

Ez a dokumentum kizárólag tájékoztató jellegű és nem vált ki joghatást. Az EU intézményei semmiféle felelősséget nem vállalnak a tartalmáért. A jogi aktusoknak – ideértve azok bevezető hivatkozásait és preambulumbekendéseit is – az Európai Unió Hivatalos Lapjában közzétett és az EUR-Lex portálon megtalálható változatai tekintendők hitelesnek. Az említett hivatalos szövegváltozatok közvetlenül elérhetők az ebben a dokumentumban elhelyezett linkeken keresztül

► **B****A BIZOTTSÁG 152/2009/EK RENDELETE**

(2009. január 27.)

a takarmányok hatósági ellenőrzése során alkalmazott mintavételi és vizsgálati módszerek megállapításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

(HL L 54., 2009.2.26., 1. o.)

Módosította:

Hivatalos Lap

		Szám	Oldal	Dátum
► <u>M1</u>	A Bizottság 278/2012/EU rendelete (2012. március 28.)	L 91	8	2012.3.29.
► <u>M2</u>	A Bizottság 51/2013/EU rendelete (2013. január 16.)	L 20	33	2013.1.23.
► <u>M3</u>	A Bizottság 691/2013/EU rendelete (2013. július 19.)	L 197	1	2013.7.20.
► <u>M4</u>	A Bizottság 709/2014/EU rendelete (2014. június 20.)	L 188	1	2014.6.27.
► <u>M5</u>	A Bizottság (EU) 2017/645 rendelete (2017. április 5.)	L 92	35	2017.4.6.
► <u>M6</u>	A Bizottság (EU) 2017/771 rendelete (2017. május 3.)	L 115	22	2017.5.4.

Helyesbítette:

- **C1** Helyesbítés, HL L 335., 2012.12.7., 55. o. (152/2009/EK)
- **C2** Helyesbítés, HL L 141., 2020.5.5., 39. o. (51/2013/EU)
- **C3** Helyesbítés, HL L 143., 2020.5.6., 12. o. (152/2009/EK)

▼ **B****A BIZOTTSÁG 152/2009/EK RENDELETE****(2009. január 27.)****a takarmányok hatósági ellenőrzése során alkalmazott mintavételi és vizsgálati módszerek megállapításáról****(EGT-vonatkozású szöveg)**▼ **M3***1. cikk*

A takarmányok hatósági ellenőrzésére, különös tekintettel az alkotóelemek, többek között a géntechnológiával módosított szervezeteket (GMO-kat) tartalmazó, azokból álló, illetve azokból előállított anyagok, az 1831/2003/EK rendelet ⁽¹⁾ szerinti takarmány-adalékanyagok és a 2002/32/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv ⁽²⁾ szerinti nemkívánatos anyagok meghatározására szolgáló mintavételezést az I. mellékletben meghatározott módszereknek megfelelően kell elvégezni.

Az I. mellékletben foglalt mintavételi módszer alkalmazandó a takarmányoknál előforduló peszticid-szermaradványok 2005. február 23-i 396/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet ⁽³⁾ szerinti meghatározására irányuló ellenőrzés, valamint a 619/2011/EU rendeletnek való megfelelés ellenőrzése során.

▼ **B***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 ► **C1** takarmánykeverékek ◄ 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

► **C1** A baromfitakarmány-keverék ◄ 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.

⁽¹⁾ HL L 268., 2003.10.18., 29. o.

⁽²⁾ HL L 140., 2002.5.30., 10. o.

⁽³⁾ HL L 70., 2005.3.16., 1. o.

▼B*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.

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.

▼ M3

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.

A reprezentatív mintavétel célja kisebb mennyiséget venni a tételből oly módon, hogy e mennyiség bármely jellemző tulajdonságának meghatározásával az adott tulajdonságot illetően a teljes tételre érvényes középértéket kapjunk. A mintavételezés során a tétel különböző részeiből ismételt elemi mintákat kell venni. Ezen elemi mintákat össze kell keverni annak érdekében, hogy az így nyert átlagolt mintából reprezentatív osztással reprezentatív végső mintákat lehessen kialakítani.

Ha a mintavételre kerülő takarmányadagok szemrevételezés alapján minőségi eltérést mutatnak a takarmány ugyanazon tételének többi részéhez képest, a szóban forgó adagokat el kell különíteni és altételként kell kezelni őket. Amennyiben a takarmányt nem lehet különálló altételekre osztani, azt egyetlen tételként kell mintavételezni. Ebben az esetben erről a tényről említést kell tenni a mintavételi jegyzőkönyvben.

Ha az e rendelet előírásai alapján mintavételezett takarmányról megállapítják, hogy nem felel meg az uniós követelményeknek, továbbá az egy azonos osztályú vagy megnevezésű takarmánytétel részét képezi, abból kell kiindulni, hogy a tétel többi része sem biztonságos, kivéve, ha a részletes átvizsgálás során nem bizonyítható, hogy a tétel többi része nem felel meg az uniós követelményeknek.

2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

- Tétel: azonosított mennyiségű takarmány, amely közös jellemzőkkel rendelkezik, úgymint eredet, fajta, a csomagolás típusa, csomagoló, feladó, címkézés, valamint – előállítási folyamat esetében – az egyetlen üzemben egységes előállítási paraméterek mellett előállított termelési egység vagy – amennyiben azokat egymás után folyamatosan állítják elő és együtt tárolják – több ilyen egység.
- Mintavételi tétel: egy tétel, illetve a tétel vagy altétel egy azonosított része.
- Lepecsételt minta: pecséttel oly módon ellátott minta, hogy a pecsét felsértése vagy eltávolítása nélkül ne lehessen hozzáférni a mintához.
- Elemi minta: a mintavételi tétel egy pontjából vett mennyiség.
- Átlagolt minta: ugyanazon mintavételi tételből vett elemi minták egyesítésével nyert minta.
- Redukált minta: az átlagolt minta olyan része, amelyet az utóbbiból reprezentatív redukálási folyamattal nyernek.
- Végső minta: a redukált minta vagy a homogenizált átlagolt minta egy része.
- Laboratóriumi minta: a laboratórium részére szánt minta (a laboratóriumba érkező minta), amely lehet végső, redukált vagy átlagolt minta.

▼ **M3**

3. ÁLTALÁNOS RENDELKEZÉSEK

- A mintavételt végző személyzet: a mintavételezést az illetékes hatóságok által erre a feladatra felhatalmazott személyek végzik.
- A mintát pecséttel kell ellátni úgy, hogy a pecsét felsértése vagy eltávolítása nélkül ne lehessen hozzáférni a mintához. A pecsétjelenek egyértelműen azonosíthatónak és jól láthatónak kell lennie. Egy másik lehetőség szerint a mintát zárható edénybe kell helyezni oly módon, hogy azt a tárolóedény vagy tartály visszafordíthatatlan roncsolása nélkül ne lehessen felnyitni, elkerülve így a tárolóedény vagy tartály esetleges újrafelhasználását.
- A minta azonosítása: a mintát letörölhetetlenül meg kell jelölni és azonosítani kell oly módon, hogy egyértelmű kapcsolata a mintavételi jegyzőkönyvvel megállapítható legyen.
- Valamennyi átlagolt mintából legalább kettő végső mintát kell venni: egyet az ellenőrzéshez (hatósági ellenőrzés), egyet pedig a takarmányipari vállalkozó részére (védelem). Adott esetben referencia céljából is lehet végső mintát venni. Amennyiben a teljes átlagolt minta homogenizált, a végső mintákat a homogenizált átlagolt mintából kell venni, ha ez az eljárás nem ütközik az adott tagállam takarmányipari vállalkozói jogokra vonatkozó jogszabályaiba.

4. BERENDEZÉS

- 4.1. A mintavételi eszközöket olyan anyagokból kell készíteni, amelyek nem szennyezhetik a mintavételre kerülő termékeket. A többszöri használatra szánt eszközöknek könnyen tisztíthatónak kell lenniük a keresztszennyeződések elkerülése érdekében.

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.

Amennyiben a mintavételi szűrőcsapon több nyílás található, e nyílásokat rekeszekkel kell elválasztani, vagy a szűrőcsapnak lépcsősen elhelyezett, szekvenciális nyílásokkal kell rendelkeznie annak biztosítására, hogy a mintavételezés a szűrőcsap egymás mellett elhelyezkedő különböző pontjain történjen.

4.2.2. *Gépi mintavétel*

Mozgásban lévő takarmányok mintavételére megfelelő gépi eszközök használhatók. Az eszköz megfelelőnek tekinthető, ha alkalmas legalább az anyagáram teljes keresztmetszetének mintavételezésére.

A (magas áramlási sebességgel) mozgásban lévő takarmányok esetében automata mintavételőket lehet használni.

4.2.3. *Mintaosztó*

Ha lehetséges és indokolt, a minta megközelítően egyenlő részekre való felosztására tervezett eszközt kell használni a redukált minták reprezentatív elkészítéséhez.

▼ **M3****5. AZ ELEMI MINTÁK SZÁMÁRA VONATKOZÓ MENNYISÉGI KÖVETELMÉNYEK**

- Az elemi minták számára vonatkozóan az 5.1. és 5.2. pontban leírt mennyiségi követelmények alkalmazandók az 500 tonnát meg nem haladó tömegű és a reprezentatív módon mintavételezhető tételek esetében. A bemutatott mintavételi eljárás érvényes a mintavételi tétel előírt maximális méreténél nagyobb mennyiségekre is, feltéve, hogy figyelmen kívül hagyják az elemi minták alábbi táblázatokban feltüntetett maximális számát, hogy az elemi minták számának meghatározása az eljárás megfelelő részénél megadott négyzetgyökös képlettel történik (lásd: az 5.3. pont), valamint hogy az átlagolt minta minimális méretét arányosan növelték. Ez nem zárja ki egy nagy tétel kisebb altételekre történő felosztását, amelyet követően minden egyes altételt az 5.1. és 5.2. pontban leírt eljárással összhangban kell mintavételezni.
- A mintavételi tételnek akkorának kell lennie, hogy minden egyes alkotórészből mintát lehessen venni.
- Igen nagy tömegű (> 500 tonna) tételek és altételek, valamint azon tételek esetében, amelyek szállítása vagy tárolása nem teszi lehetővé az e fejezt 5.1. és 5.2. pontja szerinti mintavételi eljárást, az 5.3. pontban bemutatott eljárást kell alkalmazni.
- Ha a takarmányipari vállalkozót kötelező monitoringrendszer keretében jogszabályok kötelezik az e rendeletben foglaltaknak való megfelelésre, a vállalkozó a működési jellemzők figyelembevétele érdekében – az illetékes hatóság engedélyét követően – eltérhet az e fejezetben megállapított mennyiségi követelményektől, feltéve, hogy az illetékes hatóság számára kielégítő módon bizonyította a mintavételi eljárás egyenértékűségét a reprezentativitás tekintetében.
- Különleges esetekben, amikor (a csomagolási forma, szállítás és tárolás módja stb. miatt) a mennyiségi követelmények szerinti mintavételi módszer nem alkalmazható a tételen bekövetkező elfogadhatatlan gazdasági kár miatt” alternatív mintavételi módszert lehet alkalmazni, feltéve, hogy az a lehetőségekhez képest reprezentatív, továbbá azt teljes körűen leírják és dokumentálják.

5.1. A takarmányban egyenletesen eloszló anyagok és termékek ellenőrzése kapcsán az elemi mintákra vonatkozó mennyiségi követelmények**5.1.1. Ömlesztett szilárd takarmány**

A mintavételi tétel tömege	Az elemi minták minimális száma
≤ 2,5 tonna	7
> 2,5 tonna	a mintavételi tételt (*) kitevő tonnák számának $\sqrt{20}$ -szorosa, legfeljebb 40 elemi minta

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

▼ M3

5.1.2. *Ömlesztett folyékony takarmány*

A mintavételi tétel tömege	Az elemi minták minimális száma
≤ 2,5 tonna vagy ≤ 2 500 liter	4 (*)
> 2,5 tonna vagy > 2 500 liter	7 (*)

(*) Amennyiben nem lehet homogén folyadékot elérni, növelni kell az elemi minták számát.

5.1.3. *Kiszerezelt takarmány*

A (szilárd és folyékony) takarmányt zsákokba, göngyölegekbe, dobozokba, hordókba stb. lehet csomagolni, amelyek a táblázatban egységek néven szerepelnek. A nagy egységek (≥ 500 kg vagy liter) esetében a mintavételezésnek az ömlesztett takarmányokra érvényes előírásokkal összhangban kell történnie (lásd: az 5.1.1. és az 5.1.2. pont).

A mintavételi tétel tömege	Azon egységek minimális száma, amelyekből (legalább) egy elemi mintát kell venni (*)
1–20 egység	1 egység (**)
21–150 egység	3 egység (**)
151–400 egység	5 egység (**)
> 400 egység	a mintavételi tételt (***) kitevő egységek $\sqrt{\text{számának}}$ egy negyede, legfeljebb 40 egység

(*) Ha egy egység felbontása befolyásolhatja a vizsgálatot (pl. romlandó nedves takarmányoknál), az elemi mintának a felbontatlan egységnek kell lennie.

(**) Az 1 kg-ot vagy 1 litert meg nem haladó egységek esetében az elemi mintának egy eredeti egység tartalmának kell lennie.

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

5.1.4. *Takarmánytömbök és nyalósók*

A 25 egységből álló mintavételi tételenként legalább egy, legfeljebb 4 tömböt vagy nyalósót kell mintaként venni.

Az egyenként 1 kg-ot meg nem haladó tömegű tömbök és nyalósók esetében az elemi mintának egy tömbnek vagy egy nyalósónak kell lennie.

5.1.5. *Szálastakarmány/zöldtakarmány*

A mintavételi tétel tömege	Az elemi minták minimális száma (*)
≤ 5 tonna	5
> 5 tonna	a mintavételi tételt (**) kitevő tonnák számának $\sqrt{5}$ -szorosa, legfeljebb 40 elemi minta

(*) Elismert tény, hogy bizonyos helyzetekben (pl. silótakarmányok esetében) a tétel elfogadhatatlan mértékű sérülése nélkül nem lehet teljesíteni az elemi minták számára vonatkozó előírást. Ekkor alternatív módszerhez lehet folyamodni, és még e rendelet alkalmazásának megkezdése előtt útmutató készül az ilyen típusú tételek mintavételezéséhez.

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

▼M3

5.2. **A takarmányban egyenetlenül eloszló anyagok és termékek ellenőrzése kapcsán az elemi mintákra vonatkozó mennyiségi követelmények**

Az elemi minták számára vonatkozóan itt ismertetett követelményeket az alábbi esetekben kell alkalmazni:

— takarmány-alapanyagokban előforduló aflatoxinok, anyarozs, más mikotoxinok és káros botanikai szennyeződések ellenőrzése,

— alkotóelemek, többek között a géntechnológiával módosított anyagok okozta keresztszennyeződés, illetve a takarmány-alapanyagokban feltételezhetően egyenetlenül eloszló anyagok ellenőrzése.

Amennyiben az ellenőrzést végző hatóságnak erős a gyanúja, hogy ez az egyenetlen eloszlás valamely alkotóelem, illetve az összetett takarmányban található valamely anyag okozta keresztszennyeződés nyomán is fellép, az alábbi táblázatban feltüntetett mennyiségi követelményeket lehet alkalmazni.

A mintavételi tétel tömege	Az elemi minták minimális száma
< 80 tonna	Lásd: az 5.1. pont szerinti mennyiségi követelmények. Az elemi minták szükséges számát meg kell szorozni 2,5-tel.
≥ 80 tonna	100

5.3. **Az igen nagyméretű tételek esetében az elemi mintákra vonatkozó mennyiségi követelmények**

A nagyméretű mintavételi tételek (> 500 tonna) esetében az elemi minták szükséges száma = 40 elemi minta + $\sqrt{\text{tonna}}$ a takarmányban egyenletesen eloszló anyagok és termékek ellenőrzése esetén, vagy 100 elemi minta + $\sqrt{\text{tonna}}$ a takarmányban feltételezhetően egyenetlenül eloszló anyagok és termékek ellenőrzése esetén.

6. **AZ ÁTLAGOLT MINTÁRA VONATKOZÓ MENNYISÉGI KÖVETELMÉNYEK**

Mintavételi tételenként egy átlagolt minta szükséges.

	A takarmány jellege	Az átlagolt minta minimális tömege (*) (**)
6.1.	Ömlesztett takarmány	4 kg
6.2.	Kiszerelt takarmányok	4 kg (***)

▼ M3

Mintavételi tételenként egy átlagolt minta szükséges.

	A takarmány jellege	Az átlagolt minta minimális tömege (*) (**)
6.3.	Folyékony vagy félfolyékony takarmányok	4 liter
6.4.	Takarmánytömbök vagy nyalósók	
6.4.1.	1 kg-nál nagyobb egyedi tömeg	4 kg
6.4.2.	legfeljebb 1 kg-os egyedi tömeg	négy eredeti tömb vagy nyalósó tömege
6.5.	Szálatakarmány/zöldtakarmány	4 kg (****)

(*) A nagy értékű megmintázott takarmány esetében az előírtnál kisebb mennyiségű átlagolt mintát lehet venni azzal a feltétellel, hogy mindezt a mintavételi jegyzőkönyvben ismertetik és dokumentálják.

(**) A takarmányok hatósági ellenőrzése során alkalmazott mintavételi és vizsgálati módszereknek a géntechnológiával módosított anyagok – amelyek esetében az engedélyezési eljárás függőben van vagy amelyek esetében az engedély lejárt – jelenléte tekintetében történő megállapításáról szóló, 2011. június 24-i 619/2011/EU bizottsági rendelet (HL L 166., 2011.6.25., 9. o.) előírásainak megfelelően a géntechnológiával módosított anyagok jelenlétének ellenőrzésére szolgáló átlagolt mintának legalább 35 000 magot/szemet kell tartalmaznia. Ez azt jelenti, hogy a kukorica esetében az átlagolt minta tömege legalább 10,5 kg, a szójabab esetében pedig 7 kg. Más magvak és szemek, mint például az árpa, a köles, a zab, a rizs, a búza és a repcemag tekintetében az átlagolt minta 4 kg-os tömege több mint 35 000 magnak felel meg.

(***) Kiszerezett takarmányok esetében is előfordulhat, hogy a kiszereési egységek méretének függvényében az átlagolt minta tömege nem éri el a 4 kg-ot.

(****) A kis fajlagos tömegű szálatakarmányok és zöldtakarmányok (pl. széna, szalma) tekintetében az átlagolt minta minimális tömegének 1 kg-nak kell lennie.

7. A VÉGSŐ MINTÁKRA VONATKOZÓ MENNYISÉGI KÖVETELMÉNYEK

Végső minták

Legalább egy végső minta elemzése szükséges. Az analízisra szolgáló végső minta nem lehet kisebb a következőknél:

Szilárd takarmányok	500 g (*) (**) (***)
Folyékony vagy félfolyékony takarmányok	500 ml (*)

(*) A 619/2011/EU rendelet előírásainak megfelelően a géntechnológiával módosított anyagok jelenlétének ellenőrzésére szolgáló végső mintának legalább 10 000 magot/szemet kell tartalmaznia. Ez azt jelenti, hogy a kukorica esetében a végső minta tömege legalább 3 000 g, a szójabab esetében pedig 2 000 g. Más magvak és szemek, mint például az árpa, a köles, a zab, a rizs, a búza és a repcemag tekintetében a végső 500 g-os minta tömege több mint 10 000 magnak felel meg.

(**) Amennyiben az átlagolt minta tömege lényegesen kevesebb, mint 4 kg vagy liter (lásd: a 6. fejezet lábjegyzetei), az előírtnál kisebb mennyiségű végső mintát lehet venni azzal a feltétellel, hogy mindezt a mintavételi jegyzőkönyvben ismertetik és dokumentálják.

(***) Hüvelyesek, gabonafélék és fán termő héjas gyümölcsűek mintavételezésekor a peszticid-szermaradványok meghatározásához vett végső minta tömegének – a 2002/63/EK bizottsági irányelv (HL L 187., 2002.7.16., 30. o.) rendelkezéseivel összhangban – legalább 1 kg-nak kell lennie.

▼ **M3**

8. IGEN NAGYMÉRETŰ TÉTELEK, ILLETVE OLY MÓDON TÁROLT VAGY SZÁLLÍTOTT TÉTELEK MINTAVÉTELEZÉSE, AMELY NEM TESZI LEHETŐVÉ A MINTAVÉTELEZÉSÉT A TÉTEL EGÉSZÉBEN

8.1. **Általános elvek**

Amennyiben egy tétel szállítási vagy tárolási módja nem teszi lehetővé, hogy elemi mintákat vegyünk a tétel valamennyi részéből, a mintavételezésre lehetőleg akkor kell sort keríteni, amikor a tétel mozgásban van.

Takarmányok tárolására szolgáló nagyméretű raktárak esetében a raktárak üzemeltetőit ösztönözni kell olyan berendezések felszerelésére, amelyek segítségével (automatikusan) mintát lehet venni az ott tárolt teljes tételből.

Az e 8. fejezetben meghatározott mintavételi eljárások alkalmazása esetén a takarmányipari vállalkozó vagy annak képviselője tisztában van a mintavételi eljárással. Ha a takarmányipari vállalkozó vagy annak képviselője kétségbe vonja a mintavételi eljárást, lehetővé kell tennie az illetékes hatóság számára, hogy a vállalkozó saját költségén a tétel minden részéből mintát tudjon venni.

8.2. **Hajóval szállított nagy tételek**

8.2.1. *A hajóval szállított nagy tételek dinamikus mintavételezése*

A hajóval szállított nagy tételek mintavételezésére lehetőleg akkor kell sort keríteni, amikor az mozgásban van (dinamikus mintavételezés).

A mintavételezést rakterenként (fizikailag elkülöníthető egységenként) kell végezni. A rakterek kiürítése azonban egymás után, részlegesen történik, ezért a kezdeti fizikai elkülönítés a tárolólétesítménybe történő áthelyezést követően már nem áll fenn. A mintavételezést ennek megfelelően vagy a kezdeti fizikai elkülönítés, vagy a tárolólétesítménybe történő áthelyezést követő elkülönítés függvényében lehet elvégezni.

A hajó rakterének kiürítése néhány napot is igénybe vehet. A mintavételezést rendszerint a kiürítés teljes időtartama alatt, szabályos időközönként kell végezni. Hatósági ellenőr jelenléte azonban nem mindig szükséges vagy célszerű a teljes kiürítési művelet alatt. A mintavételezést tehát a tétel egy részén (mintavételi tétel) is el lehet végezni. Az elemi minták számának meghatározása a mintavételi tétel méretének figyelembevételével történik.

Ha azonos osztályú vagy megnevezésű takarmánytétel egy részének mintavételezése esetén azt állapítják meg, hogy a tétel szóban forgó része nem felel meg az uniós követelményeknek, abból kell kiindulni, hogy a tétel többi része sem biztonságos, kivéve, ha a részletes átvizsgálás során nem bizonyítható, hogy a tétel többi része nem felel meg az uniós követelményeknek.

Abban az esetben is, ha a hatósági mintát automata mintavevő segítségével veszik, indokolt az ellenőr jelenléte. Amennyiben azonban az automatikus mintavételezés előre beállított paraméterekkel történik, és a család bármely formáját megelőzendő a mintákat pecsételt ellátott tárolóedényekbe gyűjtik, az ellenőrnek kizárólag a mintavételezés megkezdésekor és befejezésekor, valamint akkor kell jelen lennie, amikor a tárolóedényeket cserélni kell.

▼M3

8.2.2. *A hajóval szállított nagy tételek statikus mintavételezése*

Statikus mintavételezés esetén a felülről hozzáférhető tárolók (silók) tekintetében előírt eljárást kell alkalmazni (lásd: 8.4.1. pont).

A mintavételezést a tétel/raktér hozzáférhető részén (felülről) kell elvégezni. Az elemi minták számának meghatározása a mintavételi tétel méretének figyelembevételével történik. Ha azonos osztályú vagy megnevezésű takarmánytétel egy részének mintavételezése esetén azt állapítják meg, hogy a tétel szóban forgó része nem felel meg az uniós követelményeknek, abból kell kiindulni, hogy a tétel többi része sem biztonságos, kivéve, ha a részletes átvizsgálás során nem bizonyítható, hogy a tétel többi része nem felel meg az uniós követelményeknek.

8.3. **A raktárakban tárolt nagy tételek mintavételezése**

A mintavételezést a tétel hozzáférhető részén kell elvégezni. Az elemi minták számának meghatározása a mintavételi tétel méretének figyelembevételével történik. Ha azonos osztályú vagy megnevezésű takarmánytétel egy részének mintavételezése esetén azt állapítják meg, hogy a tétel szóban forgó része nem felel meg az uniós követelményeknek, abból kell kiindulni, hogy a tétel többi része sem biztonságos, kivéve, ha a részletes átvizsgálás során nem bizonyítható, hogy a tétel többi része nem felel meg az uniós követelményeknek.

8.4. **A raktározási létesítmények (silók) mintavételezése**8.4.1. *A felülről (könnyen) hozzáférhető silók mintavételezése*

A mintavételezést a tétel hozzáférhető részén kell elvégezni. Az elemi minták számának meghatározása a mintavételi tétel méretének figyelembevételével történik. Ha azonos osztályú vagy megnevezésű takarmánytétel egy részének mintavételezése esetén azt állapítják meg, hogy a tétel szóban forgó része nem felel meg az uniós követelményeknek, abból kell kiindulni, hogy a tétel többi része sem biztonságos, kivéve, ha a részletes átvizsgálás során nem bizonyítható, hogy a tétel többi része nem felel meg az uniós követelményeknek.

8.4.2. *A felülről nem hozzáférhető (zárt) silók mintavételezése*8.4.2.1. **Felülről nem hozzáférhető (zárt), 100 tonnát meghaladó kapacitású silók**

Az ilyen típusú silókban tárolt takarmányból nem lehet statikusan mintát venni. Ezért amennyiben el kell végezni a silóban tárolt takarmány mintavételezését, továbbá nincs lehetőség a tétel mozgására, meg kell állapodni a létesítmény üzemeltetőjével, hogy az értesíteni fogja az ellenőrt a siló kiürítésének időpontjáról annak érdekében, hogy mintát lehessen venni a mozgásban lévő takarmányból.

8.4.2.2. **Felülről nem hozzáférhető (zárt), legfeljebb 100 tonna kapacitású silók**

A mintavételi eljárás 50–100 kg közötti mennyiségben a takarmány tartályba történő engedéséből és e mennyiség megmintázásából áll. Az átlagolt minta mérete a teljes tételnek, az elemi minták száma pedig a silóból mintavételezési céllal a tartályba engedett takarmány mennyiségének felel meg. Ha azonos osztályú vagy megnevezésű takarmánytétel egy részének mintavételezése esetén azt állapítják meg, hogy a tétel szóban forgó része nem felel meg az uniós követelményeknek, abból kell kiindulni, hogy a tétel többi része sem biztonságos, kivéve, ha a részletes átvizsgálás során nem bizonyítható, hogy a tétel többi része nem felel meg az uniós követelményeknek.

▼ **M3****8.5. Nagyméretű zárt tartályokban tárolt ömlesztett takarmány mintavételezése**

Az ilyen típusú tételekből sokszor csak a tartályból történő eltávolítás során lehet mintát venni. Bizonyos esetekben erre nincs lehetőség a behozatal vagy az ellenőrzés helyén, ezért a mintavételezésre a tartály kiürítésekor kell sort keríteni.

9. A MINTAVÉTELRE, A MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSÉRE ÉS CSOMAGOLÁSÁRA VONATKOZÓ UTASÍTÁSOK**9.1. Általános megjegyzések**

A mintákat indokolatlan késedelem nélkül 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 eszközöknek, felületeknek és tartályoknak tisztáknak és szárazaknak kell lenniük.

9.2. Elemi minták

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

Az elemi minta minimális tömege 100 gramm, illetve 25 gramm a kis fajlagos tömegű szálatakarmányok és zöldtakarmányok esetében.

