31998L0064

L 257/14 *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* 1998.9.19.

A BIZOTTSÁG 98/64/EK IRÁNYELVE

(1998. szeptember 3.)

a takarmányokban lévő aminosavak, nyersolajok és zsírok, valamint az olaquindox meghatározására szolgáló közösségi analitikai módszerek létrehozásáról és a 71/393/EGK irányelv módosításáról

(EGT vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

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

mivel a 70/373/EGK irányelv előírja, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzését, amelynek célja a takarmányok minőségére és összetételére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezésekből eredő követelmények betartásának ellenőrzése, közösségi mintavételi és analitikai módszerek alkalmazásával kell végrehajtani;

mivel a legutóbb a 97/47/EK bizottsági irányelvvel [2] módosított, az összetett takarmányok forgalmazásáról szóló, 1979. április 2-i 79/373/EGK tanácsi irányelv [3], valamint a legutóbb a 96/25/EK irányelvvel [4] módosított, a különleges táplálkozási célokra szánt takarmányokról szóló, 1993. szeptember 13-i 93/74/EGK tanácsi irányelv [5] kimondja, hogy az aminosavakat, valamint a nyersolajokat és zsírokat fel kell tüntetni a takarmányok címkéjén;

mivel a legutóbb a 98/19/EK bizottsági irányelvvel [6] módosított, a takarmány-adalékanyagokról szóló, 1970. november 23-i 70/524/EGK tanácsi irányelv [7] kimondja, hogy az olaquindox-tartalmat jelezni kell a címkén, ha ezt az anyagot összetett takarmányokhoz adják hozzá;

mivel a legutóbb a 84/4/EGK bizottsági irányelvvel [8] módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról szóló, 1971. november 18-i 71/393/EGK bizottsági irányelv [9] meghatároz analitikai módszereket, többek között a nyersolajok és zsírok meghatározására; mivel helyénvaló a leírt módszer módosítása;

mivel ezen anyagok ellenőrzésére közösségi analitikai módszereket kell meghatározni;

mivel az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok aminosav-, nyersolaj- és zsír-, valamint olaquindox-tartalmára vonatkozó, hatósági ellenőrzés céljából végzett analitikai vizsgálatokat a mellékletben meghatározott módszerek alkalmazásával kell végrehajtani.

2. cikk

A 71/393/EGK bizottsági irányelv mellékletének „4. Nyersolajok és zsírok meghatározása” pontja helyébe ezen irányelv mellékletének B. része lép.

3. cikk

(1) A tagállamok 1998. december 31-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti vagy közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Az intézkedéseket 1999. január 1-jétől alkalmazzák.

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

[1] HL L 170., 1970.8.3., 2. o.
[2] HL L 211., 1997.8.5., 45. o.
[3] HL L 86., 1979.4.6., 30. o.
[4] HL L 125., 1996.5.23., 35. o.
[5] HL L 237., 1993.9.22., 23. o.
[6] HL L 96., 1998.3.28., 39. o.
[7] HL L 270., 1970.12.14., 1. o.
[8] HL L 15., 1984.1.18., 28. o.
[9] HL L 279., 1971.12.20., 7. o.

(2) A tagállamok közlik a Bizottsággal nemzeti joguknak azokat a főbb rendelkezéseit, amelyeket az ezen irányelv által szabályozott területen fogadnak el.

4. cikk

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

5. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1998. szeptember 3-án.

a Bizottság részéről

Franz FISCHLER

a Bizottság tagja

MELLÉKLET

A. RÉSZ

AZ AMINOSAVAK MEGHATÁROZÁSA

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer a takarmányok szabad (szintetikus és természetes) és összes (peptidhez kötött és szabad) aminosav tartalmának meghatározására szolgál, amihez aminosav analizátort használunk. A módszer a következő aminosavakra alkalmazható: cisztein, metionin, lizin, threonin, 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 hidroxi analógjainak meghatározására.

2. **Vizsgálati alapelv**

2.1. *Szabad aminosavak*

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

2.2. *Összes aminosav*

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

Az oxidálást 0 °C-on végezzük perhangyasav/fenol keverékével. A oxidálószer-felesleget nátrium-diszulfittal bontjuk le. Az oxidált vagy oxidálatlan mintát sósavval (k = 6 mol/l) 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. **Reagensek**

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

3.1. Hidrogénperoxid, w = 30 %.

3.2. Hangyasav, w = 98–100 %.

3.3. Fenol.

3.4. Nátrium-diszulfit.

3.5. Nátrium-hidroxid

3.6. 5-Szulfoszalicilsav-dihidrát.

