (3.17.) csúcsterülete

V<sub>3</sub> = a standard kalibrálóoldathoz (3.17.) hozzáadott, koncentrált belső standardoldat (3.16.) térfogata, ml-ben (= 2,00 ml)

m = a minta tömege, g-ban (szárított és/vagy zsírtalanított minta esetében az eredeti tömegre korrigált)

M = a triptofán molekulatömege (= 204,23 g/mol)

## 7. Ismételtetés

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

## 8. A körvizsgálat eredményei

Közösségi körvizsgálatra került sor (negyedik körvizsgálat), amelynek során három mintát vizsgáltak meg a hidrolízis módszerének hitelesítése céljából, 12 laboratóriumban. Mindegyik mintát többször (5) analizálták. Az eredmények a következő táblázatban szerepelnek:

	1. minta Sertéstáp	2. minta L-triptofánnal kiegészített sertéstáp	3. minta Takarmánykoncentrátum ser- tések számára
L	12	12	12
n	50	55	50
Átlag [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s <sub>r</sub> [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV <sub>r</sub> [%]	1,9	1,6	1,9
S <sub>R</sub> [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV <sub>R</sub> [%]	6,3	6,0	2,2

L = eredményeket beküldő laboratóriumok száma

n = a (Cochran- és Dixon-próbával azonosított) kiugró értékek kizárását követően megmaradt egyedi értékek száma

s<sub>r</sub> = az ismételtetés szórása

S<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság szórása

r = ismételtetés

R = reprodukálhatóság

CV<sub>r</sub> = az ismételtetés relatív szórása, %

CV<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

Egy másik közösségi körvizsgálatot is végeztek (harmadik körvizsgálat), amelynek során két mintát vizsgáltak meg a szabad triptofán kivonására használt módszer hitelesítése céljából, 13 laboratóriumban. Mindegyik mintát többször (5) analizálták. Az eredmények a következő táblázatban szerepelnek:

	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- és Dixon-próbával azonosított) kiugró értékek kizárását követően megmaradt egyedi értékek száma

$s_r$  = az ismételhetőség szórása

$S_R$  = a reprodukálhatóság szórása

$r$  = ismételhetőség

$R$  = reprodukálhatóság

$CV_r$  = az ismételhetőség relatív szórása, %

$CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

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) analizálták.

	1. minta Kevért sertéstáp (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- és Dixon-próbával azonosított) kiugró értékek kizárását követően megmaradt egyedi értékek száma

$s_r$  = az ismételhetőség szórása

$S_R$  = a reprodukálhatóság szórása

$r$  = ismételhetőség

$R$  = reprodukálhatóság

$CV_r$  = az ismételhetőség relatív szórása, %

$CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

## 9. Észrevételek

- 9.1. Speciális kromatográfiai paraméterek alkalmazása a triptofán és az  $\alpha$ -metil-triptofán jobb elválasztását teheti lehetővé.

Izokratikus elúció, majd grádiens oszlopon történő tisztítás:

Folyadékkromatográfiás oszlop:	125 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , 5 µm töltet, vagy ezzel egyenértékű oszlop		
Oszlophőmérséklet:	32 °C		
Mozgófázis:	A: 0,01 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /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 oszloptöltetként 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.

## H. NYERSOLAJOK ÉS ZSÍROK MEGHATÁROZÁSA

### 1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer az állati takarmányokban lévő nyersolajok és zsírok meghatározására szolgál. Nem vonatkozik az olajos magvakra és olajtartalmú gyümölcsökre.

A továbbiakban leírt két módszer használata a takarmány jellegétől és összetételétől, valamint az analitikai vizsgálat céljától függ.

#### 1.1. *A. eljárás – Közvetlenül extrahálható nyersolajok és zsírok*

Ez a módszer a növényi eredetű takarmány-alapanyagok esetében alkalmazható, kivéve azokat, amelyek a B. módszer tárgykörébe esnek.

#### 1.2. *B. eljárás – Összes nyersolaj és zsír*

Ez a módszer az állati eredetű takarmány-alapanyagok és minden összetett takarmány esetében alkalmazható. Mindazon anyagokra alkalmazandó, amelyekből az olajok és a zsírok teljesen nem extrahálhatók előzetes hidrolízis nélkül (pl. sikkó, élesztő, burgonyafehérjék és extrudálás, a pelyhesítés és a melegítés révén készített termékek).

#### 1.3. *Az eredmények értelmezése*

Mindazon esetekben, amikor magasabb eredményt kapunk a B. eljárással, mint az A. eljárással, a B. eljárással kapott eredményt tekintjük a helyes értéknek.

## 2. Vizsgálati alapelv

### 2.1. A. módszer

A mintát petroléterrel extraháljuk. Az oldószert bepároljuk, a maradékanyagot megszáritjuk, és megmérjük.

### 2.2. B. módszer

A mintát melegítés közben sósavval kezeljük. A keveréket lehűtjük, és leszűrjük. A maradékanyagot kimossuk, megszáritjuk és a meghatározást az A. módszer szerint végezzük el.

## 3. Reagensek

3.1. Petroléter, forráspont tartománya: 40–60 °C. Brómszáma kisebb legyen 1-nél, és a bepárlási maradékanyaga kisebb legyen, mint 2 mg/100 ml.

3.2. Nátrium-szulfát, vízmentes.

3.3. Sósav,  $c = 3$  mól/l

3.4. Szűrési segédanyag, pl. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

## 4. Eszközök

4.1. Extrahálókészülék. Amennyiben szifonnal ellátott készülékről van szó (Soxhlet-készülék) a visszafolyás mértéke körülbelül óránként 10 ciklus legyen; ha nem szifonos típust használunk, a visszafolyás mértéke körülbelül percenként 10 ml legyen.

4.2. Extrahálótégely, petroléterben oldható anyagoktól mentes, a 4.1. pont követelményeinek megfelelő porozitással.

4.3. Szárítókemence, amely lehet  $75 \pm 3$  °C-ra beállított vákuumkemence vagy  $100 \pm 3$  °C-ra beállított légkeveréses kemence.

## 5. A vizsgálat módja

### 5.1. A. módszer (lásd 8.1. pont)

1 mg pontossággal mérjük ki 5 g mintát, töltjük át egy extraháló tégelybe (4.2.), és fedjük be egy zsírmentes gyapotvattatamponnal.

Tegyük az extraháló tégelyt az extrahálókészülékbe (4.1.), és extraháljuk hat órán keresztül petroléterrel (3.1.). A petroléter-kivonatot egy horzsakődarabokat <sup>(1)</sup> tartalmazó, száraz, lemért lombikba gyűjtjük.

Pároljuk be az oldószert. A lombikot másfél órán át tartjuk a szárítókemencében (4.3.), hogy a maradékanyag megszáradjon. Hagyjuk kihűlni egy exsikkátorban, és mérjük meg a tömegét. Ismét szárítjuk 30 percig annak biztosítása érdekében, hogy az olajok és zsírok tömege stabilizálódjon (a tömegvesztés a két egymást követő mérés között legfeljebb 1 mg lehet).

### 5.2. B. módszer

1 mg pontossággal mérjük ki 2,5 g mintát (lásd 8.2. pont), tegyük egy 400 ml-es főzőpohárba vagy egy 300 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 100 ml sósavat (3.3.) és horzsakődarabokat. Fedjük le a főzőpoharat egy óraiüveggel, vagy csatlakoztassunk az Erlenmeyer-lombikhoz egy visszafolyós hűtőt. Lassú lángon vagy főzőlapon enyhén forraljuk fel, és tartjuk így egy órán keresztül. Ne hagyjuk, hogy az anyag odatapadjon az edény falához.

Hűtsük le, és adjunk hozzá annyi szűrési segédanyagot (3.4.), amely elég ahhoz, hogy megakadályozza a szűrés folyamán keletkező olaj- vagy zsírvesztést. Szűrjük át egy nedvesített, zsírmentes, kettős szűrőpapíron. Addig mossuk hideg vízzel a maradékanyagot, amíg semleges szűrletet nem kapunk. Ellenőrizzük, hogy a szűrlet nem tartalmaz olajat vagy zsírokat. Ezek jelenléte azt jelzi, hogy a mintát a hidrolízis előtt petroléterrel extrahálni kell az A. módszer szerint.

<sup>(1)</sup> Amennyiben az olajon vagy a zsíron ezt követően minőség-ellenőrzést végeznek, a horzsakődarabokat üvegyöngyökkel helyettesítsük.

Tegyük a maradékanyagot tartalmazó kettős szűrőpapírt egy óraüvegre, és szárítsuk a légkeveréses kemencében (4.3.) másfél órán keresztül,  $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ -on.

Tegyük a száraz maradékanyagot tartalmazó kettős szűrőpapírt egy extrahálótégelybe (4.2.), és fedjük le egy zsírintes üvegvatta tamponnal. Helyezzük az extrahálótégelyt egy extrahálókészülékbe (4.1.), és folytassuk a műveletet az 5.1. pont második és harmadik bekezdése szerint.

## 6. Az eredmény kifejezése

A maradékanyag tömegét a minta százalékában fejezzük ki.

## 7. Ismételhetőség

Ugyanazon a mintán, ugyanazon analitikus által végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

- az 5 % alatti nyersolaj és zsírtartalmaknál a 0,2 %-ot, abszolút értékben,
- 5–10 % közötti olaj- és zsírtartalom esetében a 4,0 %-ot, a legmagasabb eredményhez viszonyítva,
- a 10 % feletti nyersolaj és zsírtartalmaknál a 0,4 %-ot, abszolút értékben.

## 8. Észrevételek

- 8.1. Magas olaj- és zsírtartalmú termékeknel, amelyeket nehéz felaprítani, vagy amelyek nem alkalmasak arra, hogy homogén vizsgálati mintát képezzünk belőlük, a következőképpen járjunk el:

1 mg pontossággal mérjük ki 20 g mintát, és keverjük össze 10 g vagy annál több vízmentes nátriumszulfáttal (3.2.). Extraháljuk petroléterrel (3.1.) az 5.1. pont szerint. A kapott kivonatot töltsük fel petroléterrel (3.1.) 500 ml-re, és keverjük össze. Helyezzünk 50 ml oldatot egy horzsakődarabokat tartalmazó, száraz, lemért kis lombikba. Pároljuk be az oldószert, szárítsuk, majd az 5.1. pont utolsó bekezdésében leírtak szerint járjunk el.

Távolítsuk el az oldószert az extrahálótégelyben hagyott maradékanyagból, aprítsuk fel a maradékanyagot 1 mm-es finomságúra, tegyük vissza az extrahálótégelybe (ne adjunk hozzá nátriumszulfátot), és az 5.1. pont második és harmadik bekezdésében leírtak szerint folytassuk a műveletet.

Az olaj- és zsírtartalmat a minta százalékában számítsuk ki a következő képlet segítségével:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

ahol:

$m_1$  = a maradékanyag tömege grammban az első extrahálás után (a kivonat aliquot része),

$m_2$  = a maradékanyag tömege grammban a második extrahálás után.

- 8.2. Az olajokban és zsírokban szegény termékek esetében a vizsgálati mintát 5 g-ra lehet növelni.
- 8.3. A magas víztartalmú hobbiallat-eledeleket vízmentes nátriumszulfáttal kell keverni a B. módszer szerinti hidrolízis és extrahálás előtt.
- 8.4. Az 5.2. pontban hatásosabb lehet forró víz használata hideg víz helyett a maradékanyag szűrés utáni mosásához.
- 8.5. Az 1,5 órás szárítási időt néhány takarmány esetében meg kell hosszabbítani. El kell kerülni a túlzott szárítást, mivel az alacsony eredményekhez vezethet. Mikrohullámú sütő is használható.
- 8.6. Az A. módszer szerinti előzetes extrahálás a hidrolízis előtt és a B. módszer szerinti ismételt extrahálás akkor javasolt, ha a nyersolaj- és zsírtartalom nagyobb, mint 15 %. Bizonyos mértékig ez a takarmány jellegétől és a takarmányban lévő olaj és zsír jellegétől függ.

## I. A NYERSROST MEGHATÁROZÁSA

### 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányokban előforduló, hagyományosan nyersrostnak nevezett, savas és lúgos közegben oldhatatlan, zsírintes szerves anyagok meghatározását.

### 2. Vizsgálati alapelv

A szükség esetén zsírtalanított mintát többször egymás után meghatározott koncentrációjú kénsav és kálium-hidroxid forrásban lévő oldataival kezeljük. A maradékot zsugorított üvegszűrővel szűréssel elválasztjuk, kimossuk, megszáritjuk, lemérjük és 475–500 °C-on elhamvasztjuk. A hamvasztásból eredő tömegveszteség megegyezik a vizsgálati minta nyersrosttartalmával.

### 3. Reagensek

- 3.1. Kénsav,  $c = 0,13$  mól/l.
- 3.2. Habzásgátló anyag (pl. n-oktanol).
- 3.3. Szűrési segédanyag (Celite 545 vagy azzal egyenértékű), négy órán át 500 °C-on hevítve (8.6.).
- 3.4. Aceton.
- 3.5. Petroléter, forráspont-tartomány: 40–60 °C.
- 3.6. Sósav,  $c = 0,5$  mól/l.
- 3.7. Kálium-hidroxid oldat,  $c = 0,23$  mól/l.

### 4. Eszközök

- 4.1. Kénsavval vagy kálium-hidroxiddal történő roncsolásra szolgáló fűtőegység, amely egy, a szűrőtégely (4.2.) csatlakoztatására alkalmas tartóval, illetve egy olyan elvezetőcsővel van felszerelve, amelyhez egy lehetőleg sűrített levegővel töltött folyadékkezelhető és a vákuumhoz kapcsolt csap tartozik. Használat előtt mindennap öt percig melegítjük elő az egységet forrásban lévő vízzel.
- 4.2. Üveg szűrőtégely 40–90 µm porozitású, olvasztott zsugorított üveg szűrőlappal. Az első használat előtt melegítjük fel 500 °C-ra néhány percre, és hűtjük le (8.6.).
- 4.3. Visszafolyós hűtővel ellátott, legalább 270 ml-es, forralásra alkalmas henger.
- 4.4. Szárítókemence, hőfokszabályzóval.
- 4.5. Tokos kemence, hőfokszabályzóval.
- 4.6. Extrahálóegység, amelyhez a szűrőtégelyhez (4.2.) való tartólemez és a vákuum, illetve folyadék kivezetésére szolgáló csappal ellátott ürítőpipa tartozik.
- 4.7. Csatlakozógyűrűk a fűtőegység (4.1.), a szűrőtégely (4.2.) és a henger (4.3.) összekapcsolásához, a hideg extrahálóegység (4.6.) és a tégely csatlakoztatásához.

### 5. A vizsgálat módja

Mérjük ki 1 mg-os pontossággal 1 g-ot az előkészített mintából, és helyezzük a szűrőtégelybe (4.2.) (lásd az Észrevételek 8.1., 8.2. és 8.3. pontját), majd adjunk hozzá 1 g szűrési segédanyagot (3.3.).

Állítsuk össze a fűtőegységet (4.1.) és a szűrőtégelyt (4.2.), majd csatlakoztassuk a hengert (4.3.) a szűrőtégelyhez. Öntsünk 150 ml forrásban lévő kénsavat (3.1.) az összeállított hengerbe és tégelybe, és szükség esetén adjunk hozzá néhány csepp habzásgátló anyagot (3.2.).

5 ± 2 perc alatt hozzuk forrásba a folyadékot, és forraljuk erőteljesen pontosan 30 percig.



Nyissuk meg az ürítőpipa csapját (4.1.), vákuum alatt szűrjük át a kénsavat a szűrőtégelyen, és mossuk a maradékot egymást követően háromszor, 30 ml-es forróvízadagokkal, ügyelve arra, hogy a maradékot minden mosás után szárazra szűrjük.

Zárjuk el a kivezető csapot, és öntsünk 150 ml forrásban lévő kálium-hidroxid oldatot (3.7.) az összeállított hengerbe és tégelybe, majd adjunk hozzá néhány csepp habzástgátló anyagot (3.2.).  $5 \pm 2$  perc alatt hozzuk forrásba a folyadékot, és forraljuk erőteljesen pontosan 30 percig. Szűrjük, és ismételjük meg a kénsavas lépésnél alkalmazott mosási műveletet.

Az utolsó mosás és szárítás után szereljük le a tégelyt, és tartalmával együtt csatlakoztassuk a hideg extrahálóegységhez (4.6.). Vákuumot használva mossuk a tégelyben lévő maradékot háromszor egymás után 25 ml-es acetonadagokkal (3.4.), ügyelve arra, hogy a maradékot minden mosás után szárazra szűrjük.

Szárítsuk a tégelyt tömegállandóságig a kemencében 130 °C-on. Az egyes szárítások után hűtsük le exsikkátorban, és gyorsan mérjük le. Helyezzük a tégelyt a tokos kemencébe, és 475–500 °C-on hamvasszuk tömegállandóságig (a tömegvesztésnek két egymást követő mérés között 1 mg-nál kisebbnek kell lennie) legalább 30 percen át.

A mérés előtt minden hevítés után hűtsük a tégelyt először a kemencében, majd az exsikkátorban.

Végezzünk vakpróbát minta nélkül. A hamvasztásból adódó tömegvesztés nem haladhatja meg a 4 mg-ot.

## 6. Az eredmények kiszámítása

A minta százalékosan kifejezett nyersrosttartalma az alábbi képlettel adható meg:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

ahol:

m = a minta tömege g-ban;

m<sub>0</sub> = a meghatározás során végzett hamvasztás utáni tömegvesztés, g-ban;

m<sub>1</sub> = a vakpróba során végzett hamvasztás utáni tömegvesztés, g-ban.

## 7. Ismételhetőség

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

— 10 %-nál alacsonyabb nyersrosttartalom esetén abszolút értékben a 0,6 %-ot,

— 10 %-os vagy annál magasabb nyersrosttartalom esetén a magasabb érték 6 %-át.

## 8. Észrevételek

8.1. A 10 %-nál több nyerszsírt tartalmazó takarmányokat az analízis előtt petroléterrel (3.5.) zsírtalanítani kell. Csatlakoztassuk a szűrőtégelyt (4.2.) tartalmával együtt a hideg extrahálóegységhez (4.6.), és vákuumban mossuk a maradékot egymás után háromszor 30 ml-es petroléteradagokkal, ügyelve arra, hogy a maradék száraz legyen. Csatlakoztassuk a tégelyt tartalmával együtt a fűtőegységhez (4.1.), és folytassuk a meghatározást az 5. pont szerint.

8.2. A petroléterrel (3.5.) közvetlenül nem extrahálható zsírokat tartalmazó takarmányokat a 8.1. pontban bemutatott módon kell zsírtalanítani, majd savas forralást követően még egyszer zsírtalanítani kell őket. A savas forralás és az ezt követő mosás után csatlakoztassuk a tégelyt tartalmával együtt a hideg extrahálóegységhez (4.6.), és mossuk három alkalommal 30 ml acetonnal, amit további három mosás követ 30 ml-es petroléteradagokkal. Vákuumban szűrjük, amíg száraz nem lesz, majd folytassuk az analízist az 5. pontban leírtak szerint, a kálium-hidroxidos kezeléssel kezdve.

- 8.3. Ha a takarmányok, kalcium-karbonátban kifejezve több mint 5 % karbonátot tartalmaznak, akkor csatlakoztassuk a tégelyt (4.2.) a lemért mintával együtt a fűtőegységhez (4.1.). Mossuk a mintát háromszor 30 ml sósavval (3.6.). Az egyes savadagok hozzáadása után, a szűrés előtt körülbelül egy percig hagyjuk állni a mintát. Mossuk egyszer 30 ml vízzel, és folytassuk az analízist az 5. pontban leírtak szerint.
- 8.4. Ha állvány formájú berendezést használunk (több tégely csatlakozik ugyanahhoz a fűtőegységhez), akkor ugyanannak a mintának nem végezhető el két egyedi vizsgálata ugyanabban a sorozatban.
- 8.5. Ha a forralás után nehéz leszűrni a savas és a lúgos oldatokat, akkor vezessünk sűrített levegőt a fűtőegység ürítőcsövébe, és így folytassuk a szűrést.
- 8.6. Az üveg szűrőtégelyek élettartamának meghosszabbítása érdekében a hamvasztás hőmérséklete nem haladhatja meg az 500 °C-ot. Ügyeljünk arra, hogy a hevítési és a hűtési ciklusok alatt kerüljük a túlzott, lökészerű hőhatást.

## J. A CUKOR MEGHATÁROZÁSA

### 1. Cél és alkalmazási terület

A módszer lehetővé teszi a redukálócukor és az invertálás utáni összes cukor glükózban vagy, adott esetben, 0,95-os tényezővel konvertálva, szacharózban kifejezett szintjének meghatározását. A módszer összetett takarmányok esetében alkalmazható. Egyéb takarmányokra különleges módszerek vonatkoznak. Adott esetben, a laktózt külön kell mérni, és figyelembe kell venni az eredmények kiszámításánál.

### 2. Vizsgálati alapelv

A cukrot hígított etanolban extraháljuk; az oldatot Carrez I. és II. oldattal derítjük. Az etanol kizárása után az invertálás előtti és utáni mennyiség Luff–Schoorl-módszerrel kerül meghatározásra.

### 3. Reagensok

- 3.1. Etanol-oldat 40 % (v/v) sűrűség: 0,948 g/ml, 20 °C-on, fenolftaleinhez semlegesítve.
- 3.2. Carrez I. oldat: vízben oldjunk fel 21,9 g cink-acetátot,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  és 3 g jégecetet. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.3. Carrez II. oldat: vízben oldjunk fel 10,6 g kálium-[hexaciano-ferrát(II)]-ot,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.4. 0,1 %-os (w/v) metilnarancsoldat.
- 3.5. 4 mól/liter koncentrációjú sósav.
- 3.6. 0,1 mól/liter koncentrációjú sósav.
- 3.7. 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-hidroxid oldat.
- 3.8. Luff–Schoorl-reagens:

Óvatosan kevergetve öntsük a citromsavoldatot (3.8.2.) a nátrium-karbonát-oldatba (3.8.3.). Adjuk hozzá a réz-szulfát oldatot (3.8.1.), és öntsük fel 1 literig vízzel. Hagyjuk másnapig ülepedni, majd szűrjük.

Ellenőrizzük az így kapott reagens koncentrációját (0,05 mól/liter koncentrációjú Cu; 1 mól/liter koncentrációjú  $Na_2CO_3$ ), lásd az (5.4.) pont utolsó bekezdését. Az oldat pH-értékének körülbelül 9,4-nek kell lenni.

- 3.8.1. Réz-szulfát-oldat. 100 ml vízben oldjunk fel 25 g vasmentes rézszulfátot  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .

- 3.8.2. Citromsavoldat: 50 ml vízben oldjunk fel 50 g citromsavat,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ .
- 3.8.3. Nátrium-karbonát-oldat: kb. 300 ml meleg vízben oldjunk fel 143,8 g dehidratált nátrium-karbonátot. Hagyjuk kihűlni.
- 3.9. 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-tioszulfát-oldat.
- 3.10. Keményítőoldat: adjunk 30 ml vízben elkevert 5 g oldható keményítőt 1 liter forrásban lévő vízhez. Forraljuk három percen keresztül, hagyjuk kihűlni, szükség esetén adjunk hozzá 10 mg higany-jodidot tartósítószerként.
- 3.11. 3 mól/liter koncentrációjú kénsav.
- 3.12. 30 %-os (w/v) kálium-jodid oldat.
- 3.13. Sósavban forralt, vízben mosott és szárított, szemcsés horzsakő.
- 3.14. 3-metilbután-1-ol.

#### 4. Eszközök

Billenődobos keverőgép: kb. 35–40 fordulatszám/perc teljesítménnyel.

#### 5. A vizsgálat módja

##### 5.1. A minta extrahálása

Mérjünk ki mg-os pontossággal 2,5 g-ot a mintából, és helyezzük egy 250 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 200 ml etanolt (3.1.), és keverjük a keverőgépen egy órán keresztül. Adjunk hozzá 5 ml Carrez I. oldatot (3.2.), és kevergessük körülbelül 30 másodpercig. Adjunk hozzá 5 ml Carrez II. oldatot (3.3.), és kevergessük egy percig. Töltsük fel térfogatra etanollal (3.1.), homogenizáljuk, és szűrjük. Vegyünk el 200 ml-t a szűrletből, és az etanol nagy részének eltávolítása céljából pároljuk térfogatának kb. felére. Helyezzük a bepárlás utáni maradékot mennyiségileg egy 200 ml-es mérőlombikba meleg vízzel, hűtsük, töltsük fel térfogatra vízzel, homogenizáljuk, és szükség esetén szűrjük. Ezen oldatot használjuk a redukálócukor és invertálás utáni összes cukor mennyiségének meghatározására.

##### 5.2. A redukálócukor meghatározása

Pipetta segítségével vegyünk fel legfeljebb 25 ml oldatot, amely 60 mg-nál kevesebb, glükózban kifejezett redukálócukrot tartalmaz. Szükség esetén töltsük fel az oldatot desztillált vízzel 25 ml-re, és határozzuk meg redukálócukor-tartalmát a Luff–Schoorl-módszerrel. Az eredményt a minta glükóztartalmára vonatkoztatva, százalékosan fejezzük ki.

##### 5.3. Az invertálás utáni összes cukor meghatározása

Pipetta segítségével vegyünk fel az oldatból 50 ml-t, és öntsük át egy 100 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá néhány csepp metilnarancsoldatot (3.4.), majd óvatosan és folyamatos kevergetés közben, adjunk hozzá sósavat (3.5.), amíg a folyadék határozottan vörössé nem válik. Adjunk hozzá 15 ml sósavat (3.6.), mértsük a lombikot gyorsan forró vízfürdőbe, és tartsuk ott harminc percen keresztül. Hűtsük le gyorsan kb. 20 °C-ra, és adjunk hozzá 15 ml nátrium-hidroxid-oldatot (3.7.). Töltsük fel vízzel 100 ml-re, és homogenizáljuk. Vegyünk el legfeljebb 25 ml oldatot, amely 60 mg-nál kevesebb, glükózban kifejezett redukálócukrot tartalmaz. Szükség esetén töltsük fel az oldatot desztillált vízzel 25 ml-re, és határozzuk meg redukálócukor-tartalmát a Luff–Schoorl-módszerrel. Az eredményt a glükózra vagy, adott esetben, 0,95-os tényezővel szorozva a szacharózra vonatkoztatva, százalékosan fejezzük ki.

##### 5.4. Titrálás a Luff–Schoorl-módszerrel

Pipetta segítségével vegyünk fel 25 ml Luff–Schoorl-reagenst (3.8.), és helyezzük át egy 300 ml-es Erlenmeyer-lombikba; adjunk hozzá pontosan 25 ml-t a derített cukoroldatból. Adjunk hozzá kétszemcsényi habkővet (3.13.), hevítsük közepes méretű, szabad lángon, közben kézzel kevergessük, és kb. két perc alatt forraljuk fel a folyadékot. Az Erlenmeyer-lombikot azonnal helyezzük egy 6 cm átmérőjű lyukkal ellátott azbesztes dróthálóra, amely alatt előzőleg lángot gyújtunk. A lángot úgy kell szabályoznunk, hogy az Erlenmeyer-lombiknak csak az alját melegítse. Illesszünk egy visszafolyós hűtőt az Erlenmeyer-lombikhoz. Forraljuk pontosan tíz percig. Hűtsük le azonnal hideg vízben, és kb. öt perc elteltével a következők szerint titráljuk:

Adjunk hozzá 10 ml kálium-jodid-oldatot (3.12.), és közvetlenül ezután (a bőséges habképződés veszélye miatt óvatosan) adjunk hozzá 25 ml kénsavat (3.11.). Titráljuk nátrium-tioszulfát-oldattal (3.9.), amíg fakósárga színt nem kapunk, adjuk hozzá a keményítő-indikátort (3.10.), és fejezzük be a titrálást.

Forralás nélkül, 10 ml kálium-jodid-oldat (3.12.) és 25 ml kénsav (3.11.) hozzáadása után végezzük el ugyanezt a titrálást egy pontosan kimért, 25 ml Luff–Schoorl-reagenst (3.8.) és 25 ml vizet tartalmazó keveréken.

## 6. Az eredmények kiszámítása

A táblázat segítségével határozzuk meg a glükóz mennyiségét mg-ban, amely a két titrálás eredménye közti különbségnek felel meg 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-tioszulfát mg-jában kifejezve. Az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

## 7. Különleges vizsgálati módok

- 7.1. A melaszban gazdag, valamint egyéb, kevésbé homogén összetételű takarmányok esetében mérjük ki 20 g-ot, és helyezzük egy 1 literes mérőlombikba 500 ml vízzel felöntve. Keverjük forgó dobon egy órán keresztül. Az 5.1. pontban leírtak szerint derítsük Carrez I. (3.2.) és Carrez II. (3.3.) reagensek használatával, ebben az esetben azonban négyszeres mennyiséget használunk az egyes reagensekből. Töltsük fel térfogatra 80 %-os (v/v) etanollal.

Homogenizáljuk és szűrjük. Vonjuk ki az etanolt az 5.1. pontban leírtak szerint. Ha nincs jelen dextrinált keményítő, töltsük fel térfogatra desztillált vízzel.

- 7.2. Melaszok, valamint cukorban gazdag és gyakorlatilag keményítőmentes takarmány-alapanyagok (szentjánoskenyér, szárítottcukorrépa-szeletek stb.) esetében mérjük ki 5 g-ot, és helyezzük egy 250 ml-es mérőlombikba, adjunk hozzá 200 ml desztillált vizet, és keverjük forgó dobon egy órán keresztül vagy szükség esetén tovább. Az 5.1. pontban leírtak szerint derítsük Carrez I. (3.2.) és Carrez II. (3.3.) reagensekkel. Töltsük fel térfogatra hideg vízzel, homogenizáljuk, és szűrjük. Az összes cukortartalom meghatározásához az 5.3. pontban leírtak szerint folytassuk a vizsgálatot.

## 8. Észrevételek

- 8.1. A habképződés elkerülése érdekében a Luff–Schoorl-reagenssel történő forralás előtt tanácsos (a mennyiségtől függetlenül) kb. 1 ml 3-metilbután-1-ol (3.14.) hozzáadása.
- 8.2. A glükózban kifejezett, invertálás utáni összes cukortartalom és a glükózban kifejezett, redukálócukor-tartalom különbsége 0,95-dal szorozva megadja a szacharóztartalomra vonatkoztatott százalékos arányt.
- 8.3. A laktóz nélkül számított redukálócukor-tartalom meghatározására két módszer alkalmazható:
- 8.3.1. Közelítő számításhoz, szorozzuk meg 0,675-tel a laktóztartalmat, amely egy másik elemzési módszerrel került megállapításra, és vonjuk ki a kapott eredményt a redukálócukor-tartalomból.
- 8.3.2. A laktóz nélkül számított redukálócukor-tartalom pontos kiszámításához ugyanazt a mintát kell használni a két végső meghatározáshoz. Az egyik vizsgálatot az 5.1. pontban foglaltak szerint nyert oldaton végezzük, a másikat pedig a laktóz meghatározása során nyert oldaton az említett célból meghatározott módszer szerint (más típusú cukrok erjesztése és derítés után).

A jelen lévő cukormennyiség meghatározása mindkét esetben a Luff–Schoorl-módszerrel történik, és a glükóz mg-ban kerül kiszámításra. Az egyik értéket kivonjuk a másiktól, és az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

### Példa

A kiválasztott két mennyiség az egyes meghatározások esetében 250 mg-os mintának felel meg.

Az első esetben 44,2 mg glükóznak megfelelő, 17 ml 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-tioszulfát oldat fogyott; a második esetben 11 ml, amely 27,6 mg glükóznak felel meg.

A különbség 16,6 mg glükóz.

Ezért a glükózra átszámított (laktóz nélküli) redukálócukor-tartalom a következő

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

## 25 ml Luff-Schoorl-reagenshez tartozó értékek táblázata

0,1 mól/liter koncentrációjú  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ml-e, kétpercnyi melegítés, tízpercnyi forralás

0,1 mól/liter koncentráció	Glükóz, fruktóz, invertcukor $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktóz $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltóz $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		0,1 mól/liter koncentráció
	ml	mg	különbség	mg	különbség	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

## K. LAKTÓZ MEGHATÁROZÁSA

## 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a 0,5 %-nál magasabb laktóztartalmú takarmányok laktózsintjének meghatározását.

## 2. Vizsgálati alapelv

A cukrokat vízben oldjuk. Az oldatot *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel erjesztjük, amely a laktózt érintetlenül hagyja. Derítés és szűrés után a szűrlet laktóztartalmát Luff-Schoorl-módszerrel határozzuk meg.

## 3. Reagensok

- 3.1. *Saccharomyces cerevisiae* szuszpenzió: oldjunk fel 25 g friss élesztőt 100 ml vízben. A szuszpenzió hűtőben legfeljebb egy hétig áll el.
- 3.2. Carrez I. oldat: vízben oldjunk fel 21,9 g cink-acetátot,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  és 3 g jégecetet. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.3. Carrez II. oldat: vízben oldjunk fel 10,6 g kálium-[hexaciano-ferrát(II)]-ot,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.4. Luff-Schoorl-reagens:

Óvatosan kevergetve öntsük a citromsavoldatot (3.4.2.) a nátrium-karbonát-oldatba (3.4.3.). Adjuk hozzá a réz-szulfát-oldatot (3.4.1.), és töltsük fel egy 1 l-re vízzel. Hagyjuk másnapig ülepedni, majd szűrjük. Ellenőrizzük az így kapott reagens koncentrációját (0,05 mól/liter Cu; 1 mól/liter  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Az oldat pH-értékének körülbelül 9,4-nek kell lenni.

- 3.4.1. Réz-szulfát-oldat. 100 ml vízben oldjunk fel 25 g vasmentes rézszulfátot  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 3.4.2. Citromsavoldat: 50 ml vízben oldjunk fel 50 g citromsavat,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .
- 3.4.3. Nátrium-karbonát-oldat: kb. 300 ml meleg vízben oldjunk fel 143,8 g dehidratált nátrium-karbonátot. Hagyjuk kihűlni.
- 3.5. Sósavban forralt, vízben mosott és szárított, granulált habkő.
- 3.6. 30 %-os (w/v) kálium-jodid-oldat:
- 3.7. 3 mól/liter koncentrációjú kénsav.
- 3.8. 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-tioszulfát oldat.
- 3.9. Keményítőoldat: adjunk 30 ml vízben elkevert 5 g oldható keményítőt 1 liter forrásban lévő vízhez. Forraljuk 3 percig, hagyjuk hűlni, és amennyiben szükséges, adjunk hozzá 10 mg higany-jodidot tartósítószerként.