Amennyiben a 8. fejezetben meghatározott mintavételi eljárásra vonatkozó szabályok alapján kevesebb mint 40 elemi mintát kell venni, az elemi minták méretét az átlagolt minta előírt méretének függvényében kell meghatározni (lásd: 6. fejezet).

Kiszerelt takarmány kis tételeinek mintavételezésekor – amikor is a mennyiségi követelmények szerint korlátozott számú elemi mintát kell venni – az elemi minta egy olyan eredeti egység tartalma, amelynek tartalma nem haladja meg az 1 kg-ot vagy az 1 litert.

Kis egységű (pl.: < 250 g) kiszerelt takarmány mintavételezésekor az elemi minta mérete az egység méretéről függ.

9.2.1. Ömlesztett takarmány

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

9.2.2. Kiszerelt takarmány

Miután a mintavétel elvégzésére az 5. fejezet szerint kiválasztottuk az előírt számú egységet, minden egység tartalmának egy részét szűrőcsap vagy lapát segítségével ki kell venni. Ha szükséges, az egységek egyenkénti kiürítése után is le lehet venni a mintákat.

9.2.3. Homogén vagy homogenizálható folyékony vagy félfolyékony takarmányok

Miután a mintavétel elvégzésére az 5. fejezet szerint kiválasztottuk az előírt számú egységet, az egységek tartalmát szükség esetén homogenizálni kell, és minden egyes egységből ki kell venni egy bizonyos mennyiséget.

Az elemi mintákat a tartályok kiürítésekor is lehet vételezni.

▼ M3

9.2.4. *Nem homogenizálható, folyékony vagy félfolyékony takarmányok*

Miután a mintavétel elvégzésére az 5. fejezet szerint kiválasztottuk az előírt számú egységet, a különböző rétegekből kell a mintákat levenni.

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

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

9.2.5. *Takarmánytömbök és nyalósók*

Miután a mintavétel elvégzésére az 5. fejezet szerint kiválasztottuk a kívánt számú blokkot vagy tömböt, minden blokk vagy tömb egy részét lehet venni. Nem homogén blokk vagy tömb gyanúja esetén a teljes blokkot vagy tömböt fel lehet mintaként használni.

Az egyenként 1 kg-ot meg nem haladó tömegű blokkok és tömbök esetében az elemi minta egy blokk vagy egy tömb.

9.3. **Átlagolt minták elkészítése**

Az átlagolt minta kialakítása érdekében az elemi mintákat össze kell keverni.

9.4. **Végső minták elkészítése**

Az átlagolt mintában lévő anyagot gondosan össze kell keverni ⁽¹⁾.

— Valamennyi vizsgálati mintát egy, a célnak megfelelő külön tartályba/edénybe 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.

— A takarmányban egyenletesen eloszló alkotóelemek vagy anyagok ellenőrzésekor az átlagolt minta tömegét reprezentatív módon, lehetőleg mechanikus vagy automata osztóval minimum 2 kg-ra vagy 2 literre lehet csökkenteni (redukált minta) ⁽²⁾. Peszticid-szermaradványok hüvelyesekben, gabonafélékben és fán termő héjas gyümölcsűekben való jelenlétének ellenőrzésekor a redukált minta minimális tömegének 3 kg-nak kell lennie. Ha a takarmány jellege nem teszi lehetővé az osztó használatát, vagy az osztó nem elérhető, a mintát a negyedeléses módszer segítségével lehet csökkenteni. Ezt követően a redukált mintákból megközelítőleg egyenlő számú (ellenőrzési, védelmi és referencia célra szánt) végső mintát kell készíteni a 7. fejezetben bemutatott mennyiségi követelményeknek megfelelően. Alkotóelemek, többek között géntechnológiával módosított anyagok, illetve a takarmány-alapanyagokban feltételezhetően egyenetlenül eloszló anyagok ellenőrzésekor az átlagolt minta:

— teljesen homogenizált kell, hogy legyen, majd végső mintákra kell azt felosztani, vagy

— tömegét mechanikus vagy automata osztóval legalább 2 kg-ra, illetve 2 literre kell csökkenteni ⁽³⁾. A mintát szükség esetén negyedeléses módszerrel is lehet csökkenteni, de kizárólag abban az esetben, ha a takarmány jellege nem teszi lehetővé az osztó használatát. A géntechnológiával módosított anyagok jelenlétének 619/2011/EU rendelet szerinti ellenőrzésekor a redukált mintának legalább 35 000 magot/szemet kell tartalmaznia annak érdekében, hogy el lehessen érni a hatósági, valamint a védelmi és a referenciacélra szánt végső minták esetében érvényes, minimálisan 10 000 mag/szem számot (lásd: a 6. fejezet ^(**) jelölésű és a 7. fejezet ^(*) jelölésű lábjegyzete).

⁽¹⁾ Az esetlegesen előforduló csomókat össze kell törni (a csomókat szükség esetén ki is lehet venni, porlasztás után pedig visszatenni a mintába).

⁽²⁾ Kivéve a kis fajlagos tömegű szálatakarmányokat vagy zöldtakarmányokat.

⁽³⁾ Kivéve a kis fajlagos tömegű szálatakarmányokat vagy zöldtakarmányokat.

▼ M3**9.5. A minta csomagolása**

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

9.6. A minták laboratóriumba történő küldése

A mintát – a vegyelemző számára szükséges információkkal együtt – indokolatlan késedelem nélkül el kell küldeni az arra a kijelölt vizsgálati laboratóriumba.

10. MINTAVÉTELI JEGYZŐKÖNYV

Minden egyes mintáról jegyzőkönyvet kell vezetni, amely lehetővé teszi az egyes mintavételi tételek és azok méretének egyértelmű azonosítását.

Jegyzőkönyvbe kell foglalni az e rendeletben meghatározott mintavételi eljárástól történő bármely eltérést.

A jegyzőkönyvet elérhetővé kell tenni a hatósági ellenőrző laboratórium, továbbá a takarmányipari vállalkozó és/vagy a takarmányipari vállalkozó által kijelölt laboratórium számára.

▼ M3

II. MELLÉKLET

A TAKARMÁNYVIZSGÁLATI MÓDSZEREKRE VONATKOZÓ ÁLTALÁNOS RENDELKEZÉSEK

A. MINTÁK ANALITIKAI VIZSGÁLATRA TÖRTÉNŐ ELŐKÉSZÍTÉSE

1. Cél

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

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

2. Óvintézkedések

A követendő mintaelőkészítési eljárás függ az alkalmazandó vizsgálati módszertől és az ellenőrizendő alkotóelemtől, illetve anyagoktól. Ezért elsőrendű fontosságú annak biztosítása, hogy a követett minta-előkészítési eljárás megfeleljen az alkalmazott vizsgálati módszernek, valamint az ellenőrizendő alkotóelemeknek, illetve anyagoknak.

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

Az őrlést, keverést és rostálást haladéktalanul végre kell hajtani azért, 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 szennyeződés 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. Az eljárás

3.1. Általános eljárás

A vizsgálati aliquotot a végső mintából kell venni. Az átlós negyedeléssel történő mintavétel nem ajánlott, mivel magas eloszlási hibát tartalmazó vizsgálati aliquotokat eredményezhet.

3.1.1. Előkészítés nélkül őrlhető takarmányok

— Keverjük össze az átrostált végső mintát, és vegyük fel egy megfelelően tisztá, száraz, légmentesen záródó tartályba. Közvetlenül a vizsgálatra szánt mennyiség (vizsgálati aliquot) kimérése előtt keverjük újra össze a teljes homogenitás elérése érdekében.

3.1.2. Szárítás után őrlhető takarmányok

— Amennyiben a vizsgálati módszerekben másképpen nem írják elő, a III. melléklet A. részében említett nedvességmeghatározási módszer 4.3. pontja szerint leírt előzetes szárítási eljárásnak megfelelően szárítsuk a végső mintát 8–12 %-os nedvességtartalmúra. Ezt követően a 3.1.1. szakaszban leírtak szerint járjunk el.

▼ **M3****3.1.3. Folyékony vagy félfolyékony takarmányok**

- Vegyük fel a végső mintát egy megfelelően tiszta, száraz, légmentesen záródó tartályba. Közvetlenül a vizsgálatra szánt mennyiség (vizsgálati aliquot) kimérése előtt alaposan keverjük össze a teljes homogenitás elérése érdekében.

3.1.4. Egyéb takarmányok

- Azok a végső minták, amelyek a fent említett eljárások egyikével sem készíthetők elő, bármely egyéb, olyan eljárással kezelhetők, amely biztosítja, hogy a vizsgálatra kimért mennyiségek (vizsgálati aliquotok) homogének és a végső mintákra jellemzőek legyenek.

3.2. *A szemrevételezéses vagy mikroszkópos vizsgálat, illetve a teljes egészében homogenizált átlagolt minta esetében alkalmazandó külön eljárás*

- A szemrevételezéses (mikroszkóp alkalmazása nélküli) ellenőrzés a teljes laboratóriumi minta felhasználásával történik.
- Mikroszkópos ellenőrzés esetén a laboratórium redukálhatja az átlagolt mintát, vagy tovább redukálhatja a már redukált mintát. A védelem és adott esetben a referencia céljait szolgáló végső mintákat a hatósági ellenőrzéshez használt végső mintákra érvényes eljárással egyenértékű eljárást követve kell venni.
- Amennyiben a teljes átlagolt minta homogenizált, a végső mintákat a homogenizált átlagolt mintából kell venni.

4. A minták tárolása

A mintákat olyan hőmérsékleten kell tárolni, amely összetételüket nem változtatja meg. A vitaminok vagy fényre különösen érzékeny anyagok vizsgálatára szánt mintákat a fény esetleges hátrányos hatását kizáró feltételek mellett kell tárolni.

B. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK SORÁN HASZNÁLT REAGEN-SEKRE ÉS ESZKÖZÖKRE VONATKOZÓ RENDELKEZÉSEK

- Amennyiben a vizsgálati módszerekben másképpen 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 reagensek esetleges további tisztítását tehetik szükségessé.
- A vizsgálati módszerek leírásában 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. A vizsgálati módszerekben jelzett különleges esetekben a vizet speciális tisztítási eljárásokkal kell kezelni.
- Az ellenőrző laboratóriumokban megtalálható alapfelszerelésre való tekintettel a vizsgálati módszerek leírásában csak a speciális vagy speciális használatot megkövetelő eszközöket és készülékeket említik. Ezeknek tisztáknak kell lenniük, különösen a nagyon kis anyagmennyiségek meghatározása esetén.

▼ M3

C. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA ÉS AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

1. **Extrahálási eljárás**

Számos módszer külön extrahálási eljárást határoz meg. Főszabályként a módszerben említettől eltérő extrahálási eljárást is lehet követni, feltéve, hogy az alkalmazott extrahálási eljárás hatékonysága a vizsgált mátrix tekintetében bizonyítottan egyenértékű a módszerben említett eljárás extrahálási hatékonyságával.

2. **Tisztítási eljárás**

Számos módszer külön tisztítási eljárást határoz meg. Főszabályként a módszerben említettől eltérő tisztítási eljárást is lehet követni, feltéve, hogy az alkalmazott tisztítási eljárás a vizsgált mátrix tekintetében bizonyítottan a módszerben említett eljárással egyenértékű vizsgálati eredményt ad.

3. **Meghatározások száma**

Nemkívánatos anyagok vizsgálata esetében, ha az első meghatározás eredménye jelentősen (> 50 %) alacsonyabb, mint a megengedett határérték, nincs szükség további meghatározásokra, feltéve, hogy a megfelelő minőségügyi eljárásokat alkalmazzák. Eltérő esetben párhuzamos vizsgálatra (második meghatározásra) van szükség ahhoz, hogy kizárjuk a minták belső keresztszennyeződésének, valamint esetleges összecszerelődésének veszélyét. A mérési bizonytalanságot is figyelembe véve, a két meghatározás számtani középértéke szolgál a megfelelőség ellenőrzésére.

Valamely anyag vagy összetevő feltüntetett mennyiségére végzett vizsgálat esetében, ha az első meghatározás eredménye igazolja a feltüntetett mennyiséget, azaz az vizsgálati eredmény a feltüntetett tartalom elfogadható szórási tartományába esik, nincs szükség további meghatározásokra, feltéve, hogy a megfelelő minőségügyi eljárásokat alkalmazzák. Ettől eltérő esetben párhuzamos vizsgálatra (második meghatározásra) van szükség ahhoz, hogy kizárjuk a minták belső keresztszennyeződésének, valamint esetleges összecszerelődésének veszélyét. A mérési bizonytalanságot is figyelembe véve, a két meghatározás számtani középértéke szolgál a megfelelőség ellenőrzésére.

Néhány esetben az elfogadható szórási tartományról jogszabályok rendelkeznek, mint például a takarmányok forgalomba hozataláról és felhasználásáról, az 1831/2003/EK rendelet módosításáról, valamint a 79/373/EGK tanácsi irányelv, a 80/511/EGK bizottsági irányelv, a 82/471/EGK, 83/228/EGK, 93/74/EGK, 93/113/EK és 96/25/EK tanácsi irányelv és a 2004/217/EK bizottsági határozat hatályon kívül helyezéséről szóló, 2009. július 13-i 767/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet⁽¹⁾.

4. **Az alkalmazott vizsgálati módszer jegyzőkönyvi feltüntetése**

A vizsgálati jegyzőkönyvben fel kell tüntetni az alkalmazott vizsgálati módszert.

5. **Az vizsgálati eredmények jegyzőkönyvi feltüntetése**

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

⁽¹⁾ HL L 229., 2009.9.1., 1. o.

▼ **M3****6. Mérési bizonytalanság és visszanyerési arány nemkívánatos anyagok vizsgálata esetében**

A 2002/32/EK irányelv szerinti nemkívánatos anyagok tekintetében valamely takarmányozásra szánt termék akkor minősül meg nem felelőnek a megengedett határérték szempontjából, ha úgy ítélik meg, hogy a 12 %-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkoztatott vizsgálati eredmény – figyelembe véve a kiterjesztett mérési bizonytalanságot és a visszanyerési korrekciót – meghaladja a megengedett határértéket. A megfelelés megállapítására a mért koncentrációt alkalmazzák a visszanyerés alapján végzett korrekció, valamint a kiterjesztett mérési bizonytalanság kivonása után. Ezt az eljárást csak olyan esetekben lehet alkalmazni, amikor a vizsgálati módszer lehetővé teszi a mérési bizonytalanság becslését és a visszanyerési korrekciót (pl. mikroszkópos elemzésnél nem lehetséges).

A vizsgálati eredményt a következők szerint kell a jegyzőkönyvben feltüntetni (amennyiben az alkalmazott vizsgálati 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 a vizsgálat 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, a vizsgálati eredményeket fel lehet tüntetni a jegyzőkönyvben a visszanyerési korrekció nélkül, és ezekben az esetekben el lehet hagyni a visszanyerés arányának és a mérési bizonytalanságnak jegyzőkönyvi feltüntetését.

▼B**III. MELLÉKLET****ANALITIKAI MÓDSZEREK A TAKARMÁNY-ALAPANYAGOK ÉS
►C1 TAKARMÁNYKEVERÉKEK ◄ ÖSSZETÉTELÉNEK ELLEN-
ŐRZÉSÉRE****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 határozzuk 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 egynemű 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 vízhűtéses mikroaprítók, összecsucskható 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/cm² körüli mennyiségben történő terítését.

3.4. Elektromos fűtésű izotermikus, megfelelően ►C3 szellőztethető szárítószekrény ◄ (± 2 °C), amely gyors hőfokszabályozást tesz lehetővé ⁽¹⁾.

3.5. Szabályozható, elektromos fűtésű ►C3 vákuum szárítószekrény ◄ olajszivattyúval és forró, száraz levegő vagy szárítóanyag (pl. kalcium-oxid) bejuttatására alkalmas szerkezettel ellátva.

3.6. Megfelelő szárítóanyagot tartalmazó, vastag, perforált fém- vagy porcelánlemez exsikkátor.

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.

⁽¹⁾ A gabonafélék, lisztek, darafélék és derce szárítására szolgáló ►C3 szárítószekrény ◄ 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 búzamintát elhelyezzük 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.

▼B4.1. *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. Örljük 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.

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. **►C3** 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 szárítószekrénybe. Annak megakadályozása érdekében, hogy a szárítószekrény hőfoka a kívánatos érték alá süllyedjen, a tartályt a lehető leggyorsabban helyezzük a szárítószekrénybe. Hagyjuk száradni négy órán át attól az időponttól számítva, amikor a szárítószekrény hőfoka újból elérte a 103 °C-ot. Helyezzük vissza a tartályra a fedelet, a tartályt vegyük ki a szárítószekrényből, hagyjuk hűlni 30–45 percig az exszikátorban (3.6.), és mérjük le 1 mg pontossággal.

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

▼C3

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 szárítószekrénybe. Annak megakadályozása érdekében, hogy a szárítószekrény hőfoka a kívánatos érték alá süllyedjen, a tartályt a lehető leggyorsabban helyezzük a szárítószekrénybe. Hagyjuk száradni két órán át attól az időponttól számítva, amikor a szárítószekrény hőfoka újból elérte a 130 °C-ot. Helyezzük vissza a tartályra a fedelet, a tartályt vegyük ki a szárítószekrényből, hagyjuk hűlni 30–45 percig az exszikátorban (3.6.), és mérjük le 1 mg pontossággal.

▼B4.2.3. Több mint 4 % szacharózt vagy **►C1** laktózt tartalmazó takarmánykeverékek: ◀ takarmány-alapanyagok, mint a szentjánoskenyér, a hidrolizált gabonatermékek, a malátamagvak, a szárított répaszelet, a hal- és cukorlevek; a 25 %-nál több ásványi sót **►C1** beleértve a kristályvíztartalmat is) tartalmazó takarmánykeverékek. ◀**▼C3**

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 vákuum szárítószekrénybe (3.5.). Annak megakadályozása érdekében, hogy a szárítószekrény hőfoka a kívánatos érték alá süllyedjen, a tartályt a lehető leggyorsabban helyezzük a szárítószekrénybe.

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

▼C3

időt attól a pillanattól kell számítani, amikor a szárítószekrény hőmérséklete visszaáll 80–85 °C-ra. Óvatosan állítsuk vissza a szárítószekrényben a légköri nyomást. Nyissuk ki a szárítószekrényt, azonnal helyezzük vissza a tartály fedelét, vegyük ki a tartályt a szárítószekrényből, hagyjuk hűlni 30–45 percen át az exsikkátorban (3.6.), és mérjük le 1 mg-os pontossággal. Szárítsuk további 30 percen át a vákuum szárítószekrényben 80–85 °C-on, és mérjük le újra. A két mérés különbsége nem haladhatja meg a nedvességtartalom 0,1 %-át.

▼B4.3. *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). ►C3 Hagyjuk száradni 60–70 °C-os szárítószekrényben, amíg a nedvességtartalom 8–12 % körüli értékre csökken. Vegyük ki a szárítószekrényből, 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). ►C3 Hagyjuk száradni 5–7 percen át 130 °C-os szárítószekrényben. Vegyük ki a szárítószekrényben, hagyjuk fedél nélkül hűlni a laboratóriumban két órán át, és mérjük le 10 mg pontossággal. ◀ Örljük 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_0 = 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_1 = a vizsgálati minta tömege, grammban, előszárítás után,
 m_2 = a vizsgálati minta tömege, grammban, aprítás vagy örlés után,
 m_0 = a száraz vizsgálati minta tömege, grammban.

▼B**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, lezárt edénybe (3.1.). A hőmérővel folyamatosan kevergetve hevítjük a homokfürdón 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 tömegveszteség 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:

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

▼B

ahol:

m = a vizsgálati minta tömege, grammban;

m_1 = az edény hevítés előtti tömege, grammban, a tartalmával együtt;

m_2 = 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 eltérésének 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 bőséges 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, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.6. Kénsav, normál mérőoldat, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.

3.7. Kénsav, normál mérőoldat, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

3.8. Metilvörösindikátor; oldjunk fel 300 mg metilvöröst 100 ml etanolban, $\sigma = 95\text{--}96 \text{ \% (v/v)}$

3.9. Nátrium-hidroxid-oldat (technikai minőségű is használható) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.

3.10. Nátrium-hidroxid, normál mérőoldat, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.11. Nátrium-hidroxid, normál mérőoldat, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

3.12. Granulált horzsakő, sósavban mosott és meggyújtott.

3.13. Acetanilid (olvadáspont = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, N-tartalom = $10,36 \text{ \%}$).

3.14. Szacharóz (nitrogénmentes).

3.15. Bórsav (H_3BO_3).

3.16. Metilvörösindikátor-oldat: oldjunk fel 100 mg metilvöröst 100 ml etanolban vagy metil-alkoholban.

▼B

- 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, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

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. **Eszközk**

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

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *Roncsolás*

Mérjük 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.).

▼B

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, ammóniavesztés 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 kénsavkoncentrációtól 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.

▼B

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 reagensok 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:

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

▼B

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.

▼B**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 megméréssel 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 (ρ_{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 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. 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 szénnel (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 hasonlítsuk össze a vakpróbához a reagensből 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 oldat 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, csökkentsük a minta nagyságát 1 g-ra vagy hígítsuk az eredeti oldatot úgy, hogy 500 ml-ben ne legyen több 50 mg karbamidnál.

▼B

- 7.2. Alacsony karbamidtartalom esetén növeljük a minta nagyságát mindaddig, amíg a szűrlet áttetsző és szintelen marad.
- 7.3. Ha a minta olyan egyszerű nitrogéntartalmú elegyeket 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 NH₃-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 keverőgéppen 30 percen át. Adjunk hozzá 50 ml triklór-ecetsavas oldatot (3.1.), töltsük fel térfogatra vízzel, rázzuk össze alaposan, majd szűrjük át hajtogatott szűrőn.

Pipettázunk 1 ml bórsavas oldatot (3.3.) a Conway-küvetta középső részébe és 1 ml mintaszűrletet a küvetta koronaszébe. Fedjük le részlegesen a bezsírozott fedéllel. Tegyük 1 ml telített kálium-karbonát oldatot (3.4.) gyorsan a küvetta koronaszébe, majd zárjuk le légmenetesen 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.

▼B**6. Az eredmények kiszámítása**

1 ml 0,01 mól/liter koncentrációjú H_2SO_4 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:

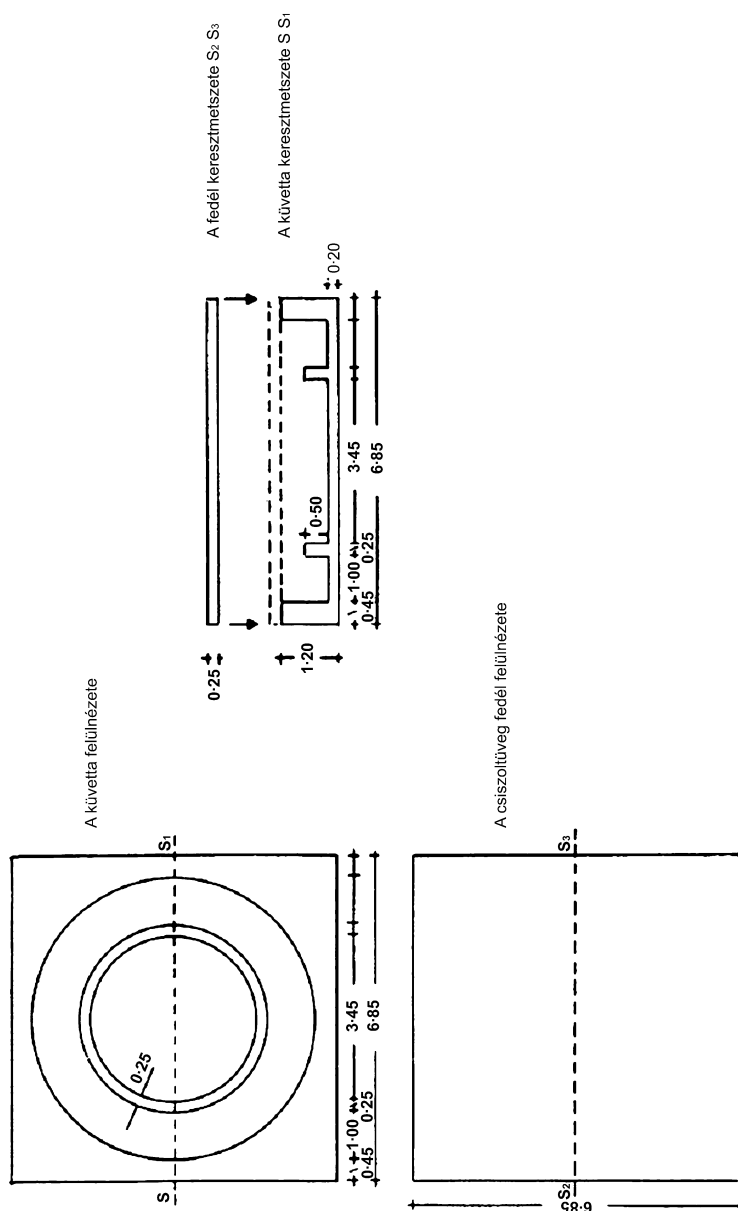
- 1,0 %-osnál alacsonyabb ammóniartalom esetén relatív értékben a 10 %-ot,
- 1,0 %-os vagy annál magasabb ammóniartalom esetén abszolút értékben a 0,1 %-ot.

7. Észrevételek

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

CONWAY CELL

Scale 1/1



▼B**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 nitrogénbázis forráspontra 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 lakmuspapírral 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_2SO_4 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 KIVÉTELEVEL)**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

▼B

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 szűrővel 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-szulfó-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.

▼B

- 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 kristályvíz-tartalom 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 / 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 tiodiglikol tartalommal:
- Vegyünk 8,2 ml HCl-t (3.7.), hígítsuk megközelítőleg 900 ml vízzel, adjunk hozzá 20 ml tiodiglikolt (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 tiodiglikolt (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. Töltsük fel vízzel 1 literre.
- 3.25. Eluáló pufferek, a használt analízátor feltételei szerint készítve (4.9.).
- 3.26. Ninhidrin reagens, a használt analízátor feltételei szerint készítve (4.9.).
- 3.27. Aminosavak standardoldata. Ezeket az oldatokat 5 °C alatt kell tárolni.

▼B

3.27.1. Aminosavak standard törzsoldata (3.16.1.).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$, mindegyik sósavban.

Kereskedelmi forgalomban kapható.

3.27.2. Ciszteinsav és metionin-szulfon standard törzsoldata, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

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 töltsük fel jelig citrátpufferrel. Legfeljebb 12 hónapig tároljuk $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 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, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

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 $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 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 $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 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 $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ alatt.

4. Eszközök

4.1. 100 vagy 250 ml-es visszafolyós hűtővel ellátott gömbömbik.

4.2. 100 ml-es, csavaros tetejű, gumi/teflon bélésű bór-szilikát üveglombik (pl. Duran, Schott) ► **C3** szárítószekrényben ◄ történő használatra.4.3. Intenzív szellőztetésű és $+2 \text{ } ^\circ\text{C}$ -nál nagyobb pontosságú hőmérséklet-szabályozóval ellátott ► **C3** szárítószekrény ◄.

4.4. pH-mérő (három tizedesjegyre)

4.5. $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ -es membránszűrő.

4.6. Centrifuga.

4.7. Rotációs vákuumbepárló.

4.8. Mechanikus vagy mágneses keverőberendezés.

▼B

- 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 $k = 0,8$ mól/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 °C-on kell végezni.

5. A vizsgálat módja

5.1. A minta előkészítése

A mintát úgy őröljük meg, hogy átjusson egy 0,5 mm-es szitán. Örlés előtt a nagy nedvességtartalmú mintákat vagy légszáraz állapotba kell hozni 50 °C-nál nem magasabb hőmérsékleten, vagy liofilizálni kell azokat. A nagy zsírtartalmú mintákat örlés 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 rázógép vagy mágneses keverő segítségével (4.8.). Hagyjuk leülepedni az üledéket, és a felülúszó oldatból pipetázunk 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

▼B

- 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 üvegspatulával. 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-diszulfít (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

Tegyük 3 üveggyöngyöt 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

▼C3

Tegyük az 5.3.2.1. vagy az 5.3.2.2. pont szerint elkészített keveréket tartalmazó palackot egy 110 °C-os szárítószekrénybe (4.3.). A (gázfejlődésnek tulajdonítható) nyomás kialakulásának megelőzése és a robbanás elkerülése érdekében az első órában helyezzük 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 szárítószekrényben (4.3.) 23 órán keresztül. Amikor a hidrolízis befejeződött, vegyük ki az edényt a szárítószekrényből, óvatosan nyissuk fel a palack fedelét, és tegyük a palackot jeges vízfürdőbe. Hagyjuk lehűlni.