3.7. Sósav, sűrűsége körülbelül 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 tartománya 40–60 °C.

3.13. Norleucin vagy más olyan vegyület, amely belső standardként használható.

3.14. Nitrogén gáz (< 10 ppm oxigén).

3.15. 1-Oktanol.

3.16. Aminosavak.

3.16.1. Az (1) bekezdésben felsorolt standard anyagok. Tiszta vegyületek, nem tartalmaznak kristályvizet. Felhasználás előtt szárítsuk vákuum alatt P_2O_5 vagy H_2SO_4 felett 1 hétig.

3.16.2. Ciszteinsav.

3.16.3. Metionin-szulfon.

3.17. Nátrium-hidroxid-oldat, k = 7,5 mol/l:

Oldjunk fel 300 g NaOH-t (3.5.) vízben, és töltsük fel 1 literre.

3.18. Nátrium-hidroxid-oldat, k = 1 mol/l:

Oldjunk fel 40 g NaOH-t (3.5.) vízben, és töltsük fel 1 literre.

3.19. Hangyasav-fenol oldat:

Keverjünk össze 889 g hangyasavat (3.2.) 111 g vízzel, és adjunk hozzá 4,73 g fenolt (3.3.).

3.20. Hidrolízis keverék, k = 6 mol HCl/l, amely 1 g fenol/l-t tartalmaz:

Adjunk 1 g fenolt (3.3.) 492 ml HCl-hez (3.7.), és töltsük fel 1 literre.

3.21. Extraháló keverék, k = 0,1 mol HCl/l, ami 2 % tiodiglikolt tartalmaz:

Vegyünk 8,2 ml HCl-t (3.7.), hígítsuk fel körülbelül 900 ml vízzel, adjunk hozzá 20 ml tiodiglikolt (3.9.), és töltsük fel 1 literre vízzel (a [3.7.]-et ne keverjük közvetlenül a [3.9.]-cel).

3.22. 5-Szulfoszalicilsav, β = 6 %:

Oldjunk fel 60 g 5-szulfoszalicilsavat (3.6.) vízben, és töltsük fel 1 literre vízzel.

3.23. Oxidációs keverék (perhangyasav-fenol):

Keverjünk össze 0,5 ml hidrogénperoxidot (3.1.) 4,5 ml hangyasav-fenol oldattal (3.19.) egy kis főzőpohárban. Inkubáljuk 20–30 °C-on 1 órán keresztül, hogy perhangyasav keletkezzen, aztán hűtsük jeges vízfürdőben (15 perc), mielőtt hozzáadjuk a mintához.

Vigyázat:
kerüljük el a bőrrel való érintkezést, és viseljünk védőruházatot.

3.24. Citrát-puffer, k = 0,2 mol 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.) körülbelül 800 ml vízben. Állítsuk be a pH-t 2,20-re. Töltsük fel 1 literre vízzel.

3.25. Eluciós pufferek, az alkalmazott analizátornak megfelelő (4.9.) feltételek szerint elkészítve.

3.26. Ninhidrin reagens, az alkalmazott analizátornak megfelelő (4.9.) feltételek szerint elkészítve.

3.27. Aminosavak standard oldatai. Ezeket az oldatokat 5 °C alatt kell tárolni.

3.27.1. Aminosavak standard törzsoldatai (3.16.1.). Mindegyik esetében k = 2,5 μmol/ml sósavban. Kereskedelmi úton beszerezhetők.

3.27.2. Ciszteinsav és metionin-szulfon standard törzsoldata, k = 1,25 μmol/ml.

Oldjunk fel 0,2115 g ciszteinsavat (3.16.2.) és 0,2265 g metionin-szulfont (3.16.3.) citrát-pufferben (3.24.) egy 1 literes mérőlombikban, és töltsük fel jelig citrát-pufferrel. 5 °C alatt tároljuk 12 hónapnál nem hosszabb ideig. Ezt az oldatot nem használjuk, ha a standard oldat törzsoldata (3.27.1.) ciszteinsavat és metionin-szulfont tartalmaz.

3.27.3. A belső standard (pl. norleucin) standard törzsoldata, k = 20 μmol/ml.

Oldjunk fel 0,6560 g norleucint (3.13.) citrát-pufferben (3.24.) egy mérőlombikban, és töltsük fel 250 ml-re citrát-pufferrel. 5 °C alatt tároljuk 6 hónapnál nem hosszabb ideig.