#### 4. **Eszközök**

38–40 °C-ra beállított, hőfokszabályzóval ellátott vízfürdő.

#### 5. **A vizsgálat módja**

Mérjük ki a mintából 1 g-ot mg-os pontossággal, és ezt a részmintát helyezzük egy 100 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 25–30 ml vizet. Helyezzük a lombikot harminc percre forrásban lévő vízfürdőbe, majd hűtsük le kb. 35 °C-ra. Adjunk hozzá 5 ml élesztő-szuszpenziót (3.1.), és homogenizáljuk. Hagyjuk a lombikot két órán keresztül, 38–40 °C-on állni a vízfürdőben. Hűtsük le kb. 20 °C-ra.

Adjunk hozzá 2,5 ml Carrez I. oldatot (3.2.), és kevergessük harminc másodpercig, majd adjunk hozzá 2,5 ml Carrez II. oldatot (3.3.), és újra kevergessük harminc másodpercig. Töltsük fel vízzel 100 ml-re, keverjük össze, és szűrjük. Pipetta segítségével vegyünk fel a szűrletből egy részt, amely nem haladja meg a 25 ml-t, és amely lehetőleg 40–80 mg laktózt tartalmaz, és helyezzük át egy 300 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Amennyiben szükséges, töltsük fel 25 ml-re vízzel.

Végezzünk vakpróbát ugyanilyen módon 5 ml élesztő oldattal (3.1.). A laktóztartalmat a Luff–Schoorl-módszer szerint, a következőképpen határozzuk meg: adjunk az oldathoz pontosan 25 ml Luff–Schoorl-reagenst (3.4.) és kétszemcsényi habkővet (3.5.). Közepes méretű, szabad lángon történő melegítés közben kézzel kevergessük, és kb. két perc alatt forraljuk fel a folyadékot. Az Erlenmeyer-lombikot azonnal helyezzük egy 6 cm átmérőjű lyukkal ellátott azbesztes dróthálóra, amely alatt előzőleg lángot gyújtunk. A lángot úgy kell szabályoznunk, hogy az Erlenmeyer-lombiknak csak az alját melegítse. Illesszünk egy visszafolyós hűtőt az Erlenmeyer-lombikhoz. Forraljuk pontosan tíz percig. Hűtsük le azonnal hideg vízben, és kb. öt perc elteltével a következők szerint titráljuk:

Adjunk hozzá 10 ml kálium-jodid-oldatot (3.6.), és rögtön utána (a bőséges habképződés veszélye miatt óvatosan) adjunk hozzá 25 ml kénsavat (3.7.). Titráljuk nátrium-tioszulfát-oldattal (3.8.) amíg fakósárga színt nem kapunk, adjuk hozzá a keményítő-indikátort (3.9.), és fejezzük be a titrálást.

Forralás nélkül, 10 ml kálium-jodid-oldat (3.6.) és 25 ml kénsav (3.7.) hozzáadása után végezzük el ugyanezt a titrálást egy pontosan kimért, 25 ml Luff–Schoorl-reagenst (3.4.) és 25 ml vizet tartalmazó keveréken.

#### 6. **Az eredmények kiszámítása**

A csatolt táblázat segítségével határozzuk meg a laktóz mennyiségét mg-ban, amely a két titrálás eredménye közti különbségnek felel meg, 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-tioszulfát ml-ében kifejezve.

A dehidratált laktózra vonatkozó eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

#### 7. **Észrevételek**

A 40 %-nál több erjeszhető cukrot tartalmazó termékek esetében 5 ml-nél nagyobb mennyiségű élesztő-szuszpenziót (3.1.) használjunk.

## 25 ml Luff-Schoorl-reagenshez tartozó értékek táblázata

0,1 mól/liter koncentrációjú  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ml-e, kétpercnyi melegítés, tízpercnyi forralás

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mól/liter koncentráció	Glükóz, fruktóz, invertcu- kor $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktóz $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltóz $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mól/liter koncentráció
	ml	mg	különbség	mg	különbség	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

## L. A KEMÉNYÍTŐ MEGHATÁROZÁSA

## POLARIMETRIÁS MÓDSZER

## 1. Cél és alkalmazási terület

E módszer lehetővé teszi a keményítő és a nagy molekulású keményítő-bomlástermékek takarmányokban jelen lévő szintjének meghatározását a feltüntetett energiaérték (a VII. melléklet rendelkezései) és a 96/25/EK tanácsi irányelv<sup>(1)</sup> betartásának ellenőrzése céljából.

## 2. Vizsgálati alapelv

A módszer két meghatározásból áll. Az első meghatározás során a mintát híg sósavval kezeljük. Tisztítás és szűrés után az oldat optikai forgatóképességét polarimetriával mérjük.

A második meghatározás során a mintát 40 %-os etanollal extraháljuk. A szűrlet sósavval való savanyítása, tisztítása és szűrése után az optikai forgatóképességet ugyanúgy mérjük, mint az első meghatározás esetében.

A minta keményítőtartalmát úgy kapjuk meg, hogy a két mért érték különbségét megszorozzuk egy ismert együtthatóval.

## 3. Reagensek

3.1. 25 %-os (w/w) sósav-oldat, d: 1,126 g/ml.

<sup>(1)</sup> HL L 125., 1996.5.23., 35. o.

## 3.2. 1,13 %-os (w/v) sósav-oldat

A koncentrációt 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldattal végzett titrálással kell ellenőrizni, 94 %-os (v/v) etanolban oldott 0,1 % (w/v) metilvörös jelenlétében. 10 ml semlegesítéséhez 30,94 ml 0,1 mól/liter koncentrációjú NaOH szükséges.

3.3. Carrez I. oldat: vízben oldjunk fel 21,9 g cink-acetátot,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  és 3 g jégecetet. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.3.4. Carrez II. oldat: vízben oldjunk fel 10,6 g kálium-[hexaciano-ferrát(II)]-ot  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Töltsük fel vízzel 100 ml-re.

## 3.5. 40 %-os (v/v) etanol, d: 0,948 g/ml 20 °C-on.

4. **Eszközök**

## 4.1. 250 ml-es Erlenmeyer-lombik szabványos üvegciszolattal és visszafolyós hűtővel.

## 4.2. Polariméter vagy szachariméter.

5. **A vizsgálat módja**5.1. *A minta előkészítése*

Őröljük a mintát olyan finomságúra, hogy az teljes egészében átjusson egy 0,5 mm szemméretű, kerek szemű szitán.

5.2. *A teljes optikai forgatóképesség (P vagy S) meghatározása (lásd az Észrevételek 7.1. pontját)*

Mérjük ki a megőrölt mintából mg pontossággal 2,5 g-ot, és helyezzük azt egy 100 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 25 ml sósavat (3.2.), rázzuk össze a vizsgálati minta egyenletes eloszlásának biztosítása céljából, és adjunk hozzá további 25 ml sósavat (3.2.). Merítsük a lombikot forrásban levő vízfürdőbe, az első három percben erőteljesen és folyamatosan rázogassuk a csomóképződés megakadályozása céljából. A vízfürdőben elegendő víznek kell lennie ahhoz, hogy a fürdő a lombik behelyezésekor forrásponton maradjon. A lombikot rázogatás közben nem szabad kivenni a vízfürdőből. Pontosan 15 perc elteltével vegyük ki a lombikot a vízfürdőből, adjunk hozzá 30 ml hideg vizet, és azonnal hűtsük le 20°-ra.

Adjunk hozzá 5 ml-t a Carrez I. oldatból (3.3.), és rázogassuk kb. harminc másodpercen át. Ezt követően adjunk hozzá 5 ml-t a Carrez II. oldatból (3.4.), és ismét rázzuk kb. harminc másodpercen át. Töltsük fel vízzel térfogatra, keverjük össze és szűrjük meg. Ha a szűrlet nem teljesen tiszta (ami ritkán fordul elő), nagyobb mennyiségű (pl. 10 ml) Carrez I. és II. oldat hozzáadásával ismételjük meg a meghatározást.

Egy 200 mm-es csőben a polariméterrel vagy a szachariméterrel mérjük meg az oldat optikai forgatóképességét.

5.3. *A 40 %-os etanolban oldható anyagok optikai forgatóképességének (P' vagy S') meghatározása*

Mérjük ki a mintából mg pontossággal 5 g-ot, helyezzük egy 100 ml-es mérőlombikba, és adjunk hozzá mintegy 80 ml etanolt (3.5.) (lásd az Észrevételek 7.2. pontját). Hagyjuk a lombikot állni szobahőmérsékleten 1 órán át; ezalatt hatszor erőteljesen rázzuk össze, hogy a vizsgálati minta alaposan összekeveredjen az etanollal. Töltsük fel térfogatra etanollal (3.5.), keverjük össze és szűrjük meg.

A szűrletből pipettázzunk 50 ml-t (= 2,5 g minta) egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 2,1 ml sósavat (3.1.), és erősen rázzuk össze. Csatlakoztassunk visszafolyós hűtőt az Erlenmeyer-lombikhoz, és mérítsük az utóbbit forrásban levő vízfürdőbe. Pontosan 15 perc elteltével vegyük ki az Erlenmeyer-lombikot a vízfürdőből, öntsük át annak tartalmát egy 100 ml-es mérőlombikba, öblítsük kis mennyiségű hideg vízzel, majd hűtsük le 20 °C-ra.

Derítsük Carrez I. oldattal (3.3.) és Carrez II. oldattal (3.4.), vízzel töltsük fel térfogatra, keverjük össze, szűrjük át, majd mérjük meg az optikai forgatóképességét az 5.2. pont második és harmadik bekezdésében ismertetett módon.

6. **Az eredmények kiszámítása**

A keményítőtartalmat (%) a következőképpen számítjuk ki:

6.1. *Mérés polariméterrel*

$$\text{Keményítőtartalom (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = a teljes optikai forgatóképesség szögokban



- $P'$  = a 40 %-os (V/V) etanolban oldható anyagok optikai forgatóképessége szögfokban
- $[\alpha]_D^{20}$  = a tiszta keményítő fajlagos optikai forgatóképessége. Az e tényezőre hagyományosan elfogadott  $D$  számértékek a következők:
- + 185,9°: rizskeményítő
  - + 185,7°: burgonyakeményítő
  - + 184,6°: kukoricakeményítő
  - + 182,7°: búzakeményítő
  - + 181,5°: árpakeményítő
  - + 181,3°: zabkeményítő
  - + 184,0°: összetett takarmányokban található egyéb keményítő- és keményítőkeverék-fajták.

## 6.2. Mérés szachariméterrel

$$\text{Keményítőtartalom (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

- $S$  = teljes optikai forgatóképesség szachariméter-fokban
- $S'$  = a 40 %-os (v/v) etanolban oldható anyagok optikai forgatóképessége szachariméter-fokban
- $N$  = az a szacharózmennyiség (g) 100 ml vízben, amely 100 szachariméter-foknak megfelelő optikai forgatóképességet ad 200 mm-es csőben mérve.
- 16,29 g a francia szachariméterek esetében
  - 26,00 g a német szachariméterek esetében
  - 20,00 g a vegyes szachariméterek esetében.
- $[\alpha]_D^{20}$  = a tiszta keményítő fajlagos optikai forgatóképessége (lásd a 6.1. pontot).

## 6.3. Ismételtetés

Az ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredményének különbsége 40 %-nál alacsonyabb keményítőtartalom esetén, abszolút értékben nem lehet több mint 0,4, 40 %-os vagy annál nagyobb keményítőtartalom esetén pedig nem haladhatja meg az 1 %-os relatív értéket.

## 7. Észrevételek

- 7.1. Ha a minta több mint 6 %-nyi karbonátot tartalmaz kalcium-karbonátra számítva, e karbonátot híg kénsav pontosan megfelelő mennyiségével történő kezeléssel el kell roncsolni a teljes optikai forgatóképesség meghatározását megelőzően.
- 7.2. Magas laktóztartalmú termékek – pl. tejsavópor vagy sovány tejpor – esetében, 80 ml etanol (3.5.) hozzáadását követően, a következőképpen kell eljárni. Csatlakoztassunk visszafolyós hűtőt a lombikhoz, és merítsük az utóbbit 50 °C-os vízfürdőbe 30 percre. Hagyjuk lehűlni, majd folytassuk az analízist az 5.3. pontban leírt módon.
- 7.3. A következő takarmány-alapanyagokról ismert, hogy a takarmányokban való nagy mennyiségű jelenlétük esetén olyan interferenciákat idéznek elő a keményítőtartalom polarimetriás módszerrel való meghatározásakor, amelyek téves eredményekhez vezethetnek:
- (cukor)répakészítmények, pl. (cukor)répapép, (cukor)répa-melasz, (cukor)répapép-melasz, (cukor)répaseprő, (répa)cukor,
  - citruspép,
  - lenmag; lenmagpogácsa; lenmagkivonat,
  - repcemag; repcemagpogácsa; repcemagkivonat; repcemaghéj,
  - napraforgómag; napraforgómag kivonat; részlegesen hántolt napraforgómag kivonat,
  - koprapogácsa, koprakivonat,
  - burgonyapép,
  - szárított élesztő,

- inulinban gazdag termékek (pl. csicsókaszeletek és csicsókaliszt),
- töpörtyű.

#### M. NYERSHAMU MEGHATÁROZÁSA

##### 1. Cél és alkalmazási terület

A módszer lehetővé teszi a takarmányok nyershamutartalmának meghatározását.

##### 2. Vizsgálati alapelv

A mintát 550 °C-on hamvasztjuk; a maradékanyagot megmérjük.

##### 3. Reagensek

20 %-os (w/v) ammónium-nitrát-oldat.

##### 4. Eszközök

4.1. Főzőlap.

4.2. Hőfokszabályzós, elektromos tokos kemence.

4.3. Kvarcból, porcelánból vagy platinából készült négyszögletes (60 × 40 × 25 mm) vagy kör alakú (átmérő: 60–75 mm, magasság: 20–40 mm) hamvasztótégelyek.

##### 5. A vizsgálat módja

Mérjük ki a mintából 5 g-ot mg-os pontossággal (2,5 g-ot a duzzadóképes anyagból származó termékek esetében), és helyezzük egy hamvasztótégelybe, amelyet előzetesen 550 °C-ra hevítettük, majd lehűtöttük és táráztunk. Helyezzük a tégelyt a főzőlapra, és fokozatosan addig hevítjük, amíg az anyag el nem szesenedik. Hamvasszuk az 5.1. vagy az 5.2. pont szerint.

5.1. Helyezzük a tégelyt az 550 °C-ra beállított, kalibrált tokos kemencébe. Tartsuk ezen a hőmérsékleten egészen addig, amíg széntartalmú részecskéktől mentesnek tűnő fehér, halványszürke vagy vöröses hamut nem nyerünk. Helyezzük a tégelyt egy szárítóba, hagyjuk kihűlni, majd azonnal mérjük meg.

5.2. Helyezzük a tégelyt az 550 °C-ra beállított, kalibrált tokos kemencébe. Hamvasszuk 3 órán át. Helyezzük a tégelyt egy szárítóba, hagyjuk kihűlni, majd azonnal mérjük meg. Hamvasszuk újra 30 percen keresztül, annak érdekében, hogy a hamu tömege állandó maradjon (két egymást követő mérés közötti tömegvesztés legfeljebb 1 mg lehet).

##### 6. Az eredmények kiszámítása

A maradék tömegét a táratömeg kivonásával számoljuk ki.

Az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

##### 7. Észrevételek

7.1. A nehezen hamvasztható anyagok hamuját legalább három órán keresztül előzetesen hamvasztani kell, le kell hűteni, majd néhány csepp 20 %-os ammónium-nitrát oldatot vagy vizet kell hozzáadni (ügyelve arra, hogy elkerüljük a hamu szétszóródását vagy a csomóképződést). A kemencében való szárítása után folytassuk a kalcinálást. Szükség szerint ismételjük a műveletet a teljes elhamvadásig.

7.2. A 7.1. pontban ismertetett eljárással szemben ellenálló anyagok esetében a következőképpen járunk el: háromórás hamvasztás után helyezzük a hamut meleg vízbe, és egy kisméretű, hamumentes szűrőn szűrjük át. Hamvasszuk el a szűrőt és annak tartalmát az eredeti tégelyben. Helyezzük a szűrőletet a lehűtött tégelybe, párologtassuk kiszáradásig, hamvasszuk, és mérjük meg.

- 7.3. *Olajok és zsírok* esetében mérjük ki pontosan egy 25 g-os mintát egy megfelelő méretű tégelybe. Hamumentes szűrőpapírcsíkkal meggyújtva, szenesítsük az anyagot. A gyulladás után a lehető legkevesebb vízzel nedvesítsük meg. Szárítsuk, és hamvasszuk az 5. pontban ismertetett módszerrel.

## N. SÓSAVBAN OLDHATATLAN HAMU MEGHATÁROZÁSA

### 1. Cél és alkalmazási terület

A módszer lehetővé teszi a takarmányokban lévő sósavban oldhatatlan ásványi anyagok szintjének meghatározását. A minta jellegétől függően két módszer alkalmazható.

- 1.1. A. *módszer*: a szerves takarmány-alapanyagok és a legtöbb összetett takarmány esetében alkalmazható;
- 1.2. B. *módszer*: olyan ásványi vegyületek és keverékek, valamint összetett takarmányok esetében alkalmazható, amelyeknek az A. módszer szerint meghatározott, sósavban nem oldható anyagtartalma 1 %-nál magasabb.

### 2. Vizsgálati alapelv

- 2.1. A. *módszer*: a mintát hamvasztjuk, a hamut sósavban forraljuk, az oldhatatlan maradékanyagot pedig szűrjük és megmérjük.
- 2.2. B. *módszer*: a mintát sósavval kezeljük. Az oldatot szűrjük, a maradékanyagot hamvasztjuk, az így kapott hamut pedig az A. módszer szerint kezeljük.

### 3. Reagensek

- 3.1. 3 mól/liter koncentrációjú sósav.
- 3.2. 20 %-os (w/v) triklór-ecetsav oldat.
- 3.3. 1 %-os (w/v) triklór-ecetsav oldat.

### 4. Eszközök

- 4.1. Főzőlap.
- 4.2. Hőfokszabályzós, elektromos tokos kemence.
- 4.3. Kvarcból, porcelánból vagy platinából készült négyszögletes (60 × 40 × 25 mm) vagy kör alakú (átmérő: 60–75 mm, magasság: 20–25 mm) hamvasztótégelyek.

### 5. A vizsgálat módja

#### 5.1. A. módszer

Hamvasszuk a mintát a nyershamu meghatározásánál ismertetett módszer szerint. Annak az analízisnek a során kapott hamut is használhatjuk.

75 ml sósav (3.1.) felhasználásával helyezzük a hamut egy 250–400 ml-es főzőpohárba. Lassan forraljuk, és tartjuk forrásban óvatosan tizenöt percig. Szűrjük át a meleg oldatot egy hamumentes szűrőpapíron, és mossuk a maradékot meleg vízzel mindaddig, amíg a savreakció már nem észlelhető. Szárítsuk ki a maradékot tartalmazó szűrőt, és hamvasszuk egy tározott tégelyben legalább 550 °C és legfeljebb 700 °C hőmérsékleten. Hűtsük le egy szárítóban, és mérjük meg.

#### 5.2. B. módszer

Mérjük le a mintából 5 g-ot mg-nyi pontossággal, és helyezzük egy 250–400 ml-es főzőpohárba. Adjunk hozzá egymást követően 25 ml vizet és 25 ml sósavat (3.1.), keverjük össze, és várjunk a pezsgés elállásáig. Adjunk hozzá még 50 ml sósavat (3.1.). Várjunk az esetleges gázkibocsátás megszűnéséig, majd helyezzük a főzőpoharat forró vízfürdőbe, és tartuk ott harminc percig vagy szükség esetén tovább, az esetlegesen jelen lévő összes

keményítő teljes hidrolízise érdekében. Még meleg állapotban szűrjük át egy hamumentes szűrőn, és mossuk a szűrőt 50 ml meleg vízben (lásd: 7. Észrevételek). Helyezzük a maradékanyagot tartalmazó szűrőt hamvasztótégelybe, szárítsuk ki, és hamvasszuk legalább 550 °C és legfeljebb 700 °C hőmérsékleten. 75 ml sósav (3.1.) felhasználásával helyezzük a hamut egy 250–400 ml-es főzőpohárba; kövessük az 5.1. pont második albekezdésében leírtakat.

#### 6. **Az eredmények kiszámítása**

A maradék tömegét a táratömeg kivonásával számoljuk ki. Az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

#### 7. **Észrevételek**

Ha a szűrés problémásnak bizonyul, kezdjük újra az analízist úgy, hogy az 50 ml sósavat (3.1.) 50 ml 20 %-os triklór-ecetsavval (3.2.) helyettesítjük, és a szűrőt 1 %-os meleg triklór-ecetsavban oldatban (3.3.) mossuk.

### O. **KARBONÁTOK MEGHATÁROZÁSA**

#### 1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer lehetővé teszi a karbonátok hagyományosan kalcium-karbonátban kifejezett mennyiségének meghatározását a legtöbb takarmányban.

Bizonyos esetekben (például a vas-karbonát esetében) speciális módszert kell alkalmazni.

#### 2. **Vizsgálati alapelv**

A karbonátokat sósavban bontjuk szét; a kibocsátott szén-dioxidot egy kalibrált csőben gyűjtjük össze, és térfogatát ismert mennyiségű kalcium-karbonát által azonos körülmények között kibocsátott mennyiséggel hasonlítjuk össze.

#### 3. **Reagensek**

3.1. Sósav,  $d = 1,10$  g/ml.

3.2. Kalcium-karbonát.

3.3. Kb. 0,05 mól/liter koncentrációjú kénsav, metilvörösindikátorral megszíneze.

#### 4. **Eszközök**

Scheibler–Dietrich-készülék (lásd az ábrát) vagy annak megfelelő készülék.

#### 5. **A vizsgálat módja**

A minta karbonáttartalmától függően mérjük ki egy részmintát az alábbiak szerint:

— 0,5 g az 50–100 % karbonáttartalmú termékek esetén, kalcium-karbonátban kifejezve,

— 1 g a 40–50 % karbonáttartalmú termékek esetén, kalcium-karbonátban kifejezve;

— 2–3 g egyéb termékek esetében.

Helyezzük a részmintát a készülék speciális lombikjába (4), amelyet 10 ml sósavat (3.1.) tartalmazó, törhetetlen anyagból készült, kisméretű csővel szereltek fel, és kapcsoljuk a lombikot a készülékhez. Fordítsuk el a háromfázisú csapot (5), hogy a cső (1) a külső résszel kapcsolódjon. A színezett kénsavval (3.3.) töltött és a kalibrált csőhöz (1) kapcsolt mozgatható cső (2) segítségével igazítsuk a folyadék szintjét a nulla jelhez. Az (1) és a (3) cső összekapcsolásához fordítsuk el a csapot (5), és ellenőrizzük, hogy a szint nullán áll-e.

A lombik (4) megdöntésével folyassunk lassan sósavat (3.1.) a részmintára. A (2) cső leengedésével egyenlítsük ki a nyomást. Rázzuk a (4) lombikot egészen addig, amíg a szén-dioxid-kibocsátás teljesen meg nem szűnik.

Az (1) és a (2) csőben lévő folyadék egyenlő szintre igazításával állítsuk vissza a nyomást. *Néhány perc* múlva, amikor a gáz mennyisége állandósul, olvassuk le az eredményt.

Végezzünk ellenőrző vizsgálatot ugyanilyen körülmények között 0,5 g kalcium-karbonáton (3.2.).

#### 6. **Az eredmények kiszámítása**

A kalcium-karbonátként kifejezett karbonáttartalmát az alábbi képlet segítségével számítjuk ki:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

ahol:

X = a minta kalcium-karbonátként kifejezett %-os (w/w) karbonáttartalma

V = a rész minta által kibocsátott szén-dioxid, ml-ben.

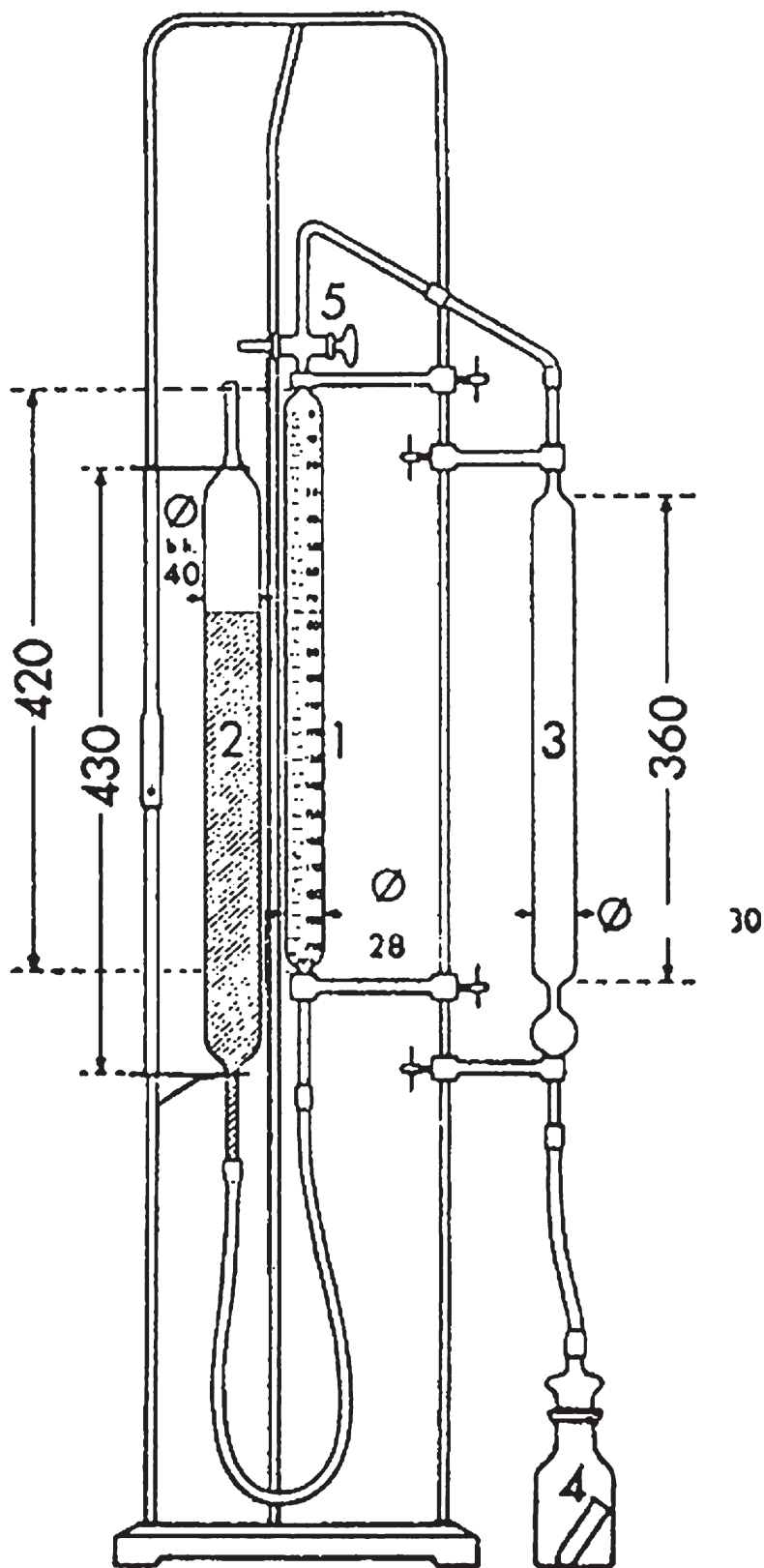
V<sub>1</sub> = 0,5 g CaCO<sub>3</sub> által kibocsátott szén-dioxid, ml-ben.

m = a rész minta grammal kifejezett tömege.

#### 7. **Észrevételek**

- 7.1. Ha a rész minta 2 g-nál nehezebb, először töltsünk 15 ml desztillált vizet a (4) lombikba, és keverjük össze a vizsgálat megkezdése előtt. Az ellenőrző vizsgálat esetében ugyanezt a vízmennyiséget használjuk.
- 7.2. Ha a használt készülék űrtartalma eltér a Scheibler–Dietrich-készülékétől, a mintából és a kontrollanyagból vett részt, valamint az eredmények kiszámítását annak megfelelően kell korrigálni.

## SCHEIBLER-DIETRICH-KÉSZÜLÉK SZÉN-DIOXID MEGHATÁROZÁSÁRA



(mm-ben mérve)

## P. AZ ÖSSZES FOSZFOR MEGHATÁROZÁSA

## FOTOMETRIÁS ELJÁRÁSSAL

## 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányok összes foszfortartalmának meghatározását. Különösen alkalmas az alacsony foszfortartalmú termékek elemzésére. Bizonyos esetekben (foszforban gazdag termékeknel) gravimetriás módszert használhatunk.

## 2. Vizsgálati alapelv

A mintát száraz égetéssel (szerves takarmányok esetén) vagy savas feltárással (ásványi vegyületek és folyékony takarmányok esetén) mineralizáljuk, és savas oldatba helyezzük. Az oldatot molibdén-vanadát reagenssel kezeljük. Az így keletkező sárga oldat optikai sűrűségét 430 nm-nél mérjük egy spektrofotométeren.

## 3. Reagensok

3.1. Kalcium-karbonát.

3.2. Sósav,  $\rho_{20} = 1,10$  g/ml (közelítőleg 6 mól/liter).

3.3. Salétromsav,  $\rho_{20} = 1,045$  g/ml.

3.4. Salétromsav,  $\rho_{20} = 1,38-1,42$  g/ml.

3.5. Kénsav,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.

3.6. Molibdén-vanadát reagens: 1 literes mérőlombikban keverjük össze 200 ml ammónium-heptamolibdát-oldatot (3.6.1.), 200 ml ammónium-monovanadát-oldatot (3.6.2.) és 134 ml salétromsavat (3.4.). Töltsük fel vízzel térfogatra.

3.6.1. Ammónium-heptamolibdát-oldat: oldjunk fel forró vízben 100 g ammónium-heptamolibdátot,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Adjunk hozzá 10 ml ammóniát (d: 0,91 g/ml), és töltsük fel vízzel 1 literre.

3.6.2. Ammónium-monovanadátoldat: 2,35 g ammónium-monovanadátot ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) oldjunk fel 400 ml forró vízben. Állandó keverés közben, lassan adjunk hozzá 20 ml hígított salétromsavat (7 ml  $\text{HNO}_3$  (3.4.) + 13 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), és töltsük fel vízzel 1 literre.

3.7. 1 mg/ml foszfortartalmú standardoldat: oldjunk fel 4,387 g kálium-dihidrogén-foszfátot ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) vízben. Töltsük fel vízzel 1 literre.

## 4. Eszközök

4.1. Kvarc, porcelán vagy platina hamvasztótégelyek.

4.2. Elektromos tokos kemence, 550 °C-ra beállított termosztáttal.

4.3. 250 ml-es Kjeldahl-lombik.

4.4. Mérőlombikok és precíziós pipetták.

4.5. Spektrofotométer.

4.6. Kb. 16 mm átmérőjű kémcsövek, 14,5 mm átmérőjűre keskenyedő dugóval; űrtartalom: 25–30 ml.

## 5. A vizsgálat módja

5.1. Oldatkészítés

A minta jellege szerint készítsünk oldatot az 5.1.1. vagy az 5.1.2. pontban leírtak szerint.

### 5.1.1. Általános módszer

Mérjük le kb. 1 g-ot vagy valamivel többet a mintából, 1 mg pontossággal. Tegyük a vizsgálati mintát egy Kjeldahl-lombikba és adjunk hozzá 20 ml kénsavat (3.5.), rázzuk össze, hogy az anyag teljesen telítődjön a savval és ne tapadjon semmi a lombik oldalára, hevítsük és tartsuk forrásponton 10 percen át. Hagyjuk kissé lehűlni, adjunk hozzá 2 ml salétromsavat (3.4.), lassan hevítsük, majd hagyjuk újra kissé lehűlni, ezt követően adjunk hozzá kevés salétromsavat (3.4.), és forraljuk fel újra. Addig ismétljük ezt a műveletet, amíg színtelen oldatot nem kapunk. Hagyjuk hűlni, adjunk hozzá egy kevés vizet, majd dekantáljuk a folyadékot egy 500 ml-es mérőlombikba, és öblítsük ki a Kjeldahl-lombikot forró vízzel. Hagyjuk hűlni, töltsük fel vízzel térfogatra, homogénizáljuk, és szűrjük.

### 5.1.2. Szerves anyagokat tartalmazó, kalcium- és magnézium-dihidrogén-foszfátoktól mentes minták

Mérjük kb. 2,5 g-ot a mintából 1 mg pontossággal egy hamvasztótégelybe. Keverjük össze a vizsgálati mintát 1 g kalcium-karbonáttal (3.1.), amíg teljesen egyneművé nem válik. Hamvasszuk a kemencében 550 °C-on, amíg fehér vagy szürke hamut nem kapunk (egy kis szénmaradvány nem számít). Tegyük a hamut egy 250 ml-es főzőpohárba. Adjunk hozzá 20 ml vizet és sósavat (3.2.), amíg a pezsgés meg nem szűnik. Adjunk hozzá még 10 ml sósavat (3.2.). Tegyük a főzőpoharat homokfürdőbe és hagyjuk teljesen elpárologni, hogy a kvarc szárazzá és oldhatatlanná váljon. Oldjuk fel a maradékot 10 ml salétromsavban (3.3.), és forraljuk a homokfürdőben vagy főzőlapon 5 percen át anélkül, hogy teljesen beszáritanánk. Dekantáljuk a folyadékot egy 500 ml-es mérőlombikba, majd öblítsük ki a főzőpoharat néhányszor forró vízzel. Hagyjuk hűlni, töltsük fel vízzel térfogatra, homogénizáljuk, és szűrjük.