▼B

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 gömblombikba citrát-puffer segítségével (3.24.).

Az 5.3.3. pont szerint folytassuk a műveletet.

▼B**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 kromatográfiás 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 mérőlombikba, 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

Kromatográfiás 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 injekciót lehet kézzel vagy automatikusan végezni. Ügyeljünk arra, hogy – ± 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.

▼B

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.

▼B

A hozzáadott szabad metionin extrahálás után metioninként kerül meghatározásra, és a számításhoz 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

▼B**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
Brojlertápkéverék	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Fehérjekoncentrárum	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
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
Brojlertápkéverék	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Fehérjekoncentrárum	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
Brojlertápkéverék	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Fehérjekoncentrárum	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

▼B**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 folyadékkromatográfiás 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 oktahidráttal (BaCO₃ képződésének elkerülése érdekében ügyelnünk kell arra, hogy a Ba(OH)₂ · 0,8 H₂O-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, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8. Metil-alkohol, HPLC minőségű.
- 3.9. Petroléter, forráspont-tartomány: 40–60 °C.

▼B

- 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 töltsük fel 1 literre.
- 3.13. Sósav, $c = 0,1$ mól/l:
- Vegyünk 8,2 ml HCl-t (3.7.), és vízzel töltsük fel 1 literre.
- 3.14. Ortofoszforsav, $c = 0,5$ mól/l:
- Vegyünk 34 ml ortofoszforsavat (3.6.), és vízzel (3.1.) töltsük 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 töltsük fel jelig 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 α -metil-triptofánt (3.3.) sósavban (3.13.), majd az oldatot töltsük fel jelig sósavval (3.13.). Tároljuk -18 °C-on maximum négy hétig.
- 3.17. A triptofán kalibráló 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 (α -metil-triptofán) oldatból (3.16.). Oldjuk fel vízben (3.1.) és metil-alkoholban (3.8.) a kész hidrolizátumával körülbelül azonos térfogatra és körülbelül azonos metil-alkohol koncentrációra (10–30 %).
- Az oldatot felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.
- Készítés során közvetlen napfényhatástól óvjuk.
- 3.18. Ecetsav
- 3.19. 1,1,1-triklór-2-metil-2-propanol.
- 3.20. Etanolamin 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. Mozgófézis 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.) töltsük fel 1 000 ml-re.
4. **Eszközök**
- 4.1. HPLC-berendezés spektrofotometriás detektorral
- 4.2. Folyadékkromatográfiás oszlop, 125 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, 3 μm töltet, vagy azzal egyenértékű oszlop
- 4.3. pH-mérő
- 4.4. Polipropilén lombik, 125 ml térfogatú, széles nyakkal és csavaros zárókupakkal

▼B

- 4.5. 0,45 µm-es membránszűrő
- 4.6. Autokláv, 110 (±2) °C, 1,4 (±0,1) bar
- 4.7. Mechanikus vagy mágneses keverőberendezés
- 4.8. Kémcsőkeverő (vortex).

5. A vizsgálat módja**5.1. A minták elkészítése**

Öröljük meg a mintát annyira, hogy az átjusson egy 0,5 mm-es szeméretű szitán. Örlés előtt a nagy nedvességtartalmú mintákat vagy légszáraz állapotba kell hozni 50 °C-nál nem magasabb hőmérsékleten, vagy liofilizálni kell azokat. A nagy zsírtartalmú mintákat örlés 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 belső standardoldatot (3.16.). Rázzuk vagy keverjük 60 percen át mechanikus rázógépen vagy mágneses keverőn (4.7.). Engedjük a zagyot leülepedni, majd pipettázunk 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 végtérfogatra 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-oktahidráttal (3.4.) és 10 ml vizet. Keverjük össze kémcsőkeverővel (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 csökkentsük a hőmérsékletet kevéssel 100 °C alá. A $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 0,8 \text{ H}_2\text{O}$ kikristályosodásának elkerülése érdekében adjunk a meleg keverékhez 30 ml, szobahőmérsékletű vizet. Óvatosan rázzuk vagy keverjük össze. Adjunk hozzá 2,00 ml koncentrált belső standard (α-metil-triptofán) oldatot (3.16.). Hűtsük az edényeket víz- vagy jégfürdőben 15 percen át.

Ezután adjunk hozzá 5 ml ortofoszforsavat (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 végtérfogatra számított metil-alkohol-koncentráció 10 és 30 % között legyen. Vigyük át megfelelő úrtartalmú mérőlombikba, és vízzel hígítsuk a kromatográfiához szükséges térfogatra (például 100 ml-re). Ügyeljünk, hogy a metil-alkohol hozzáadása ne okozzon kicsapódást.

▼B

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).

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.2.):	C ₁₈ , 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 grammal 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
 V₁ = 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)
 V₂ = 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
 V₃ = 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. Ismételhetőség

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

▼B**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 Takarmánykon- centrátum sertések számára
L	12	12	12
n	50	55	50
Átlag [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = eredményeket beküldő laboratóriumok száma

n = a (Cochran- 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 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, %

▼B

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 Kevert sertéstáp (CRM 117)	2. minta Alacsony zsírtartalmú halliszt (CRM 118)	3. minta Szójaliszt (CRM 119)	4. minta Fölözött tejpör (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 kromatográfiás paraméterek alkalmazása a triptofán és az α -metil-triptofán jobb elválasztását teheti lehetővé.

Izokratikus elúció, majd gradiens oszlopon történő tisztítás:

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

Oszlophőmérséklet: 32 °C

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

Gradiens 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

▼B

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 ►C1 takarmánykeverék ◄ esetében alkalmazható. Mindazon anyagokra alkalmazandó, amelyekből az olajok és a zsírok teljesen nem extrahálhatók előzetes hidrolízis nélkül (pl. sikér, élesztő, burgonyafelhérjék 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 megszárítjuk, és megmérjük.

2.2. *B. módszer*

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

▼B**3. Reagensok**

- 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. ► **C3** Szárítószekrény, amely lehet 75 ± 3 °C-ra beállított vákuum szárítószekrény vagy 100 ± 3 °C-ra beállított légkeveréses szárítószekrény. ◄

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 zsírintes gyapottatamponnal.

Tegyük az extraháló tégelyt az extrahálókészülékbe (4.1.), és extraháljuk hat órán keresztül petroléterrel (3.1.). A petroléter-kivonat egy horzsakódarabokat ⁽¹⁾ tartalmazó, száraz, lemerített lombikba gyűjtjük.

Pároljuk be az oldószert. A lombikot másfél órán át tartjuk a ► **C3** szárítószekrényben ◄ (4.3.), hogy a maradékanyag megszáradjon. Hagyjuk kihűlni egy exsikkátorban, és mérjük meg a tömegét. Ismét szárítunk 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 horzsakódarabokat. Fedjük le a főzőpoharat egy óraüveggel, 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.

Hűtjük 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, zsírintes, 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.

Tegyük a maradékanyagot tartalmazó kettős szűrőpapírt egy óraüvegre, és szárítsuk a ► **C3** légkeveréses szárítószekrényben ◄ (4.3.) másfél órán keresztül, 100 ± 3 °C-on.

⁽¹⁾ Amennyiben az olajon vagy a zsíron ezt követően minőség-ellenőrzést végeznek, a horzsakódarabokat üveggyöngyökkel helyettesítjük.

▼B

Tegyük a száraz maradékanyagot tartalmazó kettős szűrőpapírt egy extrahálótégelybe (4.2.), és fedjük le egy zsírmentes üvegvalta 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 nátriumsulfáttal (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 horzsakódarabokat tartalmazó, száraz, lemerített 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 nátriumsulfátot), 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 hobbiállat-eledeleket vízmentes nátriumsulfáttal 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.

▼B

- 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, zsírmert szerves anyagok meghatározását.

2. Vizsgálati alapelv

A szükség esetén zsírtalanított mintát többször egymás után meghatározott koncentrációjú kénsav és kálium-hidroxid forrásban lévő oldattal kezeljük. A maradékot zsugorított üvegszűrővel szűréssel elválasztjuk, kimossuk, megszáritjuk, lemérjük és 475–500 °C-on elhamvasztjuk. A hamvasztásból eredő tömegvesztés meggyezik 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 folyadékvezetékhez és a vákuumhoz kapcsolt csap tartozik. Használat előtt mindennap öt percig melegítsük elő az egységet forrásban lévő vízzel.
- 4.2. Üveg szűrőtégely 40–90 µm porozitású, olvasztott zsugorított üveg szűrőlappal. Az első használat előtt melegítsük fel 500 °C-ra néhány percre, és hűtsük le (8.6.).
- 4.3. Visszafolyós hűtővel ellátott, legalább 270 ml-es, forralásra alkalmas henger.
- 4.4. ► **C3** Szárítószekrény ◀, 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.).

▼B

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 habzágátló 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 habzágátló anyagot (3.2.). 5 ± 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 acetoadagokkal (3.4.), ügyelve arra, hogy a maradékot minden mosás után szárazra szűrjük.

Szárítsuk a tégelyt tömegállandóságig a ►C3 szárítószekrényben ◄ 130°C -on. Az egyes szárítások után hűtsük le exsikkátorban, és gyorsan mérjük le. Helyezzük a tégelyt a tokos kemencébe, és $475\text{--}500^{\circ}\text{C}$ -on hamvassuk 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_0 = a meghatározás során végzett hamvasztás utáni tömegvesztés, g-ban;
- m_1 = 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

▼B

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 ►C1 takarmánykeverékek ◄ esetében alkalmazható. Egyéb takarmányokra különleges módszerek vonatkoznak. Adott esetben, a laktózt külön meg 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, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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. 0,1 %-os (w/v) metilnarancsoldat.
- 3.5. 4 mól/liter koncentrációjú sósav.
- 3.6. 0,1 mól/liter koncentrációjú sósav.

▼B

- 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.8.2. Citromsavoldat: 50 ml vízben oldjunk fel 50 g citromsavat, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- 3.8.3. 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**

Mérjük 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, glükózból 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 metilnarancs-oldatot (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.), merítsük a lombikot gyorsan forró vízfürdőbe, és tartsuk ott harminc percen keresztül. Hűtsük le gyorsan

▼B

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. *Titrlás 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 keveressük, 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 titrlást.

Forralás nélkül, 10 ml kálium-jodid-oldat (3.12.) és 25 ml kénsav (3.11.) hozzáadása után végezzük el ugyanezt a titrlást 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 titrlás eredménye közti különbségnek felel meg 0,1 mól/liter koncentrációjú nátrium-tioszulfát mg-jában kifejezve. Az eredményt a minta százalékosan 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 használjunk 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 keményítőtmentes 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.

▼B

- 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 Na₂S₂O₃ ml-e, kétpercnyi melegítés, tízpercnyi forralás

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mól/ liter koncent- ráció	Glükóz, fruktóz, invert- cukor C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktóz C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltóz C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mól/ liter koncent- ráció
ml	mg	különbség	mg	különbség	mg	különbség	ml
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

▼B**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. Reagens

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 jégecet. 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 l-re vízzel. Hagyjuk másnapig ülepedni, majd szűrjük. Ellenőrizzük az így kapott reagens koncentrációját (0,05 mól/liter Cu; 1 mól/liter Na_2CO_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-suszpenziót (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,

▼B

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 habkövet (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 erjeszthető 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 koncent- ráció	Glükóz, fruktóz, invert- cukor $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		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 koncent- ráció
ml	mg	különbség	mg	különbség	mg	különbség	ml
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

▼B**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 ⁽¹⁾ 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. Reagensok

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

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, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ és 3 g jécezetet. Töltsük fel vízzel 100 ml-re.

3.4. 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.

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

4. Eszközök

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

4.2. Polariméter vagy szachariméter.

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

Öröljük 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

⁽¹⁾ HL L 125., 1996.5.23., 35. o.

▼B

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 rázogatózás 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 pipetázzunk 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 merítsük 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*

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

P = a teljes optikai forgatóképesség szögfokban

P' = a 40 %-os (V/V) etanolban oldható anyagok optikai forgatóképessége szögfokban

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = a tiszta keményítő fajlagos optikai forgatóképessége. Az e tényezőre hagyományosan elfogadott $^{20^\circ}$ számértékek a következők:

+185,9°: rizskeményítő
 +185,7°: burgonyakeményítő
 +184,6°: kukoricakeményítő
 +182,7°: búzakeményítő
 +181,5°: árpakeményítő
 +181,3°: zabkeményítő
 +184,0°: ►C1 takarmánykeverékekben ◄ található egyéb keményítő- és keményítőkeverék-fajták.

6.2. *Mérés szachariméterrel*

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

▼B

- 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. Ismételhetőség

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 mérítsük 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)répamelasz, (cukor)répapép-melasz, (cukor)répaseprő, (répa)cukor,

— citruspép,

— lenmag; lenmagpogácsa; lenmagkivonat,

— repcemag; repcemagpogácsa; repcemagkivonat; repcemaghéj,

— napraforgómag; napraforgómag kivonat; részlegesen hántolt napraforgómag kivonat,

— koprápogácsa, 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.

▼B**2. Vizsgálati alapelv**

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

3. Reagenssek

20 %-os (w/v) ammónium-nitrát-oldat.

4. Eszközök**4.1. Főzőlap.****4.2. Hőfokszabályzás, 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 duzzadó-képes 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 szenesedik. 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 ►C3 szárítószekrényben ◄ 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 járjunk 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 szűrletet 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 szűrőpapírsikkal meggyújtva, szenesítjük az anyagot. A gyulladás után a lehető legkevesebb vízzel nedvesítjük meg. Szárítsuk, és hamvasszuk az 5. pontban ismertetett módszerrel.**

▼B**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 ►C1 takarmánykeverék ◄ esetében alkalmazható;

1.2. *B. módszer:* olyan ásványi vegyületek és keverékek, valamint ►C1 takarmánykeverékek ◄ 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 ($60 \times 40 \times 25$ 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 hamvasztuk 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

▼B

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. **Reagensok**

3.1. Sósav, $d = 1,10$ g/ml.

3.2. Kalcium-karbonát.

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

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 szerelték 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.).

▼ B**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.

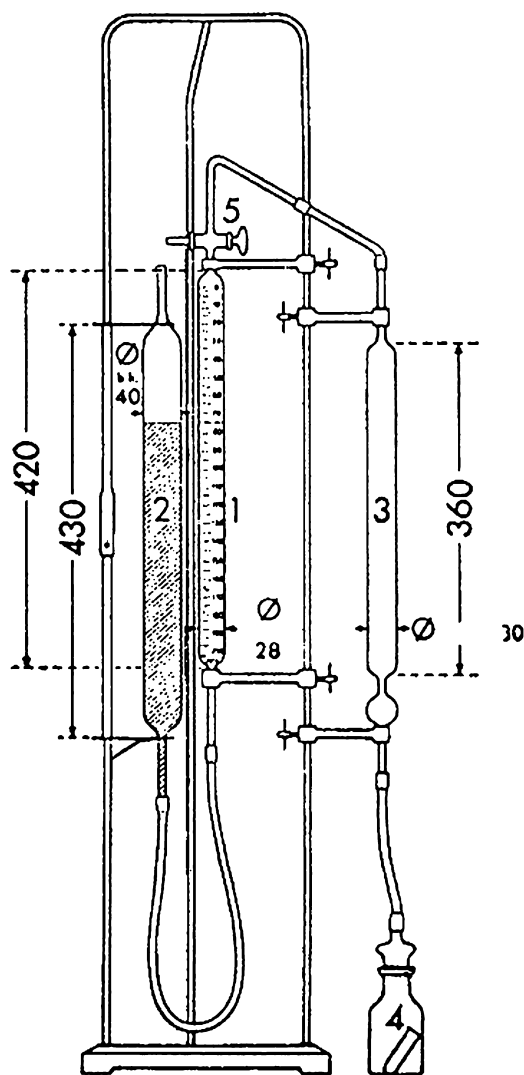
V_1 = 0,5 g CaCO_3 által kibocsátott szén-dioxid, ml-ben.

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-készüléktől, a mintából és a kontrollanyagból vett részt, valamint az eredmények kiszámítását annak megfelelően kell korrigálni.

SCHEIBLER-DIETRICH-KÉSZÜLÉK SZÉN-DIOXID MEGHATÁROZÁSÁRA



(mm-ben mérve)

▼B**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 termékek-nél) 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, $\rho_{20} = 1,38\text{--}1,42$ 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 (NH_4VO_3) oldjunk fel 400 ml forró vízben. Állandó keverés közben, lassan adjunk hozzá 20 ml hígított salétromsavat (7 ml HNO_3 (3.4.) + 13 ml H_2O), és töltsük fel vízzel 1 literre.

3.7. 1 mg/ml foszfortartalmú standardoldat: oldjunk fel 4,387 g kálium-dihidrogén-foszfátot (KH_2PO_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,

▼B

ezt követően adjunk hozzá kevés salétromsavat (3.4.), és forraljuk fel újra. Addig ismételjük ezt a műveletet, amíg szintelen 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, homogenizáljuk, 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 egyenmővé 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, homogenizáljuk, 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.). Homogenizáljuk 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.) készítünk 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.). Homogenizáljuk és hagyjuk állni legalább 10 percen át 20 °C-on. Mérjük meg az optikai sűrűséget az 5.2. pontban leírt módon. Szerkesztjük 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.

▼B**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 helyezzük 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 helyezzük 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.

▼B

- 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. *Titrlás*

Pipetázunk 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 jelű töltött büretta segítségével. Büretta 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 százalékaiban 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 titrlást potenciometrikus módszerrel is el lehet végezni.
- 7.2. Olajban és zsírban rendkívül gazdag termékek esetében először dietiléttel vagy petroléttel végezzünk zsírtalanítást.
- 7.3. Halliszt esetében a titrlás 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-vitamin mint 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 kromatográfiás paramétereket úgy válasszuk 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, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7\text{--}9$)
- 3.6.1. Nátrium-szulfid-oldat, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ glicerinen, $\beta = 120 \text{ g/l}$ ($x = 9\text{-nél}$) (lásd az Észrevételek 7.8. pontját).
- 3.7. Fenolftaleinoldat, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 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. $2,80 \times 10^6 \text{ NE/g}$
- 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 töltjük fel jelleg ugyanazzal az oldószerezrel. Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 1 400 NE A-vitamin/ml. A pontos A-vitamin-tartalmat az 5.6.3.1. pont szerint kell meghatározni.
- 3.12. *All-transz*-A-vitamin-palmitát, fokozott tisztaságú, igazolt aktivitású, pl. $1,80 \times 10^6 \text{ NE/g}$

▼B

3.12.1. All-*transz*-A-vitamin-palmitát törzsoldat: mérjünk 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 oldószerrel. Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 1 400 NE A-vitamin/ml. A pontos A-vitamin-tartalmat az 5.6.3.2. pont szerint kell meghatározni.

3.13. 2,6-Di-*terc*-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 üveg dugós, vékony nyakú, 10, 25, 100 és 500 ml-es mérőlombikok

4.2.3. 1 000 ml-es, kúpos választótölcsérek, csiszolt üveg dugóval

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. Folyadékkromatográfiás oszlop, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 vagy 10 µm töltet, vagy azzal egyenértékű (teljesítménykritérium: az alkalmazott HPLC paraméterek mellett az összes retinol-izomer csak egyetlen csúcsot adjon)

4.5.2. Állítható hullámhosszúságú UV- vagy fluoreszcens detektor,

4.6. Spektrofotométer 10 mm-es kvarcküvetákkal

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 fűvókával 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 (nitrogénáramban) kell végezni. Az extrahálás során a folyadék feletti levegőt nitrogénnel kell eltávolítani (a dugó időszakonkénti meglazításával kerüljük el a túlzottan nagy nyomás kialakulását).

5.1. *A minta előkészítése*

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

▼B

5.2. Szappanosítás

Az A-vitamin-tartalomtól függően mérjük 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 (3.13.), 2 ml nátrium-aszkorbát-oldatot (3.5.) és 2 ml nátrium-szulfid-oldatot (3.6.). Illesszünk a lombikhoz hűtőt (4.3.), és merítsük mágneses keverővel felszerelt vízfürdőbe (4.7.). Hevítjük 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 nitrogén-áramban 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 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 ráztatás 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 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 petroléterrétegeket a választótölcsérbe.

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

5.4. A mintaoldat elkészítése a HPLC-hez

Pipetázzuk a petroléteroldat aliquot részét (5.3.1. vagy 5.3.2.) egy 250 ml-es, körte alakú lombikba (4.2.4.). Az oldószert pároljuk még éppen nedves állapotúra a rotációs bepárlókészüléken (4.1.), csökkentett nyomáson legfeljebb 40 °C-os vízfürdőben. Nitrogén (3.10.) bejuttatásával állítsuk vissza az atmoszferikus nyomást, és vegyük le a lombikot

▼B

a rotációs bepárlókészülékről. Nitrogén beáramoltatásával (3.10.) távolítsuk el a maradék oldószert, és a maradékot azonnal oldjuk fel ismert térfogatú (10–100 ml) metil-alkoholban (3.3.) (az A-vitamin koncentrációjának 5 NE/ml és 30 NE/ml között kell lennie).

5.5. *Meghatározás HPLC-vel*

Az A-vitamin elválasztása fordított fázisú C₁₈ oszlopon (4.5.1.) történik, koncentrációját pedig UV-detektor (325 nm) vagy fluoreszcens detektor (gerjesztés: 325 nm, emisszió: 475 nm) (4.5.2.) segítségével mérjük.

Fecskendezzünk be az 5.4. lépés szerint nyert metil-alkoholos oldatból egy aliquot részt (pl. 20 µl), és eluáljuk a 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.

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.5.1.):	C ₁₈ , 250 mm × 4 mm, 5 vagy 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.
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*

Pipetázunk 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 pipetázunk egy 20 ml-es mérőlombikba, majd töltjük azt fel jelíg 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 jelíg 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 µl-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.

▼B**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:

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

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ az A-vitamin-acetát esetében = 1 530, 326 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:

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

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ az A-vitamin-palmitát esetében = 957, 326 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.

▼B

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

V₁ = a mintaoldat (5.4.) térfogata, ml-ben

V₂ = 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 analizáláshoz 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. Tőkealmájolaj 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. Ismételhetőség

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

▼B9. **A körvizsgálat eredményei ⁽¹⁾**

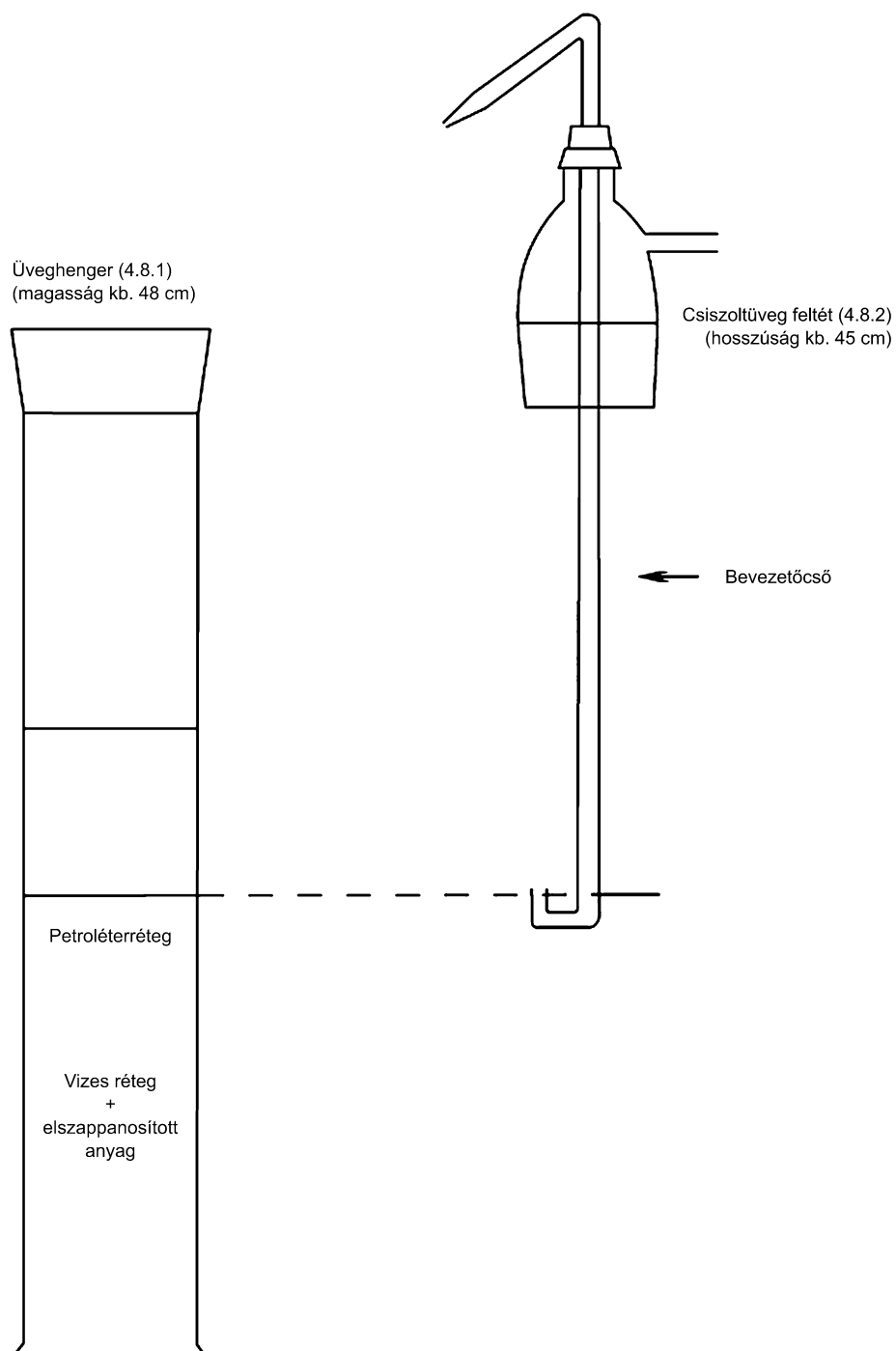
	Előkeverékek	Előkeverék-takarmány	Ásványi koncentrá-tumok	Fehérjetakar-mány	Malactáp
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
átlag [NE/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s _r [NE/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [NE/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	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

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

▼B

1. ábra: Extrahálókészülék (4.8)



▼B**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- α -tokoferol-acetát/kg-ban fejezzük ki. Egy mg DL- α -tokoferol-acetát 0,91 mg DL- α -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, $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7\text{--}9$)
- 3.6.1. Nátrium-szulfid-oldat, $c = 0,5\text{ mol/l}$ gliceriben, $\beta = 120\text{ g/l}$ ($x = 9\text{-nél}$) (lásd az Észrevételek 7.8. pontját)
- 3.7. Fenoltaleinoldat, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ 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- α -tokoferol-acetát, fokozottan tiszta, igazolt aktivitású
- 3.10.1. DL- α -tokoferol-acetát törzsoldat: mérjünk be 0,1 mg-os pontossággal 100 mg DL- α -tokoferol-acetátot (3.10.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel etanolban (3.1.), majd töltsük fel jelig ugyanezzel az oldószerezrel. Ebből az oldatból 1 ml 1 mg DL- α -tokoferol-acetátot tartalmaz. (Az UV-ellenőrzést lásd az 5.6.1.3. pontban; a stabilizálást lásd az Észrevételek 7.4. pontjánál.)
- 3.11. DL- α -tokoferol, fokozottan tiszta, igazolt aktivitású
- 3.11.1. DL- α -tocopherol törzsoldat: Mérjünk be 0,1 mg-os pontossággal 100 mg DL- α -tokoferolt (3.11.) egy 100 ml-es mérőlombikba. Oldjuk fel etanolban (3.1.), majd töltsük fel jelig ugyanezzel az oldószerezrel. Ebből az oldatból 1 ml 1 mg DL- α -tokoferolt tartalmaz. (Az UV-ellenőrzést lásd az 5.6.2.3. pontban; a stabilizálást lásd az Észrevételek 7.4. pontjánál.)
- 3.12. 2,6-Di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) (lásd az Észrevételek 7.5. pontját).