3.27.4. Aminosavak standard kalibrálóoldata hidrolizátumokkal történő felhasználásra, k = 5 nmol/50 μl ciszteinsav és metionin-szulfon, és k = 10 nmol/50 μl egyéb aminosavak.

Oldjunk fel 2,2 g nátrium-kloridot (3.10.) egy 100 ml-es főzőpohárban 30 ml citrát-pufferrel (3.24.). Adjunk hozzá 4,00 ml aminosav standard törzsoldatot (3.27.1.), 4,00 ml ciszteinsav és metionin-szulfon standard törzsoldatot (3.27.2.), és 0,50 ml belső standard törzsoldatot (3.27.3.), ha egyáltalán használunk. A pH-t nátrium-hidroxiddal (3.18.) állítsuk be 2,20-ra.

A teljes mennyiséget vigyük át egy 50 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig citrát-pufferrel (3.24.), és keverjük össze.

5 °C alatt tároljuk 3 hónapnál nem hosszabb ideig.

Lásd még Észrevételeket 9.1. pont.

3.27.5. Standard aminosavak kalibrálóoldata az 5.3.3.1. bekezdés szerint készített hidrolizátumokkal, valamint a kivonatokkal (5.2.) történő felhasználásra. A kalibrálóoldat a 3.27.4. szerint készül, kihagyva a nátrium-kloridot.

5 °C alatt tároljuk 3 hónapnál nem hosszabb ideig.

4. **Eszközök**

4.1. 100 vagy 250 ml-es, visszafolyós hűtővel ellátott gömblombik.

4.2. Csavaros tetejű, gumi/teflon béléses 100 ml-es boroszilikát üveglombik (pl. Duran, Schott) kemencében történő felhasználásra.

4.3. Intenzív szellőztetésű kemence és egy ± 2 %-nál nagyobb pontosságú hőmérséklet-szabályozó.

4.4. pH-mérő (három tizedeshellyel).

4.5. Membrán szűrő (0,2 μm).

4.6. Centrifuga.

4.7. Rotációs, vákuumos bepárló.

4.8. Mechanikus rázógép vagy mágneses keverő.

4.9. Aminosav analizátor vagy HPLC berendezés ioncserélő oszloppal, készülék ninhidrinhez, utókolonnás derivatizáláshoz és fotometriás detektor.

A kolonna szulfonált polisztirol gyantával van töltve, ami képes az aminosavak egymástól és más ninhidrin-pozitív anyagoktól való elválasztására. A puffer és ninhidrin vonal áramlását ± 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 mol/l, és amelyek tartalmazzák az oxidációs lépés valamennyi hangyasav maradékát. 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 átmenjen egy 0,5 mm-es szitán. A magas nedvességtartalmú mintákat vagy levegőn szárítjuk legfeljebb 50 °C-os hőmérsékleten, vagy fagyasztással szárítjuk őrlés előtt. A magas zsírtartalmú mintákat petroléterrel (3.12.) kell extrahálni őrlés előtt.

5.2. A szabad aminosavak meghatározása takarmányokban és előkeverékekben

Az előkészített mintából (5.1.) megfelelő mennyiséget (1–5 g) mérjünk 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 pipettázzunk 10,0 ml-t egy 100 ml-es főzőpohárba.

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

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

A 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 meghatározás*

5.3.1. Oxidáció

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

– egy 100 ml-es gömblombikba (4.1.) nyitott hidrolízishez (5.3.2.3.), vagy

– egy 250 ml-es gömblombikba (4.1.), ha alacsony nátriumkoncentrációra van szükség (5.3.3.1.), vagy

– egy csavaros tetejű 100 ml-es palackba (4.2.), (zárt hidrolízishez 5.3.2.4.).

A mintából bemért adagnak 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 magába foglaló lombikot/palackot, tegyük a lezárt tartályt tartalmazó jeges vízfürdőt 0 °C-os hűtőszekrénybe, és hagyjuk állni 16 órán keresztül. 16 óra múlva vegyük ki a hűtőszekrényből, és a feleslegben lévő oxidáló reagenst 0,84 g nátrium-diszulfit (3.4.) adagolásával bontsuk le.

Folytassuk a műveletet az 5.3.2.1. pont szerint.