### 5.2. Elszíneződés kialakulása és az optikai sűrűség mérése

Hígítsuk az 5.1.1. vagy az 5.1.2. pont szerint nyert szűrlet aliquot részét úgy, hogy 40 µg/ml-nél nem nagyobb foszforkoncentrációt kapjunk. Tegyük 10 ml-t ebből az oldatból kémcsőbe (4.6.), és adjunk hozzá 10 ml molibdén-vanadát reagenst (3.6.). Homogénizáljuk és hagyjuk állni legalább 10 percen át 20 °C-on. Mérjük meg az optikai sűrűséget 430 nm-nél spektrofotométeren egy olyan oldattal szemben, amelyet úgy nyertünk, hogy 10 ml molibdén-vanadát reagenst (3.6.) adtunk 10 ml vízhez.

### 5.3. Kalibrációs görbe

A standardoldatból (3.7.) készítsünk egyenként 5, 10, 20, 30 és 40 µg/ml foszfort tartalmazó oldatokat. Vegyünk 10 ml-t ezekből az oldatokból, és adjunk hozzá mindegyikhez 10 ml molibdén-vanadát reagenst (3.6.). Homogénizáljuk és hagyjuk állni legalább 10 percen át 20 °C-on. Mérjük meg az optikai sűrűséget az 5.2. pontban leírt módon. Szerkesszük meg a kalibrációs görbét úgy, hogy az optikai sűrűséget a megfelelő foszformennyiség függvényében ábrázoljuk. A 0 és 40 µg/ml közötti koncentrációk esetében a görbe lineáris lesz.

## 6. Az eredmények kiszámítása

A vizsgálati minta foszfortartalmát a kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg.

Az eredményt a minta százalékában fejezzük ki.

#### Ismételhetőség

Az ugyanazon mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredményének különbsége nem haladhatja meg:

- 5 %-osnál alacsonyabb foszfortartalom esetén a magasabb érték 3 %-át,
- az 5 %-os vagy annál magasabb foszfortartalom esetén abszolút értékben a 0,15 %-ot.

## Q. KLORIDOKBÓL SZÁRMAZÓ KLÓR MEGHATÁROZÁSA

### 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a vízben oldható kloridokban található, hagyományosan nátrium-kloridban kifejezett klór mennyiségének meghatározását. A módszer minden takarmány esetében alkalmazható.

### 2. Vizsgálati alapelv

A kloridokat vízben oldjuk. Ha a termék szerves anyagot tartalmaz, tisztítjuk. Az oldatot salétromsavval enyhén savasítjuk, és a kloridokat ezüst-klorid formájában csapjuk ki ezüst-nitrát-oldat felhasználásával. Az ezüst-nitrát felesleget ammónium-tiocianát oldattal, a Volhard-módszer szerint titráljuk.



### 3. Reagensok

- 3.1. 0,1 mól/liter koncentrációjú ammónium-tiocianát-oldat.
- 3.2. 0,1 mól/liter koncentrációjú ezüst-nitrát-oldat.
- 3.3. Telített ammónium-vasszulfát-oldat  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ .
- 3.4. Salétromsav, d: 1,38 g/ml.
- 3.5. Dietiléter.
- 3.6. Aceton.
- 3.7. Carrez I. oldat: oldjunk fel vízben 21,9 g cink-acetátot,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  és 3 g jégecetet. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.8. Carrez II. oldat: oldjunk fel vízben 10,6 g kálium-[hexaciano-ferrát(II)]-ot  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Töltsük fel vízzel 100 ml-re.
- 3.9. Klorid-mentes, azokat nem abszorbeáló aktív szén.

### 4. Eszközök

Billenődobos keverőgép: kb. 35–40 fordulatszám/perc teljesítménnyel.

### 5. A vizsgálat módja

#### 5.1. Oldatkészítés

A minta jellegétől függően készítsünk oldatot az 5.1.1., az 5.1.2. vagy az 5.1.3. pontban foglaltak szerint.

Ezzel egy időben végezzünk *vakpróbát* az analizálandó minta kihagyásával.

#### 5.1.1. Szerves anyagtól mentes minták

Mg-os pontossággal mérjük le a mintából legfeljebb 10 g-ot, amely legfeljebb 3 g klórt tartalmaz kloridok formájában. 400 ml vízzel helyezük egy 500 ml-es mérőlombikba kb. 20 °C-on. Keverjük harminc percig a keverőgépen, töltsük fel térfogatra, homogenizáljuk, és szűrjük.

#### 5.1.2. Szerves anyagot tartalmazó minták, az 5.1.3. pontban felsorolt termékek kivételével

Mérjük le a mintából 5 g-ot mg-os pontossággal, és 1 g aktív szénnel együtt helyezük egy 500 ml-es mérőhengerbe. Adjunk hozzá 400 ml, körülbelül 20 °C-os vizet és 5 ml Carrez I. oldatot (3.7.), keverjük 30 másodpercig, majd adjunk hozzá 5 ml Carrez II. oldatot (3.8.). Keverjük harminc percig a keverőgépen, töltsük fel térfogatra, homogenizáljuk, és szűrjük.

#### 5.1.3. Főzött takarmányok, lenpogácsák és lenliszt, lenlisztben gazdag termékek, valamint más, nyákban és kolloid anyagokban (például dextrinált keményítőben) gazdag termékek

Készítsük el az oldatot az 5.1.2. pontban foglaltak szerint, de ne szűrjük. Dekantáljuk (ha szükséges, centrifugáljuk), vegyünk el 100 ml-t a felülúszó folyadékból, és öntsük át egy 200 ml-es mérőlombikba. Keverjük össze acetonnal (3.6.), és töltsük fel térfogatra ezzel az oldószerrel, homogenizáljuk, és szűrjük.

#### 5.2. Titrálás

Pipetázzunk egy Erlenmeyer-lombikba 25–100 ml-t (a feltételezett klórtartalom szerint) a szűrletből, amelyet az 5.1.1., az 5.1.2. vagy az 5.1.3. pontban foglaltak szerint nyertünk. Az aliquot rész nem tartalmazhat 150 mg-nál több klórt (Cl). Szükség szerint hígítsuk vízzel, legalább 50 ml-ig, adjunk hozzá 5 ml salétromsavat (3.4.), 20 ml telített ammónium-vasszulfát-oldatot (3.3.) és két csepp ammónium-tiocianát-oldatot (3.1.) egy nulla jellegű töltött buretta segítségével. Burette segítségével helyezzük át az ezüst-nitrát oldatot (3.2.) úgy, hogy 5 ml-nyi többletet kapjunk. Adjunk hozzá 5 ml dietilétert (3.5.), és rázzuk fel erősen, a csapadék koagulálásáig. Titráljuk az ezüst-nitrát többletet az ammónium-tiocianát oldattal (3.1.), amíg egy percen át tartó vörösesbarna színárnyalatot nem kapunk.

**6. Az eredmények kiszámítása**

A nátriumklorid százalékában kifejezett klór mennyiségét (X) a következő képlet segítségével számíthatjuk ki:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

ahol:

$V_1$  = a hozzáadott, 0,1 mól/liter koncentrációjú ezüst-nitrát oldat mennyisége, ml-ben

$V_2$  = a titráláshoz használt, 0,1 mól/liter koncentrációjú ammónium-tiocianát oldat mennyisége, ml-ben.

m = a minta tömege.

Ha a vakpróba azt jelzi, hogy 0,1 mól/liter koncentrációjú ezüst-nitrát oldat került felhasználásra, vonjuk ki ezt az értéket a ( $V_1 - V_2$ ) mennyiségből.

**7. Észrevételek**

- 7.1. A titrálást potenciometrikus módszerrel is el lehet végezni.
  - 7.2. Olajban és zsírban rendkívül gazdag termékek esetében először dietiléterrel vagy petroléterrel végezzünk zsirtalanítást.
  - 7.3. Halliszt esetében a titrálás Mohr-módszerrel is végezhető.
-

## IV. MELLÉKLET

## ANALITIKAI MÓDSZEREK A TAKARMÁNYOKBAN LÉVŐ ENGEDÉLYEZETT ADALÉKANYAGOK SZINTJÉNEK ELLENŐRZÉSÉRE

## A. AZ A-VITAMIN MEGHATÁROZÁSA

## 1. Cél és alkalmazási terület

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

A meghatározási határ 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, nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiával (RP-HPLC) határozzuk meg, UV- vagy fluoreszcens detektor alkalmazásával. A kromatográfias paramétereket úgy választjuk meg, hogy az *all-transz*-A-vitamin-alkohol és annak *cisz*-izomerjei ne váljanak szét.

## 3. Reagensok

- 3.1. Etanol,  $\sigma = 96\%$
- 3.2. Petroléter, forráspont-tartomány: 40–60 °C
- 3.3. Metil-alkohol
- 3.4. Kálium-hidroxid-oldat,  $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$
- 3.5. Nátrium-aszkorbát-oldat,  $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$  (lásd az Észrevételek 7.7. pontját)
- 3.6. Nátrium-szulfid,  $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ )
- 3.6.1. Nátrium-szulfid-oldat,  $c = 0,5\text{ mól}/\text{l}$  gliceriben,  $\beta = 120\text{ g}/\text{l}$  ( $x = 9$ -nél) (lásd az Észrevételek 7.8. pontját).
- 3.7. Fenoltaleinoldat,  $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$  etanolban (3.1.)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Mozgófázis 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-transz*-A-vitamin-acetát, fokozott tisztaságú, igazolt aktivitású, pl.  $2,80 \times 10^6\text{ NE}/\text{g}$
- 3.11.1. *All-transz*-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 töltsük fel jelig ugyanazzal az oldószerral. 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-transz*-A-vitamin-palmitát, fokozott tisztaságú, igazolt aktivitású, pl.  $1,80 \times 10^6\text{ NE}/\text{g}$
- 3.12.1. *All-transz*-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 töltsük fel jelig ugyanazzal az oldószerral. 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.

3.1.3. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (lásd az Észrevételek 7.5. pontját)

#### 4. **Eszközök**

4.1. Rotációs vákuumbepárló

4.2. Barna üvegedények

4.2.1. 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikok, csiszolt üvegyakkal

4.2.2. Csiszolt üvegdugós, vékony nyakú, 10, 25, 100 és 500 ml-es mérőlombikok

4.2.3. 1 000 ml-es, kúpos választótölcsérek, csiszolt üvegdugóval

4.2.4. 250 ml-es, körte alakú lombikok, csiszolt üvegyakkal

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. Folyadékromatográfiás oszlop, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, 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. Extrahálókészülék (lásd 1. ábra), amely az alábbiakból áll:

4.8.1. 1 l térfogatú üveghenger, csiszolt üvegyakkal 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 fúvókával kell rendelkeznie, hogy a hengerben levő felső folyadékréteg átvihető legyen a választótölcsérbe.

#### 5. **A vizsgálat módja**

*Megjegyzés:* Az A-vitamin (UV-) fényre és oxidációra érzékeny. Minden műveletet fénytől elzárva (barna üvegedényekben vagy alumíniumfóliába tekert üvegedényekben), és oxigén kizárásával (nitrogén-áramban) 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 átjusson egy 1 mm-es szemnyagosságú szitán. Az őrlést **közvetlenül** a súlymérés és a szappanosítás előtt kell végezni, különben A-vitamin-vesztéséget léphet fel.

5.2. *Szappanosítás*

Az A-vitamin-tartalomtól függően mérünk be 1 mg 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 (3.1.3.), 2 ml nátrium-aszkorbát-oldatot (3.5.) és 2 ml nátrium-szulfid-oldatot (3.6.). Illesszünk a lombikhoz hűtőt (4.3.), és mérítsük mágneses keverővel felszerelt vízfürdőbe (4.7.). Hevítsük forrásig a lombik tartalmát, majd hagyjuk visszacsepegni öt percig. Ezután a hűtőn (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 szobahőmérsékletre.

### 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 extrahálókészülékbe (4.8.). Öblítsük a szappanosításhoz használt lombikot egymást követően 25 ml etanollal (3.1.) és 100 ml petroléterrel (3.2.), majd az öblítő oldószereket töltsük a választótölcsérbe vagy az extrahálókészülékbe. 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 választótölcsérral (4.2.3.)

Amikor a rétegek már elkülönültek (lásd az Észrevételek 7.3. pontját), 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, egészen addig, amíg a víz, fenolftaleinoldat (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.), töltsük fel jelleg petroléterrel (3.2.), és a tartalmát alaposan keverjük össze.

#### 5.3.2. Extrahálás extrahálókészülékkel (4.8.)

Amikor a rétegek szétváltak (lásd az Észrevételek 7.3. pontját), 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 nitrogénvezetékkel nyomást gyakorolva az oldalsó csőre, 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 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 petroléterréteget 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 bepárlókészülekről. 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.

Fecskendezünk be az 5.4. lépés szerint nyert metil-alkoholos oldatból egy aliquot részt (pl. 20  $\mu$ l), és eluáljuk a mozgófázissal (3.9.). Ugyanabból a mintaoldatból többszöri befecskendezés után számítsuk ki a mintaoldathoz tartozó átlagos csúcsmagasságot (területet), valamint a kalibrálóoldatból (5.6.2.) többszöri befecskendezés után számítsuk ki a kalibrálóoldathoz tartozó átlagos csúcsmagasságokat (területeket).

#### HPLC paraméterek

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

Folyadékromatográfiás  $C_{18}$ , 250 mm  $\times$  4 mm, 5 vagy 10  $\mu$ m-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés. oszlop (4.5.1.):

Mozgófázis (3.9.): Metil-alkohol (3.3.) és víz keveréke, pl. 980 + 20 (v + v).

Átáramlási 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

Pipettázzunk 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.), nitrogénáramoltatással 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 pipettázzunk egy 20 ml-es mérőlombikba, majd töltjük azt fel jelig metil-alkohollal (3.3.), és keverjük össze. E **hígított** standard munkaoldat névleges koncentrációja 56 NE A-vitamin/ml.

## 5.6.2. A kalibrálóoldatok 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, töltjük 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 kalibrálóoldatból fecskendezzünk be 20  $\mu$ l-t több alkalommal, és határozzuk meg az átlagos csúcsmagasságokat (területeket). Figyelembe véve az UV-ellenőrzés (5.6.3.3.) eredményeit, az átlagos csúcsmagasságok (területek) alapján szerkesszük meg a kalibrációs görbét.

## 5.6.3. A standardoldatok UV hitelesítése

## 5.6.3.1. A-vitamin-acetát törzsoldat

Pipettázzunk az A-vitamin-acetát törzsoldatból (3.11.1.) 2,0 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba (4.2.2.), és a lombikot töltjük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 56 NE A-vitamin/ml. Ebből a hígított A-vitamin-acetát oldatból pipettázzunk 3,0 ml-t egy 25 ml-es mérőlombikba, és a lombikot töltjük 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:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ az A-vitamin-acetát esetében} = 1\,530, 326 \text{ nm-nél 2-propanolban})$$

## 5.6.3.2. A-vitamin-palmitát törzsoldat

Pipettázzunk az A-vitamin-palmitát törzsoldatból (3.12.1.) 2,0 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba (4.2.2.), és a lombikot töltjük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 56 NE A-vitamin/ml. Ebből a hígított A-vitamin-palmitát oldatból pipettázzunk 3,0 ml-t egy 25 ml-es mérőlombikba, és a lombikot töltjük 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:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ az A-vitamin-palmitát esetében} = 957, 326 \text{ nm-nél 2-propanolban})$$

## 5.6.3.3. A-vitamin standard munkaoldat

Pipettázzunk 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 töltjük fel jelig 2-propanollal (3.8.). Ebből az oldatból pipettázzunk 5,0 ml-t egy 25 ml-es mérőlombikba, és a lombikot töltjük 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:

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

( $E_{1\text{ cm}}^1$  az A-vitamin-alkohol esetében = 1 821, 325 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:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [NE/kg]}$$

ahol:

c = 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 adag tömege grammban.

## 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. De ebben az esetben valamennyi cisz- és transz-izomer csúcsmagasságát (területét) összesíteni kell a számításokhoz.
- 7.7. Nátrium-aszkorbát-oldat helyett mintegy 150 mg aszkorbinsav is használható.
- 7.8. Nátrium-szulfid-oldat helyett mintegy 50 mg EDTA is használható.
- 7.9. A tejpótlók A-vitamin tartalmának analízise esetében kiemelt figyelmet kell fordítani a következőkre:
  - szappanosításkor (5.2.): a mintában jelen lévő zsír mennyisége miatt szükséges lehet a kálium-hidroxid oldat (3.4.) mennyiségének növelése,
  - extraháláskor (5.3.): az emulziók jelenléte miatt szükséges lehet a víz/etanol 2:1 arány módosítására.

Annak ellenőrzése érdekében, hogy a használt analitikai módszer megbízható eredményt ad-e az adott mátrixon (tejpótló), visszanyerési próbát kell végezni egy további vizsgálati adagon. Ha a visszanyerés 80 % alatti, az analízis eredményét korrigálni kell a visszanyeréssel.

## 8. Ismételtelhetőség

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

9. A körvizsgálat eredményei <sup>(1)</sup>

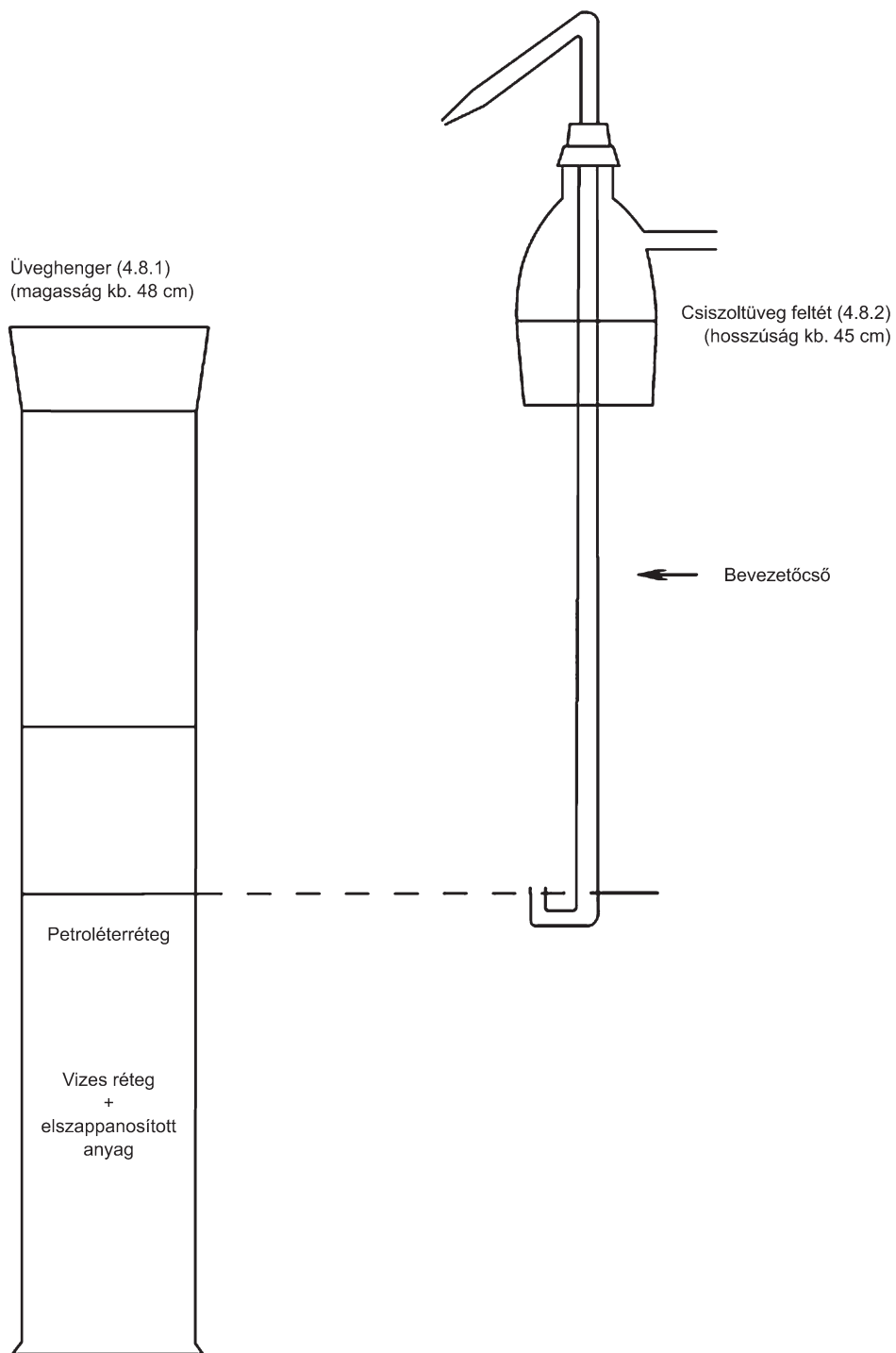
	Előkeverékek	Előkeverék-takar- mány	Ásványi kon- centrátumok	Fehérjetakar- mány	Malactáp
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
átlag [NE/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
$s_r$ [NE/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [NE/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	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 relatív szórása  
 $CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása

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



1. ábra: Extrahálókészülék (4.8)



**B. 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- $\alpha$ -tokoferol-acetát/kg-ban fejezzük ki. Egy mg DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát 0,91 mg DL- $\alpha$ -tokoferolnak (E-vitaminnak) felel meg.

A meghatározási határ 2 mg E-vitamin/kg. Ez a meghatározási határ csak fluoreszcens detektorral érhető el. UV-detektorral a meghatározási határ 10 mg/kg.

**2. Vizsgálati alapelv**

A mintát etanolos kálium-hidroxid oldattal hidrolizáljuk, és az E-vitamint petroléterrel extraháljuk. Az oldószert bepárlással eltávolítjuk, a maradékot metanolban oldjuk, és – szükség esetén – a kívánt koncentrációra hígítjuk. Az E-vitamin-tartalmat fordított fázisú, nagy teljesítményű 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,  $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$
- 3.5. Nátrium-aszkorbát-oldat,  $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$  (lásd az Észrevételek 7.7. pontját)
- 3.6. Nátrium-szulfid,  $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ )
- 3.6.1. Nátrium-szulfid-oldat,  $c = 0,5\text{ mól}/\text{l}$  glicerinben,  $\beta = 120\text{ g}/\text{l}$  ( $x = 9$ -nél) (lásd az Észrevételek 7.8. pontját)
- 3.7. Fenolftaleinoldat,  $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$  etanolban (3.1.)
- 3.8. Mozgófázis 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- $\alpha$ -tokoferol-acetát, fokozottan tiszta, igazolt aktivitású
- 3.10.1. DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát törzsoldat: mérjünk be 0,1 mg-os pontossággal 100 mg DL- $\alpha$ -tokoferol-acetátot (3.10.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel etanolban (3.1.), majd töltsük fel jellegű egyenlő mennyiségű oldószerezrel. Ebből az oldatból 1 ml 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferol-acetátot tartalmaz. (Az UV-ellenőrzést lásd az 5.6.1.3. pontban; a stabilizálást lásd az Észrevételek 7.4. pontjánál.)
- 3.11. DL- $\alpha$ -tokoferol, fokozottan tiszta, igazolt aktivitású
- 3.11.1. DL- $\alpha$ -tocopherol törzsoldat: Mérjünk be 0,1 mg-os pontossággal 100 mg DL- $\alpha$ -tokoferolt (3.11.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel etanolban (3.1.), majd töltsük fel jellegű egyenlő mennyiségű oldószerezrel. Ebből az oldatból 1 ml 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferolt tartalmaz. (Az UV-ellenőrzést lásd az 5.6.2.3. pontban; a stabilizálást lásd az Észrevételek 7.4. pontjánál.)
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (lásd az Észrevételek 7.5. pontját).

**4. Eszközök**

- 4.1. Rotációs vékonyréteges bepárló
- 4.2. Barna üvegedények
- 4.2.1. 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikok csiszolt üvegyakkal

- 4.2.2. Csiszolt üvegdugós, vékony nyakú, 10, 25, 100 és 500 ml-es mérőlombikok
- 4.2.3. 1 000 ml-es, kúpos választótölcsérek, csiszolt üvegdugóval
- 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, C<sub>18</sub>, 5 vagy 10 µm töltet, vagy azzal egyenértékű
- 4.5.2. Állítható hullámhosszúságú, fluoreszcens- vagy UV-detektor,
- 4.6. Spektrofotométer 10 mm-es kvarcküvetákkal
- 4.7. Vízfürdő mágneses keverővel
- 4.8. Extrahálókészülék (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 fúvókával kell rendelkeznie, hogy a hengerben levő felső folyadékréteg átvihető legyen a választótölcsérbe.

## 5. A vizsgálat módja

*Megjegyzés:* Az E-vitamin (UV-) fényre és oxidációra érzékeny. Minden műveletet fénytől elzárva (barna üvegedényekben vagy alumíniumfóliába tekert üvegedényekben), és oxigén kizárásával (nitrogén-áramban) 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 átjusson 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-aszkorbát-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.). Hevítjük forrássá a lombik tartalmát, 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 teljes mennyiségében egy 1 000 ml-es választótölcsérbe (4.2.3.) vagy az extrahálókészülékbe (4.8.). Öblítsük a szappanosításhoz használt lombikot egymást követően 25 ml etanollal (3.1.) és 100 ml petroléterrel (3.2.), majd az öblítő oldószereket töltsük a választótölcsérbe vagy az extrahálókészülékbe. 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 az Észrevételek 7.3. pontját), vigyük át a petroléterreteget 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 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.), töltsük fel jelig petroléterrel (3.2.), és a tartalmát alaposan keverjük össze.

#### 5.3.2. Extrahálás extrahálókészülékkel (4.8.)

Amikor a rétegek szétváltak (lásd az Észrevételek 7.3. pontját), 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 nitrogénvezetékkel nyomást gyakorolva az oldalsó, vigyük át a felső petroléterréteget egy 1 000 ml-es választótölcsérbe (4.2.3.). Mérjük 100 ml petrolétert (3.2.) az üveghengerbe, helyezzük vissza dugót, és alaposan rázzuk össze. Hagyjuk 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 (3.9.) 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- $\alpha$ -tokoferol koncentrációjának 5  $\mu$ g/ml és 30  $\mu$ g/ml között kell lennie).

#### 5.5. Meghatározás HPLC-vel

Az E-vitamin elválasztása fordított fázisú C<sub>18</sub> 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. lépés szerint nyert metil-alkoholos oldatból egy aliquot részt (pl. 20  $\mu$ l), és eluáljuk a mozgófázissal (3.8.). Ugyanabból a mintaoldatból többször befecskendezve számítsuk ki a mintaoldathoz tartozó átlagos csúcsmagasságokat (területeket), valamint a kalibrálóoldatokból (5.6.2.) többször befecskendezve a kalibrálóoldatokhoz tartozó átlagos csúcsmagasságokat (területeket).

#### HPLC paraméterek

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

Folyadékromatográfias C<sub>18</sub>, 250 mm × 4 mm, 10  $\mu$ m-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés. oszlop (4.5.1.):

Mozgófázis (3.8.): metil-alkohol (3.3.) és víz keveréke, pl. 980 + 20 (v + v).

Átáramlási 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- $\alpha$ -tokoferol-acetát vagy DL- $\alpha$ -tokoferol)

##### 5.6.1. DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát standard

##### 5.6.1.1. A standard munkaoldat elkészítése

Pipetázzunk a DL- $\alpha$ -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 állapotig a rotációs bepárlókészüléken (lásd 5.4.), nitrogénárammal távolítsuk el a maradék oldószert (3.9.), majd oldjuk a maradékot 25,0 ml metil-alkoholban (3.3.). Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 45,5  $\mu$ g DL- $\alpha$ -tokoferol/ml, ami egyenértékű 50  $\mu$ g DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát/ml-rel. A standard munkaoldatot felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.

#### 5.6.1.2. A kalibrálóoldatok 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- $\alpha$ -tokoferol-acetát, azaz 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml és 22,8 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferol.

Minden kalibrálóoldatból fecskendezzünk be 20 µl-t több alkalommal, és határozzuk meg az átlagos csúcsmagasságokat (területeket). Az átlagos csúcsmagasságok (területek) alapján szerkesszük meg a kalibrációs görbét.

#### 5.6.1.3. A DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát törzsoldat (3.10.1.) UV hitelesítése

Etanollal hígítsuk a DL- $\alpha$ -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:

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

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

#### 5.6.2. DL- $\alpha$ -tokoferol standard

##### 5.6.2.1. A standard munkaoldat elkészítése

Pipetázzunk a DL- $\alpha$ -tokoferol törzsoldatból (3.11.1.) 2 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- $\alpha$ -tokoferol/ml, ami egyenértékű 44,0 µg DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát/ml-rel. A standard munkaoldatot felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.

##### 5.6.2.2. A kalibrálóoldatok 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 2,0, 4,0, 8,0 és 20,0 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferol, azaz 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml és 22,0 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát.

Minden kalibrálóoldatból fecskendezzünk be 20 µl-t több alkalommal, és határozzuk meg az átlagos csúcsmagasságokat (területeket). Az átlagos csúcsmagasságok (területek) alapján szerkesszük meg a kalibrációs görbét.

##### 5.6.2.3. A DL- $\alpha$ -tokoferol törzsoldat (3.11.1.) UV hitelesítése

Etanollal hígítsuk a DL- $\alpha$ -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:

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

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 (a-tokoferol-acetátban számolva).

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

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

ahol:

c = a mintaoldat (5.4.) E-vitamin-koncentrációja (a-tokoferol-acetátként), µg/ml-ben

V<sub>1</sub> = a mintaoldat (5.4.) térfogata, ml-ben

V<sub>2</sub> = az 5.4. szerint vett aliquot rész térfogata, ml-ben

m = a vizsgálati adag 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) 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. A DL- $\alpha$ -tokoferol-acetát- vagy DL- $\alpha$ -tokoferol-oldat 5.6.1.3., illetve 5.6.2.3. szerinti spektrofotometriás mérése után adjunk kb. 10 mg BHT-t (3.1.2.) 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 oszloppal lehetséges az  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - és  $\delta$ -tokoferol elválasztása.
- 7.7. Nátrium-aszkorbát-oldat helyett mintegy 150 mg aszkorbinsav is használható.
- 7.8. Nátrium-szulfid-oldat helyett mintegy 50 mg EDTA is használható.
- 7.9. Az E-vitamin-acetát lúgos közegben igen gyorsan hidrolizálódik, ezért igen érzékeny az oxidációra, különösen olyan nyomelemek jelenlétében, mint a vas vagy a réz. E-vitamin előkeverékekben 5 000 mg/kg szint felett történő meghatározásakor ennek következménye az E-vitamin bomlása lehet. Ezért megerősítésre egy, az E-vitamin lúgos szappanosításának lépését nem tartalmazó, enzimes bontással járó HPLC-módszer ajánlott.

## 8. Ismételhetőség

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

## 9. A körvizsgálat eredményei <sup>(1)</sup>

	Előkeverékek	Előkeverék-takarmány	Ásványi koncentrátumok	Fehérjetakarmány	Malactáp
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
átlag [NE/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
$s_r$ [g/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [g/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
$CV_r$ [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
$s_R$ [g/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
r [g/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

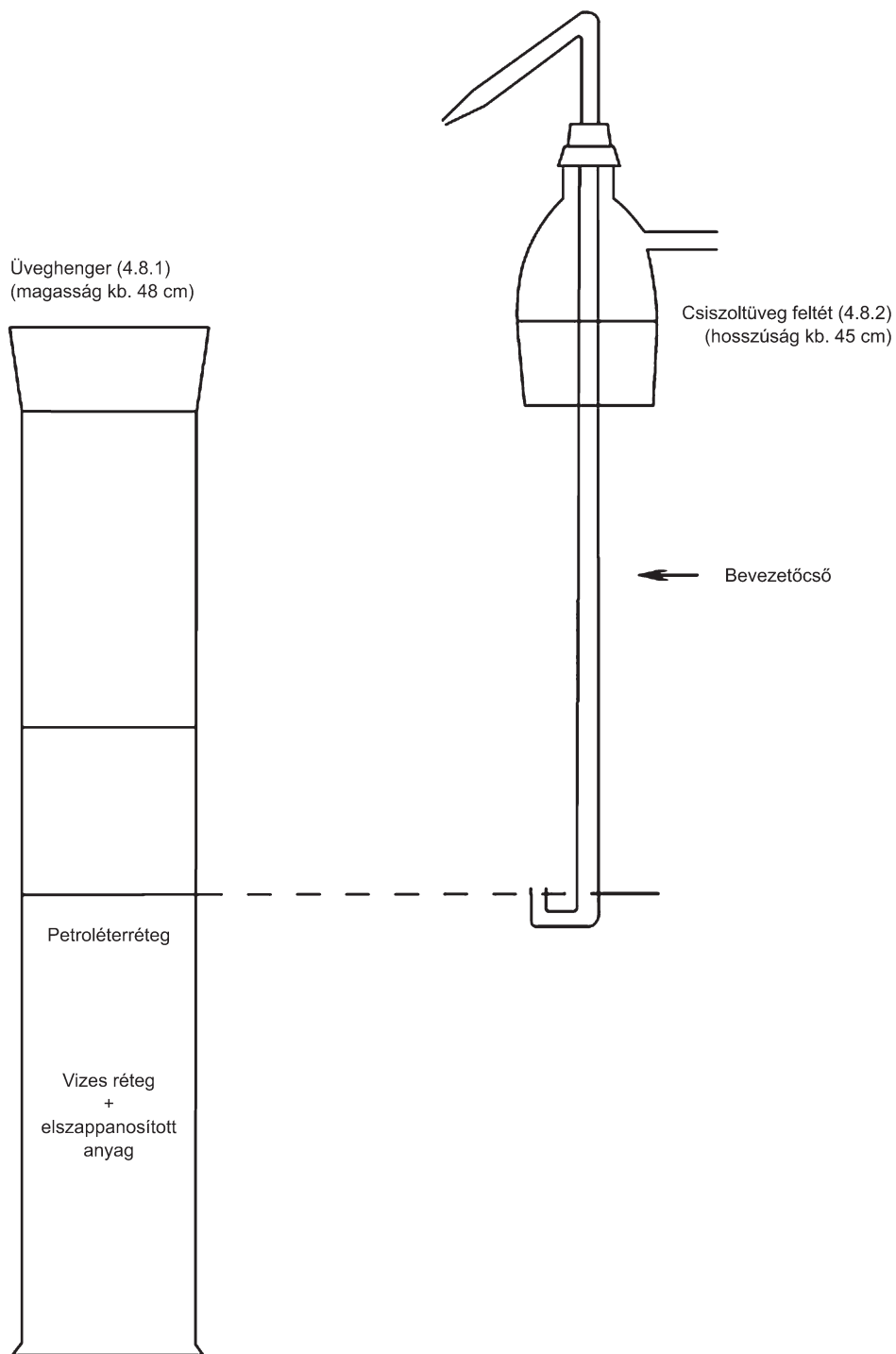
R = reprodukálhatóság

$CV_r$  = az ismételhetőség relatív szórása

$CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása

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

1. ábra: Extrahálókészülék (4.8)



**C. A VAS, RÉZ, MANGÁN ÉS CINK NYOMELEMEK MEGHATÁROZÁSA****1. Cél és alkalmazási terület**

A módszer lehetővé teszi a vas, réz, mangán és cink nyomelemek takarmányokban történő meghatározását. A meghatározás méréshatárai a következők:

- vas (Fe): 20 mg/kg
- réz (Cu): 10 mg/kg
- mangán (Mn): 20 mg/kg
- cink (Zn): 20 mg/kg

**2. Vizsgálati alapelv**

Az esetleg jelen lévő szerves anyag roncsolása után a mintát sósavban oldjuk. A vas, réz, mangán és cink nyomelemeket megfelelő hígítás után atomabszorpciós spektrometriával határozzuk meg.