4. Eszközök

- 4.1. Rotációs vékonyréteges bepárló

▼B

- 4.2. Barna üvegedények
 - 4.2.1. 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikok csiszolt üvegyakkal
 - 4.2.2. Csiszolt üveg dugós, vékony nyakú, 10, 25, 100 és 500 ml-es mérőlombikok
 - 4.2.3. 1 000 ml-es, kúpos választótölcsérek, csiszolt üveg dugóval
 - 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. Folyadék-kromatográfiás oszlop, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 vagy 10 µm töltet, vagy azzal egyenértékű
 - 4.5.2. Állítható hullámhosszúságú, fluoreszcens- vagy UV-detektor,
- 4.6. Spektrofotométer 10 mm-es kvareküvetékekkel
- 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 fűvókával 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 (nitrogénáramban) kell végezni. Az extrahálás során a folyadék feletti levegőt nitrogénnel kell eltávolítani (a dugó időszakonkénti meglazításával kerüljük el a túlzottan nagy nyomás kialakulását).

5.1. A minta előkészítése

Ügyelve a hőképződés elkerülésére, örljük a mintát annyira, hogy az átjusson egy 1 mm-es szemnagyságú szitán. Az örlést **közvetlenül** a súlymérés és a szappanosítás előtt kell végezni, különben E-vitamin-vesztés léphet fel.

5.2. Szappanosítás

Az E-vitamin-tartalomtól függően mérjük be 0,01 g pontossággal 2–25 g mintát egy 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikba (4.2.1.). Keverés közben adjunk hozzá egymást követően 130 ml etanolt (3.1.), körülbelül 100 mg BHT-t (3.12.), 2 ml nátrium-aszorbát-oldatot (3.5.) és 2 ml nátrium-szulfid-oldatot (3.6.). Illesszük a lombikhoz a hűtőt (4.3.), és merítsük a mágneses keverővel felszerelt vízfürdőbe (4.7.). Hevítjük forrásig 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 szobahőmérsékletre.

▼B**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 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 vízadaggal, lassú keverés közben (az emulzióképződés megakadályozása céljából), majd többszöri ráztatás közben további 100 ml-es vízadagokkal egészen addig, amíg a víz, fenolftaleinoldat (3.7.) hozzáadását követően szintelen nem marad (négyyszeri 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 nitrogénvezetékéből nyomást gyakorolva az oldalsó, vigyük át a felső petroléterréteget egy 1 000 ml-es választótölcsérbe (4.2.3.). Mérjünk 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

Pipetáljuk 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 bepárlókészülékről. Nitrogénáram (3.9.) segítségével távolítsuk el a maradék oldószert, és a maradékot azonnal oldjuk fel ismert térfogatú (10–100 ml) metil-alkoholban (3.3.) (a DL- α -tokoferol koncentrációjának 5 μ g/ml és 30 μ g/ml között kell lennie).

5.5. Meghatározás HPLC-vel

Az E-vitamin elválasztása fordított fázisú C₁₈ oszlopon (4.5.1.) történik, koncentrációját fluoreszcens detektor (gerjesztés: 295 nm, emisszió: 330 nm) vagy UV-detektor (292 nm) (4.5.2.) segítségével mérjük.

▼B

Fecskendezzünk be az 5.4. lépés szerint nyert metil-alkoholos oldatból egy aliquot részt (pl. 20 µl), 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.

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.5.1.):	C ₁₈ , 250 mm × 4 mm, 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.
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-α-tokoferol-acetát vagy DL-α-tokoferol*)

5.6.1. DL-α-tokoferol-acetát standard

5.6.1.1. A standard munkaoldat elkészítése

Pipettázunk a DL-α-tokoferol-acetát törzsoldatból (3.10.1.) 25 ml-t egy 500 ml-es, lapos fenekű vagy Erlenmeyer-lombikba (4.2.1.), és hidrolizáljuk az 5.2. pontban leírt módon. Ezt követően extraháljuk petroléterrel (3.2.) az 5.3. pont szerint, és töltjük fel 500 ml-re petroléterrel. Ebből a kivonatból 25 ml-t pároljunk még éppen nedves állapotig a rotációs bepárlókészüléken (lásd 5.4.), nitrogénáramoltatással 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 µg DL-α-tokoferol/ml, ami egyenértékű 50 µg DL-α-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, töltjük fel a lombikokat jelleg metil-alkohollal (3.3.), és keverjük össze a tartalmukat. Ezeknek az oldatoknak a névleges koncentrációja 2,5, 5,0, 10,0 és 25,0 µg/ml DL-α-tokoferol-acetát, azaz 2,28, 4,55, 9,10 µg/ml és 22,8 µg/ml DL-α-tokoferol.

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-α-tokoferol-acetát törzsoldat (3.10.1.) UV hitelesítése

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

Az abszorbancia maximális értéke 284 nm kell, hogy legyen:

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

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

▼B**5.6.2. DL- α -tokoferol standard****5.6.2.1. A standard munkaoldat elkészítése**

Pipettázunk a DL- α -tokoferol törzsoldatból (3.11.1.) 2 ml-t egy 50 ml-es mérőlombikba, oldjuk fel metil-alkoholban (3.3.), és töltjük fel jelig metil-alkohollal. Ennek az oldatnak a névleges koncentrációja 40 μg DL- α -tokoferol/ml, ami egyenértékű 44,0 μg DL- α -tokoferol-acetát/ml-rel. A standard munkaoldatot felhasználás előtt frissen kell 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, töltjük 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tokoferol, azaz 2,20, 4,40, 8,79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ és 22,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -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- α -tokoferol törzsoldat (3.11.1.) UV hitelesítése

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

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

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -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 (α -tokoferol-acetát-ként), $\mu\text{g}/\text{ml}$ -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, 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 analízáláshoz 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.

▼B

- 7.4. A DL- α -tokoferol-acetát- vagy DL- α -tokoferol-oldat 5.6.1.3., illetve 5.6.2.3. szerinti spektrofotometriás mérése után adjunk kb. 10 mg BHT-t (3.12.) az oldathoz (3.10.1. vagy 3.10.2.), és tartsuk az oldatot hűtőszekrényben (a tárolási időtartam legfeljebb négy hét).
- 7.5. BHT helyett hidrokinon is használható.
- 7.6. Normálfázisú oszloppal lehetséges az α -, β -, γ - és δ -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 ⁽¹⁾

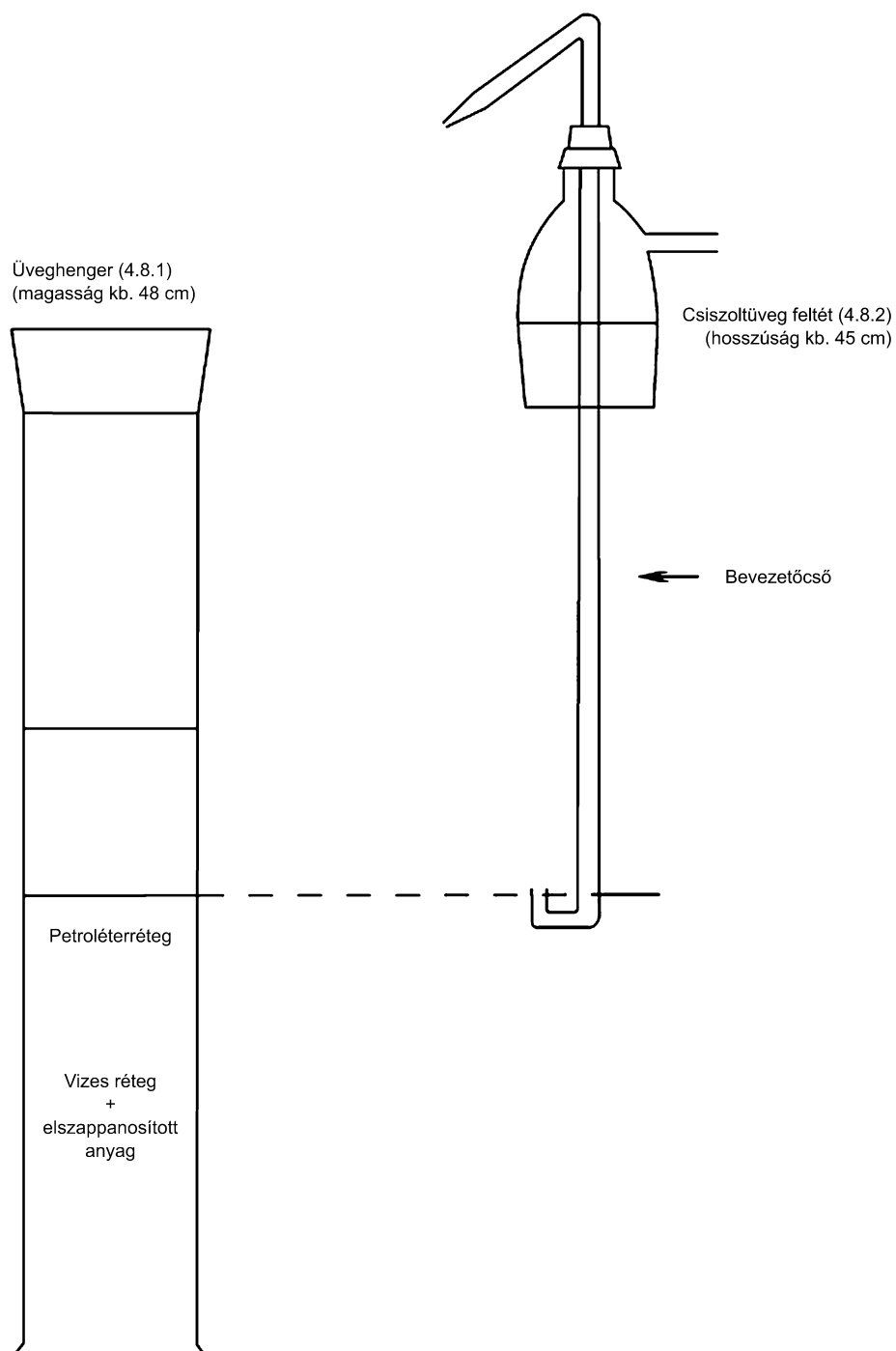
	Előkeverékek	Előkeverék-takarmány	Ásványi koncentrá-tumok	Fehérjetakar-mány	Malactáp
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
átlag [NE/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [g/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [g/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _r [g/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
r [g/kg]	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

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

▼B

1. ábra: Extrahálókészülék (4.8)



▼B**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. Reagensok*Előzetes megjegyzések*

A reagensok 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 reagenset 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.

▼B

- 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 ⁽¹⁾

- 5.1. Szerves anyagot tartalmazó minták

- 5.1.1. Hamvasztás és az oldatok előkészítése az analízis-re ⁽²⁾

- 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 ►C3 szárítószekrényben ◄ 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).

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

⁽²⁾ A (friss vagy szárított) zöldtakarmányok nagy mennyiségű növényi eredetű kovasavat 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 szűrésig. 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 kovasav 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 jelig (a HCl-koncentráció kb. 0,5 mól/liter). Folytassuk a meghatározást az 5.1.2. ponttól.

▼B

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 CO₂-képződés miatt heves reakció léphet fel). Adjuk hozzá cseppenként a sósavat (3.1.) addig kevergetve, amíg a pezsgés meg nem szűnik. Párolgassuk el belőle a nedvességet, időnként üvegbottal megkeverve.

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 kémlelő-üveggel. Lassan forraljuk és tartsuk 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 hamvasszuk 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.), párolgassuk 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 lenni 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 nyomelemet tartalmazó 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 példákon keresztül mutatják a kalibrálóoldat-sorozatok egy mintasorozatát; az alkalmazott spektrofotométer típusától és érzékenységi tartományától függően, adott esetben más koncentrációkat kell kiválasztani.

▼B**Vas**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
standard munkaoadat, 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 lantán-klorid oldat (3.11.), töltjük fel vízzel 100 ml-re.

Réz

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
standard munkaoadat, 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 munkaoadat, 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 munkaoadat, 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 pipetázunk egy 100 ml-es mérőlombikba, és töltjük fel jelig 0,5 mól/liter koncentrációjú sósavval (3.3.).

A vas, mangán és cink meghatározásához pipetázunk 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

▼B

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. **Ismételhetőség**

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 interreferenciát 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 particionáljuk. 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

▼B

3.6. Halofuginon standard anyag (DL-transz-7-bromo-6-kloro-3-[3-hidroxi-2-piperidil]acetoni] quinazolin-4-(3H)-egy hidrobromid, E 764)

3.6.1. Halofuginon standard törzsoldat, 100 µg/ml

Mérjünk be egy 500 ml-es mérőlombikba 0,1 mg pontossággal 50 mg halofuginont (3.6.), oldjuk fel ammónium-acetát pufferoldatban (3.18.), töltjük 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.) töltjük 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 (ρ₂₀ 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 előtöltött 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 µm-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.

▼B**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. Folyadékkromatográfiás oszlop, 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm-es töltet, vagy egy ezzel egyenértékű oszlop
- 4.5. Zsugorított üvegszűrővel és elzárócsappal ellátott üvegoszlop (300 mm × 10 mm)
- 4.6. Üvegszálas 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 végezzünk visszanyerési próbát. A 3 mg/kg-os szintre történő dúsításhoz adjunk 300 µl standard törzs-oldatot (3.6.1.) 10 g takarmányvakmintához, 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 percre 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 üvegszálas 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 ismételt 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.).

▼B

A vizes réteget teljes mennyiségben vigyük át egy 250 ml-es gömblobbikba, 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 üvegvas 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 gömblobbikot 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 gömblobbikban 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 gömblobbikban 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 mérőlobbikba. Mozgófézissal 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 útmutatásként szolgálnak, egyéb feltételek is használhatók, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményeket adnak.

Folyadékkromatográfiás 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 kromatográfiás 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 abszcissza ábrázoljuk.

▼B**5.4.3. Mintaoldat**

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibráló-oldatoknál 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 grammban.

7. Az eredmények validálása**7.1. Azonosítás**

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

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

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

A hozzáadott mennyiséget és a kivonat 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) 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 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;
- c) 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.

▼B

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

7.2. *Ismételhetőség*

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 ⁽¹⁾ során három mintát analizáltak nyolc laboratórium-ban.

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 _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
vissza. [%]		86	74	88	75

ND = nem kimutatható

S_R = a reprodukálhatóság szórása

CV_R = 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.

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. **Reagensok**

3.1. Metil-alkohol

3.2. Savas metil-alkohol

Öntsünk át 4,0 ml sósavat (p20 = 1,18 g/ml) egy 500 ml-es mérőombikba, töltsük fel jelig metil-alkohollal (3.1.), majd keverjük el. Ezt az oldatot használat előtt frissen kell elkészíteni.

⁽¹⁾ The Analyst 108., 1983, 1 252–1 256. o.

▼B

- 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 oszlopkromatográfiás 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 tartjuk.
- 3.6. Kálium-dihidrogén-foszfát-oldat, $c = 0,025$ mol/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, $c = 0,025$ mol/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 μm -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 $\mu\text{g/ml}$
- 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 $\mu\text{g/ml}$ robenidin-koncentrációnak felelnek meg. Az oldatokat használat előtt frissen kell elkészíteni.
- 3.10. Víz, HPLC minőségű.

▼B**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 rázógép 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. Folyadékkromatográfiás oszlop: C₁₈, 300 mm × 4 mm, 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.****4.5. Üvegszálas 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. Vissgáljunk 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 üvegszálas 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 üvegszálas 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 ütögetssük a megtöltött oszlop alsó végét, hogy a benne lévő alumínium-oxid leülepedjen.

▼B**5.3.2. A minta derítése**

Az (5.2.) pontban előkészített mintakivonatból 5,0 ml-t pipetázunk 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 jelig ugyanezzel az oldószerezrel, majd keverjük el. Egy aliquot részt szűrjünk 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 útmutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak:

Folyadékkromatográfiás 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 kromatográfiás 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.

▼B**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 ± 10 %-án 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) 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;
- c) 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. Ismételhetőség

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 örlemény, illetve pellet formájában négy baromfi- és négy nyúltakarmánymintát elemeztek, 12 laboratóriumban. Minden mintán kettős analízist végeztek. Az eredményeket az alábbi táblázat mutatja.

▼B

	Baromfi		Nyúl	
	Örlemény	Pellet	Örlemény	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 ismételhetőség szórása

CV_r = az ismételhetőség 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-tetrahydro-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_{18} 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. Reagensek

3.1. Víz, HPLC minőségű.

3.2. Ammónium-acetát

3.3. Tetrautil-ammónium-hidrogén-szulfát (TBHS)

3.4. Acetonitril, HPLC minőségű.

3.5. Metil-alkohol, HPLC minőségű

3.6. N, N-dimetilformamid (DMF).

3.7. Sósav, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Standard anyag: garantált tisztaságú diklazuril II-24: (+)-4-klórfeńil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il) feńil] acetonitril, E771.

3.8.1. Diklazuril standard törzsoldat, 500 μ g/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.

▼B

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-klorofenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2 (3H)-il) α -metilbenzén-acetonitril.

3.9.1. Belső standard törzsoldat, 500 µg/ml.

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/1000 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. C₁₈ szilárdfázisú extrahálótöltet, pl. Bond Elut, méret: 1 cm³, 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 – tetrabutilammónium-hidrogén-szulfát 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.).

▼B**4. Eszközök**

- 4.1. Mechanikus rázógépet
- 4.2. Felszerelés a háromkomponensű HPLC-hez.
 - 4.2.1. Hypersil ODS folyadékkromatográfiás oszlop, 100 mm × 4,6 mm, 3 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés.
 - 4.2.2. Változtatható hullámhosszon mérő UV-detektor vagy diódasoros detektor.
- 4.3. 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**

Vizsgálunk meg egy takarmányvakmintát annak ellenőrzésére, hogy sem diklauril, sem interferáló anyagok nincsenek jelen. A takarmányvakminta a mintával azonos típusú takarmány legyen, amelyben az analízis során sem diklauril, sem interferáló anyagok nem mutathatók ki.

5.1.2. Visszanyerési próba

Végezzünk visszanyerési próbát a mintában meglévővel közel azonos mennyiségű diklaurillal 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 diklaurillal 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 diklauriltartalma) aliquot részét

▼B

öntsük át egy megfelelő méretű gömblobbikba. 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.

Folyadékkromatográfias oszlop (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-tetra-butilammónium-hidrogén-szulfát vizes oldata B-eluens (3.13.2): acetonitril C-eluens(3.13.3): metil-alkohol
Eluálás módja:	— lineáris gradiens — kiindulási feltételek: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — 10 perces gradiens 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 retenciók idői 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:

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

▼B

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 $\mu\text{g/ml}$ -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:

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

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 $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezett koncentrációja a kalibrálóoldatban (3.1.0.)
 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) 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 $\pm 2\text{ nm}$.

▼B

- b) 230 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) 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 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. Ismételhetőség

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 szervesetlen mátrixszal (A 100) keverték össze. Az elméleti diklazuriltartalom 100 mg/kg. A három baromfitakaromány-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 találhatók 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 _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Névleges tartalom mg/kg)	100	100	1	1	1

L = a laboratóriumok száma

n = az egyedi értékek száma

S_r = az ismételhetőség szórása

CV_r = az ismételhetőség relatív szórása

▼B

S_R = a reprodukálhatóság szórása

CV_R = 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 (KH_2PO_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 KH_2PO_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, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (a poliéter-monokarboxilsav nátriumsója, amelyet a *Streptomyces lasaliensis* termel), E763

3.10.1. Lazalocid-nátrium standard törzsoldat, 500 µg/ml

Mérjük 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 oldószerrel, és keverjük össze. Ezt az oldatot használat előtt frissen kell elkészíteni.

▼B**3.10.2. Lazalocid-nátrium közbenső standardoldat, 50 µg/ml**

Pipettázzunk 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 rázógép), hőmérséklet-szabályozóval****4.2. Membránszűrők, 0,45 µm****4.3. HPLC-berendezés injektáló rendszerrel, 20 µl-nyi injektálási lehetőség-gel.****4.3.1. Folyadékkromatográfiás oszlop 125 mm × 4 mm, fordított fázisú C₁₈, 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 analízálásával, amelyet a mintában jelen lévőhöz hasonló mennyiségű lazalocid-nátriumnal 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 hozzáadásos módszerrel lehet elvégezni. Ebben az esetben az analizálandó mintát a mintában már meglévővel közel azonos mennyiségű lazalocid-nátriumnal dúsítjuk. Ezt a mintát a nem dúsított mintával együtt analizáljuk, a visszanyerést kivonással számítjuk ki.

5.2. Extrahálás**5.2.1. Takarmány**

Mérjük 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

▼B

(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

Mérjük 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 jelig 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:

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.3.1)	125 mm × 4 mm, fordított fázisú C ₁₈ , 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 retenciós idők 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.

▼B**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.) $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezett lazalocid-nátrium koncentrációja

V_1 = 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.) $\mu\text{g/ml}$ -ben megadott lazalocid-nátrium koncentrációja

V_2 = 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 spektro-fluorimetrián alapuló módszerek kevésbé érzékenyek az interferenciára, mint azok az eljárások, amelyek során UV-detektort használnak. Az analizált anyag azonossága párhuzamos kromatográfiával ellenőrizhető.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot (5.2.1. vagy 5.2.2.) megfelelő mennyiségű kalibráló-oldattal (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 csúcshélessége $\pm 10\%$ -on belül kell lennie.

7.2. Ismételhetőség

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.

▼B**8. A körvizsgálat eredményei**

Körvizsgálat (*) keretében 12 laboratóriumban 2 előkeveréket (1. és 2. minta) és 5 takarmányt (3–7. minta) analizáltak. Minden mintán kettős analízist végeztek. Az eredmények a következő táblázatban szerepelnek:

	1. minta Csirke- előkeverék	2. minta Pulyka- előkeverék	3. minta Pulyka- pellet	4. minta Csirke- derce	5. minta Pulykata- karmány	6. minta Baromfi A. takar- mány	7. minta Baromfi B. takar- mány
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Középérték [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 tartalom 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 ismételhetőség szórása

s_R = a reprodukálhatóság szórása

CV_r = az ismételhetőség relatív szórása, %

CV_R = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

(*) *Analyst*, 1995, 120., 2175–2180. o.

▼B*V. MELLÉKLET***ANALITIKAI MÓDSZEREK A TAKARMÁNYOKBAN LÉVŐ NEMKÍVÁNTOS 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 ►**CI** takarmánykeverékekben ◄, 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: tegyük 1 literes mérőlombikba kb. 500 ml propán-2-ol-hexán keveréket (3.1.), 2 ml 3-aminopropán-1-ol-t, 8 ml jégcetet, 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 jégcetet 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, lezárt üveglombikban tárolva a reagens több hónapig áll.

3.5. Gosszipol-A standardoldat: tegyük 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: tegyük 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.

▼B

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, ►C1 takarmánykeverékek ◄ 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*

Tegyük a vizsgálati mintát egy 250 ml-es, csiszolatos lombikba, amelynek az alján üvegüzalékot 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 tölcéért egy óráüveggel.

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. oldószerezrel (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, mellyel 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 fölé, 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 üvegvettákat 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*

Tegyük 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

▼B

két lombikot forró vízfürdő fölé 30 percen át. Hűtsük le a lombikokat szobahőmérsékletre, és töltsük fel tartalmukat térfogatra propán-2-ol-hexán keverékkel (3.1.). Homogenizáljuk, és hagyjuk ülepedni 10–15 percig, utána szűrjük át, majd gyűjtjük 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 fölé, hogy tartalmuk elszíneződjön. Utána hűtsük le őket szobahőmérsékletre, 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:

$$\text{Szabad gosszipoltartalom: } E_{1\text{ cm}}^1 \% = 625$$

$$\text{Összes gosszipoltartalom: } E_{1\text{ cm}}^1 \% = 600$$

A minta szabad vagy összes gosszipoltartalmát a következő képlet alapján számítjuk ki:

$$\text{gosszipol \%} = \frac{E \times 1\,250}{E_{1\text{ cm}}^1 \% \times p \times a}$$

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).

▼B

Adjunk a másik sorozat minden lombikjának tartalmához 2 ml anilint (3.4.), beleértve a másik vakpróba lombikját is. Hevítjük ezeket 30 percen át forró vízfürdő fölött, hogy tartalmuk elszíneződjön. Ezután hűtjük le őket szobahőmérsékletűre, töltjük 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.). Hevítjük a lombikokat forró vízfürdő fölött 30 percen át. Hűtjük le őket szobahőmérsékletűre, töltjük 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.). Hevítjük a lombikokat forró vízfürdő fölött 30 percen át. Ezután hűtjük le őket szobahőmérsékletűre, töltjük 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. Ismételhetőség

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.

▼ M6

B. DIOXINOK (PCDD/PCDF) ÉS PCB-K KONCENTRÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA

I. FEJEZET

Mintavételi módszerek és az analitikai eredmények értelmezése

1. Cél és alkalmazási kör

A takarmányokban előforduló poliklórozott dibenzo-p-dioxinok (PCDD-k), poliklórozott dibenzo-furánok (PCDF-ek), dioxin jellegű poliklórozott bifenilek (PCB-k) ⁽¹⁾ és nem dioxin jellegű PCB-k koncentrációjának hatósági ellenőrzésére az I. mellékletnek megfelelően kell mintát venni. Alkalmazni kell az I. melléklet 5.1. pontjában a takarmányban egyenletesen eloszló anyagok vagy termékek ellenőrzésére vonatkozóan előírt mennyiségi követelményeket. Az így nyert egyesített minták reprezentatívnak tekintendők azon tételekre és altételekre, amelyekből a mintavétel történt. A 2002/32/EK irányelvben előírt felső határértékeknek való megfelelést a laboratóriumi minták elemzésével kapott koncentrációk alapján kell megállapítani.

E B. rész alkalmazásakor a 2002/657/EK bizottsági határozat ⁽²⁾ I. mellékletében meghatározott fogalommeghatározások alkalmazandók.

⁽¹⁾ A PCDD-k, PCDF-ek és dioxin jellegű PCB-k toxicitási egyenérték-tényezőit (TEF) tartalmazó táblázat: Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) Nemzetközi Kémiai Biztonsági Programja (IPCS) keretében 2005 júniusában Genfben tartott szakértői konferencia megállapításai alapján számított, a humán kockázatok felméréséhez használt WHO-TEF-értékek (Martin van den Berg és mtsai.: *The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds* [Dioxinok és dioxin jellegű vegyületek emberekre és emlősökre vonatkozó toxicitási egyenérték-tényezőinek az Egészségügyi Világszervezet által 2005-ben végzett újraértékelése] *Toxicological Sciences* 93(2), 223–241. oldal (2006).

Kongéner	TEF-érték	Kongéner	TEF-érték
Dibenzo-p-dioxinok (PCDD-k) és dibenzo-p-furánok (PCDF-ek)		Dioxin jellegű PCB-k: nem orto-PCB-k + mono-orto-PCB-k	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Nem orto-PCB-k	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
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	0,03
OCDD	0,0003	mono-orto-PCB-k	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Alkalmazott rövidítések: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = hexa; „Hp” = hepta; „O” = okta; „CDD” = klór-dibenzo-dioxin; „CDF” = klór-dibenzo-furán; „CB” = klór-bifenil.

⁽²⁾ A Bizottság 2002/657/EK határozata (2002. augusztus 14.) a 96/23/EK tanácsi irányelvnek az analitikai módszerek elvégzése és az eredmények értelmezése tekintetében történő végrehajtásáról (HL L 221., 2002.8.17., 8. o.).