5.3.2. Hidrolízis

5.3.2.1. Az oxidált minták hidrolízise

Az 5.3.1. pont szerint elkészített oxidált mintához adjunk 25 ml hidrolízis keveréket (3.20.), ügyelve arra, hogy mossuk le az edény falára és a spatulára tapadt minta-maradékot. 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

Mérjünk 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 0,2 mg pontossággal. A mintából bemért adagnak hozzávetőlegesen 10 mg nitrogéntartalommal kell rendelkeznie. Óvatosan adjunk hozzá 25 ml hidrolízis keveréket (3.20.), és keverjük őket össze. Az 5.3.2.3. vagy az 5.3.2.4. pont szerint folyassuk a műveletet.

5.3.2.3. Nyitott hidrolízis

Tegyünk 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 folyassuk a műveletet.

5.3.2.4. Zárt hidrolízis

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

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

Az 5.3.3. pont szerint folytassuk a műveletet.

5.3.3. A pH beállítása

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

5.3.3.1. Alacsony nátriumkoncentrációt igénylő 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.) csökkentsük 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.)-es nátrium-hidroxid-oldattal és végül a (3.18.)-as 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.). Alaposan keverjük össze.

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 szűrjünk át megfelelő mennyiséget egy 0,2 µm-es membránszűrőn (4.5.). A kapott tiszta oldatot vessük alá ioncserés kromatográfiának aminosav analizátor segítségével (4.9.).

Az injektálást lehet kézzel vagy automatikusan végezni. Ügyeljünk arra, hogy, ± 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.

Általában a kalibrálás gyakorisága 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 kissé változik az alkalmazott analizátor és a használt gyanta típusától függően. A választott rendszernek képesnek kell lennie arra, hogy az aminosavakat elválassza egymástól és a ninhidrin-pozitív anyagoktól. A működési tartományban a kromatográfiás rendszernek lineáris változást kell mutatnia a kolonnára felvitt aminosavak mennyiségi változásaira.

A kromatográfiás lépésnél az alábbiakban említett csúcs-völgy arányt alkalmazzuk, amikor a meghatározandó aminosavak ekvimolar-oldatát analizáljuk. Az ekvimolar-oldatnak azon aminosavak maximális mennyiségének legalább 30 %-át kell tartalmaznia, amely aminosavak pontosan mérhetők az aminosav analizátor rendszerrel (4.9.).

A threonin-szerin szétválasztásánál a kromatogramon a két egymást átfedő aminosav közül a kisebb csúcs-völgy aránya ne haladja meg a 2:10 értéket (ha csak cisztein, metionin, threonin és lyzin 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 választania a lizint a „mesterséges lizin képződményektől” és az ornitintől.

6. **Az eredmények kiszámítása**

Minden aminosavra megmérjük a minta és a standard csúcsterületét, és a aminosav g/minta kg mennyiséget kiszámítjuk.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{aminosav g/minta kg}$$

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

A = a hidrolizátum vagy a kivonat csúcsterülete

B = a kalibráló standard oldat csúcsterülete

C = a hidrolizátumban vagy a kivonatban lévő belső standard csúcsterülete

D = a belső standard, kalibráló standard oldat csúcsterülete

MW = a meghatározandó aminosav molekulatömege

E = a standard koncentrációja μmol/l-ben

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

F = 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 ciszteinként ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MW 240,30, ha MW 120,15-öt használunk [= 0,5 x 240,30]) kerül kiszámításra.

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

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

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

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

V = a végső kivonat térfogata

7. **A módszer értékelése**

A módszert nemzetközi összehasonlító vizsgálatok során ellenőrizték, amit 1990-ben végeztek négy különböző takarmány (kevert sertéstáp, brojler tápkeverék, fehérje koncentrátum, előkeverék) felhasználásával. A szélsőértékek kizárásával kapott átlagértékeket és standard szórásokat az alábbi táblázat mutatja:

Átlagértékek g/kg-ban

Referencia anyag	Aminosav			
	Threonin	Cisztein	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Brojler tápkeverék	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Fehérje koncentrátum	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 résztvevő laboratóriumok száma

7.1. *Ismételhetőség*

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

Laboratóriumon belüli szabvány szórás (S_r) g/kg

Referencia anyag	Aminosav			
	Threonin	Cisztein	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Brojler tápkeverék	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Fehérje koncentrátum	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 résztvevő laboratóriumok száma

A laboratóriumon belüli szabvány szórás (S_r) variációs koefficiense (%)