**3. Reagensek***Előzetes megjegyzések*

A reagensek és az analitikai oldatok elkészítéséhez használt víznek a meghatározás alá eső kationoktól mentesnek kell lennie, amelyet vagy boroszilikát üveg, illetve kvarc lepárlókészülékben történő kétszeres desztillálással, vagy ioncserélő gyantával végzett kétszeres kezeléssel érhetünk el.

A reagenseknek legalább analitikai tisztaságúaknak kell lenniük. A meghatározandó elemektől való mentességet vakpróbával kell ellenőrizni. Szükség esetén a reagenseket tovább kell deríteni.

Az alább leírásra kerülő standardoldatok helyett használhatunk olyan kereskedelmi forgalomban lévő standardoldatokat is, amelyek garantált minőségűek, és ezt felhasználásuk előtt le is ellenőrizték.

- 3.1. Sósav (d:1,19 g/ml).
- 3.2. Sósav (6 mól/liter).
- 3.3. Sósav (0,5 mól/liter).
- 3.4. 38–40 %-os (v/v) fluorsav, amelynek vastartalma kevesebb mint 1 mg Fe/liter, és a bepárlás utáni maradék kevesebb mint 10 mg (mint szulfát)/liter.
- 3.5. Kénsav (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Hidrogén-peroxid (megközelítőleg 100 térfogat oxigén (30 tömegszázalék)).
- 3.7. Standard vasoldat (1 000 µg Fe/ml) a következőképpen elkészítve vagy ezzel egyenértékű, kereskedelmi forgalomban kapható oldat: oldjunk fel 1 g vashuzalt 200 ml 6 mól/liter koncentrációjú sósavban (3.2.), adjunk hozzá 16 ml hidrogén-peroxidot (3.6.), és töltsük fel vízzel 1 literre.
  - 3.7.1. Standard vas-munkaoldat (100 µg Fe/ml), amelyet a standardoldat (3.7.) egy részének 9 rész vízzel történő hígításával készítünk el.
- 3.8. Standard rézoldat (1 000 µg Cu/ml) a következőképpen elkészítve vagy ezzel egyenértékű, kereskedelmi forgalomban kapható oldat:
  - oldjunk fel 1 g porított rezet 25 ml 6 mól/liter koncentrációjú sósavban (3.2.), adjunk hozzá 5 ml hidrogén-peroxidot (3.6.), és töltsük fel vízzel 1 literre.



- 3.8.1. Standard réz-munkaoldat (10 µg Cu/ml), amelyet a standardoldat (3.8.) egy részének 9 rész vízzel történő hígításával, majd az így kapott oldat egy részének 9 rész vízzel történő hígításával készítünk el.
- 3.9. Standard mangánoldat (1 000 µg Mn/ml) a következőképpen elkészítve vagy ezzel egyenértékű kereskedelmi forgalomban kapható oldat:
- oldjunk fel 1 g porított mangánt 25 ml 6 mól/liter koncentrációjú sósavban (3.2.), és töltsük fel vízzel 1 literre.
- 3.9.1. Standard mangán-munkaoldat (10 µg Mn/ml), amelyet a standardoldat (3.9.) egy részének 9 rész vízzel történő hígításával, majd az így kapott oldat egy részének 9 rész vízzel történő hígításával készítünk el.
- 3.10. Standard cinkoldat (1 000 µg Zn/ml) a következőképpen elkészítve vagy ezzel egyenértékű kereskedelmi forgalomban kapható oldat:
- oldjunk fel 1 g cinkszalagot vagy -fóliát 25 ml 6 mól/liter koncentrációjú sósavban (3.2.), és töltsük fel vízzel 1 literre.
- 3.10.1. Standard cink-munkaoldat (10 µg Zn/ml), amelyet a standardoldat (3.10.) egy részének 9 rész vízzel történő hígításával, majd az így kapott oldat egy részének 9 rész vízzel történő hígításával készítünk el.
- 3.11. Lantán-klorid-oldat: oldjunk fel 12 g lantán-oxidot 150 ml vízben, adjunk hozzá 100 ml 6 mól/liter koncentrációjú sósavat (3.2.), és töltsük fel vízzel 1 literre.

#### 4. **Eszközök**

- 4.1. Hőmérséklet-szabályozóval és lehetőleg regisztrálókészülékkel ellátott tokos kemence.
- 4.2. Magas rezisztenciájú boroszilikát üveg eszközök. Ajánlatos kimondottan nyomelemek meghatározására szolgáló eszközöket használni.
- 4.3. Atomabszorpciós spektrofotométer, amely érzékenység és pontosság vonatkozásában a kívánt tartományban megfelel a módszer követelményeinek.

#### 5. **A vizsgálat módja <sup>(1)</sup>**

- 5.1. *Szerves anyagot tartalmazó minták*
- 5.1.1. Hamvasztás és az oldatok előkészítése az analízisre <sup>(2)</sup>
- 5.1.1.1. Helyezzünk egy 0,2 mg pontossággal kimért, 5–10 g tömegű mintát kvarc- vagy platinatégelybe (lásd a b) megjegyzést), szárítsuk ki kemencében 105 °C-on, majd rakjuk be a tégelyt a hideg tokos kemencébe (4.1.). Zárjuk a kemencét (lásd a c) megjegyzést) és fokozatosan emeljük a hőmérsékletet kb. 90 perc alatt 450–475 °C-ra. Tartsuk ezt a hőmérsékletet 4–16 óráig (pl. egész éjszaka), hogy eltávozzanak a széntartalmú anyagok, majd nyissuk ki a kemencét, és hagyjuk kihűlni (lásd a d) megjegyzést).

Vízzel nedvesítsük meg a hamut, és tegyük egy 250 ml-es főzőpohárba. Mossuk a tégelyt kb. 5 ml sósavval (3.1.), amit aztán lassan és óvatosan öntsünk a főzőpohárba (a CO<sub>2</sub>-képződés miatt heves reakció léphet fel). Adjuk hozzá cseppenként a sósavat (3.1.) addig kevergetve, amíg a pezsgés meg nem szűnik. Párologtassuk el belőle a nedvességet, időnként üvegbottal megkeverve.

<sup>(1)</sup> Más roncsolási módszerek is használhatók, ha azok igazoltan hasonló eredményt adnak (mint például a nyomás alatti mikrohullámú roncsolás).

<sup>(2)</sup> A (friss vagy szárított) zöldtakarmányok nagy mennyiségű növényi eredetű kóvasavat tartalmazhatnak, amely nyomelemeket tarthat vissza, ezért el kell távolítani. Ilyen takarmányokból vett minták esetén ezért a következő, módosított módszert kell követni. Végezzük el az 5.1.1. pont i. alpontjában ismertetett műveletet egészen a szűrőig. Az oldhatatlan maradékot tartalmazó szűrőpapírt mossuk át kétszer forrásban lévő vízzel, és helyezzük egy kvarc- vagy platinatégelybe. Égessük el a tokos kemencében (4.1.) 550 °C alatti hőmérsékleten, amíg az összes széntartalmú anyag teljesen el nem tűnik. Hagyjuk kihűlni, adjunk hozzá néhány csepp vizet, ezt követően pedig 10–15 ml fluorsavat (3.4.), és párologtassuk el belőle a nedvességet kb. 150 °C-on. Ha maradt kóvasav a maradékanyagban, oldjuk fel újra néhány milliliter fluorsavban (3.4.), és párologtassuk el belőle a nedvességet. Adjunk hozzá öt csepp kénsavat (3.5.), és melegítsük addig, amíg megszűnik a fehér füst képződése. Miután hozzáadtunk 5 ml 6 mól/liter koncentrációjú sósavat (3.2.) és kb. 30 ml vizet, melegítsük meg, szűrjük le az oldatot egy 250 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel vízzel a jelég (a HCl-koncentráció kb. 0,5 mól/liter). Folytassuk a meghatározást az 5.1.2. ponttól.

Ezután adjunk a maradékanyaghoz 15 ml, 6 mól/liter koncentrációjú sósavat (3.2.), majd kb. 120 ml vizet. Keverjük meg az üvegbottal, amit a főzőpohárban hagyunk, és fedjük be a főzőpoharat egy kémlelőüveggel. Lassan forraljuk és tartjuk forrásponton addig, amíg a hamu feloldódása befejeződik. Szűrjük le hamumentes szűrőpapíron, és vegyük fel a szűrletet egy 250 ml-es mérőlombikban. Mossuk a főzőpoharat és a szűrőt 5 ml, forró, 6 mól/liter koncentrációjú sósavval (3.2.) és kétszer forrásban lévő vízzel. Töltsük fel a mérőlombikot jelig vízzel (a HCl-koncentráció kb. 0,5 mól/liter).

- 5.1.1.2. Ha a szűrőben lévő maradékanyag feketének látszik (szén), tegyük vissza a kemencébe, és hamvasztjuk újra 450–475 °C-on. Ez a hamvasztás, amely csak pár órát vesz igénybe (kb. három–öt órát), akkor fejeződik be, amikor a hamu fehérnek vagy majdnem fehérnek tűnik. Oldjuk fel a maradékanyagot kb. 2 ml sósavval (3.1.), párologtassuk el belőle a nedvességet és adjunk hozzá 5 ml, 6 mól/liter koncentrációjú sósavat (3.2.). Hevítsük, szűrjük az oldatot mérőlombikba, és töltsük fel a mérőlombikot jelig vízzel (a HCl-koncentráció kb. 0,5 mól/liter).

*Megjegyzések:*

- a) A nyomelemek meghatározásakor fontos odafigyelni a – főleg a cink, réz és vas képezte – szennyeződés jelentette kockázatokra. Ezért a minták előkészítésére használt eszközöknek mentesnek kell lennie ezen fémektől.

A szennyeződés általános kockázatának csökkentése érdekében dolgozzunk pormentes környezetben, gondosan tisztított eszközökkel és alaposan elmosott üvegedényekkel. Különösen a cink meghatározása érzékeny a szennyeződések számos típusára, pl. az üvegekészítményektől, a reagensektől, a portól stb. származókra.

- b) Az elhamvasztandó minta tömege a takarmány hozzávetőleges nyomelemtartalma alapján számítható ki, az alkalmazott spektrofotométer érzékenységehez viszonyítva. Egyes, kevés nyomelemtartalmú takarmányok esetén 10–20 g-os mintát kell venni, és a végső oldatot csak 100 ml-re kell feltölteni.
- c) A hamvasztást zárt kemencében kell elvégezni, levegő vagy oxigén befúvatása nélkül.
- d) A pirométer által jelzett hőmérséklet nem lépheti túl a 475 °C-ot.

## 5.1.2. Spektrofotometriás meghatározás

### 5.1.2.1. A kalibrálóoldatok elkészítése

Minden egyes meghatározandó elemhez készítsünk a 3.7.1., 3.8.1., 3.9.1. és 3.10.1. pontban megadott standard munkaoldatokból egy kalibrálóoldat-sorozatot, úgy, hogy minden egyes kalibrálóoldatnak a HCl-koncentrációja kb. 0,5 mól/liter és (vas, mangán és cink esetében) a lantan-klorid koncentrációja 0,1 %-os (w/v) lantánnal egyenértékű legyen.

A kiválasztott nyomelem-koncentrációknak az alkalmazott spektrofotométer érzékenységi tartományán belül kell lenniük. Az alábbi táblázatok példákön keresztül mutatják a kalibrálóoldat-sorozatok egy mintasorozatát; az alkalmazott spektrofotométer típusától és érzékenységi tartományától függően, adott esetben más koncentrációkat kell kiválasztani.

#### Vas

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
standard munkaoldat, ml-ben (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml lantan-klorid oldat (3.11.), töltsük fel vízzel 100 ml-re.							

#### Réz

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
standard munkaoldat, ml-ben (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2.)	8	8	8	8	8	8	8

**Mangán**

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
standard munkaoldat, ml-ben (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantán-klorid oldat (3.11.), töltjük fel vízzel 100 ml-re.

**Cink**

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
standard munkaoldat, ml-ben (3.10.1.) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lantán-klorid oldat (3.11.), töltjük fel vízzel 100 ml-re.

5.1.2.2. *Az oldat előkészítése az analízisre*

A réz meghatározásához az 5.1.1. pont szerint elkészített oldatot általában közvetlenül fel lehet használni. Ha mégis korrigálni kell koncentrációját a kalibrálóoldat-sorozaton belül, egy aliquot részt pipettázzunk egy 100 ml-es mérőlombikba, és töltjük fel jelig 0,5 mól/liter koncentrációjú sósavval (3.3.).

A vas, mangán és cink meghatározásához pipettázzunk egy aliquot részt az 5.1.1. pont szerint elkészített oldatból egy 100 ml-es mérőlombikba, adjunk hozzá 10 ml lantán-klorid oldatot (3.11.), és töltjük fel jelig 0,5 mól/liter koncentrációjú sósavval (3.3.) (lásd még az Észrevételek 8. pontját).

5.1.2.3. *Vakpróba*

A vakpróba során a módszer összes meghatározott lépését el kell végezni, azzal a különbséggel, hogy a mintaanyagot elhagyjuk. A „0” kalibrálóoldatot nem szabad vakoldatként használni.

5.1.2.4. *Az atomabszorpció mérése*

Mérjük meg a kalibrálóoldatok és az analizálandó oldat atomabszorpcióját oxidáló, levegő-acetilén láng alkalmazásával, a következő hullámhosszokon:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Minden mérést négyszer végezzünk el.

5.2. *Ásványi takarmányok*

Ha a minta nem tartalmaz szerves anyagot, az előzetes hamvasztás szükségtelen. Folytassuk a műveletet az 5.1.1.1. pont második bekezdésétől. A fluorsavval végzett bepárlás elhagyható.

6. **Az eredmények kiszámítása**

Egy kalibrációs görbe segítségével számoljuk ki az analizálandó oldat nyomelem-koncentrációját, az eredményt a minta kilogrammonkénti nyomelemtartalmára vonatkoztatva, milligrammban adjuk meg (ppm).

## 7. Ismételhetség

Ugyanazon a mintán, ugyanazon analitikus által végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg a:

- a vizsgált nyomelemtartalom legfeljebb 50 mg/kg értéke esetén abszolút értékben az 5 mg/kg-ot,
- a vizsgált nyomelemtartalom 50 és 100 mg/kg koncentráció közötti értéke esetén a magasabb érték 10 %-át,
- a vizsgált nyomelemtartalom 100 és 200 mg/kg közötti értéke esetén abszolút értékben a 10 mg/kg-ot,
- a vizsgált nyomelemtartalom 200 mg/kg feletti értéke esetén a magasabb érték 5 %-át.

## 8. Észrevétel

Nagy mennyiségű foszfát jelenléte interferenciát okozhat a vassal, mangánnal és cinkkel. Az interferenciát lantán-klorid oldat (3.11.) hozzáadásával kell korrigálni. Ha azonban a mintában a Ca + Mg / P súlyaránya > 2, elhagyható a lantán-klorid oldatnak a vizsgálandó oldathoz és a kalibrálóoldatokhoz való hozzáadása.

### D. A HALOFUGINON MEGHATÁROZÁSA

*DL-transz-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]-quinazolin-4-(3H)-egy hidrobromid*

#### 1. Cél és alkalmazási terület

A módszer a halofuginon takarmányokban történő meghatározására szolgál. A meghatározás határértéke 1 mg/kg.

#### 2. Vizsgálati alapelv

Forró vízzel történt kezelés után a halofuginont szabad bázis formában etilén-acetátba extraháljuk, ezt követően pedig hidroklorid formában vizes savoldatba partíciónáljuk. A kivonatot ioncserélő kromatográfiával tisztítjuk. A halofuginontartalom meghatározását fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel és UV-detektor alkalmazásával végezzük.

#### 3. Reagensek

- 3.1. Acetonitril, HPLC minőségű.
- 3.2. Amberlite XAD-2 műgyanta
- 3.3. Ammónium-acetát
- 3.4. Etil-acetát
- 3.5. Jégecet
- 3.6. Halofuginon standard anyag (DL-transz-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil] quinazolin-4-(3H)-egy hidrobromid, E 764)
- 3.6.1. Halofuginon standard törzsoldat, 100 µg/ml

Mérjük be egy 500 ml-es mérőlombikba 0,1 mg pontossággal 50 mg halofuginont (3.6.), oldjuk fel ammónium-acetát pufferoldatban (3.18.), töltsük fel a lombikot jelig a pufferoldattal, majd keverjük el. Ezen oldat 5 °C hőmérsékleten és sötétben tárolva három héten át stabil marad.

#### 3.6.2. Kalibrálóoldatok

100 ml-es mérőlombikokba adagoljunk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 és 6,0 ml standard törzsoldatot (3.6.1.). A mozgófázissal (3.21.) töltsük fel jelig, és keverjük el. Ezen oldatok halofuginon-koncentrációja 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, illetve 6,0 µg/ml lesz. Az oldatokat használat előtt frissen kell elkészíteni.

- 3.7. Sósav ( $\rho_{20}$  megközelítőleg 1,16 g/ml)
- 3.8. Metil-alkohol
- 3.9. Ezüst-nitrát
- 3.10. Nátrium-aszkorbát
- 3.11. Nátrium-karbonát
- 3.12. Nátrium-klorid
- 3.13. EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav, dinátrium só)
- 3.14. Víz, HPLC minőségű
- 3.15. Nátrium-karbonát-oldat,  $c = 10$  g/100 ml
- 3.16. Nátrium-kloriddal telített nátrium-karbonát-oldat,  $c = 5$  g/100 ml
- Oldjunk fel 50 g nátrium-karbonátot (3.11.) vízben, hígítsuk fel 1 literre, és adjunk hozzá nátrium-kloridot (3.12.), amíg az oldat telített nem lesz.
- 3.17. Sósav, megközelítőleg 0,1 mól/l
- 10 ml HCl-t (3.7.) hígítsunk vízzel egy literre.
- 3.18. Ammónium-acetát pufferoldat, megközelítőleg 0,25 mól/l koncentrációjú
- Oldjunk fel 19,3 g ammónium-acetátot (3.3.) és 30 ml ecetsavat (3.5.) vízben (3.14.), és hígítsuk 1 literre.
- 3.19. Amberlite XAD-2 műgyanta előkészítése
- Megfelelő mennyiségű Amberlite-et (3.2.) mossunk addig vízzel, amíg az összes kloridiont el nem távolítottuk, mindezt ezüst-nitrátnak (3.20.) az előtött vizes fázishoz való hozzáadásával ellenőrizhetjük. Ezután mossuk ki a gyantát 50 ml metil-alkoholban (3.8.), öntsük le a metil-alkoholt, és a gyantát friss metil-alkohol alatt tároljuk.
- 3.20. Ezüst-nitrát oldat, megközelítőleg 0,1 mól/l
- Oldjunk fel 0,17 g ezüst-nitrátot (3.9.) 10 ml vízben.
- 3.21. HPLC mozgófázis
- Keverjünk el 500 ml acetonitrilt (3.1.) 300 ml ammónium-acetát pufferoldattal (3.18.) és 1 200 ml vízzel (3.14.). Az oldat pH-ját ecetsavval (3.5.) állítsuk be 4,3-ra. Szűrjük át egy 0,22  $\mu\text{m}$ -es szűrőn (4.8.) és gázmentesítsük az oldatot (pl. 10 percig tartó ultrahangos kezeléssel). Az oldat egy hónapon át stabil marad, ha zárt edényben, sötétben tároljuk.
4. **Eszközök**
- 4.1. Ultrahangos fürdő
- 4.2. Rotációs, vékonyfilmes bepárló
- 4.3. Centrifuga
- 4.4. HPLC-berendezés, változtatható hullámhosszú UV-detektorral vagy diódasoros detektorral
- 4.4.1. Folyadékkromatográfias oszlop, 300 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$ , 10  $\mu\text{m}$ -es töltet, vagy egy ezzel egyenértékű oszlop
- 4.5. Zsugorított üvegszűrővel és elzárócsappal ellátott üvegoszlop (300 mm  $\times$  10 mm)
- 4.6. Üvegszálás szűrők, 150 mm-es átmérővel

4.7. Membránszűrők, 0,45 µm-es.

4.8. Membránszűrők, 0,22 µm-es.

## 5. A vizsgálat módja

*Megjegyzés:* A halofuginon szabad bázis formájában nem stabil a lúgos és etil-acetát oldatokban. Harminc percnél tovább nem maradhat etil-acetátban.

### 5.1. Általános szabályok

5.1.1. Vizsgáljunk meg egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem halofuginon, sem interferáló anyagok nincsenek jelen.

5.1.2. A mintában találhatóval közel azonos mennyiségű halofuginonnal dúsított takarmányvakminta analízisével végezzük öt percen 80 °C-os vízfürdőbe. Miután visszahűlt szobahőmérsékletre, adjunk hozzá 20 ml nátrium-karbonát oldatot (3.15.), és keverjük össze, majd várjunk 10 percet, mielőtt folytatnánk a műveletet az extrahálással (5.2.).

*Megjegyzés:* Ennél a módszernél a takarmányvakminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen, amelyben az analízis során halofuginon nem mutatható ki.

### 5.2. Extrahálás

Egy 200 ml-es centrifugacsőbe 0,1 g-os pontossággal mérjük ki 10 g-ot az előkészített mintából, adjunk hozzá 0,5 g nátrium-aszkorbátot (3.10.), 0,5 g EDTA-oldatot (3.13.) és 20 ml vizet, majd keverjük össze. A csövet helyezzük öt percen 80 °C-os vízfürdőbe. Miután visszahűlt szobahőmérsékletre, adjunk hozzá 20 ml nátrium-karbonát oldatot (3.15.), és keverjük össze. Közvetlenül ezután adjunk hozzá 100 ml etil-acetátot (3.4.), és kézzel erősen rázzuk 15 másodpercen keresztül. Ezután tegyük a csövet három percig az ultrahangos fürdőbe (4.1.), és lazítsuk meg a dugóját. Centrifugáljuk két percen át, majd dekantáljuk az etil-acetát fázist egy üvegszálás szűrőn (4.6.) keresztül egy 500 ml-es választótölcsérbe. Ismételjük meg az extrahálást a mintán egy második 100 ml-es etil-acetát adaggal. Mossuk az elegyített kivonatot 50 ml nátrium-kloriddal telített nátrium-karbonát oldattal (3.16.) egy percen keresztül, és a vizes fázist öntsük el.

A szerves réteget 1 percen keresztül 50 ml sósavval (3.17.) extraháljuk. Az alsó savas réteget eresszük le egy 250 ml-es választótölcsérbe. A szerves réteget ismételten extraháljuk másfél percen keresztül további 50 ml sósavval, és elegyítsük az első kivonattal. Mossuk az elegyített savas kivonatot úgy, hogy megközelítőleg tíz másodpercig locsoljuk 10 ml etil-acetáttal (3.4.).

A vizes réteget teljes mennyiségben vigyük át egy 250 ml-es gömblombikba, és öntsük el a szerves fázist. A rotációs, vékonyfilmes bepárlókészülékkel (4.2.) párologtassuk el az összes visszamaradó etil-acetátot a savas oldatból. A vízfürdő hőmérséklete nem haladhatja meg a 40 °C-ot. Körülbelül 25 mbar vákuumban 38 °C-on az összes visszamaradt etil-acetát öt perc alatt elpárolog.

### 5.3. Tisztítás

#### 5.3.1. Az Amberlite-oszlop előkészítése

Minden mintakivonat számára külön XAD-2 oszlopot készítünk. Vigyük át metil-alkohollal (3.8.) 10 g előkészített Amberlite-et (3.19.) egy üvegoszlopba (4.5.). A gyantaágy tetejére tegyünk egy kis üvegvatta dugót. Eresszük le az oszlopról a metil-alkoholt, és 100 ml vízzel mossuk el a gyantát, de állítsuk meg az átfolyást, amikor a folyadék elérte a gyantaágy tetejét. Használat előtt, 10 percig engedjük, hogy az oszlop egyensúlyba kerüljön. Soha ne hagyjuk az oszlopot kiszáradni.

#### 5.3.2. A minta tisztítása

A kivonatot (5.2.) teljes mennyiségben vigyük át az előkészített Amberlite-oszlop (5.3.1.) tetejére, eluáljuk, majd az eluátumot öntsük el. Az eluálás sebessége nem lehet több, mint 20 ml/perc. Öblítsük el a gömblombikot 20 ml sósavval (3.17.), és ezt használjuk a gyantaoszlop elmosásához is. Légbefúvással távolítsunk el minden savoldat-maradékot. A mosóoldatot öntsük el. Adjunk 100 ml metil-alkoholt (3.8.) az oszlopra, és engedjük 5–10 ml-t eluálódni, miközben az eluátumot egy 250 ml-es gömblombikban fogjuk fel. Tíz percig hagyjuk, hogy a maradék metil-alkohol egyensúlyba kerüljön a műgyantával, majd folytassuk az eluálást maximum 20 ml/perc sebességen, miközben az eluátumot ugyanabban a gömblombikban fogjuk fel. A metil-alkoholt a rotációs, vékonyfilmes bepárlókészüléken párologtassuk el (4.2.), a vízfürdő hőmérséklete nem haladhatja meg a 40 °C-ot. A maradékot a mozgófázis (3.21.) segítségével teljes mennyiségben vigyük át egy 10 ml-es mérőlombikba. Mozgófázissal töltjük fel jelig, és keverjük el. Egy aliquot részt szűrjük át membránszűrőn (4.7.) Ezt az oldatot tegyük el a HPLC-meghatározáshoz (5.4.).

#### 5.4. HPLC-meghatározás

##### 5.4.1. Paraméterek

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

Folyadékkromatográfias oszlop (4.4.1.)

HPLC mozgófázis (3.21.)

Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/perc

Kimutatási hullámhossz: 243 nm

Befecskendezett mennyiség: 40–100 µl.

Ellenőrizzük a kromatográfias rendszer stabilitását oly módon, hogy 3,0 µg/ml koncentrációjú kalibrálóoldatot (3.6.2.) fecskendezünk be többször, amíg a csúcsmagasságok (vagy területek) és a retenciók idői állandóvá nem válnak.

##### 5.4.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibrálóoldatokat (3.6.2.), és mérjük meg az egyes koncentrációkhoz tartozó csúcsok magasságát (területét). Szerkesszünk kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibrálóoldatok átlagos csúcsmagasságait vagy területeit az ordinátatengelyen, a hozzájuk tartozó, µg/ml-ben kifejezett koncentrációkat pedig az abszcisszán ábrázoljuk.

##### 5.4.3. Mintaoldat

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibrálóoldatoknál használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatot (5.3.2.) egymás után többször, és határozzuk meg a halofuginoncsúcsok átlagos magasságát (területét).

#### 6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat halofuginoncsúcsainak átlagos magasságát (területét) a kalibrációs görbével (5.4.2.) egybevetve határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben.

A minta (mg/kg-ban kifejezett) *w* halofuginontartalmát az alábbi képlet segítségével kapjuk meg:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

ahol:

*c* : a mintaoldat halofuginon-koncentrációja, µg/ml-ben,

*m* : a mintadarab tömege grammal.

#### 7. Az eredmények validálása

##### 7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítása párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektor használatával erősíthető meg, amely során a mintakivonatot és a 6,0 µg/ml-es kalibrálóoldatot (3.6.2.) spektrumát hasonlítjuk össze.

##### 7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot megfelelő mennyiségű kalibrálóoldattal (3.6.2.) dúsítjuk. A hozzáadott halofuginon mennyiségének a mintakivonatotban található halofuginon becsült mennyiségével közel azonosnak kell lennie.

A hozzáadott mennyiséget és a kivonatot hígítását figyelembe véve, csak a halofuginoncsúcs emelkedhet. A csúcs szélességének a legnagyobb magasság felénél az eredeti szélesség ± 10 %-on belül kell lennie.

## 7.1.2. Diódasoros detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- a minta és a standard spektrumában a kromatogram csúcsmaximumán rögzített legnagyobb elnyeléshez tartozó hullámhossznak a detektor felbontóképessége által meghatározott tűréshatáron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűréshatár jellemzően  $\pm 2$  nm;
- 225 és 300 nm között a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsmaximumán rögzített spektruma nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen vizsgált ponton sem tér el a standard abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben;
- 225 és 300 nm között a mintakivonat által kiváltott csúcs felszálló ágának, csúcsmaximumának és leszálló ágának spektrumai nem térhetnek el egymástól a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a spektrumok egyetlen vizsgált ponton sem térnek el a csúcsmaximum spektruma abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezen kritériumok valamelyike nem teljesül, az analizált anyag jelenléte nem bizonyított.

## 7.2. Ismételtetés

Két azonos mintán végzett párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség 3 mg/kg halofuginontartalomig nem lehet több, mint 0,5 mg/kg.

## 7.3. Visszanyerés

A dúsított takarmányvakminta esetében legalább 80 %-os visszanyerési arányt kell elérni.

## 8. A körvizsgálat eredményei

Egy körvizsgálat <sup>(1)</sup> során három mintát analizáltak nyolc laboratóriumban.

## Eredmények

	A. minta (vak) átvételtkor	B. minta (takarmányliszt)		C. minta (granulátum)	
		átvételtkor	két hónap után	átvételtkor	két hónap után
Középérték [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S <sub>R</sub> [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV <sub>R</sub> [%]	—	16	18	14	17
vissza. [%]		86	74	88	75

ND = nem kimutatható

S<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság szórása

CV<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság relatív szórása (%)

vissza = visszanyerés (%)

## E. A ROBENIDIN MEGHATÁROZÁSA

1,3-bisz[(4-klorobenzilidén)amino]guanidin-hidroklorid

## 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányokban lévő robenidin szintjének meghatározását. A meghatározás határértéke 5 mg/kg.

<sup>(1)</sup> The Analyst 108., 1983, 1 252–1 256. o.



## 2. Vizsgálati alapelv

A mintát savas metil-alkohollal extraháljuk. A kivonatot szárítjuk, és egy aliquot részét alumínium-oxid oszlopon tisztítjuk. A robenidint az oszlopról metil-alkohollal eluáljuk, koncentrálnak, majd a mozgófázissal megfelelő térfogatra töltjük fel. A robenidintartalom meghatározását fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC), UV-detektor alkalmazásával végezzük.

## 3. Reagensek

### 3.1. Metil-alkohol

### 3.2. Savas metil-alkohol

Öntsünk át 4,0 ml sósavat ( $p_{20} = 1,18$  g/ml) egy 500 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig metil-alkohollal (3.1.), majd keverjük el. Ezt az oldatot használat előtt frissen kell elkészíteni.

### 3.3. Acetonitril, HPLC minőségű

### 3.4. Molekuláris szűrő

3A típusú, 8–12 szitaszemcse (1,6–2,5 mm-es szemcsék, kristályos alumínium-szilikát, 0,3 mm pórusátmérő)

### 3.5. Alumínium-oxid: I. savas aktivitási fokozatú anyag oszlopkromatográfias célra

Öntsünk át 100 g alumínium-oxidot egy megfelelő tárolóedénybe, és adjunk hozzá 2,0 ml vizet. Zárjuk le, és rázzuk kb. 20 percen keresztül. Jól lezárt tárolóedényben tartsuk.

### 3.6. Kálium-dihidrogén-foszfát-oldat, $c = 0,025$ mól/l

Oldjunk fel vízzel 3,40 g kálium-dihidrogén-foszfátot (HPLC minőségű) egy 1 000 ml-es mérőlombikban, töltsük fel jelig, és keverjük el.

### 3.7. Dinátrium-hidrogén-foszfát-oldat, $c = 0,025$ mól/l

Oldjunk fel 3,55 g vízmentes (vagy 4,45 g dehidrát, illetve 8,95 g dodekahidrát) dinátrium-hidrogén-foszfátot vízben (HPLC minőségű) egy 1 literes mérőlombikban, töltsük fel jelig, és keverjük el.

### 3.8. HPLC mozgófázis

Az alábbi reagenseket keverjük össze:

650 ml acetonitril (3.3.),

250 ml víz (HPLC minőségű),

50 ml kálium-dihidrogén-foszfát oldat (3.6.),

50 ml dinátrium-hidrogén-foszfát oldat (3.7.).

Szűrjük át egy 0,22  $\mu\text{m}$ -es szűrőn (4.6.) és gázmentesítsük az oldatot (pl. 10 percig tartó ultrahangos kezeléssel).

### 3.9. Standard anyag

Tiszta robenidin: 1,3-bisz[(4-klorobenzilidén)amino]guanidin-hidroklorid.

#### 3.9.1. Robenidin standard törzsoldat: 300 $\mu\text{g/ml}$

Mérjük ki 0,1 mg-os pontossággal 30 mg robenidin standard anyagot (3.9.). Oldjuk fel savas metil-alkohollal (3.2.) egy 100 ml-es mérőlombikban, töltsük fel jelig ugyanezzel az oldószerrel, és keverjük el. A lombikot tekerjük alumíniumfóliába, és tároljuk sötét helyen.