▼ M6

Az említett fogalommeghatározásokon kívül e B. rész alkalmazásában a következő fogalommeghatározásokat kell alkalmazni:

„Szűrő módszerek”: azoknak a mintáknak a kiválasztására használt módszerek, melyekben a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k koncentrációja meghaladja a felső határértéket vagy a beavatkozási küszöbértéket. Segítségükkel költséghatékonyan lehet nagy mennyiségű mintát feldolgozni, és így nagyobb az esély az olyan új szennyeződési esetek felismerésére, amelyek nagy fogyasztói expozíciót és egészségi kockázatot jelenthetnek. A szűrő módszerek bioanalitikai módszereken vagy gázkromatográfiás/tömegspektrometriás (GC-MS) módszereken alapsznak. A felső határértékeknek való megfelelés ellenőrzéséhez használt cut-off értéket meghaladó mintákból kapott eredményeket az eredeti minta megerősítő módszerrel történő teljes újbóli vizsgálata által kell ellenőrizni.

„Megerősítő módszerek”: olyan teljes vagy kiegészítő információkkal szolgálnak, amelyek lehetővé teszik a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k maximális koncentrációban vagy szükség esetén a beavatkozási küszöbértéken történő azonosítását és egyértelmű mennyiségi meghatározását. E módszerek gázkromatográfiát/nagyfelbontású tömegspektrometriát (GC-HRMS) vagy gázkromatográfiát/tandem tömegspektrometriát (GC-MS/MS) alkalmaznak.

2. A tétel vagy altétel megfelelése a felső határértéknek

2.1. A nem dioxin jellegű PCB-k tekintetében

A tétel vagy altétel akkor felel meg a felső határértéknek, ha a PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 és PCB 180 (a továbbiakban: nem dioxin jellegű PCB-k) összege tekintetében az analitikai eredmény – a kiterjesztett mérési bizonytalanságot is figyelembe véve – nem haladja meg a 2002/32/EK irányelvben megállapított felső határértéket⁽¹⁾. A tétel vagy altétel nem felel meg a 2002/32/EK irányelvben megállapított felső határértéknek, ha két párhuzamos elemzéssel⁽²⁾ nyert két felfelé kerekített⁽³⁾ analitikai eredmény átlaga – figyelembe véve a kiterjesztett mérési bizonytalanságot is – az észszerűség határain belül kétséget kizáróan meghaladja a felső határértéket; azaz a megfelelés megállapítására az elemzett koncentrációt alkalmazzák a kiterjesztett mérési bizonytalanság levonása után.

A kiterjesztett mérési bizonytalanság kb. 95 %-os konfidenciaszintnek megfelelő 2-es kiterjesztési tényezővel számítandó ki. A tétel vagy altétel nem megfelelő, ha az átlagos mért értékekből az átlag kiterjesztett bizonytalansági értékét kivonva a megállapított felső határérték feletti értéket kapunk.

⁽¹⁾ Adott esetben a „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” (Iránymutatás a mérési bizonytalanság tekintetében PCDD/F és PCB vizsgálatát végző, izotóphígításos tömegspektrometriát alkalmazó laboratóriumok számára) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) című dokumentumban meghatározott elvek követendők.

⁽²⁾ Párhuzamos elemzés: a keresett analitok külön vizsgálata ugyanazon homogenizált minta második alikvotjának használatával. Általában a II. melléklet C. fejezetének 3. pontjában előírt követelmények alkalmazandók a párhuzamos elemzésre. Ugyanakkor az adott analitoknál a ¹³C-jelölésű belső standardot alkalmazó módszerek esetében a két párhuzamos elemzésre csak akkor van szükség, ha az ilyen első megerősítés eredménye nem mutat megfelelést. A két párhuzamos elemzésre azért van szükség, hogy ki lehessen zárni a minták belső keresztiszennyeződésének vagy véletlen összecserélődésének lehetőségét. Ha szennyeződési eset miatt történik az elemzés, el lehet tekinteni a két párhuzamos elemzéssel történő megerősítéstől abban az esetben, ha az elemzésre kiválasztott minták nyomon követhetően a szennyeződéshez kapcsolódnak, a megállapított koncentráció pedig jelentős mértékben meghaladja a felső határértéket.

⁽³⁾ A felfelé kerekítés fogalma szerint a mennyiségileg nem meghatározott egyes kongénerek hozzájárulásának értéke a meghatározási határ értékével egyenlő. A lefelé kerekítés fogalma szerint a mennyiségileg nem meghatározott egyes kongénerek hozzájárulásának értéke nullával egyenlő. A középre kerekítés fogalma szerint a mennyiségileg nem meghatározott egyes kongénerek hozzájárulásának értéke a meghatározási határ értékének felével egyenlő.

▼ **M6**

Az e pont alatt, a fenti bekezdésekben említett szabályok a hatósági ellenőrzés céljából vett mintákkal kapott analitikai eredményekre alkalmazandók. Az érdekvédelmi vagy szakértői célból végzett elemzések esetében a nemzeti szabályok alkalmazandók.

2.2. *A PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k tekintetében*

A tétel vagy altétel megfelel a felső határértékeknek, ha

- 5 % alatti „hamis megfelelő” arányt biztosító szűrő módszerrel végzett egyetlen elemzés eredménye azt mutatja, hogy a koncentráció nem haladja meg a 2002/32/EK irányelvben a PCDD/F-ekre, illetve a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegére megállapított felső határértéket,
- a megerősítő módszerrel végzett egyetlen elemzés eredménye – a kiterjesztett mérési bizonytalanságot is figyelembe véve – nem haladja meg a 2002/32/EK irányelvben a PCDD/F-ekre, illetve a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegére megállapított felső határértéket.

A szűrőtesztekhez cut-off értéket kell megállapítani annak meghatározásához, hogy a minta megfelel-e a PCDD/F-ekre, illetve a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegére megállapított határértéknek.

A tétel vagy altétel nem felel meg a 2002/32/EK irányelvben megállapított felső határértéknek, ha megerősítő módszerrel végzett két párhuzamos elemzéssel ⁽¹⁾ nyert két felfelé kerekített ⁽²⁾ analitikai eredmény átlaga – figyelembe véve a kiterjesztett mérési bizonytalanságot is – az észszerűség határain belül kétséget kizáróan meghaladja a felső határértéket; azaz a megfelelés megállapítására az elemzett koncentrációt alkalmazzák a kiterjesztett mérési bizonytalanság levonása után.

A kiterjesztett mérési bizonytalanság kb. 95 %-os konfidenciaszintnek megfelelő 2-es kiterjesztési tényezővel számítandó ki. A tétel vagy altétel nem megfelelő, ha az átlagos mért értékekből az átlag kiterjesztett bizonytalansági értékét kivonva a megállapított felső határérték feletti értéket kapunk.

A PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k külön-külön kapott analitikai eredményei becsült kiterjesztett bizonytalanságainak összegét kell használni a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegének kiszámításához.

Az e pont alatt, a fenti bekezdésekben említett szabályok a hatósági ellenőrzés céljából vett mintákkal kapott analitikai eredményekre alkalmazandók. Az érdekvédelmi vagy szakértői célból végzett elemzések esetében a nemzeti szabályok alkalmazandók.

⁽¹⁾ Általában a II. melléklet C. fejezetének 2. pontjában előírt követelmények alkalmazandók a párhuzamos elemzésre. Ugyanakkor az adott analitoknál a ¹³C-jelölésű belső standardot alkalmazó megerősítő módszerek esetében a két párhuzamos elemzésre csak akkor van szükség, ha az ilyen első megerősítés eredménye nem mutat megfelelést. A két párhuzamos elemzésre azért van szükség, hogy ki lehessen zárni a minták belső keresztszennyeződésének vagy véletlen összecszerelődésének lehetőségét. Ha szennyeződési eset miatt történik az elemzés, el lehet tekinteni a két párhuzamos elemzéssel történő megerősítéstől abban az esetben, ha az elemzésre kiválasztott minták nyomon követhetően a szennyeződéshez kapcsolódnak, a megállapított koncentráció pedig jelentős mértékben meghaladja a felső határértéket.

⁽²⁾ A felfelé kerekítés fogalma szerint a mennyiségileg nem meghatározott egyes kongénereknek a toxicitási egyenértékhez (TEQ) való hozzájárulása a meghatározási határ értékével egyenlő. A lefelé kerekítés fogalma szerint a mennyiségileg nem meghatározott egyes kongénereknek a toxicitási egyenértékhez (TEQ) való hozzájárulása nullával egyenlő. A közép kerekítés fogalma szerint a mennyiségileg nem meghatározott egyes kongénereknek a toxicitási egyenértékhez (TEQ) való hozzájárulása a meghatározási határ értékének felével egyenlő.

▼ M6

3. **A 2002/32/EK irányelv II. mellékletében megállapított beavatkozási küszöbértékeket meghaladó eredmények**

A beavatkozási küszöbértékek a minták kiválasztásának eszközei azokban az esetekben, amelyekben azonosítani kell a szennyeződés forrását, és intézkedni kell a csökkentéséről vagy megszüntetéséről. A szűrőmódszerekkel meg kell határozni a megfelelő cut-off értékeket az ilyen minták kiválasztásához. Ha jelentős erőfeszítések szükségesek a szennyeződés forrásának beazonosításához és a szennyeződés csökkentéséhez vagy megszüntetéséhez, célszerű eljárás két párhuzamos, megerősítő módszert alkalmazó elemzést végezni – a kiterjesztett mérési bizonytalanságot is figyelembe véve – a beavatkozási küszöbérték túllépésének megerősítésére ⁽¹⁾.

II. FEJEZET

A takarmányokban előforduló dioxinok (pcdd/f-ek) és dioxin jellegű pcb-k koncentrációjának hatósági ellenőrzéséhez használt minta-előkészítés és az elemzési módszerekre vonatkozó követelmények

1. **Alkalmazási kör**

Az e fejezetben előírt követelményeket kell alkalmazni a takarmányoknak a 2,3,7,8-as szénatomokon helyettesített PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k koncentrációja tekintetében történő hatósági ellenőrzési célú elemzéséhez, továbbá az egyéb szabályozási célokat szolgáló minta-előkészítés és analitikai követelmények tekintetében, ideértve 183/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet ⁽²⁾ rendelkezéseinek való megfelelés biztosítása érdekében a takarmányipari vállalkozó által végzett ellenőrzéseket.

A takarmányokban előforduló PCDD/F-ek és dioxin jellegű PCB-k jelenlétének figyelemmel kísérése két különböző analitikai módszerrel történhet:

a) *Szűrőmódszerek*

A szűrőmódszerek célja azoknak a mintáknak a kiválasztása, melyekben a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k koncentrációja meghaladja a felső határértéket vagy a beavatkozási küszöbértéket. A szűrőmódszerek segítségével költséghatékonyan lehet nagy mennyiségű mintát feldolgozni, és így nagyobb az esély az olyan új szennyeződési esetek felismerésére, amelyek nagy fogvasztói expozíciót és egészségi kockázatot jelenthetnek. Alkalmazásuknak arra kell irányulnia, hogy ne forduljanak elő „hamis megfelelő” eredmények. A szűrőmódszerek közé tartozhatnak bioanalitikai módszerek és gázkromatográfiás/tömegspektrometriás (GC-MS) módszerek.

A szűrőmódszerek az analitikai eredményt összehasonlítják egy cut-off értékkel, és igen/nem választ adnak a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték lehetséges túllépéséről. Az olyan mintákban, amelyek esetében feltételezhető a felső határértéket meghaladó eredmény, a PCDD/F-ek koncentrációját, valamint a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összkoncentrációját megerősítő módszerrel kell meghatározni vagy megerősíteni.

Emellett a szűrőmódszerek jelezhetik a mintában lévő PCDD/F-ek és dioxin jellegű PCB-k koncentrációját. Bioanalitikai szűrőmódszerek alkalmazása esetén az eredmény bioanalitikai egyenértékként (BEQ) fejezhető ki, míg fizikai-kémiai GC-MS módszerek alkalmazása esetén toxicitási egyenértékként (TEQ). A szűrőmódszerek számadattal megadott eredményei megfelelően mutatják a megfelelést, a

⁽¹⁾ A beavatkozási küszöbértékek ellenőrzésére szolgáló párhuzamos elemzés indokolása és követelményei azonosak a felső határértékre a fenti 2. lábjegyzetben leírtakkal.

⁽²⁾ Az Európai Parlament és a Tanács 183/2005/EK rendelete (2005. január 12.) a takarmányhigiénia követelményeinek meghatározásáról (HL L 35., 2005.2.8., 1. o.).

▼ **M6**

feltételezett meg nem felelést vagy a beavatkozási küszöbérték túllépését, és amennyiben megerősítő módszerekkel történő nyomon követés szükséges, jelzik a koncentrációtartományt. Nem alkalmasak olyan célokra, mint például a háttér-koncentrációk értékelése, a bevitel becslése, a koncentráció időbeli tendenciáinak nyomon követése vagy a beavatkozási küszöbérték, illetve a felső határértékek felülvizsgálata.

b) *Megerősítő módszerek*

A megerősítő módszerek lehetővé teszik a mintában jelen lévő PCDD/F-ek és dioxin jellegű PCB-k egyértelmű azonosítását és mennyiségi meghatározását, és teljeskörű információt adnak a kongénerszintről. Ezért e módszerek lehetővé teszik a felső határértékek és a beavatkozási küszöbértékek ellenőrzését, ideértve a szűrőmódszerekkel kapott eredmények megerősítését. Ezen túlmenően az eredmények egyéb célokra – például a takarmányellenőrzésben az alacsony háttér-koncentrációk meghatározására, az időbeli tendenciák követésére, az expozíció felmérésére, valamint a beavatkozási küszöbérték és a felső határértékek esetleges felülvizsgálatát szolgáló adatbázis létrehozására – is alkalmazhatók. Fontosak továbbá a kongénerekombinációk megállapításához, hogy azonosítani lehessen egy szennyeződések lehetséges forrását. Az ilyen módszerek GC-HRMS-t alkalmaznak. A felső határértéknek való megfelelés/meg nem felelés megerősítésére GC-MS/MS is alkalmazható.

2. **Háttér**

A toxicitási egyenértékben (TEQ) kifejezett koncentráció kiszámításához az egyes anyagok adott mintában mért koncentrációját meg kell szorozni a hozzájuk tartozó toxicitási egyenérték-tényezővel (TEF) (lásd az I. fejezet 1. lábjegyzetét), majd össze kell adni őket, és ez adja a dioxin jellegű vegyületek toxicitási egyenértékben (TEQ) kifejezett összkoncentrációját.

Az e B. rész alkalmazásában egy adott kongéner specifikus meghatározási határa a mintában az a legkisebb analittartalom, amely elfogadható statisztikai bizonyossággal mérhető, teljesítve a nemzetközileg elfogadott szabványokban, így például az EN 16215:2012 szabványban (*Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS*; Állati takarmányok. Dioxinok és dioxin jellegű PCB-k meghatározása GC-HRMS módszerrel és indikátor PCB-k meghatározása GC-HRMS módszerrel) és/vagy a felülvizsgált EPA 1613 és 1668 módszerben leírt azonosítási kritériumokat.

Egy adott kongéner meghatározási határa a következőképpen azonosítható:

- a) a mintakivonatban mért azon analitkoncentráció, amelynél két különböző vizsgált ion olyan analitikai jelet ad, amelynél a jel/zaj (S/N) arány a kisebb intenzitású jelre 3:1; vagy
- b) amennyiben technikai okokból a jel-zaj viszony számítása nem ad megbízható eredményt, egy kalibrációs görbe legkisebb koncentrációs pontja, amely elfogadható ($\leq 30\%$) és következetes (a minták analitikai sorozatának legalább a kezdetén és a végén mért) eltérést mutat az egyes mintasorozatokban a kalibrációs görbe valamennyi pontjára kiszámított átlagos relatív válaszfaktoroktól. A meghatározási határt a legkisebb koncentrációs pontból kell kiszámítani, figyelembe véve a belső standardok visszanyerését és a beviteli mintamennyiséget.

▼ **M6**

A bioanalitikai szűrőmódszerek az eredményeket nem a kongénerek szintjén adják meg, hanem csupán bioanalitikai egyenértékként (BEQ) jelzik ⁽¹⁾ a TEQ-értéket, ami azt jelenti, hogy a mérésakor analitikai jelet adó, a mintakivonatban jelen lévő vegyületek közül esetleg nem felel meg mindegyik a TEQ-elv összes követelményének.

Egy adott mátrix ellenőrzésére csak akkor alkalmazhatók szűrési és megerősítő módszerek, ha azok kellően érzékenyek ahhoz, hogy megbízhatóan ki tudják mutatni a beavatkozási küszöbértéket vagy a felső határértéket.

3. Minőségbiztosítási előírások

- 3.1. Intézkedéseket kell hozni, hogy a mintavétel és az analitikai eljárás szakaszaiban ne fordulhasson elő a minták keresztszennyeződése.
- 3.2. A mintákat olyan üveg, alumínium, polipropilén vagy polietilén edényekben kell tárolni és szállítani, amelyek alkalmasak a minták olyan tárolására, hogy az azokban lévő PCDD/F-ek és dioxin jellegű PCB-k koncentrációját semmilyen hatás ne érhesse. A papírpormaradékokat el kell távolítani a mintatartóból.
- 3.3. A minták tárolása és szállítása során gondoskodni kell a takarmányminta épségének megőrzéséről.
- 3.4. Adott esetben az egyes laboratóriumi mintákat finomra kell őrölni és alaposan össze kell keverni bizonyítottan teljes homogenizációt eredményező eljárással (például őrlés olyan finomságúra, hogy 1 mm-es szitán áthulljon). A túl nagy nedvességtartalmú mintákat őrlés előtt szárítani kell.
- 3.5. Ellenőrizni kell, hogy a reagensek, a laboratóriumi üvegeszközök és berendezések esetleg nem befolyásolják-e a TEQ-értékre vagy BEQ-értékre alapozott eredményeket.
- 3.6. Vakpróbát kell végezni, azaz végre kell hajtani a teljes analitikai eljárást, a mintát kihagyva belőle.
- 3.7. Bioanalitikai módszereknél az elemzéshez használt összes laboratóriumi üvegeszközt és oldószert ellenőrizni kell, hogy mentesek legyenek olyan vegyületektől, melyek a munkatartományban zavarhatnák a keresett vegyületek kimutatását. Az üvegeszközöket ki kell öblíteni oldószerezrel, vagy fel kell melegíteni olyan hőmérsékletre, amelyen a felületükről eltávoznak a nyomokban esetleg ott lévő PCDD/F-ek, dioxin jellegű vegyületek és zavaró vegyületek.
- 3.8. Az extrakcióhoz használt minta mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy teljesüljenek a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték koncentrációit magában foglaló, kellően alacsony munkatartományra vonatkozó követelmények.
- 3.9. A vizsgált termékekre alkalmazott adott minta-előkészítési eljárásoknak nemzetközileg elfogadott iránymutatásokat kell követniük.

⁽¹⁾ A bioanalitikai módszerek nem specifikusak a TEF-rendszerben szereplő kongénerekre. A mintakivonatban lehetnek szerkezetileg hasonló más AhR-aktív vegyületek, amelyek hozzájárulnak az összreakcióhoz. A bioanalitikai eredményeket ezért nem lehet a minta TEQ-értéke becslésének tekinteni, hanem csupán jelzik azt.

▼M6

4. **A laboratóriumokra vonatkozó követelmények**
 - 4.1. A 882/2004/EK rendelet rendelkezéseinek megfelelően az analitikai minőségbiztosítás alkalmazásának biztosítása érdekében a laboratóriumokat az ISO 58 útmutató szerint működő elismert testületnek kell akkreditálnia. A laboratóriumokat az EN ISO/IEC 17025 szabvány szerint kell akkreditálni. Adott esetben a „*Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis*” (Műszaki iránymutatás a mérési bizonytalanság és meghatározási határ becsléséhez PCDD/F és PCB vizsgálata tekintetében) dokumentumban ⁽¹⁾ foglalt elvek követendők.
 - 4.2. A laboratóriumok szakmai felkészültségét olyan laboratóriumközi körvizsgálatokban való folyamatos, sikeres részvétellel kell bizonyítani, amelyek a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k meghatározására irányulnak a megfelelő takarmánymátrixokban és koncentrációtartományokban.
 - 4.3. A minták rutinszerű ellenőrzésére szűrőmódszereket alkalmazó laboratóriumoknak szoros együttműködést kell kialakítaniuk a megerősítő módszert alkalmazó laboratóriumokkal mind a minőség-ellenőrzés, mind a feltehetően nem megfelelő minták analitikai eredményének megerősítése terén.
5. **A dioxinok (PCDD/F-ek) és dioxin jellegű PCB-k tekintetében alkalmazott analitikai eljárásokra vonatkozó alapkövetelmények**
 - 5.1. *Alacsony munkatartomány és a mennyiségi meghatározás határértéke*

A PCDD/F-ek esetében a kimutatható mennyiségnek a femtogrammos (10^{-15} g) tartomány felső részébe kell esnie, mivel az említett vegyületek közül több rendkívül mérgező. A legtöbb PCB-kongénér esetében már az is elegendő, ha a meghatározási határ értéke a nanogrammos (10^{-9} g) tartományban van. A mérgezőbb dioxin jellegű PCB-kongénerek (és különösen a nem orto szubsztituált kongénerek) méréséhez a munkatartomány aljának el kell érnie a pikogrammos (10^{-12} g) tartomány alját. Az összes többi PCB-kongénér esetében elegendő, ha a meghatározási határ értéke a nanogrammos (10^{-9} g) tartományba esik.
 - 5.2. *Nagy szelektivitás (specifikusság)*
 - 5.2.1. Meg kell tudni különböztetni a PCDD/F-eket és a dioxin jellegű PCB-eket azoktól a sokféle, együtt extrahálódó és a mérést esetleg zavaró más vegyületektől, amelyek több nagyságrenddel nagyobb koncentrációban lehetnek jelen, mint a keresett analitok. A GC-MS módszerekkel meg kell tudni különböztetni egymástól a különböző kongénereket, így például a mérgező kongénereket (például a 2,3,7,8-as szénatomokon helyettesített tizenhét PCDD/F-et és a tizenkét dioxin jellegű PCB-t) a többi kongénertől.
 - 5.2.2. A bioanalitikai módszerekkel ki kell tudni mutatni a keresett vegyületeket a PCDD/F-ek, és/vagy a dioxin jellegű PCB-k összegeként. A mintatisztítás célja az olyan vegyületek eltávolítása, amelyek „hamis nem megfelelő” eredményeket okoznak, vagy az olyanokét, amelyek a reakció gyengítésével „hamis megfelelő” eredményt okoznak.
 - 5.3. *Nagy adatpontosság (valódiság és módszerpontosság, biológiai próba során észlelt visszanyerés)*
 - 5.3.1. A GC-MS módszerekkel a meghatározásnak hiteles becslést kell adnia a minta valódi koncentrációjáról. Nagy adatpontosság szükséges ahhoz, hogy a mintaelemzés eredményét ne kelljen elutasítani a kapott TEQ-érték gyenge megbízhatósága miatt. Az adatpontosság a valódiság (egy

⁽¹⁾ *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* (Iránymutatás a mérési bizonytalanság tekintetében PCDD/F és PCB vizsgálatát végző, izotóphígításos tömegspektrometriát alkalmazó laboratóriumok számára) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* (Iránymutatás az érzékelési határ és a meghatározási határ méréséhez a takarmányban és élelmiszerekben előforduló szennyező anyagok tekintetében) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

▼ **M6**

hitelesített anyagban az adott analitra mért átlagérték és a hitelesített érték közötti különbség, ez utóbbi százalékában kifejezve) és a *módszerpon-tosság* (a reprodukálhatósági körülmények között kapott eredményekből kiszámított relatív szórás [RSD_R] összege).

- 5.3.2. A bioanalitikai módszereknél a biológiai próba során észlelt visszanyerést kell meghatározni. A biológiai próba során észlelt visszanyerés a TCDD vagy a PCB-126 kalibrációs görbéjéből számított, a vakminta eredményeivel korrigált BEQ-érték osztva a megerősítő módszerrel meghatározott TEQ-értékkel. Célja az olyan hatások korrigálása, mint például a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű vegyületek vesztesége az extrakció és a mintatisztítás során, az extrakcióval átmenő más vegyületek reakciót erősítő vagy gyengítő (agonisztikus és antagonistikus) hatása, a görbeilleszkedés minősége vagy a toxikológiai egyenérték-tényező (TEF) és a relatív hatóképesség (REP) értékei közötti különbségek. A biológiai próba során észlelt visszanyerés kiszámítása reprezentatív kongénorkombinációkat a keresett koncentráció körüli koncentrációkban tartalmazó, alkalmas referenciamintákból történik.

- 5.4. *Hitelesítés a felső határérték tartományában és általános minőség-ellen-őrző intézkedések*

- 5.4.1. A laboratóriumoknak a hitelesítés és a rutinszerű elemzés során igazolniuk kell a módszerek teljesítőképességét a felső határérték esetében – például a felső határérték felénél, egyszeresénél és kétszeresénél – azzal, hogy az ismételt elemzések variációs együtthatója elfogadható.

- 5.4.2. Belső minőség-ellenőrzési intézkedésként rendszeresen vakpróbákat, adalékolási kísérleteket vagy kontrollminta-elemzést (lehetőleg hitelesített referenciaanyaggal) kell végezni. A vakpróbákról, az adalékolási kísérletekről vagy a kontrollminta-elemzésekről minőség-ellenőrzési nyilvántartást kell vezetni, és ellenőrizni kell, hogy az analitikai teljesítőképesség valóban megfelel-e a követelményeknek.

- 5.5. *A meghatározási határ*

- 5.5.1. A bioanalitikai szűrőmódszereknél nem feltétlenül szükséges, hogy meg legyen határozva a meghatározási határ (LOQ), de a módszerről bizonyítani kell, hogy meg tudja különböztetni a vakmintával kapott eredményeket a cut-off értéktől. BEQ-érték megadásakor az e koncentráció alatti reakciót mutató minták kezelése céljából meg kell határozni egy jelentési határértéket. A jelentési határértéknek igazoltan az elemzési vakmintákkal kapott eredmény legalább háromszorosának kell lennie úgy, hogy az érték a munkatartomány alá esik. Ezért ezt a keresett vegyületet az előírt minimumkoncentráció körüli koncentrációban tartalmazó mintákból, nem pedig a jel/zaj arányból vagy mérési vakmintából kell kiszámítani.

- 5.5.2. Megerősítő módszer esetében a meghatározási határ értékének a felső határérték körülbelül egyötödénél kell lennie.

- 5.6. *Analitikai kritériumok*

Ahhoz, hogy a megerősítő vagy a szűrőmódszerek megbízható eredményeket adjanak, a következő kritériumoknak kell teljesülniük a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték tartományában a TEQ-értékre, illetve a BEQ-értékre, függetlenül attól, hogy a meghatározás TEQ-összeztékként (a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegékként) vagy külön a PCDD/F-ekre és külön a dioxin jellegű PCB-k-re történik:

▼ M6

	Szűrés bioanalitikai vagy fizikai-kémiai módszerekkel	Megerősítő módszerek
„Hamis megfelelő” arány ⁽¹⁾	< 5 %	
Valódiság		– 20 % és + 20 % között
Ismételhetőség (RSD _r)	< 20 %	
Közbenső módszerpontosság (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ A felső határértékhez képest.

5.7. *A szűrőmódszerekre vonatkozó egyedi követelmények*

5.7.1. A szűréshez mind GC-MS módszerek, mind bioanalitikai módszerek használhatók. A GC-MS módszerekre a 6. pontban előírt követelményeket kell alkalmazni. A sejtalapú bioanalitikai módszerekre vonatkozó egyedi követelményeket a 7. pont írja le.

5.7.2. A minták rutinszerű ellenőrzéséhez szűrőmódszereket alkalmazó laboratóriumoknak szoros együttműködést kell kialakítaniuk a megerősítő módszert alkalmazó laboratóriumokkal.

5.7.3. A szűrőmódszerek teljesítőképességét a rutinszerű elemzések során analitikai minőség-ellenőrzéssel és a módszer folyamatos hitelesítésével ellenőrizni kell. A „megfelelő” eredmények ellenőrzésére folyamatos programot kell alkalmazni.