Referencia anyag	Aminosav			
	Threonin	Cisztein	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Brojler tápkeverék	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Fehérje koncentrátum	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 résztvevő laboratóriumok száma

7.2. *Reprodukálhatóság*

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

Laboratóriumok közötti szabvány szórás (S_R) g/kg-ban

Referencia anyag	Aminosav			
	Threonin	Cisztein	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Brojler tápkeverék	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Fehérje koncentrátum	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 résztvevő laboratóriumok száma

A laboratóriumok közötti szabvány szórás (S_R) variációs koefficiense (%)

Referencia anyag	Aminosav			
	Threonin	Cisztein	Metionin	Lizin
Kevert sertéstáp	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Brojler tápkeverék	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Fehérje koncentrátum	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 résztvevő laboratóriumok száma

8. **Referenciaanyagok használata**

A módszer helyes alkalmazását, lehetőség szerint, hitelesített referenciaanyagokon végzett ismételt mérésekkel kell ellenőrizni. A 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.) kalibrálóoldatainak végső koncentrációit útmutatóként kell tekinteni.

A berendezés lineáris reagálásának tartományát valamennyi aminosavra ellenőrizni kell.

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

9.2. Amennyiben nagynyomású 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.

B. RÉSZ

A NYERSOLAJOK ÉS ZSÍROK MEGHATÁROZÁSA

1. **Cél és alkalmazási terület**

Ez a módszer az állati takarmányokban lévő nyersolajok és zsírok meghatározására szolgál. Nem vonatkozik az 1966. szeptember 22-i, 136/66/EGK tanácsi rendeletben meghatározott 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 takarmányok esetében alkalmazható, kivéve azokat, amelyek a B-módszer tárgykörébe esnek.

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

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

1.3. *Az eredmények értelmezése*

Mindazon esetekben, amikor magasabb eredményt kapunk a B-eljárással, mint az A-eljárással, a B-eljárással kapott eredményt tekintsük 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.

3. **Reagensek**

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

3.2. Nátrium-szulfát, vízmentes.

3.3. Sósav, k = 3 mol HCl/l.

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

4. **Eszközök**

4.1. Extraháló készülék. 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. Extraháló tégely, petroléterben oldható anyagoktól mentes, a 4.1 pont követelményeinek megfelelő porozitással.

4.3. Szárítókemence, vagy 75 °C ± 3 °C-ra beállított vákuumkemence, vagy 100 °C ± 3 °C-ra beállított légkeveréses kemence.

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *A-módszer (lásd 8.1. pont)*

1 mg pontossággal mérjünk ki 5 g mintát, töltsük át egy extraháló tégelybe (4.2.), és fedjük be egy zsírmentes üvegvatta-tamponnal.

Tegyük az extraháló tégelyt az extraháló készülékbe (4.1.), és extraháljuk hat órán keresztül petroléterrel (3.1.). A petroléter-kivonatot egy horzsakődarabokat ([1]) tartalmazó, száraz, lemért lombikba gyűjtsük.

Pároljuk be az oldószert. A lombikot másfél órán át tartsuk a szárítókemencében (4.3.), hogy a maradékanyag megszáradjon. Hagyjuk kihűlni egy szárítóberendezésben, és mérjük meg a súlyát. Ismét szárítsuk 30 percig annak biztosítása érdekében, hogy az olajok és zsírok tömege stabilizálódjon (a tömegveszteségnek a két egymást követő mérés között 1 mg-nál kisebbnek kell lennie).

5.2. *B-módszer*

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

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

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

Tegyük a száraz maradékanyagot tartalmazó kettős szűrőpapírt egy extraháló tégelybe (4.2.), és fedjük le egy zsírmentes üvegvatta-tamponnal. Helyezzük az extraháló tégelyt egy extraháló készülékbe (4.1.), és folytassuk a műveletet az 5.1. pont második és harmadik bekezdése szerint.

([1]) Amennyiben az olajon vagy a zsíron ezt követően minőségellenőrzést végeznek, a horzsakődarabokat üveggyöngyökkel helyettesítsük.

6. **Az eredmény kifejezése**

A maradékanyag tömegét a mintára vonatkoztatva, százalékosan fejezzük ki.

7. **Ismételhetőség**

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

– 0,2 %-ot abszolút értékben, 5 %-nál alacsonyabb nyersolaj- és zsírtartalom esetében,

– 4,0 %-ot a legmagasabb eredményhez viszonyítva, 5–10 % közötti olaj- és zsírtartalom esetében,

– 0,4 %-ot abszolút értékben, 10 % feletti olaj- és zsírtartalom esetében.