3.9.2. Robenidin közbenső standardoldat: 12 µg/ml

A standard törzsoldatból (3.9.1.) öntsünk át 10,0 ml-t egy 250 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig a mozgófázissal (3.8.), és keverjük el. A lombikot tekerjük alumíniumfóliába, és tároljuk sötét helyen.

3.9.3. Kalibrálóoldatok

50 ml-es mérőlombikokba adagoljunk 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 és 25,0 ml közbenső standardoldatot (3.9.2.). A mozgófázissal (3.8.) töltsük fel jelig, és keverjük el. Ezen oldatok 1,2, 2,4, 3,6, 4,8, illetve 6,0 µg/ml robenidin-koncentrációnak felelnek meg. Az oldatokat használat előtt frissen kell elkészíteni.

3.10. Víz, HPLC minőségű.

## 4. Eszközök

4.1. Üvegoszlop

Barna üvegből készült, elzáró csappal és egy megközelítőleg 150 ml-es tartállyal ellátott, 10–15 mm belső átmérőjű és 250 mm hosszú oszlop.

4.2. Mechanikus rázógépj vagy mágneses keverő

4.3. Rotációs vékonyréteges bepárló.

4.4. 250–400 mm-es érzékenységi tartományú HPLC-berendezés, változtatható hullámhosszú UV-detektorral vagy diódasoros detektorral

4.4.1. Folyadékromatográfiás oszlop: C<sub>18</sub>, 300 mm × 4 mm, 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.

4.5. Üvegszálás szűrőpapír (Whatman GF/A vagy azzal egyenértékű más papír)

4.6. Membránszűrők, 0,22 µm-es.

4.7. Membránszűrők, 0,45 µm-es.

## 5. A vizsgálat módja

*Megjegyzés:* A robenidin fényérzékeny. Minden műveletnél barna üvegeszközöket kell használni.

5.1. Általános szabályok

5.1.1. Vizsgáljunk meg egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem robenidin, sem interferáló anyagok nincsenek jelen.

5.1.2. A mintában találhatóval közel azonos mennyiségű robenidinnel dúsított takarmányvakminta (5.1.1.) analízisével végezzünk visszanyerési próbát. A 60 mg/kg-os szintre történő dúsításhoz öntsünk 3,0 ml standard törzsoldatot (3.9.1.) egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Az oldatot nitrogénáramban kb. 0,5 ml-re pároljuk be. Adjunk hozzá 15 g takarmányvakmintát, keverjük össze, és hagyjuk állni 10 percig, mielőtt folytatjuk a műveletet az extrahálással (5.2.).

*Megjegyzés:* Ehhez a módszerhez a takarmányvakminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen, amelyben az analízis során robenidin nem mutatható ki.

5.2. Extrahálás

Az előkészített mintából mérjük ki 15 g-t, 0,01 g-os pontossággal. Tegyük egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 100,0 ml savas metil-alkoholt (3.2.), zárjuk le, és rázassuk egy órán keresztül a rázógépen (4.2.). Az oldatot szűrjük át üvegszálás szűrőpapíron (4.5.), majd az egész szűrletet vegyük fel egy 150 ml-es Erlenmeyer-lombikban. Adjunk hozzá 7,5 g molekuláris szűrőt (3.4.), zárjuk le, és öt percig rázassuk. Azonnal szűrjük át egy üvegszálás szűrőpapíron. Ezt az oldatot használjuk a derítésnél (5.3.).

### 5.3. Derítés

#### 5.3.1. Az alumínium-oxid oszlop előkészítése

Az üvegoszlop (4.1.) alsó végébe illesszünk egy kis üvegvatta dugót, és üvegbottal tömködjük le egészen az aljára. Mérjük ki az előkészített alumínium-oxidból (3.5.) 11,0 g-ot, és öntsük át az oszlopba. Ügyeljünk arra, hogy az oszlop tartalma, a vizsgálat ezen szakaszában minél kevésbé legyen a levegő hatásának kitéve. Gyengéden ütögetjük a megtöltött oszlop alsó végét, hogy a benne lévő alumínium-oxid leülepedjen.

#### 5.3.2. A minta derítése

Az (5.2.) pontban előkészített mintakivonatból 5,0 ml-t pipetázzunk az oszlop tetejére. A pipetta csúcsát az oszlop falának közelébe fektessük, és hagyjuk, hogy az oldatot az alumínium-oxid elnyelje. 100 ml metil-alkohol (3.1.) segítségével, 2–3 ml/perc átfolyási sebességgel eluáljuk a robenidint az oszlopról, és vegyük fel az eluátumot egy 250 ml-es gömblombikban. Csökkentett nyomáson, 40 °C hőmérsékleten egy rotációs, vékonyfilmes bepárló (4.3.) segítségével teljes száradásig párologjuk be a metil-alkoholt. A maradékot újra oldjuk fel 3–4 ml mozgófázisban (3.8.), és öntsük át teljes mennyiségben egy 10 ml-es mérőlombikba. Többször öblítsük el a lombikot 1–2 ml mozgófázissal, és az öblítő folyadékot is öntsük bele a mérőlombikba. Töltsük fel jelleg ugyanazzal az oldószerezrel, majd keverjük el. Egy aliquot részt szűrjük át egy 0,45 µm-es membránszűrőn (4.7.). Ezt az oldatot tegyük el a HPLC-meghatározáshoz (5.4.).

### 5.4. HPLC-meghatározás

#### 5.4.1. Paraméterek

Az alábbi vizsgálati feltételek csak útmutatásként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak:

Folyadékkromatográfias oszlop (4.4.1.)

HPLC mozgófázis (3.8.)

Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/perc

Kimutatási hullámhossz: 317 nm

Befecskendezett mennyiség: 20–50 µl.

Ellenőrizzük a kromatográfias rendszer stabilitását oly módon, hogy 3,6 µg/ml anyagot tartalmazó kalibrálóoldatot (3.9.3.) fecskendezünk be többször, míg a csúcsok magassága és a retenciós idők állandóvá nem válnak.

#### 5.4.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibrálóoldatokat (3.9.3.), és mérjük meg az egyes koncentrációkhoz tartozó csúcsok magasságát (területét). A kalibrálóoldatok átlagos magassága vagy területe legyen az ordinátatengelyen, a megfelelő koncentrációk µg/ml-ben az abszcisszán, és ennek alapján szerkesszünk kalibrációs görbét.

#### 5.4.3. Mintaoldat

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibrálóoldatoknál használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatot (5.3.2.) egymás után többször, és határozzuk meg a robenidincsúcsok átlagos magasságát (területét).

### 6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat robenidincsúcsainak átlagmagasságából (területéből) határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben a kalibrációs görbe (5.4.2.) alapján.

A minta, (mg/kg-ban kifejezett) *w* robenidintartalmát az alábbi képlet segítségével kapjuk meg:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

ahol:

*c* = a mintaoldat robenidin-koncentrációja, µg/ml-ben,

*m* = a mintadarab tömege grammban.

## 7. Az eredmények validálása

### 7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítását párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektorral lehet megerősíteni, amely során a mintakivonat és a 6,0 µg/ml robenidint tartalmazó kalibrálóoldat (3.9.3.) spektrumát hasonlítjuk össze.

#### 7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot megfelelő mennyiségű kalibrálóoldattal (3.9.3.) dúsítjuk. A hozzáadott robenidin mennyisége és a mintakivonatban található robenidin becsült mennyisége közel azonos legyen.

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat hígítását figyelembe véve, csak a robenidincsúcs 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 és a standard spektrumában a kromatogram csúcsmaximumán rögzített legnagyobb elnyeléshez tartozó hullámhossznak a detektor felbontóképessége által meghatározott tűrészhatáron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűrészhatár jellemzően  $\pm 2$  nm;
- 250 és 400 nm között a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsmaximumán rögzített spektruma nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen vizsgált ponton sem tér el a standard abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben;
- 250 és 400 nm között a mintakivonat által kiváltott csúcs felszálló ágának, csúcsmaximumának és leszálló ágának spektrumai nem térhetnek el egymástól a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a spektrumok egyetlen vizsgált ponton sem térnek el a csúcsmaximum spektruma abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezen kritériumok valamelyike nem teljesül, az analizált anyag jelentéte nem bizonyított.

### 7.2. Ismételtetés

Két azonos mintán végzett párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség, 15 mg/kg-nál magasabb robenidintartalom esetén, nem haladhatja meg a magasabb érték 10 %-át.

### 7.3. Visszanyerés

A dúsított vakminta esetében legalább 85 %-os visszanyerési arányt kell elérni.

## 8. A körvizsgálat eredményei

Az EK körvizsgálatot szervezett, amely során őrlemény, illetve pellet formájában négy baromfi- és négy nyúltakarmánymintát elemeztek, 12 laboratóriumban. Minden mintán kettős analízist végeztek. Az eredményeket az alábbi táblázat mutatja.

	Baromfi		Nyúl	
	Őrlemény	Pellet	Őrlemény	Pellet
Középérték [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
$s_r$ [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
$CV_r$ [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
$S_R$ [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
$CV_R$ [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Visszanyerés [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

$s_r$  = az ismételtetés szórása

$CV_r$  = az ismételtetés relatív szórása, %

$S_R$  = a reprodukálhatóság szórása

$CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

## F. DIKLAZURIL MEGHATÁROZÁSA

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

## 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a takarmányokban és előkeverékekben lévő diklazuril meghatározását. A kimutatási határérték 0,1 mg/kg, a meghatározás határértéke 0,5 mg/kg.

## 2. Vizsgálati alapelv

Egy belső standard hozzáadását követően a mintát savas metil-alkohollal extraháljuk. A takarmányok esetében a kivonat egy aliquot részét C<sub>18</sub> szilárdfázisú extrahálótöltetben derítjük. A diklazurilt savas 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 diklazuriltartalmat háromkomponensű, fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzuk meg, UV-detektor használatával.

## 3. Reagensok

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, ρ<sub>20</sub> = 1,19 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-fel (3.6.) és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába, vagy használjunk barna üveglombikot, és tároljuk hűtőben. 4 °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.8.2. Diklazuril standardoldat, 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 barna üveglombikot, és tároljuk hűtőben. 4 °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.9. Belső standard anyag: 2,6 dikloro-α-(4-klorofeńil)-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.

Mérjük 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 barna üveglombikot, és tároljuk hűtőben. 4 °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.9.2. Belső standardoldat, 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 barna üveglombikot, és tároljuk hűtőben. 4 °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.9.3. Belső standardoldat előkeverékekhez, p/1 000 mg/ml

(p = az előkeverék névleges diklazuriltartalma, mg/kg-ban kifejezve)

Mérjük be 0,1 mg-os pontossággal p/10 mg belső standardoldatot 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 barna üveglombikot, és tároljuk hűtőben. 4 °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.

3.10. Kalibrálóoldat, 2 µg/ml.

Pipetázzunk 2,00 ml diklazuril standardoldatot (3.8.2.) és 2,00 ml belső standardoldatot (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. C<sub>18</sub> szilárdfázisú extrahálótöltet, pl. Bond Elut, méret: 1 cm<sup>3</sup>, szorbens tömege: 100 mg.

3.12. Extraháló oldószer: savas metil-alkohol.

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

3.13. Mozgófázis a HPLC-hez:

3.13.1. A-eluens: ammónium-acetát – tetrabutylammónium-hidrogénszulfát oldat.

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 rázógépj

4.2. Felszerelés a háromkomponensű HPLC-hez.

4.2.1. Hypersil ODS folyadékkromatográfias 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. Rotációs vékonyréteges bepárló.

4.4. Membránszűrő, 0,45 µm

4.5. Vákuumos elosztóvezeték.

4.6. Ultrahangos fürdő

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *Általános szabályok*

5.1.1. Takarmányvakminta

Vizsgáljunk meg egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem diklazuril, sem interferáló anyagok nincsenek jelen. A takarmányvakminta 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 közel azonos mennyiségű diklazurillel dúsított takarmányvakminta analízisével. Az 1 mg/kg szintre való dúsításhoz adjunk 0,1 ml standard törzsoldatot (3.8.1.) 50 g takarmányvakmintához, keverjük össze alaposan, és hagyjuk állni 10 percig, keverjük össze néhányszor, mielőtt folytatjuk a műveletet (5.2.).

Amennyiben a mintával megegyező takarmányfajtából vett takarmányvakminta nem áll rendelkezésre (lásd az 5.1.1. pontot), a visszanyerési próbát a standard hozzáadási módszerrel lehet elvégezni. Ebben az esetben a vizsgált mintát a mintában meglévővel azonos mennyiségű diklazurillal dúsítjuk. Ezt a mintát a nem dúsított mintával együtt elemezzük, és a visszanyerést kivonással számítjuk ki.

## 5.2. Extrahálás

### 5.2.1. Takarmány

0,01 g pontossággal mérjük ki 50 g mintát. Öntsük át egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 1,00 ml belső standardoldatot (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 extrahálótöltetbe (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 műveletet 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 standardoldatot (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 diklazuriltartalma) aliquot részét öntsük át egy megfelelő méretű gömbömbikba. 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 útmutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak.

Folyadékkromatográfiaszlop (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm méretű, Hypersil ODS 3 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés
Mozgófázis:	A-eluens (3.13.1): ammónium-acetát-tetrabutilammónium-hidrogén-szulfát vizes oldata B-eluens (3.13.2): acetonitril C-eluens(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-eluenssel 10 percig.
Átáramlási sebesség:	1,5–2 ml/perc
Befecskendezett mennyiség:	20 µl.
Kimutatási hullámhossz:	280 nm

Ellenőrizzük a kromatográfias rendszer stabilitását oly módon, hogy 2 µg/ml-es kalibrálóoldatot (3.10.) fecskendezünk be többször, amíg a csúcsok magassága és a retenciósi idők állandóvá nem válnak.

### 5.3.2. Kalibrálóoldat

Fecskendezzünk be 20 µl kalibrálóoldatot (3.10.) néhány alkalommal, és határozzuk meg a diklazurilcsúcsok és a belső standard csúcsok átlagmagasságát (területét).

### 5.3.3. Mintaoldat

Fecskendezzünk be 20 µl mintaoldatot (5.2.1. vagy 5.2.2.) egymás után többször, és határozzuk meg a diklazurilcsúcsok és a belső standard csúcsok átlagmagasságát (területét).

## 6. Az eredmények kiszámítása

### 6.1. Takarmányok

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

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

ahol:

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

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

$h_{d,c}$  = a kalibrálóoldatban (3.10.) lévő diklazuril csúcsmagassága (területe)

$h_{i,c}$  = a kalibrálóoldatban (3.10.) lévő belső standard csúcsmagassága (területe)

$c_{d,c}$  = a diklazuril µg/ml-ben kifejezett koncentrációja a kalibrálóoldatban (3.10.)

$m$  = a mintadarab tömege grammban

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

### 6.2. Előkeverékek

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

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

ahol:

$h_{d,c}$  = a kalibrálóoldatban (3.10.) lévő diklazuril csúcsmagassága (területe)

$h_{i,c}$  = a kalibrálóoldatban (3.10.) lévő belső standard csúcsmagassága (területe)

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

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

$c_{d,c}$  = a diklazuril µg/ml-ben kifejezett koncentrációja a kalibrálóoldatban (3.10.)

$m$  = a mintadarab tömege grammban

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

$p$  = az előkeverék névleges diklazuriltartalma, mg/kg-ban kifejezve

## 7. Az eredmények validálása

### 7.1. Azonosítás

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

#### 7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot (5.2.1. vagy 5.2.2.) megfelelő mennyiségű kalibrálóoldattal (3.10.) dúsítjuk. A hozzáadott diklazuril mennyisége közel azonos legyen a mintakivonatban meglévő diklazuril mennyiségével.

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat hígítását figyelembe véve, csak a diklazuril csúcs és a belső standard csúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének a legnagyobb magasság 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 minta és a standard spektrumában a kromatogram csúcsmaximumán rögzített legnagyobb elnyeléshez tartozó hullámhossznak a detektor felbontóképessége által meghatározott tűrőhatáron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűrőhatár jellemzően  $\pm 2$  nm.
- 230 és 320 nm között a spektrumnak a relatív abszorbanancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsmaximumán rögzített spektruma nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen vizsgált ponton sem tér el a standard abszorbananciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.



- c) 230 és 320 nm között a mintakivonat által kiváltott csúcs felszálló ágának, csúcsmaximumának és leszálló ágának spektrumai nem térhetnek el egymástól a spektrumnak a relatív abszorbanca 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a spektrumok egyetlen vizsgált ponton sem térnek el a csúcsmaximum spektruma abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezen kritériumok valamelyike nem teljesül, az analizált anyag jelentéte nem bizonyított.

#### 7.2. Ismételtetés

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

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

#### 7.3. Visszanyerés

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

### 8. A körvizsgálat eredményei

Körvizsgálatot szerveztek, amely során öt mintát elemeztek 11 laboratóriumban. A minták két előkeverékből álltak; az egyiket egy szerves mátrixszal (O 100), a másikat egy szervetlen mátrixszal (A 100) keverték össze. Az elméleti diklazuriltartalom 100 mg/kg. A három baromfitakarmány-keverék három különböző gyártótól származott (NL) (L1/Z1/K1). Az elméleti diklazuriltartalom 1 mg/kg. A laboratóriumokat utasították, hogy a vizsgálatokat egyszer vagy kétszeres ismétléssel vizsgálják. (Erre a körvizsgálatra vonatkozóan részletesebb információk találhatóak a következő helyen: *Journal of AOAC International*, 77. évfolyam, 6. szám, 1994, 1359–1361. o.). Az eredmények a következő táblázatban szerepelnek.

	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	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S <sub>r</sub> (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV <sub>r</sub> (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S <sub>R</sub> (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV <sub>R</sub> (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Névleges tartalom mg/kg)	100	100	1	1	1

- L = a laboratóriumok száma  
n = az egyedi értékek száma  
S<sub>r</sub> = az ismételtetés szórása  
CV<sub>r</sub> = az ismételtetés relatív szórása  
S<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság szórása  
CV<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság relatív szórása

### 9. Észrevételek

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

#### G. A LAZALOCID-NÁTRIUM MEGHATÁROZÁSA

A *Streptomyces lasaliensis* által termelt poliéter-monokarboxilsav nátriumsója

**1. Cél és alkalmazási terület**

A módszer a takarmányok és az előkeverékek lazalocid-nátrium-tartalmának meghatározására szolgál. A kimutatási határérték 5 mg/kg, a meghatározás határértéke 10 mg/kg.

**2. Vizsgálati alapelv**

A lazalocid-nátriumot a mintából savas metil-alkohollal extraháljuk, majd fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC), spektrofotometriás detektor segítségével határozzuk meg.

**3. Reagensok**

3.1. Kálium-dihidrogén-foszfát ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

3.2. Ortofoszforsav, w (w/w) = 85 %

3.3. Ortofoszforsav oldat, c = 20 %

Hígítsunk fel vízzel 23,5 ml ortofoszforsavat (3.2.) 100 ml-re.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetil-hexilamin), w (w/w) = 99 %

3.5. Metil-alkohol, HPLC minőségű

3.6. Sósav, d = 1,19 g/ml

3.7. Foszfátpuffer-oldat, c = 0,01 mól/l

Oldjunk fel 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ot (3.1.) 500 ml vízben (3.11.), adjunk hozzá 3,5 ml ortofoszforsavat (3.2.) és 10,0 ml 6-metil-2-heptilamint (3.4.). Állítsuk be a pH-t 4,0-re ortofoszforsav-oldattal (3.3.), és hígítsuk fel vízzel 1 000 ml-re (3.11.).

3.8. Savas metil-alkohol

Öntsünk 5,0 ml sósavat (3.6.) egy 1 000 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig metil-alkohollal (3.5.), és keverjük össze. Ezt az oldatot közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

3.9. A HPLC mozgófázis, foszfátpuffer-metil-alkohol-oldat, 5 + 95 (V + V)

Keverjük össze 5 ml foszfátpuffer-oldatot (3.7.) 95 ml metil-alkohollal (3.5.).

3.10. Lazalocid-nátrium garantált tisztaságú standard anyag,  $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$  (a poliéter-monokarboxilsav nátriumsója, amelyet a *Streptomyces lasaliensis* termel), E763

3.10.1. Lazalocid-nátrium standard törzsoldat, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Mérjünk be 0,1 mg-os pontossággal 50 mg lazalocid-nátriumot (3.10.) egy 100 ml-es mérőlombikba, oldjuk fel savas metil-alkoholban (3.8.), töltsük fel jelig ugyanezzel az oldószerral, és keverjük össze. Ezt az oldatot használat előtt frissen kell elkészíteni.

3.10.2. Lazalocid-nátrium közbenső standardoldat, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Pipetázzunk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.10.1.) egy 100 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig savas metil-alkohollal (3.8.), és keverjük össze. Ezt az oldatot közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

### 3.10.3. Kalibrálóoldatok

50 ml-es mérőlombikokba öntsünk 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, illetve 10,0 ml közbenső standardoldatot (3.10.2.). Öntsük fel jelig savas metil-alkohollal (3.8.), és keverjük össze. Ezek az oldatok egyenként 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 és 10,0 µg/ml lazalocid-nátriumnak felelnek meg. Ezen oldatokat közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.

### 3.11. Víz, HPLC minőségű

## 4. Eszközök

4.1. Ultrahangos fürdő (vagy vízfürdős rázó gép), hőmérséklet-szabályozóval

4.2. Membránszűrők, 0,45 µm

4.3. HPLC-berendezés injektáló rendszerrel, 20 µl-nyi injektálási lehetőséggel.

4.3.1. Folyadékromatográfiás oszlop 125 mm × 4 mm, fordított fázisú C<sub>18</sub>, 5 µm-es töltet vagy ezzel egyenértékű berendezés

4.3.2. Spektrofluoriméter, változtatható gerjesztési és emissziós hullámhossz-szabályozással

## 5. A vizsgálat módja

### 5.1. Általános szabályok

#### 5.1.1. Takarmányvakminta

A visszanyerési próba (5.1.2.) elvégzése érdekében elemezzünk egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem lazalocid-nátrium, sem egyéb interferáló anyag nincs jelen. A takarmányvakminta a mintához hasonló típusú legyen, és benne lazalocid-nátrium vagy más interferáló anyag ne legyen kimutatható.

#### 5.1.2. Visszanyerési próba

Végezzünk visszanyerési próbát egy olyan takarmányvakminta analizálásával, amelyet a mintában jelen lévőhöz hasonló mennyiségű lazalocid-nátriummal dúsítottak. 100 mg/kg-os szintre történő dúsításhoz öntsünk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.10.1.) egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, és pároljuk be az oldatot kb. 0,5 ml-re. Adjunk hozzá 50 g takarmányvakmintát, keverjük össze alaposan, és hagyjuk állni 10 percig, majd keverjük össze újra néhányszor, mielőtt az extrahálással (5.2.) folytatjuk a műveletet.

Amennyiben a mintával megegyező takarmányfajtából vett takarmányvakminta nem áll rendelkezésre (lásd az 5.1.1. pontot), a visszanyerési próbát a standard hozzáadási módszerrel lehet elvégezni. Ebben az esetben az analizálandó mintát a mintában már meglévővel közel azonos mennyiségű lazalocid-nátriummal dúsítjuk. Ezt a mintát a nem dúsított mintával együtt analizáljuk, a visszanyerést kivonással számítjuk ki.

### 5.2. Extrahálás

#### 5.2.1. Takarmány

Mérjünk be 0,01 g-os pontossággal 5–10 g mintát egy dugós, 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Pipettával adjunk hozzá 100,0 ml savas metil-alkoholt (3.8.). Dugaszoljuk le lazán, és keverjük, míg diszperziót nem kapunk. Helyezzük a lombikot körülbelül 40 °C-os ultrahangos fürdőbe (4.1.) 20 percre, majd vegyük ki, és hűtsük le szobahőmérsékletre. Hagyjuk állni kb. 1 óráig, amíg a szuszpendált anyag leülepszik, majd egy 0,45 µm-es membránszűrőn (4.2.) szűrjük egy aliquot részt egy megfelelő edénybe. Folytassuk a műveletet a HPLC-meghatározással (5.3.).

#### 5.2.2. Előkeverékek

Mérjünk be 0,001 g-os pontossággal 2 g öröletlen előkeveréket egy 250 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 100,0 ml savas metil-alkoholt (3.8.), és keverjük, amíg diszperziót nem kapunk. Helyezzük a mérőlombikot tartalmával együtt kb. 40 °C-os ultrahangos fürdőbe (4.1.) 20 percre, majd vegyük ki, és hűtsük le szobahőmérsékletre. Hígítsuk a jelleg savas metil-alkohollal (3.8.), és alaposan keverjük össze. Hagyjuk állni 1 óráig, amíg a szuszpendált anyag leülepszik, majd egy 0,45 µm-es membránszűrőn (4.2.) szűrjük át egy aliquot részt. Hígítsuk a tiszta filtrátum megfelelő mennyiségét savas metil-alkohollal (3.8.), hogy így kb. 4 µg/ml lazalocid-nátriumot tartalmazó végső vizsgálati oldatot kapjunk. Folytassuk a műveletet a HPLC-meghatározással (5.3.).

## 5.3. HPLC-meghatározás

## 5.3.1. Paraméterek

A következő paraméterek iránymutatásul szolgálnak; más paraméterek is alkalmazhatók, feltéve, hogy egyenértékű eredményeket adnak:

Folyadékromatográfiás oszlop (4.3.1) 125 mm × 4 mm, fordított fázisú C<sub>18</sub>, 5 µm-es töltet vagy egy ezzel egyenértékű berendezés  
 Mozgófázis (3.9.): Foszfátpuffer-oldat (3.7.) és metil-alkohol (3.5.) keveréke, 5 + 95 (V + V)  
 Átáramlási sebesség: 1,2 ml/perc.  
 Kimutatási hullámhossz:  
     gerjesztés: 310 nm  
     emisszió: 419 nm  
 Befecskendezett mennyiség: 20 µl

Ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását oly módon, hogy 4,0 µg/ml-es koncentrációjú kalibrálóoldatot (3.10.3.) fecskendezünk be többször, amíg a csúcsmagasságok (vagy területek) és retenciósidők állandóvá nem válnak.

## 5.3.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibrálóoldatokat (3.10.3.), és határozzuk meg az egyes koncentrációk átlagos csúcsmagasságait (területeit). Készítsük el a kalibrációs görbét úgy, hogy az átlagos csúcsmagasságokat (területeket) az ordinátán, a µg/ml-ben kifejezett megfelelő koncentrációkat az abszcisszán ábrázoljuk.

## 5.3.3. Mintaoldat

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibrálóoldatoknál használtunk, fecskendezzük be az 5.2.1. vagy 5.2.2. pont szerint nyert mintakivonatokat egymás után többször, és határozzuk meg a lazalocid-nátrium-csúcsok átlagos csúcsmagasságait (területeit).

## 6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat (5.3.3.) befecskendezése után kapott átlagos csúcsmagasságokból (területekből), a kalibrációs görbe alapján határozzuk meg a lazalocid-nátrium koncentrációját µg/ml-ben.

## 6.1. Takarmány

A minta *w* lazalocid-nátrium-tartalma (mg/kg) a következő képlet szerint adható meg:

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

ahol:

*c* = a mintaoldat (5.2.1.) µg/ml-ben kifejezett lazalocid-nátrium koncentrációja  
*V*<sub>1</sub> = a mintakivonat, 5.2.1. pont szerint ml-ben megadott (= 100) térfogata  
*m* = a vizsgálati adag tömege, g-ban.

## 6.2. Előkeverékek

A minta *w* lazalocid-nátrium-tartalma (mg/kg) a következő képlet szerint adható meg:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

ahol:

*c* = a mintaoldat (5.2.2.) µg/ml-ben megadott lazalocid-nátrium koncentrációja  
*V*<sub>2</sub> = a mintakivonat 5.2.2. pont szerint ml-ben megadott (= 250) térfogata  
*f* = az 5.2.2. pont szerinti hígítási tényező  
*m* = a vizsgálati adag tömege, g-ban.

## 7. Az eredmények validálása

## 7.1. Azonosítás

A spektrofluorimetrián alapuló módszerek kevésbé érzékenyek az interferenciára, mint azok az eljárások, amelyek során UV-detektort használnak. Az analizált anyag azonossága párhuzamos kromatografiával ellenőrizhető.

## 7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot (5.2.1. vagy 5.2.2.) megfelelő mennyiségű kalibrálóoldattal (3.10.3.) dúsítjuk. A hozzáadott lazalocid-nátrium mennyisége közel azonos legyen a mintaoldatban található lazalocid-nátrium mennyiségével. A hozzáadott lazalocid-nátrium mennyiségét és a kivonat hígulását figyelembe véve csak a lazalocid-nátrium csúcsmagassága emelkedhet. A csúcs szélességének a legnagyobb magasság felénél a nem dúsított mintakivonat eredeti csúcsszélessége  $\pm 10\%$ -on belül kell lennie.

## 7.2. Ismételtetőség

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

- 30–100 mg/kg közötti lazalocid-nátrium-tartalom esetén a magasabb érték 15 %-át,
- 100–200 mg/kg közötti lazalocid-nátrium-tartalom esetén a 15 mg/kg értéket,
- 200 mg/kg-nál nagyobb lazalocid-nátrium-tartalom esetén a magasabb érték 7,5 %-át.

## 7.3. Visszanyerés

A dúsított (vakpróba) takarmányminta esetében a visszanyerés foka legalább 80 %-os legyen. A dúsított előkeverék-minta esetében legalább 90 %-os visszanyerési arányt kell elérni.

## 8. A körvizsgálat eredményei

Körvizsgálat (\*) keretében 12 laboratóriumban 2 előkeveréket (1. és 2. minta) és 5 takarmányt (3–7. minta) vizsgáltak. Minden mintán kettős analízist végeztek. Az eredmények a következő táblázatban szerepelnek:

	1. minta Csirke-elő- keverék	2. minta Pulyka-elő- keverék	3. minta Pulykapel- let	4. minta Csirke- derce	5. minta Pulykatak- armány	6. minta Baromfi A. takarmány	7. minta Baromfi B. takarmány
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Középpérték [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
$s_r$ [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
$CV_r$ [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
$s_R$ [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
$CV_R$ [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Névleges tartal- lom mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(\*) Gyártó által feltüntetett tartalom.

(\*\*) Laboratóriumban készített takarmány.

L = a laboratóriumok száma

n = az egyedi értékek száma

$s_r$  = az ismételtetőség szórása

$s_R$  = a reprodukálhatóság szórása

$CV_r$  = az ismételtetőség relatív szórása, %

$CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

## V. MELLÉKLET

## ANALITIKAI MÓDSZEREK A TAKARMÁNYOKBAN LÉVŐ NEMKÍVÁNATOS ANYAGOK ELLENŐRZÉSÉRE

## A. A SZABAD ÉS AZ ÖSSZES GOSSZIPOL MEGHATÁROZÁSA

## 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer lehetővé teszi a szabad gosszipol, az összes gosszipol és a kémiai rokon anyagok mennyiségi meghatározását a gyapotmagban, a gyapotmaglisztben és a gyapotmagpogácsában, valamint az ezen takarmány-alapanyagokat tartalmazó összetett takarmányokban, amennyiben több mint 20 mg/kg mennyiségben van jelen szabad gosszipol, összes gosszipol vagy kémiai rokon anyag.

## 2. Vizsgálati alapelv

A gosszipolt 3-aminopropán-1-ol jelenlétében, vagy propán-2-ol és hexán keverékével (a szabad gosszipol meghatározása esetén), vagy dimetil-formamiddal (az összes gosszipol meghatározása esetén) extraháljuk. A gosszipol anilinnel gosszipol-dianilinné alakul, amelynek optikai sűrűségét 440 nm-nél mérjük.

## 3. Reagensok

- 3.1. Propán-2-ol-hexán keverék: keverjük össze 60 térfogategységnyi propán-2-ol-t 40 térfogategységnyi *n*-hexánnal.
- 3.2. A. oldószer: tegyünk 1 literes mérőlombikba kb. 500 ml propán-2-ol-hexán keveréket (3.1.), 2 ml 3-aminopropán-1-ol-t, 8 ml jégecetet, valamint 50 ml vizet. Töltsük fel térfogatra a propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.). Ez a reagens egy hétig stabil.
- 3.3. B. oldószer: pipetázzunk 2 ml 3-aminopropán-1-ol-t és 10 ml jégecetet egy 100 ml-es mérőlombikba. Hűtsük le szobahőmérsékletre, és töltsük fel térfogatra N,N-dimetil-formamiddal. Ez a reagens egy hétig stabil.
- 3.4. Anilin: ha a vakpróba optikai sűrűsége meghaladja a 0,022-t, pároljuk le az anilint cinkpor fölött, és öntsük el a párlat első és utolsó 10-10 %-át. Lehűtve és barna, lezáró üveglombikban tárolva a reagens több hónapig eláll.
- 3.5. Gosszipol-A standardoldat: tegyünk 27,9 mg gosszipol-acetátot egy 250 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel, és töltsük fel térfogatra az A. oldószerrel (3.2.). Pipetázzunk 50 ml-t ebből az oldatból egy 250 ml-es mérőlombikba, és töltsük fel térfogatra az A. oldószerrel. Ennek az oldatnak a gosszipolkoncentrációja 0,02 mg/ml. Használat előtt hagyjuk egy órán át szobahőmérsékleten állni.
- 3.6. Gosszipol-B standardoldat: tegyünk 27,9 mg gosszipol-acetátot egy 50 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel, és töltsük fel térfogatra a B. oldószerrel (3.3.). Ennek az oldatnak a gosszipolkoncentrációja 0,5 mg/ml.

Ha fénytől védve tároljuk, a gosszipol-A és -B standardoldat 24 órán át stabil marad.

## 4. Eszközök

- 4.1. Billenődobos keverőgép: körülbelül 35 fordulat/perc.
- 4.2. Spektrofotométer.