5.7.4. A sejtreakció és a citotoxicitás esetleges elnyomásának ellenőrzése:

A mintakivonatok 20 %-át kell mérni rutinszerű szűréssel, a felső határértéknek vagy a beavatkozási küszöbértéknek megfelelően hozzáadott 2,3,7,8-TCDD-vel és anélkül, ellenőrizendő, hogy előfordulhat-e reakcióelnyomás a mintakivonatban jelen lévő zavaró anyagok miatt. Az adalékolt minta mért koncentrációját össze kell hasonlítani az adalékolás nélküli kivonat koncentrációjának és az adalékolási koncentrációnak az összegével. Ha a mért koncentráció több mint 25 %-kal kisebb a számított (össz)koncentrációnál, akkor ez azt mutatja, hogy fennáll a reakcióelnyomás lehetősége, és az illető mintát meg kell vizsgálni GC-HRMS megerősítő elemzéssel. Az eredményeket figyelemmel kell kísérni a minőség-ellenőrző nyilvántartásban.

5.7.5. A „megfelelő” minták minőség-ellenőrzése:

A mintamátrixtól és a laboratóriumi gyakorlattól függően a „megfelelő” minták megközelítőleg 2–10 %-ával el kell végezni a megerősítést GC-HRMS módszerrel.

5.7.6. A „hamis megfelelő” arányok meghatározása a minőség-ellenőrzési adatokból:

A felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték alatti és feletti minták szűrése alapján meg kell határozni a „hamis megfelelő” eredmények arányát. A tényleges „hamis megfelelő” arálynak 5 % alatt kell lennie. Ha mátrixonként vagy mátrixcsoportonként van legalább 20 megerősített eredmény a „megfelelő” minták minőség-ellenőrzéséből,

▼ **M6**

akkor a „hamis megfelelő” arányt ebből az adatbázisból kell megállapítani. A körvizsgálatokban vagy a szennyeződési esetek során elemzett minták eredményei, amelyek például akár a felső határérték (ML) kétszereséig terjedő koncentrációtartományokba is eshetnek, szintén felvehetők a „hamis megfelelő” arány kiszámításához minimumként használandó 20 eredmény közé. A mintáknak le kell fedniük a különféle forrásokat reprezentáló, leggyakoribb kongénerekombinációkat.

Noha a szűrőteszteknek lehetőleg azt kell célozniuk, hogy kimutassák a beavatkozási küszöbértéket meghaladó mintákat, a „hamis megfelelő” arányok meghatározásának kritériuma a felső határérték, figyelembe véve a megerősítő módszer mérési bizonytalanságát.

- 5.7.7. A szűrés alapján „feltehetően nem megfelelő” mintákat az eredeti mintának a teljeskörű újraelemzése útján megerősítő módszerrel kell mindig ellenőrizni. Ezek a minták a „hamis nem megfelelő” eredmények arányának kiszámításához is használhatók. A szűrőmódszerekkel a „hamis nem megfelelő” eredmények aránya a korábbi szűréskor „feltehetően nem megfelelő”-nek minősített minták megerősítő elemzéssel „megfelelő”-ként megerősített eredmények hányada. A szűrőmódszer előnyösségének értékelése a „hamis nem megfelelő” mintáknak az összes ellenőrzött mintával való összehasonlításán alapul. Ennek az arálynak elég kicsinek kell lennie ahhoz, hogy a szűrővizsgálati módszer alkalmazása előnyös legyen.

- 5.7.8. A bioanalitikai módszereknek a hitelesítési körülmények között, hitelesen kell jelezniük – a BEQ-érték kiszámításával és megadásával – a TEQ-értéket.

A megismételt körülmények között alkalmazott bioanalitikai módszerekre is igaz, hogy a laboratóriumon belüli RSD_r jellemzően kisebb, mint reprodukálhatósági körülmények között (RSD_R).

6. A szűrés és megerősítés céljából alkalmazott GC-MS módszerekre vonatkozó egyedi követelmények

- 6.1. *A felfelé kerekített és a lefelé kerekített WHO-TEQ-koncentrációk közötti elfogadható különbség*

A megerősített felső és alsó határ közötti különbség nem haladhatja meg a 20 %-ot a felső határérték vagy szükség esetén a beavatkozási küszöbérték túllépésének megerősítése céljából.

6.2. A visszanyerések ellenőrzése

- 6.2.1. Az elemzési eljárás hitelesítéséhez a 2,3,7,8-as szénatomokon klórral helyettesített PCDD/F-ekből készített, ^{13}C -jelölésű belső standardokat és a dioxin jellegű PCB-kből készített, ^{13}C -jelölésű belső standardokat az analitikai eljárás legelején, például az extrakció előtt hozzá kell adni a mintákhoz. A tetra-klórozottól az okta-klórozottig terjedő PCDD/F homológ csoportok mindegyikéből legalább egy kongénert, továbbá a dioxin jellegű PCB homológ csoportok mindegyikéből legalább egy kongénert kell hozzáadni a mintához (más megoldásként legalább egy-egy kongénert a PCDD/F-ek és dioxin jellegű PCB-k ellenőrzéséhez használt tömegspektrometriás szelektív ionkövetéses funkciókhoz). A megerősítő módszerek esetében a 2,3,7,8-as szénatomokon helyettesített mind a tizenhét PCDD/F-ből készített, ^{13}C -jelölésű belső standardot és mind a tizenkét dioxin jellegű PCB-ből készített, ^{13}C -jelölésű belső standardot használni kell.

▼ **M6**

- 6.2.2. Ezenkívül megfelelő kalibráló oldatok alkalmazásával relatív válaszfaktorokat kell meghatározni azon kongénerekre, amelyek ^{13}C -jelölésű analógja nem lett hozzáadva a mintához.
- 6.2.3. A növényi eredetű takarmányok és a 10 %-nál kevesebb zsírt tartalmazó állati eredetű takarmányok esetében a belső standardokat kötelezően az extrakció előtt kell a mintához adni. A 10 %-nál nagyobb zsírtartalmú állati eredetű takarmányok esetében a belső standardokat vagy a zsír-extrakció előtt, vagy azt követően kell a mintához adni. Az extrakció hatékonyságát megfelelően hitelesíteni kell, figyelembe véve, hogy a belső standardok hozzáadása melyik szakaszban történt.
- 6.2.4. GC-MS elemzés előtt a visszanyerés mérésére egy vagy két (kísérő) standardot is hozzá kell adni a mintához.
- 6.2.5. A visszanyerést ellenőrizni kell. A megerősítő módszerek esetében az egyes belső standardoknál a visszanyerésnek a 60–120 %-os tartományban kell lennie. Egyes kongénereknél, különösen néhány 7, illetve 8 klóratomot tartalmazó dibenzo-p-dioxin és dibenzo-furán esetében ennél kisebb vagy nagyobb visszanyerés is elfogadható, feltéve, hogy TEQ-értékük részaránya a (PCDD/F-ek és dioxin jellegű PCB-k összegén alapuló) TEQ-összértéken belül legfeljebb 10 %. GC-MS szűrőmódszerek esetében a visszanyerésnek a 30–140 %-os tartományban kell lennie.
- 6.3. *A zavaró anyagok eltávolítása*
- A PCDD/F-eket megfelelő kromatográfiás eljárással (lehetőleg florisil-, alumínium-oxid- és/vagy szénoszlopon) el kell választani a zavaró klórozott vegyületektől, így például a nem dioxin jellegű PCB-ktől és a klórozott difenil-éterektől.
 - Izomerek gázkromatográfiás elválasztásánál az 1,2,3,4,7,8-HxCDF és az 1,2,3,6,7,8-HxCDF esetében a csúcsok közötti eltérésnek 25 %-nál kisebbnek kell lennie.
- 6.4. *Kalibrálás standard görbével*
- A kalibrációs görbe tartományának le kell fednie a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték megfelelő tartományát.
- 6.5. *A megerősítő módszerekre vonatkozó egyedi kritériumok*
- A GC-HRMS esetében:

A HRMS esetében a felbontás a teljes tömegtartományra nézve jellemzően legalább 10 000 vagy annál nagyobb, 10 %-os mélypont mellett.

A nemzetközileg elismert szabványokban – például az EN 16215:2012 szabványban (*Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS* – Állati takarmányok. Dioxinok és dioxin jellegű PCB-k meghatározása GC-HRMS módszerrel és indikátor PCB-k meghatározása GC-HRMS módszerrel) és/vagy a felülvizsgált EPA 1613 és 1668 módszerekben – ismertetett további azonosítási és megerősítési kritériumok teljesülése.
 - A GC-MS/MS esetében:

legalább két specifikus anyagon nyomon követése, melyek a vizsgálat keretében minden jelölt és nem jelölt analit tekintetében rendelkeznek egy specifikus, megfelelő ionátmenettel.

A relatív ionintenzitásokhoz engedélyezett felső tűréshatár a kiválasztott ionátmenetek esetében a kiszámított vagy mért értékekhez viszonyítva $\pm 15\%$ (a kalibrációs standardokból származó átlag), az analit minden egyes átmenete esetében azonos MS/MS-feltételek alkalmazása mellett (mindenekelőtt ütközési energia és ütközési gáznyomás).

▼ M6

Az egyes quadrupolok felbontását úgy kell beállítani, hogy – a vizsgálat szempontjából fontos analitokkal kapcsolatos esetleges interferencia minimalizálása érdekében – megegyezzen az egységnyi tömegfelbontással, vagy nagyobb legyen annál (egységnyi tömegfelbontás: ahhoz elegendő felbontás, hogy egy tömegegységet két csúcsra bontson).

A nemzetközileg elismert szabványokban – például az EN 16215:2012 szabványban (*Animal feed – Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS* – Állati takarmányok. Dioxinok és dioxin jellegű PCB-k meghatározása GC-HRMS módszerrel és indikátor PCB-k meghatározása GC-HRMS módszerrel) és/vagy a felülvizsgált EPA 1613 és 1668 módszerekben – ismertetett további kritériumok teljesülése, a GC-HRMS alkalmazására vonatkozó kötelezettséget leszámítva.

7. A bioanalitikai módszerekre vonatkozó egyedi követelmények

A bioanalitikai módszerek biológiai alapelveken alapuló módszerek, mint például sejtalapú tesztek, receptortesztek vagy immunesztek. E 7. pont általánosságban leírja a bioanalitikai módszerekre vonatkozó követelményeket.

Egy szűrőmódszer alapvetően „megfelelő”-nek vagy „feltehetően nem megfelelő”-nek minősít egy mintát. Ehhez a számított BEQ-értéket össze kell hasonlítani a cut-off értékkel (lásd a 7.3. pontot). A cut-off érték alatti minták „megfelelő”-nek minősülnek, az azzal egyenlő vagy a feletti értékű minták pedig „feltehetően nem megfelelő”-nek, és ezeket megerősítő módszerrel elemezni kell. A gyakorlatban a felső határérték 2/3-ának megfelelő BEQ-érték alkalmazható cut-off értéként, amennyiben biztosított, hogy a „hamis megfelelő” arány 5 % alatt van, és a „hamis nem megfelelő” eredmények aránya is elfogadható. Mivel külön felső határértékek vonatkoznak a PCDD/F-ekre, illetve a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegére, a minták frakcionálás nélküli megfeleltetés-ellenőrzéséhez a biológiai próbáknál megfelelő cut-off értékek szükségesek a PCDD/F-ek vonatkozásában. A beavatkozási küszöbértékeket meghaladó minták ellenőrzéséhez az adott beavatkozási küszöbértékek megfelelő százalékaránya az alkalmas cut-off érték.

Amennyiben tájékoztató BEQ-érték van megadva, a mintából származó eredményeknek a munkatartományon belül kell lenniük, és meg kell haladniuk a jelentési határértéket (lásd a 7.1.1. és a 7.1.6. pontot).

7.1. A mérési reakciók kiértékelése

7.1.1. Általános követelmények

— Ha a koncentrációk kiszámítása TCDD-s kalibrációs görbével történik, akkor a görbe felső végénél lévő értékek nagy szórást (nagy variációs együtthatót [CV]) mutatnak. A munkatartomány az a terület, ahol ez a CV kisebb, mint 15 %. A munkatartomány alját (jelentési határérték) úgy kell meghatározni, hogy az legalább háromszoros legyen a elemzési vakmintákkal kapott eredményeknek. A munkatartomány tetejét általában az EC₇₀ érték jelenti (a legnagyobb hatásos koncentráció 70 %-a), de ennél kisebbnek kell lennie, ha ebben a tartományban a CV nagyobb, mint 15 %. A munkatartományt a hitelesítés során kell meghatározni. A cut-off értékeknek (lásd a 7.3. pontot) a munkatartomány belsejében kell lenniük.

— A standard oldatokat és a mintakivonatokat legalább három vagy legalább két párhuzamos elemzéssel kell mérni. Párhuzamos vizsgálatkor a lemezen elosztva 4–6 cellában mért standard oldatnak vagy kontrollkivonatnak olyan reakciókat vagy koncentrációkat kell adnia (ez csak a munkatartományban lehetséges), amelyek variációs együtthatója CV < 15 %.

▼M6

7.1.2. Kalibrálás

7.1.2.1. Kalibrálás standard görbével

- A mintában lévő mennyiségeket a mérési reakció és a TCDD-vel (vagy a PCB-126-tal vagy pedig PCDD-ből/PCDF-ből/dioxin jellegű PCB-ből álló standard keverékkel) készített kalibrációs görbe összehasonlításával kell megbecsülni, és ez alapján lehet kiszámítani a kivonatra és ezt követően a mintára jellemző BEQ-értéket.
- A kalibrációs görbéknek 8–12 (legalább két párhuzamos elemzéssel kapott) koncentrációt kell tartalmazniuk úgy, hogy elegendő koncentráció legyen a görbe alsó részén (a munkatartományban). Külön figyelmet kell fordítani a munkatartományban a görbeilleszkedés minőségére. Ennél az R^2 érték kevésbé vagy egyáltalán nem használható az illeszkedés jószágának becslésére a nem lineáris regresszió esetében. Jobb illeszkedést kell elérni a görbe munkatartományában számított és mért koncentrációk közötti legkisebb különbségek, például a legkisebb maradék négyzetösszeg alkalmazásával.
- A mintakivonat becsült koncentrációját ezután korrigálni kell egy vakmátrixra vagy vakoldószerre számított BEQ-értékkel (az alkalmazott oldószerek és vegyszerek szennyeződéseinek figyelembevételével céljából) és a látszólagos visszanyeréssel (ennek kiszámítása a reprezentatív kongénerekombinációkat a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték körül tartalmazó, alkalmas referenciaminták BEQ-értékéből történik). A visszanyeréssel való korrigáláshoz a látszólagos visszanyerésnek az előírt tartományba kell esnie (lásd a 7.1.4. pontot). A visszanyeréssel való korrigáláshoz használt referenciamintáknak meg kell felelniük a 7.2. pontban ismertetett követelményeknek.

7.1.2.2. Kalibrálás referenciamintákkal

Más megoldásként használható legalább négy referenciaminta (lásd a 7.2.4. pontot) – egy vakmátrix és három, a felső határérték vagy a cselekvési küszöbérték 0,5-szörösét, 1-szeresét, illetve 2-szeresét képviselő referenciaminta – felhasználásával készített kalibrációs görbe; így nincs szükség a vakminta eredményeivel és a visszanyeréssel történő korrigálásra, ha a referenciaminták mátrixtulajdonságai megfelelnek az ismeretlen minták tulajdonságainak. Ebben az esetben a felső határérték 2/3-ának megfelelő mérési reakció (lásd a 7.3. pontot) közvetlenül kiszámítható ezekből a mintákból és cut-off értéként használható. A beavatkozási küszöbértékeket meghaladó minták ellenőrzéséhez a beavatkozási küszöbértékek megfelelő százalékaránya az alkalmas cut-off érték.

7.1.3. A PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k meghatározása külön-külön

A kivonatok szétválaszthatók olyan frakciókra, melyek PCDD/F-eket, illetve dioxin jellegű PCB-ket tartalmaznak, így külön-külön meghatározható a PCDD/F-ek, illetve a dioxin jellegű PCB-k TEQ-értéke (BEQ-értékként kifejezve). A dioxin jellegű PCB-ket tartalmazó frakció eredményeinek kiszámításához lehetőleg a PCB-126-tal készített standarddal felvett kalibrációs görbét kell használni.

7.1.4. Biológiai próbák során észlelt visszanyerések

A „biológiai próbák során észlelt visszanyerést” a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték körüli reprezentatív kongénerekombinációkat tartalmazó alkalmas referenciamintákból kell kiszámítani és a BEQ-értéknek a TEQ-értékhez képesti százalékában kell megadni. A teszt típusától és az alkalmazott TEF-értékektől⁽¹⁾ függően a dioxin jellegű PCB-kre vonatkozó TEF- és REP-tényezők közötti különbségek a dioxin jellegű PCB-k esetében a PCDD/F-ekhez képest kis látszólagos visszanyerést okozhatnak. Ezért ha a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű

⁽¹⁾ A jelenlegi követelmények az alábbi kiadványban közzétett TEF-értékeken alapulnak: M. Van den Berg és mtsai., Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ M6

PCB-k meghatározása külön-külön történik, akkor a biológiai próba során észlelt visszanyerésnek a következőnek kell lennie: dioxin jellegű PCB-knél 20–60 %, PCDD/F-eknél pedig 50–130 % (a tartományok a TCDD-s kalibrációs görbére vonatkoznak). Mivel a dioxin jellegű PCB-k hozzájárulása a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegéhez a mátrixoktól és a mintáktól függően változhat, a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegére vonatkozóan a biológiai próba során észlelt visszanyerések tükrözik ezeket a tartományokat, és ezeknek 30 % és 130 % között kell lenniük. A PCDD/F-ekre és a dioxin jellegű PCB-kre vonatkozó uniós szabályozásban a TEF-értékek lényeges módosítása esetén ezeket a tartományokat is módosítani kell.

7.1.5. A visszanyerések ellenőrzése mintatisztításnál

A mintatisztítás során előforduló vegyületvesztést a hitelesítéskor ellenőrizni kell. A különböző kongénerek keverékével adalékolt vakmintán el kell végezni a mintatisztítást ($n =$ legalább 3), és a visszanyerést és a variabilitást megerősítő módszerrel kell ellenőrizni. A visszanyerésnek 60 % és 120 % között kell lennie, főként olyan kongénereknél, amelyek 10 %-nál nagyobb mértékben járulnak hozzá a TEQ-értékhez a különféle keverékekben.

7.1.6. Jelentési határérték

A BEQ-értékeknek a jelentésben történő megadásához jelentési határértéket kell meghatározni jellemző kongénerek kombinációkat tartalmazó adott mátrixmintákból, de nem a standard kalibrációs görbéből, mivel a görbe alján kicsi a módszerpontosság. Figyelembe kell venni az extrakció és a mintatisztítás hatásait. A jelentési határértéket az elemzési vakmintákkal kapott érték legalább háromszorosaként kell megállapítani.

7.2. Referenciaminták használata

7.2.1. A referenciamintáknak reprezentálniuk kell a mintamátrixot, a kongénerek kombinációkat és a PCDD/F-eknek és a dioxin jellegű PCB-knek a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték körüli koncentrációtartományait.

7.2.2. Mindegyik mérésorozatban lennie kell vakmátrixnak vagy, ha ez nem lehetséges, elemzési vakmintának, valamint a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték körüli koncentrációjú referenciamintának. Ezeket a mintákat egy időben és azonos körülmények között kell extrahálni és elemezni. A referenciamintának egyértelműen nagyobb reakciót kell adnia, mint a vakmintának, így biztosítva az elemzés alkalmasságát. Ezek a minták használhatók a vakminta eredményeivel és a visszanyeréssel való korrigáláshoz.

7.2.3. A visszanyeréssel való korrigáláshoz választott referenciamintáknak reprezentatívnak kell lenniük az elemzett mintákra, ami azt jelenti, hogy a kongénerek kombinációk nem okozhatják a koncentrációk alábecslését.

7.2.4. A felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték ellenőrzésére például a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték felének és kétszeresének megfelelő további referenciamintákat is alkalmazni lehet annak igazolására, hogy az elemzés alkalmassága a keresett tartományban megfelelő. Ezek a minták együttesen használhatók az elemzett minták BEQ-értékeinek kiszámítására (lásd a 7.1.2.2. pontot).

▼ M6

7.3. A cut-off értékek meghatározása

Meg kell határozni a BEQ-értékként kapott bioanalitikai eredmények és a megerősítő módszerrel kapott TEQ-értékek közötti összefüggést, például egyeztetett mátrixokkal végzett kalibrálási kísérletekkel, a felső határérték (ML) 0-szorosával, 0,5-szeresével, 1-szeresével és 2-szeresével egyenlő koncentrációkra adalékolt referenciamintákat használva, mindegyik koncentrációnál hat-hat ismételéssel ($n = 24$). Ebből az összefüggésből meg lehet becsülni a korrigálási tényezőket (vakminta és visszanyerés), de azokat a 7.2.2. pont szerint ellenőrizni kell.

Cut-off értékeket kell megállapítani annak eldöntéséhez, hogy a minta megfelel-e a PCDD/F-ekre és a dioxin jellegű PCB-kre külön-külön, vagy pedig a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegére meghatározott felső határértéknek, illetve adott esetben a beavatkozási küszöbértéknek. Ezeket a (vakminta eredményeivel és a visszanyeréssel korrigált) bioanalitikai eredmények eloszlásának alsó végpontja jelenti, amely megfelel a megerősítő módszernél használt, 5 %-nál kisebb „hamis megfelelő” arányt és 25 %-nál kisebb RSD_R -t feltételező 95 %-os megbízhatósági szinten alapuló döntési határértéknek. A megerősítő módszernél használt döntési határérték a felső határérték, figyelembe véve a kiterjesztett mérési bizonytalanságot.

A (BEQ-értékként kifejezett) cut-off érték a 7.3.1., a 7.3.2. és a 7.3.3. pontban ismertetett módszerek egyikével számítható ki (lásd: 1. ábra).

7.3.1. A 95 %-os predikciós intervallum alsó sávja a megerősítő módszernél használt döntési határértéknél:

$$\text{Cut-off érték} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

ahol:

BEQ_{DL} A megerősítő módszer döntési határértékének – amely a kiterjesztett mérési bizonytalanságot is figyelembe vevő felső határérték – megfelelő BEQ

$s_{y,x}$ maradék szórás

$t_{\alpha, f=m-2}$ Student-tényező ($\alpha = 5\%$, f = szabadságfok, egyoldali)

m a kalibrációs pontok összesen (j index)

n az ismétlések száma az egyes koncentrációknál

x_i az i . kalibrációs pontnál a minta megerősítő módszerrel mért koncentrációja (TEQ-értékként)

$\bar{x}$ az összes kalibrálási minta koncentrációjának (TEQ-érték) átlaga

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ négyzetösszeg-paraméter, } i = \text{az } i. \text{ kalibrálási pont indexe}$$

7.3.2. A megerősítő módszer döntési határértékének megfelelő szennyezettsgű minták párhuzamos elemzéseinek ($n \geq 6$) (a vakminta eredményeivel és a visszanyeréssel korrigált) bioanalitikai eredményeiből, az eloszlási görbének a megfelelő BEQ-átlagértéknél lévő alsó végpontjaként:

$$\text{Cut-off érték} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

ahol:

SD_R a biológiai tesztek BEQ_{DL} -értékre kapott eredményeinek szórása, a laboratóriumon belüli reprodukálhatóság körülményei között mérve.

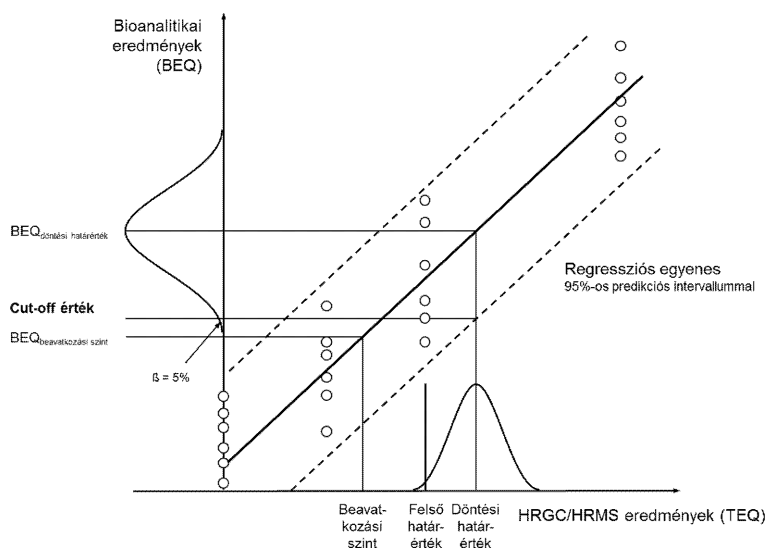
▼ **M6**

7.3.3. A felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték 2/3-ának megfelelő szennyezettségű minták párhuzamos elemzéseivel ($n \geq 6$) kapott (BEQ-értékként kifejezett, a vakminta eredményeivel és a visszanyeréssel korrigált) bioanalitikai eredmények átlaga, annak a megfigyelésnek az alapján, hogy ez az érték a 7.3.1. vagy 7.3.2. pont szerint meghatározott cut-off érték körül lesz.

5 %-nál kisebb „hamis megfelelő” arányt és 25 %-nál kisebb RSD_R -t feltételező 95 %-os megbízhatósági szinten alapuló cut-off értékek kiszámítása:

1. a 95 %-os predikciós intervallum *alsó* sávjából a megerősítő módszernél használt döntési határértéknél;
2. a megerősítő módszer döntési határértékének megfelelő szennyezettségű minták párhuzamos elemzéseiből ($n \geq 6$), az eloszlási görbének (az ábrán a harang alakú görbe) a megfelelő BEQ-átlagértéknél lévő *alsó* végpontjaként.

1. ábra

7.3.4. *A cut-off értékek korlátozásai*

A korlátozott számú, különböző mátrixú/kongénerkombinációjú mintákkal végzett hitelesítés során kapott RSD_R -ból kiszámított, BEQ-értéken alapuló cut-off értékek nagyobbak lehetnek a TEQ értéken alapuló felső határértéknél vagy beavatkozási küszöbértéknél, mivel nagyobb módszerpontosság érhető el, mint a rutinszerű elemzéseknél, ahol a lehetséges kongénerkombinációk ismeretlen skáláját kell ellenőrizni. Ilyen esetekben a cut-off értékek kiszámításához $RSD_R = 25$ %-ot kell venni, vagy pedig a felső határérték vagy a beavatkozási küszöbérték kétharmadát célszerű cut-off értéknek tekinteni.

7.4. *Alkalmasságjellemzők*

7.4.1. Mivel a bioanalitikai módszereknél nem alkalmazható belső standard, a méréssorozatokon belüli és a sorozatok közötti szórás megállapításához vizsgálni kell a bioanalitikai módszerek megismételhetőségét. A megismételhetőségnek 20 % alatt, a laboratóriumon belüli reprodukálhatóságnak pedig 25 % alatt kell lennie. Ehhez a vakminta eredményeivel és a visszanyeréssel korrigált BEQ-értékként számított koncentrációkat kell használni.

▼ **M6**

- 7.4.2. A hitelesítési eljárás részeként a tesztről ki kell mutatni, hogy különbséget tesz a vakminta eredménye és a cut-off alsó küszöbérték között, és így lehetővé teszi a megfelelő cut-off érték felett lévő minták azonosítását (lásd a 7.1.2. pontot).
- 7.4.3. Meg kell határozni a keresett vegyületeket, az esetleges interferenciákat és a vakminták elfogadható legnagyobb értékeit.
- 7.4.4. Egy mintakivonat három párhuzamos meghatározásakor kapott reakciók vagy az ilyen reakcióból számított koncentrációk (csak a munkatartományban lehetséges) százalékos szórása nem lehet nagyobb 15 %-nál.
- 7.4.5. A referenciaminta/referenciaminták BEQ-értékként kifejezett, korrigálás (vakminta és felső határérték vagy beavatkozási küszöbérték) nélküli eredményeit kell használni a bioanalitikai módszer egy meghatározott időszak alatti alkalmasságának értékelésére.
- 7.4.6. Az elemzési vakmintákról és a referenciaminták egyes típusairól minőség-ellenőrzési nyilvántartást kell vezetni, és ellenőrizni kell, hogy az analitikai alkalmasság biztosan megfelel-e a követelményeknek, az elemzési vakminták esetében főként a munkatartomány aljához képest előírt legkisebb különbség, a referenciaminták esetében pedig főként a laboratóriumon belüli reprodukálhatóság tekintetében. Az elemzési vakmintáknál ügyelni kell arra, hogy a kivonás miatt ne keletkezessenek „hamis megfelelő” eredmények.
- 7.4.7. A szűrőmódszer alkalmasságának, valamint a BEQ és a TEQ közötti összefüggés értékeléséhez a feltehetően nem megfelelő mintáknak és a megfelelő minták 2–10 %-ának (mátrixonként legalább 20 minta) megerősítő módszerrel végzett elemzéséből származó eredményeket kell összegyűjteni és felhasználni. Ez az adatbázis használható a hitelesített mátrixokkal végzett rutinszerű elemzésekre vonatkozó cut-off értékek újraértékeléséhez.
- 7.4.8. A módszerek alkalmassága igazolható körvizsgálatokban való részvétellel is. A körvizsgálatokban elemzett minták eredményei, a felső határérték kétszereséig terjedő koncentrációtartományokban, felhasználhatók a „hamis megfelelő” arány kiszámításához, ha a laboratórium igazolni tudja az alkalmasságot. A mintáknak le kell fedniük a különféle forrásokat reprezentáló, leggyakoribb kongénorkombinációkat.
- 7.4.9. Szennyeződési eseteknél a cut-off értékek átértékelhetők, hogy tükrözzék az adott külön esemény egyedi mátrix- és kongénorkombinációit.

8. Az eredmények jelentése**8.1. Megerősítő módszerek**

- 8.1.1. Amennyire az alkalmazott analitikai eljárás lehetővé teszi, az analitikai eredmények között fel kell tüntetni az egyes PCDD/F- és dioxin jellegű PCB-kongénerek koncentrációit, és ezeket felfelé, lefelé és középre kerekített értékként kell a jelentésben megadni, hogy az az eredményekről a lehető legtöbb információt tartalmazza, lehetővé téve az eredményeknek a vonatkozó követelmények szerinti értelmezését.
- 8.1.2. A jelentésnek tartalmaznia kell a PCDD/F-ek és a dioxinjellegű PCB-k extrakciójához használt módszert.

▼ **M6**

- 8.1.3. Meg kell adni az egyes belső standardok visszanyeréseit abban az esetben, ha a visszanyerések kívül esnek a 6.2.5. pontban megadott tartományon, ha az eredmények meghaladják a felső határértéket (ebben az esetben meg kell adni a két párhuzamos elemzés egyikének visszanyeréseit) vagy kérésre más esetekben.
- 8.1.4. Mivel a minta megfeleléséről való döntésnél figyelembe kell venni a kiterjesztett mérési bizonytalanságot, ezt a paramétert is meg kell adni. Az analitikai eredményeket tehát $x \pm U$ formában kell megadni a jelentésben, ahol x az analitikai eredmény, U a kiterjesztett mérési bizonytalanság, a kiterjesztési tényező 2, amely körülbelül 95 %-os megbízhatósági szintet eredményez. A PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k külön meghatározása esetén a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k külön-külön kapott analitikai eredményeinél becsült kiterjesztett bizonytalanságok összegét kell használni a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összegének kiszámításához.
- 8.1.5. Az eredményeket ugyanabban a mértékegységben és legalább ugyanannyi tizedesjeggyel kell megadni, ahogy a 2002/32/EK irányelv a felső határértékeket megadja.
- 8.2. *Bioanalitikai szűrőműszerek*
- 8.2.1. A szűrés eredményét „megfelelő” vagy „feltehetően nem megfelelő” megjelöléssel kell megadni.
- 8.2.2. Ezenkívül megadható egy indikatív eredmény a PCDD/F-ekre és/vagy a dioxin jellegű PCB-kre – TEQ érték helyett – BEQ-értékként.
- 8.2.3. A jelentési határérték alatti reakciókat adó mintákat „jelentési határérték alatt” megjelöléssel kell feltüntetni. A munkatartomány feletti reakciókat mutató mintákat a „munkatartományt meghaladókként” kell jelenteni, és a munkatartomány tetejének megfelelő szintet BEQ-értékként kell megadni.
- 8.2.4. A jelentésnek minden mintamátrix-típusnál tartalmaznia kell az értékelés alapját képező felső határértéket vagy beavatkozási küszöbértéket.
- 8.2.5. A jelentésnek tartalmaznia kell az alkalmazott teszt típusát, a teszt alapelvét és a kalibráció típusát.
- 8.2.6. A jelentésnek tartalmaznia kell a PCDD/F-ek és a dioxinjellegű PCB-k extrakciójához használt módszert.
- 8.2.7. Ha valamely mintával kapcsolatban felmerül, hogy feltehetően nem felel meg, a jelentésben szerepelnie kell a szükséges intézkedésre vonatkozó megjegyzésnek. A jelentős koncentrációt tartalmazó mintákban a PCDD/F-ek koncentrációját, valamint a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összkoncentrációját megerősítő módszerrel kell meghatározni/megerősíteni.
- 8.2.8. A nem megfelelő eredményeket csak megerősítő elemzés után kell jelenteni.
- 8.3. *Fizikai-kémiai szűrőműszerek*
- 8.3.1. A szűrés eredményét „megfelelő” vagy „feltehetően nem megfelelő” megjelöléssel kell megadni.
- 8.3.2. A jelentésnek minden mintamátrix-típusnál tartalmaznia kell az értékelés alapját képező felső határértéket vagy beavatkozási küszöbértéket.

▼ M6

- 8.3.3. Emellett jelenteni kell az egyes PCDD/F- és dioxin jellegű PCB-kongénerek koncentrációit és a TEQ-értékeket, és ezeket felfelé, lefelé és középre kerekített értéként kell a jelentésben megadni. Az eredményeket ugyanabban a mértékegységben és legalább ugyanannyi tizedesjeggyel kell megadni, ahogy a 2002/32/EK irányelv a felső határértékeket megadja.
- 8.3.4. Meg kell adni az egyes belső standardok visszanyeréseit abban az esetben, ha a visszanyerések kívül esnek a 6.2.5. pontban megadott tartományon, ha az eredmények meghaladják a felső határértéket (ebben az esetben meg kell adni a két párhuzamos elemzés egyikének visszanyeréseit) vagy kérésre más esetekben.
- 8.3.5. A jelentésnek tartalmaznia kell az alkalmazott GC-MS módszert.
- 8.3.6. A jelentésnek tartalmaznia kell a PCDD/F-ek és a dioxinjellegű PCB-k extrakciójához használt módszert.
- 8.3.7. Ha valamely mintával kapcsolatban felmerül, hogy feltehetően nem felel meg, a jelentésben szerepelnie kell a szükséges intézkedésre vonatkozó megjegyzésnek. A jelentős koncentrációt tartalmazó mintákban a PCDD/F-ek koncentrációját, valamint a PCDD/F-ek és a dioxin jellegű PCB-k összkoncentrációját megerősítő módszerrel kell meghatározni/megerősíteni.
- 8.3.8. A nem megfelelésről csak megerősítő elemzés után lehet határozni.

III. FEJEZET

A takarmányokban előforduló nem dioxin jellegű pcb-k koncentrációjának hatósági ellenőrzéséhez használt minta-előkészítés és az elemzési módszerekre vonatkozó követelmények

1. Alkalmazási kör

Az e fejezetben előírt követelményeket kell alkalmazni a takarmányoknak a nem dioxin jellegű PCB-k koncentrációja tekintetében történő hatósági ellenőrzési célú elemzéséhez, továbbá az egyéb szabályozási célokat szolgáló minta-előkészítés és analitikai követelmények tekintetében, ideértve a 183/2005/EK rendelet rendelkezéseinek való megfelelés biztosítása érdekében az takarmányipari vállalkozó által végzett ellenőrzéseket.

2. Az alkalmazandó kimutatási módszerek

Gázkromatográfia/elektronbefogásos kimutatás (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS vagy egyenértékű módszerek.

3. A keresett analitok beazonosítása és megerősítése

- 3.1. A belső standardokhoz vagy referenciastandardokhoz viszonyított relatív retenció idő (elfogadható eltérés: $\pm 0,25\%$).
- 3.2. A nem dioxin jellegű PCB-k gázkromatográfias elválasztása a zavaró anyagoktól, főként az együtt eluálódó PCB-ktől, különösen, ha a minták koncentrációi a jogszabályi határértékek tartományában vagy afölött vannak, és a meg nem felelést meg kell erősíteni.⁽¹⁾
- 3.3. A GC-MS módszerekre vonatkozó követelmények

Legalább az alábbi számú molekuláris ion vagy a molekuláris klaszterben lévő jellemző ionok nyomon követése:

- a) a HRMS-nél két specifikus ion;

⁽¹⁾ A tapasztalatok szerint a következő kongénereknél például gyakran előfordul az együttes eluáció: PCB-28/31, PCB-52/69 és PCB-138/163/164. A GC-MS módszernél figyelembe kell venni az esetleg a nagyobb mértékben klórozott kongénerek fragmentumai által okozott esetleges zavarást is.

▼ **M6**

- b) az LRMS-nél három specifikus ion;
- c) két specifikus anyai ion; mindegyik esetében egy megfelelő ionátmenettel az MS-MS tekintetében.

Kiválasztott tömegfragmentumok gyakoriságára megengedett tűrések:

Kiválasztott tömegfragmentumok gyakoriságának relatív eltérése az elméleti gyakorisághoz vagy a keresett ion (a vizsgált ionok közül a leggyakoribb) és a minősítő ion(ok) kalibrációs standardjához képest: $\pm 15\%$

3.4. A GC-ECD módszerekre vonatkozó követelmények

A felső határértéket meghaladó eredményeket különböző polaritású állófázist használó két gázkromatográfiás oszloppal meg kell erősíteni.

4. A módszer alkalmasságának igazolása

A módszer alkalmasságát a felső határérték tartományában (a felső határérték felétől a kétszereséig) kell hitelesíteni úgy, hogy az ismételt elemzések elfogadható variációs együtthatót adnak (a közbeső módszerpontosságra vonatkozó előírásokat lásd a 9. pontban).

5. A meghatározási határ

A nem dioxin jellegű PCB-k meghatározási határának ⁽¹⁾ összege nem lehet magasabb a felső határérték egyharmadánál ⁽²⁾.

6. Minőség-ellenőrzés

Rendszeres vakkontrollmérések, adalékolt minták elemzése, minőség-ellenőrzési minták, részvétel a vonatkozó mátrixokkal végzett laboratóriumközi körvizsgálatokban.

7. A visszanyerések ellenőrzése

- 7.1. A keresett analitokhoz hasonló fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező alkalmas belső standardokat kell használni.

- 7.2. Belső standardok hozzáadása:

Hozzáadás a termékekhez (extrakció és mintatisztítás előtt).

- 7.3. A mind a hat izotópos jelölésű nem dioxin jellegű PCB-kongénert használó módszerekre vonatkozó előírások:

- a) az eredményeket korrigálni kell a belső standardok visszanyeréseivel;
- b) az izotópjelölésű belső standardok visszanyerésének 60 és 120 % között kell lennie;
- c) a nem dioxin jellegű PCB-k összegéhez 10 %-nál kisebb mértékben hozzájáruló egyes kongénereknél elfogadható ennél kisebb vagy nagyobb visszanyerés.

- 7.4. A nem mind a hat izotópos jelölésű belső standardot vagy más belső standardokat használó módszerekre vonatkozó előírások:

- a) a belső standard(ok) visszanyerését minden minta esetében ellenőrizni kell;

⁽¹⁾ Adott esetben a „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food” (Iránymutatás az érzékelési határ és a meghatározási határ méréséhez a takarmányban és élelmiszerekben előforduló szennyező anyagok tekintetében) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) dokumentumban meghatározott elvek követendők.

⁽²⁾ Határozottan ajánlott, hogy a reagenssel készített vakminta koncentrációjának hozzájárulása a mintában lévő szennyeződés koncentrációjához ennél kisebb legyen. A laboratórium felelőssége a vakminták koncentrációeltéréseinek ellenőrzés alatt tartása, különösen akkor, ha a vakmintákkal kapott eredményeket le kell vonni az analitikai eredményekből.

▼ M6

b) a belső standard(ok) visszanyeréseinek 60 % és 120 % között kell lenniük;

c) az eredményeket korrigálni kell a belső standardok visszanyeréseivel.

7.5. Az izotóppal nem jelölt kongénerek visszanyerését olyan adalékolt mintákkal vagy minőség-ellenőrzési mintákkal kell ellenőrizni, amelyek koncentrációja a felső határérték tartományába esik. Ezen kongénereknél a visszanyerést elfogadhatónak kell tekinteni, ha az 60 és 120 % között van.

8. A laboratóriumokra vonatkozó követelmények

A 882/2004/EK rendelet rendelkezéseinek megfelelően az analitikai minőségbiztosítás alkalmazásának biztosítása érdekében a laboratóriumokat az ISO 58 útmutató szerint működő elismert testületnek kell akkreditálnia. A laboratóriumokat az EN ISO/IEC 17025 szabvány szerint kell akkreditálni. Emellett adott esetben a „*Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCB analysis*” (Műszaki iránymutatás a mérési bizonytalanság és meghatározási határ becsléséhez a PCB vizsgálata tekintetében) dokumentumban foglalt elvek követendők ⁽¹⁾.

9. Alkalmasságjellemzők: a felső határértékben jelen lévő hat indikátor PCB összegére vonatkozó kritériumok

	Izotóphígításos tömegspektrometria ⁽¹⁾	Egyéb technikák
Valódiság	– 20 % és + 20 % között	– 30 % és + 30 % között
Közbenső módszerpontosság (RSD%)	≤ 15 %	≤ 20 %
A felfelé és a lefelé kerekítés közötti különbség	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Belső standardként mind a hat, ¹³C-jelölésű analógot használni kell.

10. Az eredmények jelentése

10.1. Az analitikai eredmények között fel kell tüntetni az egyes nem dioxin jellegű PCB-k koncentrációit és az ilyen PCB-kongénerek összegét, és ezeket felfelé, lefelé és középére kerekített értékként kell a jelentésben megadni, hogy az az eredményekről a lehető legtöbb információt tartalmazza, lehetővé téve az eredményeknek a vonatkozó követelmények szerinti értelmezését.

10.2. A jelentésnek tartalmaznia kell a PCB-k extrakciójához használt módszert.

10.3. Meg kell adni az egyes belső standardok visszanyeréseit abban az esetben, ha a visszanyerések kívül esnek a 7. pontban megadott tartományon, ha az eredmények meghaladják a felső határértéket vagy kérésre más esetekben.

10.4. Mivel a minta megfeleléségéről való döntésnél figyelembe kell venni a kiterjesztett mérési bizonytalanságot, ezt a paramétert is meg kell adni. Az analitikai eredményeket tehát $x \pm U$ formában kell megadni a jelentésben, ahol x az analitikai eredmény, U a kiterjesztett mérési bizonytalanság, a kiterjesztési tényező 2, amely körülbelül 95 %-os megbízhatósági szintet eredményez.

10.5. Az eredményeket ugyanabban a mértékegységben és legalább ugyanannyi tizedesjeggyel kell megadni, ahogy a 2002/32/EK irányelv a felső határértékeket megadja.

⁽¹⁾ A jelenlegi követelmények az alábbi kiadványban közzétett TEF-értékeken alapulnak: M. Van den Berg és mtsai., Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ **M2***VI. MELLÉKLET***A TAKARMÁNYOK HATÓSÁGI ELLENŐRZÉSE SORÁN AZ ÁLLATI EREDETŰ ALKOTÓELEMEK MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ ANALITIKAI MÓDSZEREK****1. CÉL ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLET**

E melléklet rendelkezéseinek értelmében a takarmányban lévő állati eredetű alkotóelemeket fénymikroszkóppal vagy polimeráz láncreakcióval (PCR) kell meghatározni.

A két módszer lehetővé teszi az állati fehérje jelenlétének kimutatását a takarmány-alapanyagokban és az összetett takarmányokban. Azonban ezekkel a módszerekkel az említett összetevők mennyiségét a takarmány-alapanyagokban és az összetett takarmányokban nem lehet meghatározni. A kimutatási határérték mindkét módszer esetén 0,1 m/m%.

A PCR-módszerrel lehetséges a takarmány-alapanyagokban és az összetett takarmányokban jelen lévő állati fehérje rendszertani csoportjának meghatározása.

Ezek a módszerek alkalmazandók a 999/2001/EK rendelet 7. cikkének (1) bekezdésében és IV. mellékletében, valamint az 1069/2009/EK rendelet 11. cikkének (1) bekezdésében megállapított tilalmak betartásának ellenőrzéséhez.

A vizsgált takarmány típusától függően a takarmányokban előforduló állati fehérjéket vizsgáló uniós referencialaboratórium (EURL-AP) által meghatározott és a laboratórium honlapján⁽¹⁾ közzétett szabványműveleti eljárásoknak (SOP) megfelelően ezek a módszerek külön-külön vagy egymással kombinálva egy műveleti eljáráson belül is alkalmazhatók.

2. MÓDSZEREK**2.1. Fénymikroszkóp****2.1.1. A módszer alapelve**

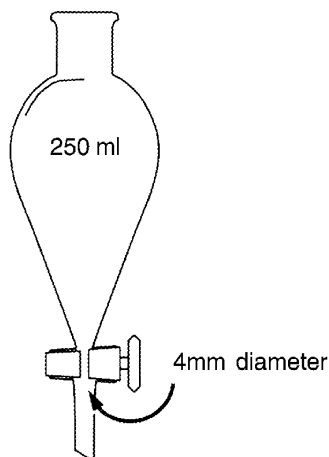
Az elemzésre küldött takarmány-alapanyagokban és összetett takarmányokban jelen lévő állati eredetű alkotóelemek a típusos, mikroszkóppal felismerhető jellegzetességek alapján azonosíthatók (pl. izomrostok és egyéb húsrészek, porc, csontok, szaru, szőr, sörté, vér, tollak, tojáshéjak, halcsontok, pikkelyek).

2.1.2. Reagensok és eszközök**2.1.2.1. Reagensok****2.1.2.1.1. Koncentráció anyagok****2.1.2.1.1.1. Tetraklór-etilén (fajsúly: 1,62)****2.1.2.1.2. Színezékek****2.1.2.1.2.1. Alizarinvörös-oldat (fel kell oldani 2,5 ml 1 M-os sósavat 100 ml vízben, majd hozzá kell adni ehhez az oldathoz 200 mg alizarinvöröset)****2.1.2.1.3. Beágyazó közegek****2.1.2.1.3.1. Lúg (NaOH 2,5 % w/v vagy KOH 2,5 %w/v)**

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

- 2.1.2.1.3.2. Glicerín (tömény, viszkozitás: 1 490 cP)
- 2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (viszkozitás: 1 200 cP) vagy ezzel egyenértékű tulajdonságokkal rendelkező, tartós tárgylemez-előkészítésre alkalmas gyanta
- 2.1.2.1.4. Színező tulajdonsággal rendelkező beágyazó közegek
- 2.1.2.1.4.1. Lugoldoldat (fel kell oldani 2 g kálium-jodidot 100 ml vízben, majd hozzáadni 1 g jódot sűrű rázogatós közben)
- 2.1.2.1.4.2. Cisztin reagens (2 g ólom-acetát, 10 g NaOH/100 ml víz)
- 2.1.2.1.4.3. Fehling reagens (felhasználás előtt az A és B törzsoldatból vett egyenlő egységekből (1/1) készül. A oldat: fel kell oldani 6,9 g réz(II)-szulfát-pentahidrárt 100 ml vízben. B oldat: fel kell oldani 34,6 g kálium-nátrium-tartarát-tetrahidrárt és 12 g NaOH-t 100 ml vízben)
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidin/Hidrogén-peroxid. (fel kell oldani 1 g 3,3',5,5'-tetrametilbenzidint (TMB) 100 ml jégecetben és 150 ml vízben. Felhasználás előtt össze kell keverni négy rész TMB-oldatot és egy rész 3 %-os hidrogén-peroxidot.
- 2.1.2.1.5. Öblítő reagentsek
- 2.1.2.1.5.1. Etanol ≥ 96 % (technikai minőségű)
- 2.1.2.1.5.2. Aceton (technikai minőségű)
- 2.1.2.1.6. Fehérítő reagens
- 2.1.2.1.6.1. Kereskedelmi nátriumhipoklorit-oldat (9–14 % aktív klór)
- 2.1.2.2. Felszerelés
- 2.1.2.2.1. 0,001 g pontosságú analitikai mérleg.
- 2.1.2.2.2. Örlőeszközök: daráló vagy mozsár
- 2.1.2.2.3. 0,25 mm-es és 1 mm-es lyukátmérőjű négyzethálós szita
- 2.1.2.2.4. 250 ml űrtartalmú kúpos üveg elválasztótölcsér, a tölcser kúpos végén teflon vagy csiszolt üveg elzárócsappal. Az elzárócsap nyitási átmérője ≥ 4 mm. Alternatív megoldásként kúpos aljú főzőpohár is használható, amennyiben a laboratórium bizonyítja, hogy a kimutatási szintek megegyeznek a kúpos üveg elválasztótölcsér alkalmazásával elért kimutatási szintekkel.

Elválasztótölcsér

▼ M2

- 2.1.2.2.5. Sztereomikroszkóp, legalább 6,5–40-szeresig terjedő nagyítású
- 2.1.2.2.6. Összetett mikroszkóp legalább 100–400-szorosig terjedő nagyítású, áteső fényű világos látótérrel. Kiegészítésként polarizált fény és differenciál-interferenciakontraszt is alkalmazható
- 2.1.2.2.7. Szabványos laboratóriumi üvegedények
- 2.1.2.2.8. Felszerelés tárgylemez előkészítéséhez: klasszikus mikroszkóp-tárgylemezek, vésett tárgylemezek, fedőlemezek (20x20 mm), csipeszek, finom spatula
- 2.1.3. *Mintavételezés és minta-előkészítés*
- 2.1.3.1. Mintavétel
- Az I. mellékletben megállapított rendelkezések szerint vett reprezentatív mintát kell használni.
- 2.1.3.2. Óvintézkedések
- A laboratóriumban a keresztszennyeződés elkerülése érdekében a többször használatos eszközöket használat előtt gondosan meg kell tisztítani. Az elválasztótölcsért tisztítás előtt részecskéket kell szedni. Az elválasztótölcsért és az üvegedényeket először kézzel el kell mosni, és ezt követően mosogatógépben tisztítani. A szitákat erősszalú műszalas kefével kell megtisztítani. Zsíros anyag (például halliszt) átszitálását követően acetonnal és sűrített levegővel javasolt a szitákon végső tisztítást végezni.
- 2.1.3.3. Zsirtól vagy olajtól eltérő minták előkészítése
- 2.1.3.3.1. Mintaszáritás: a 14 %-nál magasabb nedvességtartalmú mintákat kezelés előtt ki kell szárítani.
- 2.1.3.3.2. Minta előszitálása: a pelletált takarmányokat és magvakat ajánlatos 1 mm-es lyukátmérőjű szitán előszitálni, majd a két kapott frakciót külön mintaként előkészíteni és elemezni.
- 2.1.3.3.3. Részminta-vételezés és őrlés: A mintából legalább 50 g részmintát kell venni elemzés céljára, majd leőrölni.
- 2.1.3.3.4. Üledék kivonása és előkészítése: a 10 g tömegű (0,01 g pontossággal bemért) őrlött részmintát elválasztó tölsérbe vagy kúpos aljú főzőpohárba kell helyezni, és legalább 50 ml tetraklór-etilént hozzáadni. Hallisztból vagy egyéb tiszta állati termékből, ásványi alkotóelemből vagy olyan előkeverékekből, amelyek 10 %-nál nagyobb mennyiségű üledéket képeznek, 3 g-nál nagyobb mennyiség nem kerülhet a tölsérbe. A keveréket legalább 30 mp-ig erőteljesen kell rázni, majd óvatosan hozzáadni legalább 50 ml tetraklór-etilént a tölsér belső falának leöblítésével, a rátapadt részecskék eltávolítása érdekében. A kapott keveréket legalább öt percig állni kell hagyni, mielőtt az elzárócsap megnyitásával az üledéket leválasztjuk.

Kúpos aljú főzőpohár használatakor a keveréket legalább 15 mp-ig erőteljesen fel kell keverni, majd legalább 10 ml tiszta tetraklór-etilénnel óvatosan leöblíteni a pohár belső faláról az odatapadt részecskéket. A keveréket legalább 3 percig állni kell hagyni, majd további 15 mp-ig keverni és legalább 10 ml tiszta tetraklór-etilénnel óvatosan leöblíteni a pohár belső faláról az odatapadt részecskéket. Az így kapott keveréket legalább 5 percig állni kell hagyni, majd a folyadékfrakciót eltávolítani és óvatos dekantálással kiönteni úgy, hogy az összes üledék megmaradjon.

▼ **M2**

Az üledéket ki kell szárítani, és ezt követően (0,001 g) pontossággal lemérni. Ha az üledék több mint 5 %-át 0,50 mm-nél nagyobb részecskék alkotják, 0,25 mm lyukátmérőjű szitán át kell szitálni és az így kapott két frakciót vizsgálni.

2.1.3.3.5. A flotátum kivonása és előkészítése: az üledék fentiek szerinti módszerrel történő kinyerése után két fázis marad vissza az elválasztó tölcsérben: a tetraklór-etilénből álló folyadék és a felülúszó anyagból álló szilárd halmazállapotú anyag. A szilárd fázist (a flotátumot) a tetraklór-etilénnek az elzárócsapon keresztüli kiengedésével kell kinyerni a tölcsérből. Az elválasztótölcsér megfordításával a flotátumot egy nagy Petri-csészébe kell önteni, majd füstelszívó süvegben levegős szárítással megszáritani. Ha a flotátum több mint 5 %-át 0,50 mm-nél nagyobb részecskék alkotják, 0,25 mm lyukátmérőjű szitán át kell szitálni és az így kapott két frakciót vizsgálni.

2.1.3.3.6. A nyersanyag előkészítése: az őrölt részmintából legalább 5 g-ot kell előkészíteni. Ha az anyag több mint 5 %-át 0,50 mm-nél nagyobb részecskék alkotják, 0,25 mm lyukátmérőjű szitán át kell szitálni és az így kapott két frakciót vizsgálni.

2.1.3.4. Zsirt vagy olajat tartalmazó minták előkészítése

A következő módszer alkalmazható a zsirt vagy olajat tartalmazó minták előkészítéséhez:

- ha a zsír szilárd, addig kell melegíteni ► **C2** szárítószekrényben, ◀ amíg folyékonyá nem válik,
- át kell pipettázni 40 ml zsirt vagy olajat a minta aljáról egy centrifugacsőbe,
- centrifugáljuk tíz percig 4 000-es percenkénti fordulatszámon,
- ha a zsír a centrifugálás után szilárd, addig kell melegíteni ► **C2** szárítószekrényben, ◀ 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 mikroszkóp-tárgylemezre vizsgálat céljából, beágyazószerként a glicerint használata javasolt,
- a fennmaradó szennyeződéseket a 2.1.3.3. pontnak megfelelően az üledék előkészítésére kell használni.

2.1.3.5. Színezékek használata

Az állati eredetű alkotóelemek helyes meghatározásának megkönnyítése érdekében, az EURL-AP által kiadott és a honlapján is elérhető útmutatókkal összhangban a laboratóriumi munkatárs használhat színezékeket a minta előkészítése során.