## 5. A vizsgálat módja

## 5.1. A vizsgálati minta

A vizsgálati minta mennyisége a minta feltételezett gosszipoltartalmától függ. Jobb kisebb mennyiségű vizsgálati mintával dolgozni, és a szűrlet viszonylag nagyobb mennyiségű aliquot részét használni, hogy elegendő mennyiségű gosszipolt nyerjünk, amely precíz fotometriás mérést tesz lehetővé. A gyapotmag, a gyapotmagliszt és a gyapotmagpogácsa szabad gosszipoltartalmának mérésére a vizsgálati minta mennyisége ne haladja meg az 1 g-ot, összetett takarmányok vizsgálata során a minta mennyisége akár 5 g is lehet. A szűrlet 10 ml-nyi aliquot része a legtöbb esetben megfelelő: ez kb. 50–100 µg gosszipolt tartalmaz. Az összes gosszipoltartalom meghatározásához a vizsgálati minta mennyisége 0,5 és 5 g között legyen, így a szűrlet 2 ml-nyi aliquot része kb. 40–200 µg gosszipolt fog tartalmazni.

A vizsgálatokat kb. 20 °C-os szobahőmérsékleten kell végezni.

## 5.2. A szabad gosszipoltartalom meghatározása

Tegyünk a vizsgálati mintát egy 250 ml-es, csiszolatos lombikba, amelynek az alján üvegzúzalékot helyeztünk el. Pipetázzunk 50 ml A. oldószert (3.2.) a lombikba, zárjuk le a lombikot, és keverjük egy órán át a keverőben. Szűrjük át egy száraz szűrőn, és gyűjtsük össze a szűrletet egy kis, csiszolatos lombikban. Szűrés közben fedjük be a tölcseért egy óraüveggel.

Pipetázzunk azonos aliquot mennyiségű, 50–100 µg gosszipolt tartalmazó szűrletet két, 25 ml-es mérőlombikba (A. és B. jelű). Ha szükséges, töltsük fel a mintát 10 ml-re az A. oldószerral (3.2.). Ezután töltsük fel térfogatra az A. jelű lombikot propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.). Ezt az oldatot referenciaoldatként használjuk, amellyel szemben a mintaoldatot mérjük.

Pipetázzunk 10–10 ml A. oldószert (3.2.) két másik, 25 ml-es mérőlombikba (C. és D. jelű). Töltsük fel a C. jelű lombik tartalmát térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.). Ezt az oldatot referenciaoldatként használjuk, amellyel szemben a vakpróbaoldatot mérjük.

Adjunk 2-2 ml anilint (3.4.) a D. és a B. jelű lombikhoz. Hevítsük ezeket 30 percen át forró vízfürdő fölött, hogy tartalmuk elszíneződjön. Hűtsük le szobahőmérsékletűre, és töltsük fel tartalmukat térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.), homogenizáljuk, majd hagyjuk állni egy órán át.

Határozzuk meg a D. jelű vakpróbaoldat optikai sűrűségét a C. jelű referenciaoldattal összehasonlítva, és a B. jelű mintaoldat optikai sűrűségét az A. jelű referenciaoldattal összehasonlítva egy spektrofotométerrel, 440 nm-nél, 1 cm-es üvegvéküvetéket használva.

Vonjuk ki a vakpróbaoldat optikai sűrűségét a mintaoldat optikai sűrűségéből (= korrigált optikai sűrűség). Ebből az értékből a 6. pontban leírtak szerint számítsuk ki a szabad gosszipoltartalmat.

## 5.3. Az összes gosszipoltartalom meghatározása

Tegyünk egy 1–5 mg gosszipolt tartalmazó vizsgálati mintát egy 50 ml-es mérőlombikba, és adjunk hozzá 10 ml B. oldószert (3.3.). Készítsünk ezzel párhuzamosan egy vakpróbaoldatot is úgy, hogy 10 ml B. oldószert (3.3.) teszünk egy másik, 50 ml-es mérőlombikba. Hevítsük a két lombikot forró vízfürdő fölött 30 percen át. Hűtsük le a lombikokat szobahőmérsékletűre, és töltsük fel tartalmukat térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.). Homogenizáljuk, és hagyjuk ülepedni 10–15 percig, utána szűrjük át, majd gyűjtsük össze a szűrletet csiszolatos lombikokba.

A mintaszűrletből pipetázzunk 2–2 ml-t két, 25 ml-es mérőlombikba, és a vakpróbaszűrletből is pipetázzunk 2–2 ml-t két másik, 25 ml-es lombikba. Mindkét sorozatban az egyik lombikot töltsük fel 25 ml-re a propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.). Ezeket az oldatokat használjuk referenciaoldatként.

A másik két lombik tartalmához adjunk 2–2 ml anilint (3.4.). Hevítsük ezeket 30 percen át forró vízfürdő fölött, hogy tartalmuk elszíneződjön. Utána hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel tartalmukat propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.) 25 ml-re, homogenizáljuk, és hagyjuk állni egy órán át.

Határozzuk meg az optikai sűrűséget az 5.2 pontban, a szabad gosszipoltartalomra vonatkozóan ismertetett módon. Ebből az értékből számítsuk ki az összes gosszipoltartalmat a 6. pont útmutatása alapján.

## 6. Az eredmények kiszámítása

Az eredmény kiszámítható akár a fajlagos optikai sűrűségből (6.1.), akár egy kalibrációs görbe (6.2.) segítségével.

### 6.1. A fajlagos optikai sűrűségből

A fajlagos optikai sűrűség a leírt feltételek esetén az alábbiak szerint alakul:

$$\text{Szabad gosszipol-} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

tartalom:

$$\text{Összes gosszipol-} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

tartalom:

A minta szabad vagy összes gosszipoltartalmát a következő képlet alapján számítjuk ki:

$$\text{gosszipol \%} = \frac{E \times 1\,250}{E \frac{1\%}{1\text{cm}} \times p \times a}$$

ahol:

E = az 5.2 pont szerint meghatározott korrigált optikai sűrűség,

p = a vizsgálati minta mennyisége g-ban;

a = a szűrlet aliquot része ml-ben.

## 6.2. Kalibrációs görbéből

### 6.2.1. Szabad gosszipoltartalom

Készítsünk elő két, egyenként 5 db 25 ml-es mérőlombikból álló sorozatot. Pipetázzunk mindkét sorozat lombikjaiba 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 és 10,0 ml gosszipol-A standardoldatot (3.5.). Töltsük fel valamennyi lombikot 10 ml-re az A oldószerrel (3.2.). Egészítsük ki mindkét sorozatot egy-egy, 25 ml-es, de csak 10 ml A. oldószerrel (3.2.) tartalmazó lombikkal (vakpróba).

Töltsük fel 25 ml-re az egyik sorozat lombikjait (beleértve a vakpróba lombikját is) propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.) (referenciasorozat).

Adjunk a másik sorozat minden lombikjának tartalmához 2 ml anilint (3.4.), beleértve a másik vakpróba lombikját is. Hevítsük ezeket 30 percen át forró vízfürdő fölött, hogy tartalmuk elszíneződjön. Ezután hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.), homogenizáljuk, és hagyjuk állni egy órán át (standard sorozat).

Határozzuk meg a standardoldatok optikai sűrűségét az 5.2 pont szerint, a referenciasorozat oldataival összehasonlítva. Szerkesszük meg a kalibrációs görbét úgy, hogy az optikai sűrűséget a gosszipol µg-ban kifejezett mennyiségének függvényében ábrázoljuk.

### 6.2.2. Összes gosszipoltartalom

Készítsünk elő 6 db 50 ml-es mérőlombikot. Tegyük az első lombikba 10 ml-t a B. oldószerből (3.3.), a többibe pedig sorban 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 és 10,0 ml gosszipol-B standardoldatot (3.6.). Töltsük fel valamennyi lombik tartalmát 10 ml-re a B oldószerrel (3.3.). Hevítsük a lombikokat forró vízfürdő fölött 30 percen át. Hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel térfogatra a propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.), és homogenizáljuk a tartalmukat.

Az elkészített oldatokból tegyük 2-2 ml-t a két sorozatban előkészített, 6-6 db 25 ml-es mérőlombikba. Töltsük fel az első sorozat lombikjainak tartalmát 25 ml-re propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.) (referenciasorozat).

A másik sorozat minden egyes lombikjába tegyük 2 ml anilint (3.4.). Hevítsük a lombikokat forró vízfürdő fölött 30 percen át. Ezután hűtsük le őket szobahőmérsékletűre, töltsük fel térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.), homogenizáljuk, és hagyjuk állni egy órán át (standard sorozat).

Határozzuk meg a standardoldatok optikai sűrűségét az 5.2. pont szerint, a referenciasorozat oldataival összehasonlítva. Szerkesszük meg a kalibrációs görbét úgy, hogy az optikai sűrűséget a gosszipol µg-ban kifejezett mennyiségének függvényében ábrázoljuk.

## 6.3. Ismételtetés

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

- az 500 ppm-nél kevesebb gosszipolt tartalmazó minták esetében a magasabb érték 15 %-át,
- az 500 ppm-nél nem kevesebb és 750 ppm-nél nem több gosszipolt tartalmazó minták esetében a 75 ppm-et, abszolút értékben,
- a 750 ppm-nél több gosszipolt tartalmazó minták esetében a magasabb érték 10 %-át.



## B. A DIOXIN- (PCDD/PCDF) ÉS DIOXINSZERŰ PCB-TARTALOM MEGHATÁROZÁSA

## I. MINTAVÉTELI MÓDSZEREK ÉS AZ ANALITIKAI EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

## 1. Cél és alkalmazási terület

A takarmányok dioxintartalmának (poliklórozott dibenzo-p-dioxinok (PCDD) és poliklórozott dibenzofuránok (PCDF)), valamint dioxinjellegű poliklórozott bifenil (PCB)-tartalmának <sup>(1)</sup> hatósági ellenőrzésére szánt mintákat az I. melléklet rendelkezéseinek megfelelően kell vételezni. A takarmányokban egyenletesen eloszló anyagok, illetve termékek ellenőrzésére vonatkozóan az I. melléklet 5.A. pontjában előírt mennyiségi követelményeket alkalmazni kell. Az így nyert átlagolt minták azon tételek vagy részletek reprezentatív mintáinak tekintendők, amelyekből vételezték őket. A 2002/32/EK európai parlamenti és tanácsi irányelvben <sup>(2)</sup> meghatározott legnagyobb szintek betartását a laboratóriumi mintákban kimutatott szintek alapján állapítják meg.

## 2. A tétel vagy altétel előírásoknak való megfelelése

A mintavételi tétel akkor fogadható el, ha – a mérési bizonytalanság figyelembevételével – az egyszeri elemzés analitikai eredménye nem haladja meg a 2002/32/EK irányelvben megállapított, megfelelő legnagyobb szintet.

A vizsgált tétel nem felel meg a 2002/32/EK irányelvben megállapított maximális határértéknek, ha a párhuzamos vizsgálattal <sup>(3)</sup> megerősített felső határ <sup>(4)</sup> – a mérési bizonytalanságra is figyelemmel – az ésszerűség határain belül kétséget kizáróan meghaladja a maximális határértéket.

<sup>(1)</sup> TEF (= toxicitási egyenérték-tényező) táblázat dioxinokra, furánokra és dioxinszerű PCB-kre

Rokonvegyület	TEF-érték	Rokonvegyület	TEF-érték
<b>Dibenzo-p-dioxinok (PCDD-k)</b>		<b>Dioxinszerű PCB-k:</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<b>Nem-orto PCB-k</b>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001	<b>Mono-orto PCB-k</b>	
		PCB 105	0,0001
<b>Dibenzofuránok (PCDF-ek)</b>		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Alkalmazott rövidítések: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = hexa; „Hp” = hepta; „O” = okta; „CDD” = klór-dibenzo-p-dioxin; „CDF” = klór-dibenzo-furán; „CB” = klór-bifenil.

<sup>(2)</sup> HL L 140., 2002.5.30., 10. o.

<sup>(3)</sup> Párhuzamos vizsgálatra azért van szükség, hogy kizárjuk a minták egymás közötti szennyeződésének, valamint esetleges összecserelődésének veszélyét.

Az első elemzés – a mérési bizonytalanságot figyelembe véve – a megfelelőség ellenőrzésére szolgál.

Amennyiben dioxinszennyeződés miatt történik az elemzés, el lehet tekinteni a párhuzamos vizsgálattal történő megerősítéstől abban az esetben, ha az elemzésre vételezett minták nyomon követhetően a dioxinnal szennyezett tételből származnak.

<sup>(4)</sup> A „felső határérték” kiszámításánál a mennyiségi meghatározás határértéke tekintendő az egyes, mennyiségileg nem meghatározható rokonvegyületek TEQ-hez való hozzájárulása értékének. Az „alsó határ” fogalma szerint minden egyes, mennyiségileg nem meghatározható rokonvegyület TEQ-hez való hozzájárulása nullának tekintendő.

A „középső érték” kiszámításánál a mennyiségi meghatározás határértékének fele tekintendő az egyes, mennyiségileg nem meghatározható rokonvegyületek TEQ-hez való hozzájárulásának.

A mérési bizonytalanság figyelembevétele a következő megközelítések egyikének megfelelően történhet:

- kiterjesztett bizonytalanság számítása 2-es kiterjesztési tényező alkalmazásával, amely megközelítőleg 95 %-os konfidenciaszintet eredményez. A tétel nem megfelelő, ha az U-val csökkentett mért érték meghaladja a meghatározott engedélyezett határértéket. A dioxinok és dioxinszerű PCB-k külön történő meghatározása esetén a dioxinok és a dioxinszerű PCB-k külön vizsgálati eredményei becsült kiterjesztett bizonytalanságának összegét kell felhasználni a dioxinok és a dioxinszerű PCB-k összegének megállapításához.
- a 2002/657/EK bizottsági határozat <sup>(1)</sup> szerinti döntési határérték (CCa) meghatározása (a melléklet 3.1.2.5. pontja – megállapított engedélyezett határértékekkel rendelkező anyagok). A tétel nem megfelelő, ha a mért érték egyenlő a CCa-val, vagy meghaladja azt.

A jelenlegi értelmezési szabályok a hatósági ellenőrzéshez vett mintából nyert vizsgálati eredményre alkalmazandók. Ez nem befolyásolja a tagállamok azon jogát, hogy védelmi vagy döntőbírói eljárás céljából végzett vizsgálatok esetében a nemzeti szabályokat alkalmazzák.

## II. MINTA-ELŐKÉSZÍTÉS ÉS A DIOXIN- (PCDD/PCDF) ÉS DIOXINSZERŰ PCB-TARTALOM HATÓSÁGI ELLENŐRZÉSEKOR ALKALMAZOTT ANALITIKAI MÓDSZEREKRE VONATKOZÓ KÖVETELMÉNYEK

### 1. Cél és alkalmazási terület

Ezeket a követelményeket a takarmány-alapanyagokban és a takarmányokban lévő dioxinok (poliklórozott dibenzo-p-dioxinok (PCDD) és poliklórozott dibenzofuránok (PCDF)) és a dioxinjellegű poliklórozott bifenilek (PCB-k) meghatározását célzó analitikai vizsgálatok esetén kell alkalmazni.

A dioxinok takarmányokban történő előfordulását egy olyan szűrési módszert magában foglaló stratégiával vizsgálhatjuk, amely segítségével kiválaszthatjuk azokat a mintákat, amelyekben a dioxinok és a dioxinszerű PCB-k mennyisége kevesebb, mint 25 %-kal van a kérdéses szint alatt, vagy meghaladja azt. E jelentős dioxintartalmú mintákban a dioxinok koncentrációját megerősítő módszerrel kell meghatározni/megerősíteni.

A szűrési módszerekkel a dioxinoknak és dioxinszerű PCB-knek a kérdéses koncentrációban történő előfordulása mutatható ki. E módszerek nagy teljesítményűek, és arra alkalmazzák őket, hogy nagyszámú minta közül kiszűrjék a potenciálisan pozitív mintákat. Kialakításuk kimondottan azt a célt szolgálja, hogy segítségével elkerülhetőek legyenek a téves negatív eredmények.

A megerősítő módszerek olyan teljes vagy kiegészítő információkkal szolgálnak, amelyek lehetővé teszik a dioxinok és a dioxinszerű PCB-k kérdéses koncentrációban történő azonosítását és egyértelmű mennyiségi meghatározását.

### 2. Háttér

Mivel a környezeti és a biológiai minták (ezen belül a takarmányalapanyag- és a takarmányminták is) általában különböző rokon dioxinvegyületek komplex keverékeit tartalmazzák, a kockázatfelmérés megkönnyítése érdekében kidolgozták a toxicitásigyenérték-tényezők (TEF-ek) koncepcióját. A TEF-ek a 2,3,7,8-helyen szubsztituált PCDD-eket és PCDF-eket tartalmazó keverékek koncentrációjának, valamint egyes, dioxinjellegű aktivitással rendelkező, nem orto- és mono-orto-klórral szubsztituált PCB-knek a 2,3,7,8-TCDD toxikus egyenértékében (TEQ) való kifejezésére szolgálnak. Az egyes anyagok adott mintában mért koncentrációit megszorozzuk a hozzájuk tartozó TEF-értékekkel, majd összeadjuk őket, és így megkapjuk a dioxinjellegű vegyületek TEQ-ben kifejezett összes koncentrációját.

Kizárólag e rendelet alkalmazásában az egyes rokonvegyületek (kongénerek) elfogadott meghatározási határa a vizsgált vegyület mintakivonatban mért azon koncentrációja, amelynél két különböző vizsgált ion S/N (jel/zaj) aránya a legkevésbé érzékeny ionra vonatkozóan 3:1, és amely megfelel az EPA 1613 módszer B. felülvizsgálata szerinti meghatározási módszerben megadott alapkövetelményeknek, mint amilyen például a retenció idő, illetve az izotóparány.

### 3. A minta előkészítésére vonatkozó minőségbiztosítási követelmények

Az analitikai vizsgálat céljára szolgáló minták előkészítését illetően a II. mellékletben megállapított általános rendelkezéseket kell alkalmazni.

Ezeket túlmenően az alábbi követelményeknek kell megfelelni:

- A mintákat üveg-, alumínium-, polipropilén vagy polietilén edényekben kell tárolni és szállítani. A papírpormaradékokat el kell távolítani a mintatartóból. Az üvegeszközöket dioxinszennyezettség szempontjából előzetesen ellenőrzött oldószerekkel kell kiöblíteni.

<sup>(1)</sup> HL L 221., 2002.8.17., 8. o.

- Végezzünk vakpróbát úgy, hogy elvégezzük az egész analitikai eljárást, és csak a mintát hagyjuk ki belőle.
- Az extraháláshoz használt minta súlyának meg kell felelnie az érzékenységre vonatkozó követelményeknek.

#### 4. A laboratóriumokra vonatkozó követelmények

- A laboratóriumoknak úgy kell bizonyítaniuk egy módszer teljesítményét, hogy az a kérdéses tartományban – pl. a kérdéses koncentráció felénél, egyszerűsítésénél és kétszeresénél – elfogadható relatív szórási együtthatót adjon ismételt elemzésekben. Az elfogadási kritériumokat részletesen lásd az 5. pontban.
- Megerősítő módszer esetében a meghatározási határ az adott szint körülbelül egyötödénél legyen annak érdekében, hogy az adott szinttartományban elfogadható relatív szórási együtthatókat kapjunk.
- Belső minőség-ellenőrzési intézkedésként rendszeres vakpróbát, ráméréses kísérleteket vagy ellenőrző minták (lehetőleg tanúsított anyagminták) vizsgálatát kell végezni.
- Meghatározott vizsgálatra való alkalmasság bizonyításának legjobb módja a laboratóriumi jártasság becslésére szervezett körvizsgálatokban való sikeres részvétel. A talaj- vagy szennyvízminták vizsgálatára szervezett körvizsgálatokban való sikeres részvétel azonban nem bizonyítja szükségszerűen az élelmiszer- és a takarmányminták vizsgálatára való alkalmasságot, mivel ez utóbbiakban a szennyezettségi szint kisebb. Ezért a megfelelő takarmány/élelmiszer-mátrixokban lévő dioxinok és dioxinszerű PCB-k meghatározására szervezett körvizsgálatokban való folyamatos részvétel kötelező.
- A laboratóriumokat egy elismert és az ISO 58. iránymutatással összhangban működő testület akkreditálja annak érdekében, hogy analitikai minőségbiztosítást alkalmazzanak. A laboratóriumokat az ISO/IEC/17025 szabvány szerint kell akkreditálni.

#### 5. A dioxinok és a dioxinjellegű PCB-k esetében használt analitikai eljárásokra vonatkozó követelmények

*Az elemzési eljárás elfogadására vonatkozó alapkövetelmények:*

- **Nagy érzékenység és alacsony kimutatási határ.** A PCDD-k és PCDF-ek vonatkozásában a kimutatási határnak a pikogramm ( $10^{-12}$  g) TEQ tartományban kell lennie, mivel ezen vegyületek némelyike nagyon mérgező. Ismert, hogy a PCB-k nagyobb koncentrációban fordulnak elő, mint a PCDD-k és PCDF-ek. A legtöbb PCB-rokonvegyület esetében már elegendő a nanogrammos ( $10^{-9}$  g) érzékenység is. A mérgezőbb dioxinszerű PCB-rokonvegyületek (és különösen a nem-orto szubsztituált rokonvegyületek) méréséhez azonban ugyanolyan érzékenységre van szükség, mint a PCDD-k és PCDF-ek esetében.
- **Nagy szelektivitás (specifitás).** Meg kell tudni különböztetni a PCDD-eket, PCDF-eket és dioxinszerű PCB-eket attól a sokféle, együtt extrahált és a mérést esetleg zavaró más vegyülettől, amely több nagyságrenddel magasabb koncentrációban lehet jelen, mint a kérdéses komponensek. A gázkromatográfiás/tömegspektrometriás (GC/MS) módszereknél meg kell tudni különböztetni egymástól a különböző rokonvegyületeket, így például a mérgező (pl. a tizenhét 2,3,7,8-as helyzetben szubsztituált PCDD és PCDF és a dioxinjellegű PCB-k) és a többi rokonvegyületeket. A biológiai tesztekkel szelektíven meg kell tudni határozni a TEQ-értékeket mint a PCDD-k, a PCDF-ek és a dioxinszerű PCB-k összegét.
- **Nagy pontosság (megbízhatóság és precizitás).** A meghatározásnak érvényes és megbízható becslést kell adnia a minta valódi koncentrációjáról. A nagy pontosságra (a mérés pontossága: egy mérés eredménye és a valódi vagy hozzárendelt érték közötti egyezés közelsége) azért van szükség, hogy elkerüljük egy mintaanalízis eredményének elvetését a becsült TEQ-érték gyenge megbízhatósága miatt. A pontosságot a megbízhatósággal (egy hitelesített anyagban az adott komponensre mért átlagérték és a hitelesített érték közötti különbség, ez utóbbi százalékában kifejezve) és a precizitással ( $RSD_R$ , a relatív szórás, amit a reprodukálhatósági körülmények között kapott eredményekből kell kiszámítani) fejezzük ki.

A szűrővizsgálati módszerek lehetnek biológiai tesztek és GC/MS módszerek; a megerősítő módszerek nagy felbontású gázkromatográfiás/nagy felbontású tömegspektrometriás (HRGC/HRMS) módszerek.

Az összesített TEQ-értéknek az alábbi követelményeknek kell megfelelnie:

	Szűrési módszerek	Megerősítő módszerek
Téves negatív arány	< 1 %	
Megbízhatóság		- 20 %-tól + 20 %-ig
Precizitás RSD <sub>R</sub>	< 30 %	< 15 %

#### 6. A szűrés és megerősítés céljából alkalmazott GC/MS módszerekre vonatkozó különleges követelmények

- Az elemzési eljárás hitelesítéséhez a <sup>13</sup>C-jelölésű 2,3,7,8-klórszubsztituált belső PCDD/F-standardok és a <sup>13</sup>C-jelölésű belső dioxinszerű PCB-standardok hozzáadását az elemzési módszer legelejen vagy indításakor, pl. az extrahálás előtt kell elvégezni. A tetraklórozottól az oktaklórozottig terjedő PCDD/F-ek homológ csoportjai mindegyikéből legalább egy rokonvegyületet és a dioxinszerű PCB-k homológ csoportjai mindegyikéből legalább egy rokonvegyületet kell hozzáadni (illetve legalább egy rokonvegyület kerül hozzáadásra minden egyes, a PCDD/F-ek és dioxinszerű PCB-k nyomon követéséhez használt tömegspektrometriás szelektív ionkövetéses üzemmóddhoz). A megerősítő módszerek esetében mindenképpen előnyösebb, ha mind a tizenhét <sup>13</sup>C-jelölésű 2,3,7,8-klórszubsztituált belső PCDD/F-standardot és mind a tizenkettő <sup>13</sup>C-jelölésű belső dioxinszerű PCB-standardokat alkalmazzuk.
- Megfelelő kalibrálóoldatok alkalmazásával a relatív válaszfaktorokat azon rokonvegyületekre is meg kell határozni, amelyek <sup>13</sup>C-vel jelölt analógját nem adjuk hozzá a vizsgálati anyaghoz.
- A növényi eredetű takarmányok és a 10 %-nál kevesebb zsírt tartalmazó, állati eredetű takarmányok esetében a belső standardokat kötelező az extrahálás előtt hozzáadni. A 10 %-nál magasabb zsírtartalmú, állati eredetű takarmányok esetében a belső standardokat az extrahálás előtt vagy a zsír extrahálása után is hozzáadhatjuk. Attól függően, hogy a belső standardokat melyik szakaszban adjuk a mintákhoz, valamint hogy az eredményeket termékre vagy zsírra adjuk meg, az extrahálás hatékonyságát megfelelően validálni kell.
- A GC/MS elemzés előtt egy vagy két visszanyerési (kísérő) standardot is hozzá kell adni.
- A visszanyerést is ellenőrizni kell. A megerősítő módszerek esetében az egyes belső standardok visszanyerésének a 60–120 %-os tartományba kell esnie. Egyes rokonvegyületek, különösen egyes 7, illetve 8 klóratomot tartalmazó dibenzo-dioxinok és dibenzo-furánok esetében ennél alacsonyabb vagy magasabb visszanyerés is elfogadható, feltéve, hogy TEQ-értékük részaránya az összes (a PCDD/F-ek és a dioxinszerű PCB-k összegén alapuló) TEQ-értékben legfeljebb 10 %. A szűrési módszerek esetében a visszanyerésnek a 30–140 %-os tartományban kell lennie.
- A dioxinokat az interferáló klórozott vegyületektől, így például a nem dioxinszerű PCB-ktől és a klórozott difenil-éterektől megfelelő kromatográfiás elválasztással (lehetőleg florisil-, alumínium-oxid- és/vagy szénoszlopon) kell elválasztani.
- Az izomerek gázkromatográfiás elválasztása megfelelő legyen (< 25 % a csúcsok közötti eltérés az 1,2,3,4,7,8-HxCDF és az 1,2,3,6,7,8-HxCDF között).
- A meghatározást az EPA 1613. módszerének B. módosítása szerint kell elvégezni, amely a tetraklórozottól az oktaklórozottig terjedő dioxinok és furánok izotóphígításos HRGC/HRMS-sel vagy más, egyenértékű teljesítménykritériumokkal rendelkező módszerrel történő meghatározására vonatkozik.
- A felső és az alsó határérték közötti különbség nem haladhatja meg a 20 %-ot olyan takarmányokban, amelyek dioxinszennyezettsége a maximális tartományban vagy afelett van. A maximális szintnél jóval alacsonyabb szennyezettségű takarmányok esetében a különbség a 25–40 %-os tartományban mozoghat.

#### 7. Analitikai szűrővizsgálati módszerek

##### 7.1. Bevezetés

A szűrővizsgálati módszerekkel különböző analitikai célok teljesíthetők: a tisztán szűrés és a kvantitatív megközelítés.

### Szűréses megközelítés

A minták eredményeit összehasonlítjuk egy, a kérdéses szinthez alkalmazott referenciaminta eredményével. A referenciánál kisebb eredményt adó mintákat negatívnak minősítjük, a nagyobb eredményt adókat pedig feltételezett pozitívnak. Követelmények:

- Minden kísérletsorozatnak tartalmaznia kell egy vak- és egy referenciamintát is, amelyeket azonos körülmények között és egyidejűleg extrahálunk és tesztelünk. A referenciamintának egyértelműen magasabb eredményt kell adnia, mint a vakmintának.
- A kérdéses szint ellenőrzésére a kérdéses szint felének és kétszeresének megfelelő további referenciamintákat is alkalmazni kell annak igazolására, hogy a teszt a kérdéses tartományban megfelelő teljesítményű.
- Amikor más mátrixokat tesztelünk, a referenciaminta vagy referenciaminták megfelelőségét is bizonyítani kell, lehetőleg olyan minták felhasználásával, amelyek HRGC/HRMS-sel mért TEQ-értéke hasonló a referenciaminta értékéhez vagy pedig egy vakmintával, amely erre a szintre van beállítva.
- Mivel a biológiai tesztekben nem használhatók belső standardok, az ismételtetőségre vonatkozó vizsgálatok nagyon fontosak az egy kísérletsorozatban belüli szórás megállapításában. A relatív szórás együtthatónak 30 % alatt kell lennie.
- A biológiai tesztek esetében meg kell határozni a célvegyületeket, az esetleges interferenciákat és az elfogadható vakszintek maximumát.

### Kvantitatív megközelítés

A kvantitatív megközelítéshez standard hígítási sorok, két vagy három sorozatban párhuzamosan végzett tisztítás és mérés, valamint vak- és visszanyerési próbák szükségesek. Az eredmények kifejezhetők TEQ-ban, feltételezve, hogy a jelért felelős vegyületek megfelelnek a TEQ-alapelveknek. Ezt TCDD (vagy egy dioxin/furán/dioxinszerű PCB standard keverék) alkalmazásával végezhetjük, amellyel felveszünk egy kalibrációs görbét, hogy ez alapján ki tudjuk számolni az extraktumra és ezen keresztül a mintára jellemző TEQ-szintet. Ezt azután korrigáljuk a vakmintára számított TEQ-értékkel (hogy figyelembe vegyünk az alkalmazott oldószerekből és vegyszerekből származó szennyeződést), valamint egy visszanyerésre számított TEQ-értékkel (amelyet egy, az adott szint körüli értékű minőség-ellenőrző minta TEQ-értékéből számítunk ki). Fontos megjegyezni, hogy a nyilvánvaló visszanyerési veszteség egy része mátrixhatásokból és/vagy a biológiai tesztelési eljárások során kapott TEF-értékek és a WHO által rögzített hivatalos TEF-értékek különbségéből eredhet.

#### 7.2. A szűrésre használt vizsgálati módszerekre vonatkozó követelmények

- A szűréshez használhatók GC/MS vizsgálati módszerek és biológiai tesztek. A GC/MS módszerek vonatkozásában a 6. pontban megállapított követelményeket kell alkalmazni. A sejtreakción alapuló biológiai tesztelési eljárások vonatkozásában a 7.3. pontban, a vegyszerkészleten alapuló biológiai tesztelési eljárások vonatkozásában a 7.4. pontban megállapított különleges követelményeket kell alkalmazni.
- Egy nagyszámú – a maximális vagy akciós szint alatti vagy feletti mintát tartalmazó – sorozatnál szükség van a téves pozitív és a téves negatív eredmények számával kapcsolatos információkra a megerősítő elemzési módszerrel meghatározott TEQ-tartalommal történő összehasonlításban. A téves negatív minták tényleges arányának 1 % alatt kell lennie. A téves pozitív minták arányának elég alacsonynak kell lenni ahhoz, hogy előnyös legyen a szűrővizsgálati módszer alkalmazása.
- A pozitív eredményeket mindig meg kell erősíteni megerősítő elemzési módszerrel (HRGC/HRMS). Továbbá HRGC/HRMS-sel meg kell erősíteni a széles TEQ-tartományból származó mintákat (a negatív minták körülbelül 2–10 %-a). A biológiai tesztek és a HRGC/HRMS eredményeinek összefüggésével kapcsolatos információkat is meg kell adni.

#### 7.3. A sejttalapú biológiai tesztekre vonatkozó különleges követelmények

- A biológiai tesztek során minden teszt lefuttatásához szükség van egy TCDD vagy dioxin/furán-elegy referenciakonzentráció-sorozatra (teljes dózisválasz görbe, ahol  $R^2 > 0,95$ ). Szűrési célokra azonban egy kibővített, alacsony szintű minták mérésére alkalmas alacsony szint görbét lehet alkalmazni.
- A biológiai tesztelési eljárások eredményeinek értékeléséhez egy minőség-ellenőrzési lapon rögzíteni kell az adott időtartam alatt használt TCDD referencia-konzentrációt (körülbelül a meghatározási határ háromszorosa). Másik lehetőség egy referenciaminta relatív válaszána összehasonlítása a TCDD kalibrációs egyenesével, mivel a sejtek válasza sok tényezőtől függhet.
- A referenciaanyag-fajták mindegyikéhez fel kell venni egy minőség-ellenőrzési (QC) diagramot, amelynek ellenőrzésével igazolható, hogy az eredmények valóban összhangban vannak a meghatározott iránymutatásokkal.

- Különösen a kvantitatív számítások esetében, a felhasznált hígított minta indukciójának a válaszgörbe lineáris szakaszára kell esnie. A válaszgörbe lineáris szakasza feletti mintákat fel kell hígítani, és újra meg kell vizsgálni. Ajánlott tehát egyszerre legalább három vagy több hígítást vizsgálni.
- Az egyes hígított minták három párhuzamos meghatározása esetén a százalékos szórás nem lehet 15 % felett, három független kísérlet között pedig nem haladhatja meg a 30 %-ot.
- A kimutatási határt az oldószeres vak- vagy a háttér által adott válasz szórásának háromszorosában lehet megállapítani. Egy másik megközelítés szerint alkalmazhatunk egy, a napi kalibrációs görbéből számolt háttér (az indukciós tényező az oldószeres vakérték ötszöröse) feletti választ is. A meghatározási határt az oldószeres vakérték vagy a háttér által adott válasz szórásának öt-hatszorosában lehet megállapítani, vagy alkalmazhatunk egy egyértelműen a napi kalibrációs görbéből számolt és a háttérjelnél nagyobb választ is (az indukciós tényező az oldószeres vakérték tízszerese).