Az üledék alizarinvörös-oldattal történő festésekor az alábbi eljárás alkalmazandó:

- a szárított üledéket üvegkémcsőbe kell tölteni, és kétszer kb. 5 ml etanollal átöblíteni (minden alkalommal 30 mp-ig Vortex keverőt kell használni, az oldószert másfél percig hagyni leülepedni, majd leönteni),
- az üledéket legalább 1 ml nátrium-hipoklorit oldat hozzáadásával fehériteni kell. A folyamatnak 10 perc reakcióidőt kell biztosítani. A kémcsövet megtöltjük vízzel, az üledéket 2–3 percig hagyjuk leülepedni, és a vizet és a szuszpendált részecskéket óvatosan leöntjük,

▼ **M2**

- az üledéket még kétszer kb. 10 ml vízzel le kell öblíteni (30 mp-ig Vortex keverőt kell használni, hagyni leülepedni, és a vizet minden alkalommal leönteni),
- hozzá kell adni 2–10 csepp alizarinvörös-oldatot, majd Vortex keverővel összekeverni. A reakció 30 mp-ig tarthat, és a színezett üledéket kétszer kb. 5 ml etanollal, majd egyszer acetonnal át kell öblíteni (minden alkalommal 30 mp-ig Vortex 30 keverőt kell használni, az oldószert kb. egy percig hagyni leülepedni, majd leönteni),
- a színezett üledéket ki kell szárítani.

2.1.4. *Mikroszkópos vizsgálat*

2.1.4.1. Tárgylemez-előkészítés

Az üledékből és a laboratóriumi munkatárs választásától függően a flotátumból vagy a nyersanyagból tárgylemezen preparátumot készítünk. Amennyiben szitát használtunk a minta előkészítése során, mindkét így kapott frakciót (finom és durva) preparálni kell. A frakcióból a tárgylemezre terített vizsgálati mennyiségeknek az egész frakcióra nézve reprezentatívnak kell lenniük.

Elegendő mennyiségű tárgylemezt kell előkészíteni annak érdekében, hogy a 2.1.4.2. pontban ismertetett vizsgálati eljárást teljes egészében végre lehessen hajtani.

A tárgylemezeket az EURL-AP által meghatározott és a honlapján közzétett szabványművelési eljárásokat követve a megfelelő beágyazószerezrel kell beágyazni. A tárgylemezeket fedőlemezekkel le kell fedni.

2.1.4.2. Megfigyelési eljárás állati részecskék kimutatására takarmány-alapanyagokban és összetett takarmányokban

A preparált tárgylemezt az összetett takarmányokra és a nem kizárólag hallisztból (1. ábra) vagy a kizárólag hallisztból álló (2. ábra) takarmány-alapanyagokra vonatkozóan előírt megfigyelési eljárással összhangban kell megvizsgálni.

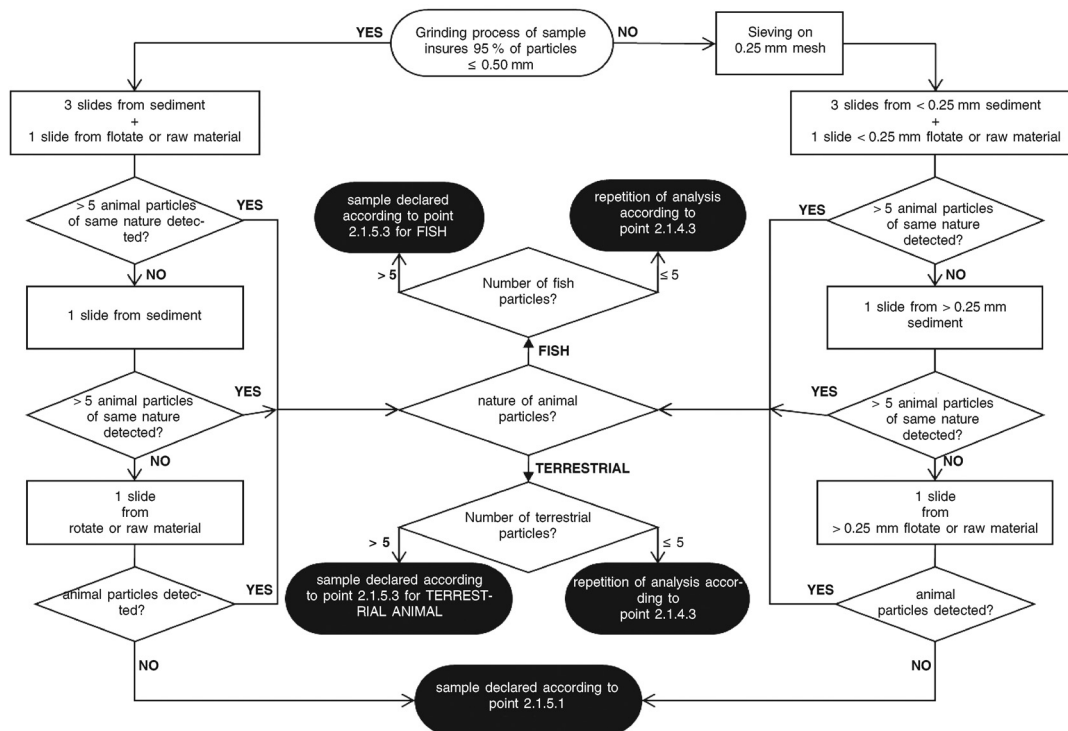
Az üledék és a laboratóriumi munkatárs döntésétől függően a flotátum vagy a nyersanyag mikroszkópos vizsgálatát összetett mikroszkóppal kell elvégezni. A durva frakciók megfigyelésekor az összetett mikroszkóp mellett sztereomikroszkóp is használható. Minden tárgylemezt többféle nagyítással kell teljes egészében megvizsgálni.

A megfigyelési eljárás minden szakaszában szigorúan be kell tartani a tárgylemezek megfigyelésre előírt minimális számát, kivéve, ha a frakció teljes mérete nem teszi lehetővé a megadott szám teljesítését. Meghatározásonként legfeljebb 6 tárgylemezt kell megvizsgálni.

A részecskék tulajdonságainak és eredetének meghatározását megkönnyítendő a laboratóriumi munkatárs alkalmazhat segédeszközöket, például döntéstámogató rendszereket, képkönyvtárakat és referenciamintákat.

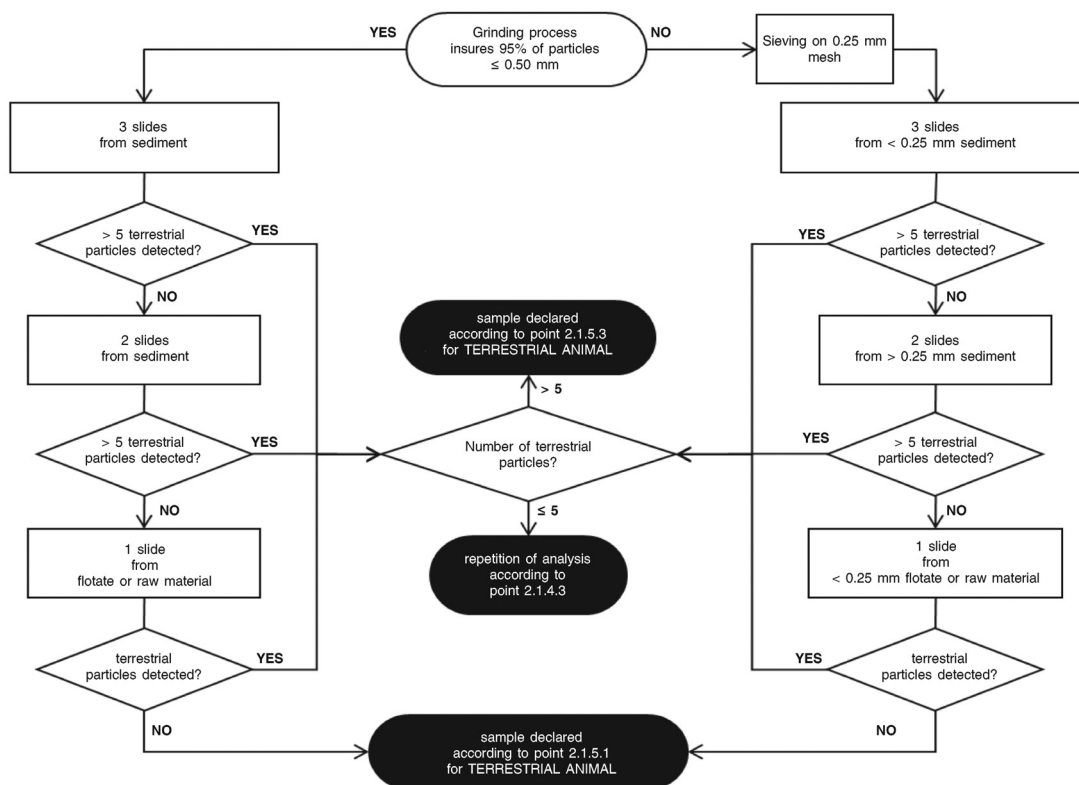
▼ **M2**

1 ábra

Megfigyelési eljárás állati részecskék kimutatására összetett takarmányokban és nem hallisztból álló takarmány-alapanyagokban

▼ **M2**

2 ábra

Megfigyelési eljárás állati részecskék kimutatására hallisztben

▼ **M2**

2.1.4.3. Meghatározások száma

Ha az 1. vagy 2. ábra szerinti megfigyelési eljárásnak megfelelően végzett első meghatározás nem mutatta ki egy adott (szárazföldi állatokból vagy halból származó) állati részecske jelenlétét, további meghatározásra nincs szükség, és az elemzés eredményét a 2.1.5.1. pont szerinti terminológiát alkalmazva jelenteni kell.

Ha az 1. vagy 2. ábra szerinti megfigyelési eljárásnak megfelelően végzett első meghatározás egy adott (szárazföldi állatokból vagy halból származó) állati részecskéből 1–5-ig terjedő mennyiséget mutat ki, egy második meghatározást kell végezni egy újabb, 50 g-os részmintán. Ha a második meghatározás egy adott állati részecskéből 1–5-ig terjedő mennyiséget mutatott ki, az elemzés eredményét jelenteni kell a 2.1.5.2. pont szerinti terminológia alkalmazásával, ellenkező esetben még egy harmadik meghatározást is el kell végezni egy újabb, 50 g-os részmintán. Ugyanakkor, ha az első és a második meghatározás egy adott állati részecskéből 15-nél többet mutatott ki, nincs szükség további meghatározásra, és az elemzés eredményét közvetlenül jelenteni kell a 2.1.5.3. pont szerinti terminológia alapján. Ha a harmadik meghatározás egy adott állati részecskéből 15-nél többet mutatott ki, az elemzés eredményéről jelentést kell készíteni a 2.1.5.3. pontban szereplő terminológia szerint. Egyéb esetben az elemzés eredményét jelenteni kell a 2.1.5.2. pontban meghatározott terminológia alapján.

Ha az 1. vagy 2. ábra szerinti megfigyelési eljárásnak megfelelően végzett első meghatározás egy adott (szárazföldi állatokból vagy halból származó) állati részecskéből 5-nél többet mutatott ki, az elemzés eredményéről jelentést kell készíteni a 2.1.5.3. pontban meghatározott terminológiát használva.

2.1.5. *Az eredmények közlése*

A laboratórium az eredmények jelentésekor megadja a vizsgált anyagok típusát (üledék, flotátum, nyersanyag) és az elvégzett meghatározások számát.

A laboratóriumi jelentésnek tartalmaznia kell legalább a szárazföldi állatokból és a halból származó alkotóelemek jelenlétére vonatkozó információt.

A különböző eseteket a következő módon kell jelenteni:

2.1.5.1. A meghatározás nem mutatott ki adott állati részecskét:

— a beküldött mintában fénymikroszkópos vizsgálat alapján, szárazföldi állatokból származó részecske nem volt kimutatható,

— a beküldött mintában fénymikroszkópos vizsgálat alapján, halból származó alkotóelem nem volt kimutatható,

2.1.5.2. A meghatározás egy adott állati részecskéből átlagosan 1–5-öt mutatott ki:

— a beküldött mintában fénymikroszkópos vizsgálat alapján meghatározásonként átlagosan legfeljebb 5, szárazföldi állatokból származó részecske volt kimutatható. Az alábbi részecskék kerültek azonosításra: ... [csont, porc, izom, szőr, szaru...] Az állati részecskéknek a mikroszkópos módszer kimutatási határértéke alatti jelenléte miatt a téves pozitív eredmény nem zárható ki.

▼ **M2**

Illetve, adott esetben:

- a beküldött mintában fénymikroszkópos vizsgálat alapján meghatározásonként átlagosan legfeljebb 5, halból származó részecske volt kimutatható. Az alábbi részecskék kerültek azonosításra: ... [halcsont, halpikkely, porc, izom, hallókö (otolith), kopolyú...] A halból származó részecskéknek a mikroszkópos módszer kimutatási határértéke alatti jelenléte miatt a téves pozitív eredmény nem zárható ki.

Előszitált minta esetén a laboratóriumi jelentés tartalmazza, hogy mely frakcióban (átszitált frakció, pelletált frakció vagy magvak) mutattak ki ezidáig állati részecskéket, mivel a kizárólag az átszitált frakcióban kimutatott állati részecskék jelenléte környezeti szennyezésre utalhat.

2.1.5.3. A meghatározás egy adott állati részecskéből átlagosan 5-nél többet mutatott ki

- a beküldött mintában fénymikroszkópos vizsgálat alapján meghatározásonként nem volt kimutatható 5-nél több szárazföldi állatokból származó részecske. Az alábbi részecskéket azonosították: ... [csont, porc, izom, szőr, szaru...]

Illetve, adott esetben:

- a beküldött mintában fénymikroszkópos vizsgálat alapján meghatározásonként 5-nél több, halból származó részecskét mutattak ki. Az alábbi részecskéket azonosították: ... [halcsont, halpikkely, porc, izom, hallókö (otolith), kopolyú...]

A minta előszitálása esetén a laboratóriumi jelentés tartalmazza, hogy melyik frakcióban (átszitált frakció, pelletált frakció vagy magvak) mutattak ki ezidáig állati részecskéket, mivel a kizárólag az átszitált frakcióban kimutatott állati részecskék jelenléte környezeti szennyezésre utalhat.

2.2. **PCR**

2.2.1. *A módszer alapelve*

A takarmány-alapanyagokban vagy az összetett takarmányokban előforduló állati eredetű dezoxiribonukleinsav- (DNS-) fragmentumok jelenlétét a PCR-módszerrel végzett genetikai amplifikációs technika révén mutatják ki, meghatározott fajspecifikus DNS-szakaszok kiválasztásával

A PCR-módszer első lépése a DNS-extrakció. Az így kapott DNS-kivonat egy amplifikációs eljárással alkalmassá válik a vizsgálandó állatfaj jelenlétének kimutatására.

2.2.2. *Reagensok és eszközök*

2.2.2.1. *Reagensok*

2.2.2.1.1. *Reagensok a DNS-extrakció szakaszában*

Kizárólag az EURL-AP által jóváhagyott és a honlapján közzétett reagensok használhatók.

2.2.2.1.2. *Reagensok a génamplifikáció szakaszában*

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Primerek és próbák

Kizárólag az EURL-AP által validált oligonukleotid szekvenciákat tartalmazó primerek és próbák használhatók ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Kizárólag olyan Master Mix oldatok használhatóak, amelyek nem tartalmaznak állati eredetű DNS komponenseket, melyek hibás mérési eredményhez vezetnek ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Dekontaminációs reagens

2.2.2.1.2.3.1. Sósavoldat (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Nátriumhipoklorit-oldat, 0,15 % aktív klór

2.2.2.1.2.3.3. Nem korrozív reagens nagy értékű eszközök, például analitikai mérlegek fertőtlenítéséhez (pl. az MP Biomedicals által gyártott DNA EraseTM)

2.2.2.2. Felszerelés

2.2.2.2.1. 0,001 g pontosságú analitikai mérleg

2.2.2.2.2. Örlőeszközök

2.2.2.2.3. Valós idejű PCR-t lehetővé tevő termocykler

2.2.2.2.4. Mikrocentrifuga mikrofugacsövekhez

2.2.2.2.5. 1 µl–1 000 µl pipettázására alkalmas mikropipetta-készlet

2.2.2.2.6. Standard molekuláris biológiai műanyag edények, mikrofugacsövek, szűrős műanyag hegy mikropipettához, lemezek a termocyklerhez

2.2.2.2.7. Fagyasztószekrény a minták és reagensok tárolására

2.2.3. *Mintavételezés és minta-előkészítés*

2.2.3.1. Mintavétel

Az azonosításra az I. mellékletben megállapított rendelkezések szerint vett reprezentatív mintát kell használni.

2.2.3.2. Minta-előkészítés

A DNS-extrakcióra szolgáló laboratóriumi minták készítése során figyelembe kell venni a II. mellékletben meghatározott követelményeket. A mintából elemzés céljára legalább 50 g részmintát kell venni, majd megőrölni.

Az ISO 24276 szabványban meghatározottak értelmében a minta-előkészítést más helyiségben kell elvégezni, mint a DNS-extrakciót és a génamplifikációt.

Két, egyenként legalább 100 mg vizsgálati mennyiséget kell előkészíteni.

2.2.4. *DNS-extrakció*

A DNS-extrakciót minden egyes elkészített vizsgálati mintán az EURL-AP által meghatározott és a honlapján közzétett szabványműveleti eljárásokat (SOP) alkalmazva kell elvégezni.

Az ISO 24276 szabvány értelmében minden extrakciós sorozathoz két extrakciós kontrollt kell készíteni:

— egy extrakciós vakpróbát,

— egy pozitív DNS-extrakciós kontrollt.

⁽¹⁾ Az EURL-AP honlapján megtalálható a vizsgálat által megcélzott állatfajokhoz használandó primerek és próbák jegyzéke.

⁽²⁾ A célnak megfelelő Master Mix oldatok megtalálhatók az EURL-AP honlapján.

▼ **M2**2.2.5. *Genetikai amplifikáció*

A genetikai amplifikációt a meghatározni kívánt egyes fajokra vonatkozóan validált módszerek alkalmazásával kell végezni. Ezeket a módszereket az EURL-AP által meghatározott és a honlapján közzétett szabványműveleti eljárások állapítják meg. Az inhibíció felmérése érdekében a DNS-kivonatokat legalább két különböző hígításban szükséges vizsgálni.

Az ISO 24276 szabvány értelmében minden célállatfajra vonatkozóan két amplifikációs kontrollt kell előkészíteni:

- egy pozitív DNS-kontrollt minden lemezhez vagy PCR vizsgálati sorozathoz,
- egy nontemplát kontrollt (más néven templátmentes kontrollt) minden lemezhez vagy PCR vizsgálati sorozathoz

2.2.6. *Az eredmények értékelése és közlése*

– A laboratóriumnak az eredmények közlésekor meg kell jelölnie legalább a felhasznált vizsgálati minta súlyát, az alkalmazott kivonási technikát, az elvégzett meghatározások számát és a módszer kimutatási határértékét.

Ha negatív templátmentes kontroll mellett a pozitív DNS-extrakciós kontroll és a pozitív DNS-kontroll nem ad pozitív eredményt a vizsgált célra vonatkozóan, az eredményeket nem kell értékelni és közölni.

Ha a két párhuzamos vizsgálat eredménye nem egyezik, legalább a génamplifikációs lépést meg kell ismételni. Amennyiben a laboratórium azt feltételezi, hogy az ellentmondások a DNS-kivonatokból adódnak, az eredmények értékelését megelőzően újabb DNS-extrakciót, majd ezt követően génamplifikációt kell végezni.

Az EURL-AP által meghatározott és a honlapján közzétett szabványműveleti eljárások (SOP) értelmében az eredmények végső közlésének két párhuzamos mérés együttes értékelésén kell alapulnia.

2.2.6.1. *Negatív eredmény*

A negatív eredményt a következők szerint kell közölni:

A vizsgálatra beküldött mintában nem volt kimutatható X-ből származó DNS (X alatt a vizsgálat által megcélzott állatfaj vagy fajcsoport értendő).

2.2.6.2. *Pozitív eredmény*

A pozitív eredményt a következők szerint kell közölni:

A vizsgálatra beküldött mintában X-ből származó DNS volt kimutatható (X alatt a vizsgálat által megcélzott állatfaj vagy fajcsoport értendő).

▼B*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 ►C1 a takarmánykeverék ◄ kilogrammonkénti, nitrogénnel korrigált, metabolizálható energiájával (ME) kell kifejezni, megajoule (MJ) mértékegységben:

$$\text{ME (MJ/kg)} = 0,1551 \times \text{nyersfehérje \%} + 0,3431 \times \text{nyers zsír \%} + 0,1669 \times \text{keményítő \%} + 0,1301 \times \text{összes cukor \% (szacharózból kifejezve)}$$

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

►C1 A takarmánykeverék ◄ 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 diklórmétánnal, ioncserélő kromatográfiás módszerrel derítjük, majd ismét diklórmétánnal kezeljük. A metil-benzokvát-tartalom meghatározását fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) és UV-detektor alkalmazásával végezzük.

3. **Reagensok**

3.1. Diklórmétán

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 (ρ₂₀ 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-metoxikarbonil-4-kvinolon)

▼B**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, C₁₈, 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 rázógéppben (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 diklórmétánt (3.1.) a töltéshez, és rázzuk egy percen keresztül. Hagyjuk a rétegeket elválni egymástól, és az alsó réteget (a diklórmétánt) eresszük bele egy 500 ml-es gömblombikba. Ismételjük meg a

▼B

vizes fázis extrakcióját még kétszer, további 40–40 ml diklórmétánnal, majd vegyítsük az első kivonattal a gömblobbikban. A rotációs, vékonyfilmes bepárlókészüléken (4.2.) csökkentett nyomáson, 40 °C hőmérsékleten teljes száradásig pároljuk be a diklórmétán-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 leszivároгjon a gyanta felszínén.

5.4.2. Oszlopkromatográfia

Az (5.3.) pontban készített mintakivonatot pipetázzuk óvatosan az oszlop tetejére. A gömblobbikot 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 gömblobbikban.

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 gömblobbikba. Ismételjük meg a vizes fázis extrakcióját még kétszer, további 70–70 ml diklórmétánnal, és ezen kivonatokot öntsük össze a gömblobbikban 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 szűrjünk 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 útmutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak:

— folyadékkromatográfiás oszlop (4.4.1.),

— HPLC mozgófázis: metil-alkohol és víz keveréke (3.3.),

— átlámlási sebesség: 1–1,5 ml/perc,

— kimutatási hullámhossz: 265 nm,

— befecskendezett mennyiség: 20–50 µl.

▼B

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 retenciósidők 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 ordinátengelyen, 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 analízált anyag azonosítását párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektorral lehet megerősíteni, amely során a mintakivonatot és a 10,0 µg/ml metil-benzokvátot tartalmazó kalibrálóoldatot (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 $\pm 10\%$ -án 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

- b) 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;
- c) 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. Ismételhetőség

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
Középérték [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Visszanyerés [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = nem kimutatható

s_r = az ismételhetőség szórása

CV_r = az ismételhetőség relatív szórása, %

s_R = a reprodukálhatóság szórása

CV_R = a reprodukálhatóság relatív szórása, %

B. AZ OLAQUINDOX MEGHATÁROZÁSA

(2-[N-2'-(hidroxietil)karbamoil]-3-metilkinoxalin- N^1,N^4 -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 olaquinox-tartalmat fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzuk meg, UV-detektor segítségével.

▼B**3. Reagensz**

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-N¹,N⁴-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 közbelső 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 közbelső 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, 5,07,5 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 rázógé

4.3. HPLC-berendezés, változtatható hullámhosszú ultraibolya-detektorral vagy diódasugaras detektorral.

4.3.1. Folyadékkromatográfiás oszlop, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 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 használjunk.

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

▼B

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 mennyiség: 20–50 µl.

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 retenciós idők 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 µg/ml-ben, a kalibrációs görbe alapján (5.3.2.).

A minta w olaquinoxtartalmát mg/kg egységben a következő képlet adja meg:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

▼B

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) 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 $\pm 2 \text{ nm}$.
- b) 220 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) 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 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. Ismételhetőség

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség 10 és 200 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.

▼B**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 ismételhetőség szórása
S_R = a reprodukálhatóság szórása
CV_r = az ismételhetőség 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. Reagensok

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.) jelleg 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.) jelleg, és keverjük össze.

▼B

- 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 µm-es membránszűrőn (4.3.) és gázmentesítjük 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 µg/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 µg/ml

Pipetázunk 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 µg/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 µl mennyiség befecskendezésére alkalmas befecskendező rendszerrel

- 4.1.1. 125 mm × 4 mm méretű, kationcserélő Nucleosil 10 SA folyadékkromatográfiás oszlop, 5 vagy 10 µm-es töltettel, vagy ezzel egyenértékű berendezés

- 4.1.2. Változtatható hullámhosszon mérő UV-detektor vagy diódasoros detektor

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

- 4.3. 0,22 µm-es membránszűrő

- 4.4. Ultrahangos fürdő

- 4.5. Mechanikus rázógépet vagy mágneses keverőt

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.

▼B**5.1.2 Visszanyerési próba**

A mintában találhatóval közel azonos mennyiségű ampróliummal dúsított takarmányvakminta analízisével végezzünk 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 hozzáadásos 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 oldószerrel (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 oldószerrel (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.

Folyadékkromatográfiás

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 mennyiség:	100 µl.

▼B

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 retenciók 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 analízált 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 tűréshatáron belül azonosnak kell lennie. A diódasoros detektoroknál ez a tűréshatár jellemzően ± 2 nm.

▼B

- 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. *Ismételhetőség*

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

▼B**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 abszorbanca 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. Reagensek

- 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, $c = 0,01$ mól/l, $pH = 6,0$.
- Oldjunk fel 0,82 g nátrium-acetátot (3.7.) 700 ml vízben (3.8.), és állítsuk be a pH -t 6,0 ra ecetsavval (3.6.). Öntsük át egy 1 000 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig vízzel (3.8.), és keverjük össze.
- 3.10. Mozgófázis a HPLC-hez:
- Keverjünk össze 825 ml acetát pufferoldatot (3.9.) 175 ml acetonitrillel (3.2.).
- Szűrjük át egy 0,22 μm -es szűrőn (4.5.), és gázmentesítsük az oldatot (pl. 10 percig tartó ultrahangos kezeléssel).

▼B

3.11. Standard anyag

Tiszta karbadox: Metil 3-(2-kinoxalin-2-ilmetilén)karbazát N¹,N⁴-dioxid, E 850.

3.11.1. Karbadox standard törzsoldat, 100 µg/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 jelleg 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 jelleg 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 µg/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 µg/ml-nél alacsonyabb koncentrációjú kalibrálóoldatokat kell készíteni.

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

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

4. Eszközök

4.1. Laboratóriumi rázógép vagy mágneses keverő.

4.2. Üvegszálas 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 üveggyapot dugót a cső alsó végébe és egy üvegpalccal tömködjük le.

4.4. HPLC-berendezés 20 µl mennyiség befecskendezésére alkalmas befecskendező rendszerrel

4.4.1. Folyadékkromatográfias oszlop: C₁₈, 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

▼B**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. Párooljuk 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 üvegszálalás 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 üvegszálalás szűrőpapíron (4.2.).

A szűrlet egy aliquot részét pipetázzuk 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

▼B

a mintát ultrahanggal (4.7.) 15 percig, majd ezt követően rázassuk vagy keverjük (4.1.) 15 percig. Szűrjük át az oldatot üvegszálás 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 üvegoszlopra (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 útmutatásként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, feltéve, hogy ezzel egyenértékű eredményt adnak:

Folyadékkromatográfiás

oszlop (4.4.1): 300 mm × 4 mm, C₁₈, 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 mennyiség: 20 µl.

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 ordinát tengelyen, a hozzájuk tartozó, µg/ml-ben kifejezett koncentrációkat pedig az abszcissza-tengelyen 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).

▼B**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*₁ = 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*₂ = 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 analizált 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

- 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 analizált 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

▼B

	Előkeverékek				Készítmények		
	A	B	C	D	A	B	C
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 MEGFELELESI 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

▼B**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

▼B**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

▼B**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