#### 7.4. A reagenskészlet-alapú biológiai tesztekre vonatkozó különleges követelmények

- Gondoskodni kell arról, hogy a reagenskészlet-alapú biológiai tesztek kellően érzékenyek és megbízhatóak legyenek a takarmányokhoz való alkalmazáshoz.
- Követni kell a gyártó minta-előkészítésre és mintaelemzésre vonatkozó utasításait.
- A szavatossági idő lejártá után a reagenskészleteket nem szabad felhasználni.
- Nem alkalmazhatók más reagenskészletekben történő felhasználásra szánt anyagok vagy komponensek.
- A reagenskészleteket a megadott tárolási hőmérsékleti tartományban kell tartani, és a megadott működési hőmérsékleten kell használni.
- Az immunvizsgálatok kimutatási határát úgy kell meghatározni, hogy a vakminta 10 párhuzamos vizsgálatából kapott átlag és a szórás háromszorosának összegét elosztjuk a lineáris regressziós egyenes meredekségével.
- A laboratóriumban végzett tesztekhez referenciastandardokat kell használni annak biztosítása érdekében, hogy a standardra adott válasz az elfogadható tartományba essen.

#### 8. Az eredményekről készült jelentés

Amennyiben az alkalmazott analitikai eljárás lehetővé teszi, az analitikai eredmények között fel kell tüntetni az egyes PCDD/F- és PCB-rokonvegyületek szintjeit is, és az analitikai eredményeket alsó határral, felső határral és középső értékekkel is ki kell fejezni, hogy a jelentés az eredmények tekintetében maximális mennyiségű információt tartalmazzon, és így lehetővé tegye az eredmények különleges követelmények szerinti értelmezését.

A jelentésben meg kell adni a minta lipidtartalmát, és a lipidek extrahálásához alkalmazott módszert is.

Az egyes belső standardok visszanyerését meg kell adni abban az esetben, ha a visszanyerések kívül esnek a 6. pontban említett tartományon, vagy ha az eredmények meghaladják a maximális szintet, vagy arra kérés érkezik.

Mivel a minta megfeleléséről való döntésnél figyelembe kell venni a mérési bizonytalanságot, ezt a paramétert is meg kell adni. Tehát az analitikai eredményeket  $x \pm U$  formában kell jelenteni, ahol  $x$  a vizsgálati eredmény,  $U$  a kiterjesztett mérési bizonytalanság, a kiterjesztési tényező 2, amely körülbelül 95 %-os konfidenciaszintet eredményez. A dioxinok és dioxinszerű PCB-k külön történő meghatározása esetén, a dioxinok és dioxinszerű PCB-k külön vizsgálati eredményei becsült kiterjesztett bizonytalanságának összegét kell felhasználni a dioxinok és a dioxinszerű PCB-k összegének megállapításához.

Ha a CCa alkalmazásával vesszük figyelembe a mérési bizonytalanságot (ezen B. rész I. 2. pontjában leírt módon), ezt a paramétert is jelenteni kell.

## VI. MELLÉKLET

A TAKARMÁNYOK HATÓSÁGI ELLENŐRZÉSE SORÁN AZ ÁLLATI EREDETŰ ALKOTÓELEMEK  
MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ ANALITIKAI MÓDSZEREKA takarmányokban található állati eredetű összetevők mikroszkópos kimutatására, azonosítására és becslésére  
vonatkozó feltételek

## 1. Cél és alkalmazási terület

E feltételeket akkor kell alkalmazni, ha a takarmányokban található állati eredetű összetevők (emlősök, baromfi és halak testének, illetve testrészeinek feldolgozásából származó termékek) kimutatása a 882/2004/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletnek <sup>(1)</sup> megfelelően a takarmányozás terén koordinált ellenőrzési program keretében, mikroszkópos vizsgálatok útján történik. Ha az e mellékletben ismertetett módszert alkalmazzák minden hatósági vizsgálatban, el kell végezni egy második vizsgálatot is egy alternatív módszerrel, az állati eredetű összetevők egyes típusai kimutatásának javítása vagy az állati összetevők eredetének további meghatározása érdekében. Továbbá egyes különös állati összetevők, pl. a faggyúban lévő plazma vagy csontok esetén (lásd a 9. pontot is) egy másik módszert is alkalmazni kell, ha ezeket a vizsgálatokat a koordinált ellenőrzési program keretében előírt vizsgálatok kiegészítéseként végzik.

## 2. Érzékenység

Az állati eredetű alkotóelem jellegétől függően a takarmányban már igen kis mennyiségben is (< 0,1 %) kimutatható.

## 3. Vizsgálati alapelv

Az azonosításra az I. mellékletben megállapított rendelkezések szerint vett és megfelelően előkészített reprezentatív mintát kell használni. A következő módszer megfelelő a csökkentett nedvességtartalmú takarmányok kezeléséhez. A 14 %-nál magasabb nedvességtartalmú takarmányokat kezelés előtt szárítani (kondenzálni) kell. Egyes takarmányoknál vagy takarmány-alapanyagoknál (pl. zsírok, olajok) célzott kezelés szükséges (lásd a 9. pontot). Az állati eredetű alkotóelemeket a tipikus, mikroszkóppal kimutatható jellegzetességek alapján azonosítjuk (pl. izomrostok és a hús egyéb részei, porc, csontok, szaru, szőr, sörté, vér, tollak, tojásshéjak, halcsontok, pikkelyek). Az azonosítást a szitafrakcióban (6.1.) és a koncentrált üledékben (6.2.) egyaránt el kell végezni.

## 4. Reagensok

4.1. *Beágyazó anyag*

4.1.1. Klorál-hidrát (vizes oldat, 60 % w/v)

4.1.2. Lúg (NaOH 2,5 % w/v vagy KOH 2,5 %w/v) a szitafrakcióhoz

4.1.3. Paraffinolaj vagy glicerol (viszkozitás: 68–81) üledékben történő mikroszkópos megfigyelésekhez

4.2. *Öblítőszer*

4.2.1. Alkohol, 96 %

4.2.2. Aceton

4.3. *Koncentrált anyagok*

4.3.1. Tetraklór-etilén (sűrűség: 1,62)

<sup>(1)</sup> HL L 165., 2004.4.30., 1. o.

#### 4.4. Festékek

- 4.4.1. Jód/kálium-jodid oldat (oldjunk fel 2 g káliumjodidot 100 ml vízben, majd adjunk hozzá 1 g jódot sűrű rázogatás közben)
- 4.4.2. Alizarinvörös (oldjunk fel 2,5 ml 1 M-os sósavat 100 ml vízben, majd adjunk hozzá ehhez az oldathoz 200 mg alizarinvöröset)
- 4.4.3. Cisztin reagens (2 g ólom-acetát, 10 g NaOH/100 ml H<sub>2</sub>O)
- 4.4.4. Jód/kálium-jodid oldat (70 % etanolban feloldva)

#### 4.5. Fehéritőszér

- 4.5.1. Kereskedelmi nátriumhipoklorit-oldat (9,6 % aktív klór)

### 5. Berendezés és kiegészítők

- 5.1. Analitikai mérleg (0,01 g pontosságú, kivéve koncentrált üledéknél: 0,001 g)
- 5.2. Őrlésre alkalmas eszköz (daráló vagy mozsár, különösen > 15 % zsírt tartalmazó takarmányok analizisénél)
- 5.3. Legfeljebb 0,50 mm lyukátmérővel ellátott négyzethálós szita
- 5.4. Elválasztótölcsér vagy kúpos aljú főzőpohár ülepítésre
- 5.5. Sztereomikroszkóp (legalább 40-szeres nagyítás)
- 5.6. Összetett mikroszkóp (legalább 400-szoros nagyítás), áteső fényel/polarizált fényel működő
- 5.7. Szabványos laboratóriumi üvegedények

Minden berendezést alaposan meg kell tisztítani. Az elválasztótölcséreket és az üvegedényeket mosogatógépben kell elmosni. A szitákat erősszállú kefével kell megtisztítani.

### 6. A vizsgálat módja

A pelletált takarmányokat elő lehet szitálni, ha mindkét frakciót külön mintaként vizsgálják.

A legalább 50 g tömegű mintát kezelni kell (gondosan felaprítani a megfelelő őrlőeszköz (5.2.) segítségével, ha a megfelelő szerkezet eléréséhez szükséges). A felaprított anyagot két reprezentatív részre kell osztani, az egyik (legalább 5 g) részt a szitafrakció számára (6.1.), a másikat (legalább 5 g) a koncentrált üledék számára (6.2.). Az azonosításhoz továbbá alkalmazható a festékekkel (6.3.) való színezés is.

Az állati fehérje jellegének és a részecskék eredetének jelölése érdekében egy döntés-támogató rendszer, mint pl. az ARIES használható, és a referenciaminták dokumentálhatók.

#### 6.1. Az állati eredetű alkotóelemek azonosítása a szitafrakcióban

A mintából legalább 5 g-ot szitáljunk át a szitán (5.3.) két frakcióra.

A nagyobb részecskéjű szitafrakció(ka)t (vagy a frakció reprezentatív részét) vékony rétegben felkenjük egy megfelelő tárgylemezre, és sztereomikroszkóp (5.5.) alatt különböző nagyításokkal szisztematikusan megvizsgáljuk, hogy tartalmaznak-e állati eredetű alkotóelemeket.

A finomabb részecskéjű szitafrakció(ka)t összetett mikroszkóp (5.6.) alatt különböző nagyításokkal szisztematikusan megvizsgáljuk, hogy tartalmaznak-e állati eredetű alkotóelemeket.



## 6.2. Állati eredetű összetevők azonosítása a koncentrált üledékben

A legalább 5 g tömegű (0,01 g pontossággal bemért) mintát elválasztó tölcserbe vagy kúpos aljú főzőpohárba helyezzzük, és legalább 50 ml tetraklór-etilénnel (4.3.1.) kezeljük. A keveréket többször egymás után felrázzuk vagy felkeverjük.

- Ha zárt elválasztó tölcserrel használunk, az üledéket megfelelő ideig állni kell hagyni (legalább három percig), mielőtt az üledéket leválasztjuk. A rázogatót meg kell ismételni, és az üledéket legalább 3 percig kell ülepedni hagyni. Az üledéket ezután ismét el kell választani.
- Ha nyitott kúpos aljú főzőpoharat használunk, az üledéket legalább öt percig állni kell hagyni, mielőtt az üledéket leválasztjuk.

A teljes üledéket szárítjuk, és ezt követően 0,001 g pontossággal lemérjük. Mérés csak akkor szükséges, ha becslést is kell végezni. Ha több nagy részecskét tartalmaz az üledék, egy szitán (5.3.) keresztül két frakcióba szitálhatjuk. Sztereomikroszkóp (5.5.) vagy összetett mikroszkóp (5.6.) alatt vizsgáljuk meg a beszárított üledéket, hogy tartalmaz-e csont alkotóelemeket.

## 6.3. Beágyazó anyagok és festékek használata

Az állati eredetű alkotóelemek mikroszkópos azonosítása speciális beágyazó anyagokkal és festékekkel elősegíthető.

**Klorál-hidrát** (4.1.1.): óvatos hevítés mellett a sejtszerkezetek tisztábban láthatóak, mert a keményítőszemcsék zselatinná alakulnak, és a nemkívánatos sejttartalmat az anyag eltávolítja.

**Lúg** (4.1.2.): a nátriumhidroxid vagy a káliumhidroxid tisztítja a takarmány anyagát, és segíti az izomrostok, szőrök és egyéb keratinszerkezetek kimutatását.

**Paraffinolaj vagy glicerol** (4.1.3.): A csont alkotóelemeket jobban lehet azonosítani egy ilyen beágyazó anyagban, mert a legtöbb lacuna levegővel töltve marad, és mintegy 5–15 µm-es kis fekete lyukként tűnik fel.

**Jód/kálium-jodid oldat** (4.4.1.): keményítő (kék-ibolya szín) és fehérje (sárga-narancs szín) kimutatására lehet használni. Szükség esetén hígítható.

**Alizarinvörös-oldat** (4.4.2.): csontok, szálkák és pikkelyek rózsaszínűvé/vörössé színezése. Az üledék szárítása előtt (lásd 6.2.) a teljes üledéket egy kémcsőbe kell tölteni, és kétszer kb. 5 ml alkohollal (4.2.1.) át kell öblíteni (minden alkalommal Vortex keverőt kell használni, az oldószert egy percig hagyni leülepedni és leönteni). E festék használata előtt az üledéket legalább 1 ml nátriumhipoklorit-oldat (4.5.1.) hozzáadásával fehéríteni kell. A reakcióidő kb. 10 percig tarthat. A kémcsövet megtöltjük vízzel, az üledéket 2–3 percig hagyjuk leülepedni, és a vizet és a szuszpendált részecskéket leöntjük. Az üledéket még kétszer kb. 10 ml vízzel leöblítjük (vortexet kell használni, hagyni leülepedni, és a vizet minden alkalommal leönteni). 2–10 vagy több csepp (a maradék mennyiségétől függően) alizarinvörös-oldatot kell hozzáadni. A keveréket össze kell rázni, és a reakció néhány másodpercig tarthat. A színezett üledéket kétszer kb. 5 ml alkohollal (4.2.1.), majd egyszer acetonnal (4.2.2.) át kell öblíteni (minden alkalommal vortexet kell használni, az oldószert kb. egy percig hagyni kell leülepedni és leönteni). Ezután az üledék kész a szárításra.

**Cisztin reagens** (4.4.3.): óvatos hevítés mellett a cisztintartalmú alkotóelemek (szőr, toll stb.) barnásfeketére színeződnek.

## 6.4. Az esetleg hallisztet tartalmazó takarmány vizsgálata

Legalább egy tárgylemezt meg kell vizsgálni összetett mikroszkóp alatt a finom szitafrakcióból és a finom üledékfrakcióból (lásd 6.1. és 6.2.).

Ha a címkén feltüntetik, hogy az összetevők között halliszt is található, vagy ha halliszt jelenlétét gyanítják, vagy az első vizsgálatkor kimutatják, az eredeti minta finom szitafrakciójából még legalább két tárgylemezt és az összes üledékfrakciót meg kell vizsgálni.

## 7. Számítás és értékelés

A tagállamok biztosítják, hogy az e pontban leírt eljárást alkalmazzák, ha hatósági analízist végeznek az állati alkotóelemek mennyiségének (és nem csak előfordulásának) becslésére.

A számításokat csak akkor lehet elvégezni, ha az állati eredetű alkotóelemek között csontdarabkák is vannak.

A szárazföldi, melegvérű állatokból (például emlősökből és madaraktól) származó csontdarabkák mikroszkópos vizsgálat során a jellegzetes lacunák alapján különböztethetők meg a különböző típusú halcsontoktól. A mintában található állati eredetű alkotóelemek részarányának felmérésekor a következő szempontokat kell figyelembe venni:

- a csontdarabkák becsült részaránya (súly %) a koncentrált üledékben, valamint
- a csont részarányát (súly %) az állati eredetű alkotóelemekben.

A felmérést lehetőség szerint legalább három különböző tárgylemezen és lemezenként legalább öt látómezőben kell elvégezni. Összetett takarmányoknál a koncentrált üledék rendszerint nem csupán szárazföldi állati és hal eredetű csontdarabkát tartalmaz, hanem egyéb, nagy fajsúlyú részecskéket is, mint például ásványdarabkákat, homokot, lignifikálódott (fásodott) növényi részeket és hasonlót.

#### 7.1. A csontdarabkák becsült százalékos értéke

a szárazföldi állatok csontjainak százalékos aránya =  $(S \times c)/W$

a halak csontjainak és pikkelyeinek százalékos aránya =  $(S \times d)/W$

(S = az üledék súlya (mg), c = korrekciós tényező (%) az üledékben található szárazföldi állatokból származó csontok becsült részarányára, d = korrekciós tényező (%) az üledékben található halcsontok és halpikkelyek becsült részarányára, W = az üledékképzésben felhasznált mintaanyag súlya (mg)).

#### 7.2. Az állati eredetű alkotóelemek becsült értéke

Az állati termékekben a csont részaránya nagymértékben változó lehet. (Csontlisztek esetében a csont százalékos aránya 50–60 % is lehet, húsliszteknél ugyanez 20–30 % közötti tartományban mozog; hallisztek esetén a halcsontok és pikkelyek mennyisége a halliszt kategóriája és eredete szerint változik, rendszerint 10–20 %-os nagyságrendben van).

Amennyiben a mintában található állati eredetű takarmányanyag típusa ismert, meg lehet becsülni annak mennyiségét:

a szárazföldi állatokból készült termékek alkotóelemeinek becsült mennyisége (%) =  $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

a hal eredetű termékek alkotóelemeinek becsült mennyisége (%) =  $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

(S = az üledék súlya (mg), c = korrekciós tényező (%) az üledékben található szárazföldi állatokból származó csont alkotóelemek becsült részarányára, d = korrekciós tényező (%) az üledékben található halcsontok és halpikkelyek becsült részarányára, f = korrekciós tényező a vizsgált mintában található állati eredetű alkotóelemekben található csont részarányának korrekciójára, W = az üledékképzésben felhasznált mintaanyag súlya (mg)).

### 8. A vizsgálat eredményeinek kifejezése

A jelentésnek tartalmaznia kell legalább a szárazföldi állatokból és a hallisztból származó alkotóelemek jelenlétére vonatkozó információt. A különböző eseteket a következő módon kell leírni:

#### 8.1. szárazföldi állatokból származó alkotóelemek jelenlétére tekintettel:

- amennyire mikroszkóp alatt kivehető, szárazföldi állatokból származó alkotóelem jelenléte nem állapítható meg a benyújtott mintában,

vagy:

- amennyire mikroszkóp alatt kivehető, szárazföldi állatokból származó alkotóelem jelenléte állapítható meg a benyújtott mintában.

#### 8.2. halliszt jelenlétére tekintettel:

- amennyire mikroszkóp alatt kivehető, halból származó alkotóelem jelenléte nem állapítható meg a benyújtott mintában,

vagy:

- amennyire mikroszkóp alatt kivehető, halból származó alkotóelem jelenléte állapítható meg a benyújtott mintában.

Amennyiben halból vagy szárazföldi állatokból származó alkotóelemeket találnak, a vizsgálati eredményekről szóló jelentésben szükség szerint a kimutatott alkotóelemek mennyiségének becslését (x %, <0,1 %, 0,1–0,5 %, 0,5–5 % vagy > 5 %), lehetőség szerint a szárazföldi állat típusának további meghatározását és az azonosított állati alkotóelemeket (izomrostok, porc, csontok, szaru, szőr, sörté, tollak, vér, tojáshéjak, halcsontok, pikkelyek) is jelezni lehet.

Ha az állati összetevők mennyisége becsült, az alkalmazott f korrekciós tényezőt is meg kell adni.

Ha szárazföldi állatokból származó csont alkotóelemek jelenlétét állapították meg, a jelentésnek még a következő pontot is tartalmaznia kell:

„Annak lehetőségét, hogy a fenti összetevők emlősökből származnak, nem lehet kizárni.”

Ez a pont nem szükséges abban az esetben, ha a szárazföldi állatokból származó csontdarabokat sikerült azonosítani, mint emlős, illetve baromfi eredetű csontdarabot.

#### 9. Választható módszer zsír vagy olaj analizálásához

A következő módszer alkalmazható zsír vagy olaj analizálásához:

- Ha a zsír szilárd, melegítsük fel például mikrohullámú sütőben, amíg folyékonyá válik.
- Pipettázzunk át 40 ml zsírt a minta aljáról egy centrifugacsőbe.
- Centrifugáljuk tíz percig 4 000 percenkénti fordulatszámon.
- Ha a zsír a centrifugálás után szilárd, melegítsük még egyszer sütőben, amíg folyékonyá nem válik. Ismételjük meg a centrifugálást öt percig 4 000 percenkénti fordulatszámon.
- A leülepedett szennyeződések felét egy kiskanállal vagy egy spatulával tegyük át egy kis Petri-csészébe vagy egy mikroszkópos tárgylemezre a lehetséges állati alkotóelemek (húsrostok, tollak, csontdarabok, stb.) tartalmának mikroszkópos meghatározásához. Beágyazó anyagként mikroszkópos vizsgálathoz paraffinolaj vagy glicerol ajánlatos.
- A fennmaradó szennyeződések a 6.2. pontnak megfelelően ülepítésre alkalmazzuk.

## VII. MELLÉKLET

**A BAROMFITAKARMÁNY-KEVERÉKEK ENERGIAÉRTÉKÉNEK SZÁMÍTÁSI MÓDSZERE****1. Az energiaérték számításának és kifejezésének módszere**

A baromfitakarmány-keverékek energiaértékét az alábbi képletnek megfelelően kell kiszámítani a takarmány bizonyos analitikai alkotóelemeinek százalékos aránya alapján. Ezt az értéket az összetett takarmány kilogrammonkénti, nitrogénnel korrigált, metabolizálható energiájával (ME) kell kifejezni, megajoule (MJ) mértékegységben:

$ME (MJ/kg) = 0,1551 \times \text{nyersfehérje } \% + 0,3431 \times \text{nyers zsír } \% + 0,1669 \times \text{keményítő } \% + 0,1301 \times \text{összes cukor } \%$   
(szacharózban kifejezve)

**2. A feltüntetett értékekre alkalmazandó tűréshatárok**

Amennyiben a hatósági ellenőrzés eltérést (a takarmány megemelkedett vagy lecsökkent energiaértéke) mutat ki az ellenőrzés eredménye és a feltüntetett energiaérték között, az ME 0,4 MJ/kg-os tűréshatárát engedélyezik.

**3. Az eredmény kifejezése**

A fenti képlet alkalmazásával kapott eredményt egy tizedesjegyre kerekítve kell megadni.

**4. A mintavétel és analitikai módszerek**

Az összetett takarmány mintavételét és a számítási módszerben jelzett analitikai alkotóelemek tartalmának meghatározását a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi mintavételi és analitikai módszerekkel összhangban kell elvégezni.

A következőket kell alkalmazni:

- a nyerszsírtartalom meghatározására: a III. melléklet H. részében a nyersolajok és zsírok meghatározására szolgáló B. módszer,
- a keményítőtartalom meghatározására: a III. melléklet L. részében megállapított polarimetriás módszer.

## VIII. MELLÉKLET

## ANALITIKAI MÓDSZEREK A MÁR NEM ENGEDÉLYEZETT ADALÉKANYAGOK TAKARMÁNYOKBAN VALÓ ILLEGÁLIS JELENLÉTÉNEK ELLENŐRZÉSÉRE

**Fontos megjegyzések:**

Az e mellékletben említett módszereknél érzékenyebb analitikai módszerek használhatók a már nem engedélyezett adalékanyagok takarmányokban való illegális jelenlétének ellenőrzésére.

Megerősítés céljára az e mellékletben említett analitikai módszerek kell használni.

## A. A METIL-BENZOKVÁT MEGHATÁROZÁSA

*7-benziloxi-6-butil-3-metoxikarbonil-4-kvinolon*

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ezzel a módszerrel a takarmányokban lévő metil-benzokvát szintjét lehet meghatározni. A meghatározási határ 1 mg/kg.

2. **Vizsgálati alapelv**

A metil-benzokvátot a mintából metil-alkoholos metánszulfonsav-oldattal extraháljuk. A kivonatot diklórmetánnal, ioncserélő kromatográfiás módszerrel derítjük, majd ismét diklórmetánnal kezeljük. A metil-benzokvát-tartalom meghatározását fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) és UV-detektor alkalmazásával végezzük.

3. **Reagensek**

3.1. Diklórmetán

3.2. Metil-alkohol, HPLC minőségű

3.3. HPLC mozgófázis

metil-alkohol (3.2.) és víz (HPLC minőségű) 75 + 25 (v + v) térfogatarányú keveréke.

Szűrjük át egy 0,22 µm-es szűrőn (4.5.), és gázmentesítsük az oldatot (pl. 10 percig tartó ultrahangos kezeléssel).

3.4. Metánszulfonsav-oldat, c = 2 %

Hígítsunk 20,0 ml metánszulfonsav-oldatot metil-alkohollal (3.2.) 1 000 ml-re.

3.5. Sósavoldat, c = 10 %

Hígítsunk 100 ml sósavat ( $\rho_{20} 1,18$  g/ml) vízzel 1 000 ml-re.

3.6. Amberlite CG-120 (Na) kationcserélő műgyanta, 100 és 200-as térháló

A gyantát felhasználás előtt előkezeljük. 100 g gyantát mossunk át 500 ml sósavoldattal (3.5.), és állandó keverés mellett hevítjük forrásig forró főzőlapon. Hagyjuk kihűlni, és öntsük le róla a savat. Vákuum alatt szűrjük át egy szűrőpapíron. Mossuk át kétszer a gyantát 500 ml vízzel, majd 250 ml metil-alkohollal (3.2.). További 250 ml metil-alkohollal öblítsük a gyantát, és a szűrőpogácsán keresztül engedett levegővel szárítsuk. A száraz gyantát lezárt üvegben tároljuk.

- 3.7. Standard anyag: tiszta metil-benzokvát (7-benziloxi-6-butil-3-metoxycarbonil-4-quinolon)
- 3.7.1. Metil-benzokvát standard törzsoldat, 500 µg/ml
- Mérjük ki 0,1 mg-os pontossággal 50 mg standard anyagot (3.7.), oldjuk fel metánszulfonsav-oldattal (3.4.) egy 100 ml-es mérőlombikban, töltjük fel jelig, és keverjük el.
- 3.7.2. Metil-benzokvát közbenső standardoldat, 50 µg/ml
- Öntsünk át 5,0 ml metil-benzokvát standard törzsoldatot (3.7.1.) egy 50 ml-es mérőlombikba, töltjük fel metil-alkohollal (3.2.) jelig, és keverjük el.
- 3.7.3. Kalibrálóoldatok
- 25 ml-es mérőlombikokba adagoljunk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, illetve 5,0 ml metil-benzokvát közbenső standardoldatot (3.7.2.). Töltsük fel a lombikokat jelig a mozgófázissal (3.3.), és keverjük össze. Ezen oldatok 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, illetve 10,0 µg/ml metil-benzokvát koncentrációnak felelnek meg. Az oldatokat használat előtt frissen kell elkészíteni.
4. **Eszközök**
- 4.1. Laboratóriumi rázógép
- 4.2. Rotációs, vékonyfilmes bepárló
- 4.3. Elzárócsappal és egy megközelítőleg 200 ml-es tartállyal ellátott, 15 mm belső átmérőjű és 250 mm magas üvegoszlop
- 4.4. HPLC-készülék, változtatható hullámhosszú UV-detektorral vagy diódasoros detektorral
- 4.4.1. Folyadékkromatográfiás oszlop: 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm-es töltet, vagy egy ezzel egyenértékű berendezés
- 4.5. Membránszűrők, 0,22 µm-es.
- 4.6. Membránszűrők, 0,45 µm-es.
5. **A vizsgálat módja**
- 5.1. *Általános szabályok*
- 5.1.1. Vizsgáljunk meg egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem metil-benzokvát, sem interferáló anyagok nincsenek jelen.
- 5.1.2. A mintában találhatóval közel azonos mennyiségű metil-benzokvátal dúsított takarmányvakminta analízisével végezzünk visszanyerési próbát. 15 mg/kg-os szintre történő dúsításhoz adjunk 600 ml standard törzsoldatot (3.7.1.) 20 g takarmányvakmintához, mindezt keverjük el, majd 10 percet várjunk, mielőtt folytatnánk a műveletet az extrahálással (5.2.).
- Megjegyzés:* Ehhez a módszerhez a takarmányvakminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen, és abban az analízis során metil-benzokvát ne legyen kimutatható.
- 5.2. *Extrahálás*
- Mérjük ki az előkészített mintából 0,01 g pontossággal 20 g-ot, és öntsük át egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Adjunk hozzá 100,0 ml metánszulfonsav-oldatot (3.4.), és rázzuk mechanikus rázógépben (4.1.) 30 percig. Szűrjük át az oldatot szűrőpapíron, és tegyük félre a szűrletet a folyadék-folyadék elválasztáshoz (5.3.).
- 5.3. *Folyadék-folyadék elválasztás*
- Egy 100 ml sósavoldatot (3.5.) tartalmazó 500 ml-es elválasztótölcsérbe öntsünk át 25,0 ml-t az (5.2.) lépésben nyert szűrletből. Adjunk hozzá 100 ml diklórmetánt (3.1.) a tölcserhez, és rázzuk egy percen keresztül. Hagyjuk a rétegeket elválni egymástól, és az alsó réteget (a diklórmetánt) eresszük bele egy 500 ml-es gömbömbikba. Ismételjük meg a vizes fázis extrakcióját még kétszer, további 40–40 ml diklórmetánnal, majd vegyítsük az első kivonattal a gömbömbikban. A rotációs, vékonyfilmes bepárlókészüleken (4.2.) csökkentett nyomáson, 40 °C hőmérsékleten teljes száradásig pároljuk be a diklórmetán-kivonatot. Oldjuk fel a maradékot 20–25 ml metil-alkoholban (3.2.), zárjuk le az üveget, és tartsuk meg az egész kivonatot az ioncserélő kromatográfiához (5.4.).

#### 5.4. Ioncserélő kromatográfia

##### 5.4.1. A kationcserélő oszlop előkészítése

Az üvegoszlop (4.3.) alsó végébe illesszünk egy kis üvegvas dugót. Készítsünk a kezelt kationcserélő műgyanta (3.6.) 5,0 grammjából és 50 ml sósavból (3.5.) egy elegyet, öntsük bele az üvegoszlopba, majd hagyjuk, hogy leülepedjen. Engedjük ki a felesleges savat, hogy még éppen ellepje a gyanta felszínét, és addig mossuk az oszlopot vízzel, amíg a szüredéken végzett lakmuszteszt semleges nem lesz. Öntsünk át 50 ml metil-alkoholt (3.2.) az oszlopra, és hagyjuk, hogy leszivárogon a gyanta felszínén.

##### 5.4.2. Oszlopkromatográfia

Az (5.3.) pontban készített mintakivonatot pipettázzuk óvatosan az oszlop tetejére. A gömblombikot két adag, 5–10 ml mennyiségű metil-alkohollal (3.2.) öblítsük, és öntsük ezt a mosófolyadékot is az oszlopra. Futtassuk le a kivonatot a gyanta felszínén, és mossuk az oszlopot 50 ml metil-alkohollal, ügyelve arra, hogy az átfolyási sebesség ne haladja meg az 5 ml/percet. Öntsük el a szüredéket. Eluáljuk az oszlopról a metil-benzokvátot 150 ml metánszulfonsav-oldattal (3.4.), majd vegyük fel az eluátumot egy 250 ml-es gömblombikban.

##### 5.5. Folyadék-folyadék elválasztás

Egy 1 literes elválasztótölcsérbe öntsük át az (5.4.2.) lépésben nyert eluátumot. Az Erlenmeyer-lombikot 5–10 ml metil-alkohollal (3.2.) öblítsük, és a mosófolyadékot öntsük össze az elválasztótölcsér tartalmával. Adjunk hozzá 300 ml sósavoldatot (3.5.) és 130 ml diklórmétánt (3.1.). Rázzuk egy percen keresztül, és engedjük, hogy a fázisok elváljanak egymástól. Az alsó réteget (a diklórmétánt) eresszük bele egy 500 ml-es gömblombikba. Ismételjük meg a vizes fázis extrakcióját még kétszer, további 70–70 ml diklórmétánnal, és ezen kivonatokot öntsük össze a gömblombikban lévő első kivonattal.

A rotációs, vékonyfilmes bepárlókészüléken (4.2.), csökkentett nyomáson, 40 °C hőmérsékleten teljes száradásig pároljuk be a diklórmétán-kivonatot. Oldjuk fel a maradékot megközelítőleg 5 ml metil-alkoholban (3.2.), és öntsük az oldatot teljes mennyiségben egy 10 ml-es mérőlombikba. Öblítsük el még kétszer a lombikot 1–2 ml metil-alkohollal, majd öntsük a mérőlombikba. Töltsük fel jelig metil-alkohollal, és keverjük el. Egy aliquot részt szűrjük át membránszűrőn (4.6.). Ezt az oldatot tegyük el a HPLC-meghatározáshoz (5.6.).

##### 5.6. HPLC-meghatározás

###### 5.6.1. Paraméterek

Az alábbi vizsgálati feltételek csak útmutatásként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak:

- folyadékkromatográfias oszlop (4.4.1.),
- HPLC mozgófázis: metil-alkohol és víz keveréke (3.3.),
- átáramlási sebesség: 1–1,5 ml/perc,
- kimutatási hullámhossz: 265 nm,
- befecskendezett mennyiség: 20–50 µl.

Ellenőrizzük a kromatográfias rendszer stabilitását oly módon, hogy 4,0 µg/ml anyagot tartalmazó kalibrálóoldatot (3.7.3.) fecskendezünk be többször, amíg a csúcsmagasságok vagy területek, illetve a retenciók időnként állandóvá nem válnak.

###### 5.6.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibrálóoldatokat (3.7.3.), és mérjük meg az egyes koncentrációkhoz tartozó csúcsok magasságát (területét). A kalibrálóoldatok átlagos magassága vagy területe legyen az ordinátatengelyen, a megfelelő koncentrációk pedig µg/ml-ben az abszcisszán, és ennek alapján szerkesszünk kalibrációs görbét.

###### 5.6.3. Mintaoldat

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibrálóoldatoknál használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatot (5.5.) egymás után többször, és határozzuk meg a metil-benzokvát-csúcsok átlagos magasságát (területét).

#### 6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat által kiváltott metil-benzokvát-csúcsok átlagos magasságát (területét) a kalibrációs görbével egybevetve (5.6.2.), határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben.

A minta mg/kg-ben kifejezett *w* metilbenzokvát-tartalma a következő képlet alapján számítható ki:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

ahol:

*c* = a mintaoldat metil-benzokvát-koncentrációja g/ml-ben,

*m* = a mintadarab tömege grammban.

## 7. Az eredmények validálása

### 7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítását párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektorral lehet megerősíteni, amely során a mintakivonat és a 10,0 µg/ml metil-benzokvátot tartalmazó kalibrálóoldat (3.7.3.) spektrumát hasonlítjuk össze.

#### 7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot megfelelő mennyiségű közbenső standardoldattal (3.7.2.) dúsítjuk. A hozzáadott metil-benzokvát mennyiségének a mintakivonatban található metil-benzokvát becsült mennyiségével közel azonosnak kell lennie.

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat hígítását figyelembe véve, csak a metil-benzokvát-csúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének, a legnagyobb magasságának felénél, az eredeti szélesség ± 10 %-án belül kell lennie.

#### 7.1.2. Diódasoros detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- a minta és a standard spektrumában a kromatogram csúcsmaximumán rögzített legnagyobb elnyeléshez tartozó hullámhossznak a detektor felbontóképessége által meghatározott tűréshatáron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűréshatár jellemzően ± 2 nm;
- 220 és 350 nm között a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsmaximumán rögzített spektruma nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen vizsgált ponton sem tér el a standard abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben;
- 220 és 350 nm között a mintakivonat által kiváltott csúcs felszálló ágának, csúcsmaximumának és leszálló ágának spektrumai nem térhetnek el egymástól a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a spektrumok egyetlen vizsgált ponton sem térnek el a csúcsmaximum spektruma abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezen kritériumok valamelyike nem teljesül, az analizált anyag jelentéte nem bizonyított.

### 7.2. Ismételtetés

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség 4–20 mg/kg metil-benzokvát-tartalom esetén nem haladhatja meg a magasabb érték 10 %-át.

### 7.3. Visszanyerés

A dúsított vakminta esetében a visszanyerésnek legalább 90 %-osnak kell lennie.

## 8. A körvizsgálat eredményei

Tíz laboratóriumban öt minta elemzésére került sor. Minden mintán kettős analízist végeztek.

	Vak	1. liszt	1. pellet	2. liszt	2. pellet
Közéérték [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
<i>s<sub>r</sub></i> [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50



	Vak	1. liszt	1. pellet	2. liszt	2. pellet
CV <sub>r</sub> [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s <sub>R</sub> [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV <sub>R</sub> [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Visszanyerés [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = nem kimutatható

s<sub>r</sub> = az ismételtetés szórása

CV<sub>r</sub> = az ismételtetés relatív szórása, %

s<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság szórása

CV<sub>R</sub> = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

## B. AZ OLAQUINDOX MEGHATÁROZÁSA

(2-[N-2'-(hidroxietil)karbamoil]-3-metilkinoxalin-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxid)

### 1. Cél és alkalmazási terület

Ez a módszer a takarmányokban lévő olaquinoxszint meghatározására szolgál. A meghatározási határ 5 mg/kg.

### 2. Vizsgálati alapelv

A mintát víz-metil-alkohol keverékével extraháljuk. Az olaquinoxtartalmat fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzuk meg, UV-detektor segítségével.

### 3. Reagensek

3.1. Metil-alkohol

3.2. Metil-alkohol, HPLC minőségű

3.3. Víz, HPLC minőségű

3.4. Mozgófázis a HPLC-hez:

Víz (3.3.)-metil-alkohol (3.2.) keveréke, 900 + + 100 (V + V).

3.5. Standard anyag: tiszta olaquinox 2-[N-2'-(hidroxietil)karbamoil]-3-metilkinoxalin-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxid, E 851.

3.5.1. Olaquinox standard törzsoldat, 250 µg/ml

0,1 mg pontossággal mérjük be 50 mg olaquinoxot (3.5.) egy 200 ml-es mérőlombikba, és adjunk hozzá kb. 190 ml vizet. Ezután tegyük a lombikot 20 percre ultrahangos fürdőbe (4.1.). Az ultrahangos kezelés után állítsuk be az oldatot szobahőmérsékletűre, töltsük fel jelig vízzel és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába, és tároljuk hűtőszekrényben. Ebből az oldatból minden hónapban frisset kell készíteni.

3.5.2. Olaquinox közbenső standardoldat, 25 µg/ml

Töltsünk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.5.1.) egy 100 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig a mozgófázissal (3.4.), és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába, és tároljuk hűtőszekrényben. Ebből az oldatból mindennap frisset kell készíteni.

3.5.3. Kalibrálóoldatok

Töltsünk 50 ml-es mérőlombikokba 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 és 20,0 ml közbenső standardoldatot (3.5.2.). Töltsük fel a lombikokat jelig a mozgófázissal (3.4.), és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába. Ezek az oldatok 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 7,5 és 10,0 µg/ml olaquinox koncentrációnak felelnek meg.

Ezekből az oldatokból mindennap frisset kell készíteni.

#### 4. **Eszközök**

- 4.1. Ultrahangos fürdő
- 4.2. Mechanikus rázógépj
- 4.3. HPLC-berendezés, változtatható hullámhosszú ultraibolya-detektorral vagy diódasugaras detektorral.
- 4.3.1. Folyadékromatográfiás oszlop, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm-es töltet vagy ezzel egyenértékű berendezés.
- 4.4. Membránszűrők, 0,45 µm-es.

#### 5. **A vizsgálat módja**

*Megjegyzés:* Az olaquinox fényérzékeny. Valamennyi műveletet tompított fénynél végezzük, vagy barna üvegedényeket használunk.

##### 5.1. *Általános szabályok*

- 5.1.1. Vizsgáljunk meg egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem olaquinox, sem pedig interferáló anyagok nincsenek jelen.
- 5.1.2. Visszanyerési próbát kell végezni a takarmányvakminta analizálásával, amelyet a minta olaquinoxtartalmához közelítő mennyiségű olaquinoxszal dúsítunk. Ahhoz, hogy 50 mg/kg értékre dúsítsuk a takarmányvakmintát, töltsünk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.5.1.) egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, és pároljuk be az oldatot kb. 0,5 ml-re. Adjunk hozzá 50 g takarmányvakmintát, alaposan keverjük össze, és hagyjuk 10 percig állni, majd többször keverjük meg újra, mielőtt folytatjuk a műveletet az extrahálással (5.2.).

*Megjegyzés:* Ehhez a módszerhez a takarmányvakminta a mintához hasonló típusú legyen, és benne olaquinox ne legyen kimutatható.

##### 5.2. *Extrahálás*

0,01 g pontossággal mérjük ki körülbelül 50 g mintát. Töltsük át egy 1 000 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 100 ml metil-alkoholt (3.1.), és tegyük a lombikot 5 percre ultrahangos fürdőbe (4.1.). Adjunk hozzá 410 ml vizet, és hagyjuk az ultrahangos fürdőben további 15 percre. Vegyük ki a lombikot az ultrahangos fürdőből, rázzuk 30 percig rázógépen (4.2.), és szűrjük át egy redőzött szűrőpapíron. A szűrletből töltsünk 10,0 ml-t egy 20 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig vízzel, és keverjük össze. Egy aliquot részt szűrjük át membránszűrőn (4.4.) (lásd 9. Észrevételek). Folytassuk a műveletet a HPLC-meghatározással (5.3.).

##### 5.3. *HPLC-meghatározás*

###### 5.3.1. *Paraméterek:*

A következő vizsgálati feltételek útmutatóként szolgálnak, más feltételeket is lehet alkalmazni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményeket adnak.

Analitikai oszlop (4.3.1.)

Mozgófázis (3.4.): víz (3.3.)-metil-alkohol (3.2.) keveréke 900 + 100 (V + V)

Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/perc

Kimutatási hullámhossz: 380 nm

Befecskendezett mennyi-20–50 µl.

ség:

Ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását oly módon, hogy 2,5 µg/ml-t tartalmazó kalibrálóoldatot (3.5.3.) fecskendezünk be többször, amíg a csúcsok magassága és a retenciók idői állandóvá nem válnak.

###### 5.3.2. *Kalibrációs görbe*

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibrálóoldatokat (3.5.3.), és határozzuk meg az egyes koncentrációkhoz tartozó átlagos csúcsmagasságot (területet). Szerkesszünk kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibrálóoldatok átlagos csúcsmagasságait (területeit) az ordinátatengelyen, a hozzájuk tartozó, µg/ml-ben kifejezett koncentrációkat pedig az abszcisszán ábrázoljuk.

###### 5.3.3. *Mintaoldat*

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibrálóoldatoknál használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatokat (5.2.) egymás után többször, és határozzuk meg az olaquinoxcsúcsok átlagos csúcsmagasságát (területét).

## 6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat olaquinoxcsúcsainak átlagmagasságából (területéből) határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját  $\mu\text{g/ml}$ -ben, a kalibrációs görbe alapján (5.3.2.).

A minta  $w$  olaquinoxtartalmát  $\text{mg/kg}$  egységben a következő képlet adja meg:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

ahol:

$c$  = a mintakivonat (5.2.) olaquinox-koncentrációja  $\mu\text{g/ml}$ -ben

$m$  = a vizsgálati adag (5.2.) tömege g-ban.

## 7. Az eredmények validálása

### 7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítását párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektor alkalmazásával lehet megerősíteni, amelyek segítségével a mintakivonat (5.2.) spektruma és az 5,0  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú kalibrálóoldat (3.5.3.) spektruma összehasonlítható.

#### 7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot (5.2.) megfelelő mennyiségű kalibrálóoldattal (3.5.3.) dúsítjuk. A hozzáadott olaquinox mennyisége közel azonos legyen a mintakivonatban található olaquinox mennyiségével.

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat hígítását figyelembe véve, csak az olaquinoxcsúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének a legnagyobb magasság felénél a dúsítás előtti mintakivonat olaquinoxcsúcsa eredeti szélessége  $\pm 10\%$ -on belül kell lennie.

#### 7.1.2. Diódasoros detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- A minta és a standard spektrumában a kromatogram csúcsmaximumán rögzített legnagyobb elnyeléshez tartozó hullámhossznak a detektor felbontóképessége által meghatározott tűrőhatáron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűrőhatár jellemzően  $\pm 2$  nm.
- 220 és 400 nm között a spektrumnak a relatív abszorbanca 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsmaximumán rögzített spektruma nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen vizsgált ponton sem tér el a standard abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.
- 220 és 400 nm között a mintakivonat által kiváltott csúcs felszálló ágának, csúcsmaximumának és leszálló ágának spektrumai nem térhetnek el egymástól, a spektrumnak a relatív abszorbanca 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a spektrumok egyetlen vizsgált ponton sem térnek el a csúcsmaximum spektruma abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezen kritériumok valamelyike nem teljesül, az analizált anyag jelentése nem bizonyított.

### 7.2. Ismételtetés

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség 10 és 200  $\text{mg/kg}$  közötti olaquinoxtartalom esetén nem haladhatja meg a magasabb eredmény 15 %-át.

### 7.3. Visszanyerés

A dúsított vakminta esetében a visszanyerésnek legalább 90 %-osnak kell lennie.

8. **A körvizsgálat eredményei**

Közösségi körvizsgálatot szerveztek, amelyben négy malactápmintát, köztük egy vakmintaként használt tápot elemeztek maximum 13 laboratóriumban. Az eredményeket az alábbi táblázat tartalmazza:

	1. minta	2. minta	3. minta	4. minta
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
átlag [NE/kg]	—	14,6	48,0	95,4
$s_r$ [g/kg]	—	0,82	2,05	6,36
$S_R$ [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
$CV_r$ [%]	—	5,6	4,3	6,7
$CV_R$ [%]	—	11,1	8,9	8,8
Névleges tartalom [mg/kg]	—	15	50	100
Visszanyerés %	—	97,3	96,0	95,4

L = a laboratóriumok száma

n = az egyedi értékek száma

$S_r$  = az ismételtetés szórása

$S_R$  = a reprodukálhatóság szórása

$CV_r$  = az ismételtetés relatív szórása

$CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása

9. **Észrevételek**

Bár a módszer nem lett hitelesítve a 100 mg/kg-nál több olaquinoxot tartalmazó takarmányokra, kielégítő eredményeket kaphatunk kisebb súlyú mintákkal és/vagy az extraktum (5.2.) olyan mértékű hígításával, hogy a kalibrációs görbe (5.3.2.) tartományába eső koncentrációt érjen el.

C. **AZ AMPRÓLIUM MEGHATÁROZÁSA**

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

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ezzel a módszerrel a takarmányokban és előkeverékekben lévő amprólium szintjét lehet meghatározni. A kimutatási határ 1 mg/kg, a meghatározási határ 5 mg/kg.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát metil-alkohol és víz keverékével extraháljuk. A mozgófázissal történő hígítás és membránszűrés után az ampróliumtartalmat kationcserélő, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC), UV-detektor használatával határozzuk meg.

3. **Reagensek**

3.1. Metil-alkohol

3.2. Acetonitril, HPLC minőségű.

3.3. Víz, HPLC minőségű

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

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

- 3.5. Nátrium-perklorát oldat,  $c = 1,6$  mól/l
- Oldjunk fel 224,74 g nátrium-perklorát-monohidrátot vízben (3.3.) egy 1 000 ml-es mérőlombikban, töltsük fel vízzel (3.3.) jelig, és keverjük össze.
- 3.6. Mozgófázis a HPLC-hez (lásd az Észrevételek 9.1. pontját).
- 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,  $500$   $\mu\text{g/ml}$
- Mérjük 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.  $4$  °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.
- 3.7.2. Amprólium közbenső standardoldat,  $50$   $\mu\text{g/ml}$
- Pipetázzunk  $5,0$  ml standard törzsoldatot (3.7.1.) egy  $50$  ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig az extraháló oldószerrel (3.8.), és keverjük össze.  $4$  °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.
- 3.7.3. Kalibrálóoldatok
- Adagoljunk  $0,5$ ,  $1,0$  és  $2,0$  ml közbenső standardoldatot (3.7.2.)  $50$  ml-es mérőlombikokba. Töltsük fel a lombikokat jelig a mozgófázissal (3.6.), és keverjük össze. Ezek az oldatok  $0,5$ ,  $1,0$ , illetve  $2,0$   $\mu\text{g/ml}$  ampróliumnak felelnek meg. Ezeket az 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. HPLC-berendezés  $100$   $\mu\text{l}$  mennyiség befecskendezésére alkalmas befecskendező rendszerrel
- 4.1.1.  $125$  mm  $\times$   $4$  mm méretű, kationcserélő Nucleosil 10 SA folyadékkromatográfias oszlop,  $5$  vagy  $10$   $\mu\text{m}$ -es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés
- 4.1.2. Változtatható hullámhosszon mérő UV-detektor vagy diódasoros detektor
- 4.2. Membránszűrő, PTFE anyag,  $0,45$   $\mu\text{m}$ -es
- 4.3.  $0,22$   $\mu\text{m}$ -es membránszűrő
- 4.4. Ultrahangos fürdő
- 4.5. Mechanikus rázó gép vagy mágneses keverő
5. **A vizsgálat módja**
- 5.1. *Általános szabályok*
- 5.1.1. Takarmányvakminta

A visszanyerési próba (5.1.2.) előtt vizsgáljunk meg egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem amprólium, sem interferáló anyagok nincsenek jelen. A takarmányvakminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen, és ampróliumot vagy interferáló anyagokat ne tartalmazzon.

### 5.1.2 Visszanyerési próba

A mintában találhatóval közel azonos mennyiségű ampróliummal dúsított takarmányvakminta analizésével végezzük visszanyerési próbát. A 100 mg/kg szintre való dúsításhoz öntsünk át a standard törzsoldatból (3.7.1.) 10,0 ml-t egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, és párologtassuk az oldatot körülbelül 0,5 ml-ig. Adjunk hozzá 50 g takarmányvakmintát, alaposan keverjük össze, és hagyjuk 10 percig állni, majd többször keverjük meg újra, mielőtt folytatjuk a műveletet az extrahálással (5.2.).

Amennyiben a mintával megegyező takarmányfajtából vett takarmányvakminta nem áll rendelkezésre (lásd az 5.1.1. pontot), a visszanyerési próbát a standard hozzáadási módszerrel lehet elvégezni. Ebben az esetben a vizsgált mintát az abban már jelen lévővel közel azonos mennyiségű ampróliummal dúsítjuk. Ezt a mintát a nem dúsított mintával együtt elemezzük, és a visszanyerést kivonással számítjuk ki.

### 5.2. Extrahálás

#### 5.2.1. Előkeverékek (ampróliumtartalom < 1 %) és takarmányok

Mérjük ki 0,01 g pontossággal, az ampróliumtartalomtól függően, 5–40 g mintát egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, és adjunk hozzá 200 ml extraháló oldószert (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 mozgófázissal (3.6.) 0,5–2 µg/ml ampróliumtartalomig és keverjük össze (lásd az Észrevételek 9.3. pontját). 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 (ampróliumtartalom ≥ 1 %).

Mérjük ki 0,001 g pontossággal, az ampróliumtartalomtól függően, 1–4 g előkeveréket egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, és adjunk hozzá 200 ml extraháló oldószert (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 mozgófázissal (3.6.) 0,5–2 µg/ml ampróliumtartalomig, 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 útmutatásként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak.

Folyadékromatográfiás

oszlop (4.1.1): 125 mm × 4 mm méretű, kationcserélő Nucleosil 10 SA, 5 vagy 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.

Mozgófázis (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

Kimutatási hullámhossz: 264 nm

Befecskendezett mennyi-100 µl.  
ség:

Ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását oly módon, hogy 1,0 µg/ml-es kalibrálóoldatot (3.7.3.) fecskendezünk be többször, amíg a csúcsok magassága és a retenciós idők állandóvá nem válnak.

#### 5.3.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzünk be minden kalibrálóoldatot (3.7.3.) többször egymás után, és határozzuk meg az egyes koncentrációkhoz tartozó csúcsmagasságok (területének) átlagát. Szerkesszünk kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibrálóoldatok átlagos csúcsmagasságait (területeit) az ordinátatengelyen, a hozzájuk tartozó, µg/ml-ben kifejezett koncentrációkat pedig az abszcisszán ábrázoljuk.

#### 5.3.3. Mintaoldat

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibrálóoldatoknál használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatot (5.2.) egymás után többször, és határozzuk meg az ampróliumcsúcsok átlagos csúcsmagasságát (területét).

## 6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat ampróliumcsúcsainak átlagmagasságából (területéből) határozzuk meg a mintaoldat µg/ml-ben kifejezett koncentrációját a kalibrációs görbe (5.3.2.) alapján.

A minta mg/kg-ban kifejezett w ampróliumtartalmát a következő képlettel kapjuk meg:

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

ahol:

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

c = a mintakivonat (5.2.) µg/ml-ben kifejezett ampróliumkoncentrációja

f = hígítási faktor, az 5.2. pont szerint

m = a mintadarab 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 2,0 µg/ml-es kalibrálóoldat (3.7.3.) spektrumát hasonlítjuk össze.

#### 7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

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

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat hígítását figyelembe véve, csak az ampróliumcsúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének a legnagyobb magasság felénél a dúsítás előtti mintakivonat ampróliumcsúcsa eredeti szélessége ± 10 %-on belül kell lennie.

#### 7.1.2. Diódasoros detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- a) a minta és a standard spektrumában a kromatogram csúcsmaximumán rögzített legnagyobb elnyeléshez tartozó hullámhossznak a detektor felbontóképessége által meghatározott tűrészatháron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűrészathár jellemzően ± 2 nm.
- b) 210 és 320 nm között a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsmaximumán rögzített spektruma nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen vizsgált ponton sem tér el a standard abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.
- c) 210 és 320 nm között, a mintakivonat által kiváltott csúcs felszálló ágának, csúcsmaximumának és leszálló ágának spektrumai nem térhetnek el egymástól a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a spektrumok egyetlen vizsgált ponton sem térnek el a csúcsmaximum spektruma abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezen kritériumok valamelyike nem teljesül, az analizált anyag jelenléte nem bizonyított.

### 7.2. Ismételtetés

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

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

### 7.3. Visszanyerés

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

8. **A körvizsgálat eredményei**

Körvizsgálatot szerveztek, amely során három baromfitakarmányt (1–3. minta) egy ásványi takarmányt (4. minta) és egy előkeveréket (5. minta) analizáltak. Az eredmények a következő táblázatban szerepelnek.

	1. minta (takarmány- vakminta)	2. minta	3. minta	4. minta	5. minta
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
átlag [NE/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
Névleges 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 relatív szórása

$s_R$  = a reprodukálhatóság szórása

$CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása

9. **Észrevételek**

- 9.1. Amennyiben a minta tiamint tartalmaz, a tiamincsúcs valamivel az ampróliumcsúcs 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 mozgófázis (3.6.) acetonitril részének legfeljebb 50 %-át helyettesítsük metil-alkohollal.
- 9.2. A British Pharmacopoeia szerint az ampróliumoldat ( $c = 0,02$  mól/l) spektruma sósavban ( $c = 0,1$  mól/l) 246 nm és 262 nm között ad maximumértékeket. Az abszorbancia értéke 246 nm-nél 0,84, 262 nm-nél 0,80.
- 9.3. A kivonatot mindig fel kell hígítani a mozgófázissal, mert egyébként az ampróliumcsúcs retenciós ideje jelentősen eltolódhat az ionerőben történő változásoknak köszönhetően.

D. **KARBADOX MEGHATÁROZÁSA**

*Metil 3-(2-kinoxalin-2-ilmetilén)karbazát  $N^1, N^4$ -dioxid*

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer a takarmányokban, előkeverékekben és készítményekben lévő karbadoxszint meghatározására szolgál. A kimutatási határ 1 mg/kg, a meghatározási határ 5 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 karbadoxtartalmat fordított fázisú, nagy teljesítményű 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).  
Keverjünk össze 500 ml metil-alkoholt (3.1.) 500 ml acetonitrillel (3.2.).
- 3.6. Ecetsav,  $\sigma = 10 \%$ .  
Hígítsunk fel 10 ml ecetsavat (3.3.) vízzel 100 ml-ig.
- 3.7. Nátrium-acetát
- 3.8. Víz, HPLC minőségű
- 3.9. Acetát pufferoldat,  $c = 0,01 \text{ mol/l}$ ,  $\text{pH} = 6,0$ .  
Oldjunk fel 0,82 g nátrium-acetátot (3.7.) 700 ml vízben (3.8.), és állítsuk be a  $\text{pH}$ -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. Mozgófázis a HPLC-hez:  
Keverjünk össze 825 ml acetát pufferoldatot (3.9.) 175 ml acetonitrillel (3.2.).  
Szűrjük át egy 0,22  $\mu\text{m}$ -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  $\text{N}^1, \text{N}^4$ -dioxid, E 850.
- 3.11.1. Karbadox standard törzsoldat, 100  $\mu\text{g/ml}$  (lásd a Megjegyzést az 5. A vizsgálat módja című pontban):  
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 barna üveglombikot, és tároljuk hűtőben. 4 °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten az oldat egy hónapig stabil.
- 3.11.2. Kalibrálóoldatok  
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 lombikokat alumíniumfóliába. Ezek az oldatok 2,0, 5,0, 10,0, illetve 20,0  $\mu\text{g/ml}$  karbadoxnak felelnek meg.  
A kalibrálóoldatokat közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni.  
Megjegyzés: A 10 mg/kg-nál kevesebb karbadoxot tartalmazó takarmányoknál történő meghatározásnál, 2,0  $\mu\text{g/ml}$ -nél alacsonyabb koncentrációjú kalibrálóoldatokat 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 rázógépj vagy mágneses keverő.
- 4.2. Üvegszál szűrőpapír (Whatman GF/A vagy azzal egyenértékű más papír).

- 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 üvegyapot dugót a cső alsó végébe és egy üvegpálcával tömködjük le.

- 4.4. HPLC-berendezés 20 µl mennyiség befecskendezésére alkalmas befecskendező rendszerrel
- 4.4.1. Folyadékromatográfiás oszlop: C<sub>18</sub>, 300 mm × 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. Membránszűrő, 0,45 µm
- 4.7. Ultrahangos fürdő

## 5. A vizsgálat módja

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

### 5.1. Általános szabályok

#### 5.1.1. Takarmányvakminta

A visszanyerési próba elvégzése előtt vizsgáljunk meg egy takarmányvakmintát 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 találhatóval közel azonos mennyiségű karbadoxszal dúsított takarmányvakminta (5.1.1.) analízisével végezzünk visszanyerési próbát. Az 50 mg/kg szintre 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-re nitrogénáramban. Adjunk hozzá 10 g takarmányvakmintát, keverjük össze, és hagyjuk állni 10 percig, mielőtt folytatjuk a műveletet az extrahálással (5.2.).

Amennyiben a mintával megegyező takarmányfajtából vett takarmányvakminta 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 közel azonos mennyiségű karbadoxszal dúsítjuk. Ezt a mintát a nem dúsított mintával együtt elemezzük, és a visszanyerést kivonással számítjuk ki.

### 5.2. Extrahálás

#### 5.2.1. Takarmány

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 üvegszálász szűrőpapíron (4.2.). Ezt az oldatot használjuk a derítésnél (5.3.).

#### 5.2.2. Előkeverékek (0,1–2,0 %).

Mérjük ki 0,001 g pontossággal 1 g öröletlen mintát, és tegyük 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 üvegszálász szűrőpapíron (4.2.).

A szűrlet egy aliquot részét pipettázzuk át egy 50 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzájuk 15,0 ml vizet, töltsük fel jelig metil-alkohol-acetonitril keverékével (3.5.), és keverjük össze. A végső oldat karbadox koncentrációjának körülbelül 10 µg/ml-nek 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 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 üvegszál szűrőpapíron (4.2.).

A szűrlet egy aliquot részét hígítsuk fel víz-metil-alkohol-acetonitril keverékkel (3.12.) 10–15 µg/ml-es végső karbadoxkoncentrációig (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 előkészítése

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

#### 5.3.2. A minta derítése

Engedjük át az alumínium-oxid oszlopon 15 ml leszűrt 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

Az alábbi vizsgálati feltételek csak útmutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak:

Folyadékkromatográfiás

oszlop (4.4.1): 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.

Mozgófázis (3.10.): Acetát pufferoldat (3.9.) és acetonitril (3.2.) 825 + 175 (v + v) arányú keveréke.

Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/perc

Kimutatási hullámhossz: 365 nm

Befecskendezett mennyi-20 µl.  
ség:

Ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását oly módon, hogy 5,0 µg/ml-es kalibrálóoldatot (3.11.2.) fecskendezünk be többször, amíg a csúcsmagasságok (vagy területek) és a retenciós idők állandóvá nem válnak.

#### 5.4.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzünk be minden kalibrálóoldatot (3.11.2.) többször egymás után, és határozzuk meg az egyes koncentrációkhoz tartozó csúcsmagasságokat (területeket). Szerkesszünk kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibrálóoldatok átlagos csúcsmagasságait (területeit) az ordinátangelyen, a hozzájuk tartozó, µg/ml-ben kifejezett koncentrációkat pedig az abszcisszán ábrázoljuk.

#### 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) egymás után többször, és határozzuk meg a karbadox átlagos csúcsmagasságát (területét).

### 6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat karbadoxcsúcsainak átlagmagasságából (területéből) határozzuk meg a mintaoldat µg/ml-ben kifejezett karbadoxkoncentrációját a kalibrációs görbe (5.4.2.) alapján.

**6.1. Takarmány**

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

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

ahol:

c = a mintakivonat (5.3.2.) µg/ml-ben kifejezett karbadoxkoncentrációja.

V<sub>1</sub> = a ml-ben kifejezett extrahált térfogat (pl. 50)

m = a mintadarab tömege grammban.

**6.2. Előkeverékek és készítmények.**

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

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

ahol:

c = a mintakivonat (5.2.2. vagy 5.2.3.) µg/ml-ben kifejezett karbadoxkoncentrációja.

V<sub>2</sub> = a ml-ben kifejezett extrahált térfogat (azaz az előkeverékek esetében 50; a készítmények esetében 150).

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

m = a mintadarab tömege grammban.

**7. Az eredmények validálása****7.1. Azonosítás**

Az analízált anyag azonosítása párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektor használatával erősíthető meg, amely során a mintakivonat és a 10,0 µg/ml-es kalibrálóoldat (3.11.2.) spektrumát hasonlítjuk össze.

**7.1.1. Párhuzamos kromatográfia**

A mintakivonatot megfelelő mennyiségű kalibrálóoldattal (3.11.2.) dúsítjuk. A hozzáadott karbadox mennyisége közel azonos legyen a mintakivonatban található karbadox becsült mennyiségével.

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat hígítását figyelembe véve, csak a karbadoxcsúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének a legnagyobb magasság felénél az eredeti szélesség ± 10 %-on belül kell lennie.

**7.1.2. Diódasoros detektálás**

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

- a) a minta és a standard spektrumában a kromatogram csúcsmaximumán rögzített legnagyobb elnyeléshez tartozó hullámhossznak a detektor felbontóképessége által meghatározott tűréshatáron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűréshatár jellemzően ± 2 nm;
- b) 225 és 400 nm között a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein a mintának és a standardnak a kromatogram csúcsmaximumán rögzített spektruma nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen vizsgált ponton sem tér el a standard abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben;
- c) 225 és 400 nm között a mintakivonat által kiváltott csúcs felszálló ágának, csúcsmaximumának és leszálló ágának spektrumai nem térhet el egymástól a spektrumnak a relatív abszorbancia 10 és 100 %-a közötti tartományba eső részein. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a spektrumok egyetlen vizsgált ponton sem térnek el a csúcsmaximum spektruma abszorbanciájának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Amennyiben ezen kritériumok valamelyike nem teljesül, az analízált anyag jelenléte nem bizonyított.

7.2. *Ismételhetőség*

A 10 mg/kg vagy magasabb karbadoxtartalmú anyagok esetében az ugyanazon mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg a magasabb érték 15 %-át.

7.3. *Visszanyerés*

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

8. **A körvizsgálat eredményei**

Körvizsgálatot szerveztek, amely során hat takarmányt, négy előkeveréket és három készítményt analizáltak nyolc laboratóriumban. Minden mintán kettős analízist végeztek. (Erről a körvizsgálatról részletesebb információk a következő helyen szerepelnek: *Journal of the AOAC*, 71. kötet, 1988, 484–490. o.). Az eredmények (a szélsőértékek kizárásával) a következő táblázatokban láthatók:

1. táblázat

**A takarmányokon végzett körvizsgálat 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 készítményeken végzett körvizsgálat eredményei**

	Előkeverékek				Készítmények		
	A	B	C	D	A	B	C
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 relatív szórása  
 $S_R$  = a reprodukálhatóság szórása  
 $CV_R$  = a reprodukálhatóság relatív szórása

## IX. MELLÉKLET

## A 6. CIKKBEN EMLÍTETT MEGFELELÉSI TÁBLÁZATOK

## 1. 71/250/EGK irányelv

71/250/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk, első albekezdés	3. cikk
1. cikk, második albekezdés	2. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet, 1. rész	II. melléklet
Melléklet, 2. rész	—
Melléklet, 3. rész	—
Melléklet, 4. rész	III. melléklet, O. rész
Melléklet, 5. rész	III. melléklet, M. rész
Melléklet, 6. rész	III. melléklet, N. rész
Melléklet, 7. rész	III. melléklet, Q. rész
Melléklet, 9. rész	III. melléklet, K. rész
Melléklet, 10. rész	—
Melléklet, 11. rész	—
Melléklet, 12. rész	III. melléklet, J. rész
Melléklet, 14. rész	III. melléklet, D. rész
Melléklet, 16. rész	—

## 2. 71/393/EGK irányelv

71/393/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet, I. rész	III. melléklet, A. rész
Melléklet, II. rész	III. melléklet, E. rész
Melléklet, III. rész	III. melléklet, P. rész
Melléklet, IV. rész	III. melléklet, H. rész

## 3. 72/199/EGK irányelv

72/199/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
4. cikk	—
I. melléklet, 1. rész	III. melléklet, L. rész
I. melléklet, 2. rész	III. melléklet, C. rész
I. melléklet, 3. rész	—
I. melléklet, 4. rész	—
I. melléklet, 5. rész	V. melléklet, A. rész
II. melléklet	—

4. **73/46/EGK irányelv**

73/46/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
3. cikk	—
4. cikk	—
I. melléklet, 1. rész	III. melléklet, B. rész
I. melléklet, 2. rész	—
I. melléklet, 3. rész	III. melléklet, I. rész

5. **76/371/EGK irányelv**

76/371/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	1. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet	I. melléklet

6. **76/372/EGK irányelv**

76/372/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	—
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet	—

7. **78/633/EGK irányelv**

78/633/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet, 1. rész	—
Melléklet, 2. rész	—
Melléklet, 3. rész	IV. melléklet, C. rész

8. **81/715/EGK irányelv**

81/715/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	—
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet	—

9. **84/425/EGK irányelv**

84/425/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	—
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet	—

10. **86/174/EGK irányelv**

86/174/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	4. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet	VII. melléklet

11. **93/70/EGK irányelv**

93/70/EGK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet	IV. melléklet, D. rész

12. **93/117/EK irányelv**

93/117/EK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. és 5. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
Melléklet, 1. rész	IV. melléklet, E. rész
Melléklet, 2. rész	VIII. melléklet, A. rész

13. **98/64/EK irányelv**

98/64/EK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. és 5. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
4. cikk	—
Melléklet, A. rész	III. melléklet, F. rész
Melléklet, C. rész	VIII. melléklet, B. rész



## 14. 1999/27/EK irányelv

1999/27/EK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. és 5. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
4. cikk	—
5. cikk	—
6. cikk	—
7. cikk	—
Melléklet, A. rész	VIII. melléklet, C. rész
Melléklet, B. rész	IV. melléklet, F. rész
Melléklet, C. rész	VIII. melléklet, D. rész

## 15. 1999/76/EK irányelv

1999/76/EK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
4. cikk	—
Melléklet	IV. melléklet, G. rész

## 16. 2000/45/EK irányelv

2000/45/EK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
4. cikk	—
Melléklet, A. rész	IV. melléklet, A. rész
Melléklet, B. rész	IV. melléklet, B. rész
Melléklet, C. rész	III. melléklet, G. rész

## 17. 2002/70/EK irányelv

2002/70/EK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	1. cikk
2. cikk	2. és 3. cikk
3. cikk	—
4. cikk	—
5. cikk	—
I. melléklet	I. melléklet és V. melléklet, B. (I.) rész
II. melléklet	II. melléklet és V. melléklet, B. (II.) rész

## 18. 2003/126/EK irányelv

2003/126/EK irányelv	Ez a rendelet
1. cikk	3. cikk
2. cikk	—
3. cikk	—
4. cikk	—
5. cikk	—
6. cikk	—
Melléklet	VI. melléklet