8. **Észrevételek**

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

1 mg pontossággal mérjünk ki 20 g mintát, és keverjük össze 10 g vagy annál több vízmentes nátriumszulfáttal (3.2.). Extraháljuk petroléterrel (3.1.) az 5.1. pont szerint. A kapott kivonatot töltsük fel petroléterrel (3.1.) 500 ml-re, és keverjük össze. Vegyünk ki az oldatból 50 ml-t, és tegyük egy horzsakődarabokat ([1]) tartalmazó kicsi, száraz, lemért lombikba. Pároljuk be az oldószert, szárítsuk ki, és az 5.1. pont utolsó bekezdésében leírt módon folytassuk a műveletet.

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

Az olaj- és zsírtartalmat a mintára vonatkoztatva, százalékosan számítsuk ki a következő képlet segítségével:

(10 a + b) x 5

ahol:

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

b = 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 társállateledeleket vízmentes nátriumszulfáttal kell keverni a B-módszerben 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 ki kell terjeszteni néhány takarmány esetében. El kell kerülni a túlzott szárítást, mivel az alacsony eredményekhez vezethet. Mikrohullámú sütő is használható.

8.6. Az A-módszer szerinti előzetes extrahálás a hidrolízis előtt és a B-módszer szerinti ismételt extrahálás akkor javasolt, ha a nyersolaj- és zsírtartalom nagyobb, mint 15 %. Bizonyos mértékig ez a takarmány természetétől és a takarmányban lévő olaj és zsír jellegétől függ.

C. RÉSZ

AZ OLAQUINDOX MEGHATÁROZÁSA

(2-[N-2'-(hidroxietil)karbamoil]-3-metilkinoxalin-N^1,N^4-dioxid)

1. **Célkitűzés és hatály**

Ez a módszer a takarmányokban lévő olaquindox meghatározására szolgál. A meghatározás alsó határértéke 5 mg/kg.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát víz-metil-alkohol keverékével extraháljuk. Az olaquindox-tartalmat fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzuk meg, UV detektor segítségével.

([1]) Hal az olaj vagy a zsír ezt követően minőségvizsgálaton megy keresztül, a horzsakődarabokat üveggyöngyökkel helyettesítsük.

3. **Reagensek**

3.1. Metil-alkohol.

3.2. Metil-alkohol, HPLC tisztaságú.

3.3. Víz, HPLC tisztaságú.

3.4. Mozgó fázis a HPLC-hez:

Víz (3.3.)-metil-alkohol (3.2.) keveréke, 900 + 100 (V + V).

3.5. Standard anyag: tiszta olaquindox 2-[N-2'-(hidroxietil)karbamoil]-3-metilkinoxalin-N^1,N^4-dioxid, E 851.

3.5.1. Olaquindox standard törzsoldat, 250 µg/ml

0,1 mg pontossággal mérjünk be 50 mg olaquindoxot (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 hagyjuk szobahőmérsékletre hűlni, 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. Olaquindox standard közbenső oldat, 25 µg/ml

Töltsünk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.5.1.) egy 100 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig a mozgó fázissal (3.4.), és keverjük össze. Tekerjük a lombikot alumíniumfóliába, és tároljuk hűtőszekrényben. Ebből az oldatból minden nap frisset kell készíteni.

3.5.3. Kalibrálóoldatok:

Töltsünk 50 ml-es mérőlombikokba 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 és 20,0 ml standard közbenső oldatot (3.5.2.). Töltsük fel a lombikokat jelig a mozgó fázissal (3.4.), és keverjük össze a tartalmukat. Tekerjük a lombikokat alumíniumfóliába. Ezek az oldatok 0,5, 1,0, 2.5, 5,0 7,5 és 10,0 µg/ml olaquindox koncentrációnak felelnek meg.

Ezekből az oldatokból minden nap frisset kell készíteni.

4. **Eszközök**

4.1. Ultrahangos fürdő

4.2. Mechanikus rázógép

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

4.3.1. Folyadékkromatográfiás oszlop, 250 mm x 4 mm, C18, 10 µm-es vagy ezzel egyenértékű töltettel.

4.4. Membránszűrők, 0,45 µm-es.

5. **A vizsgálat módja**

Megjegyzés: Az olaquindox fényérzékeny. Valamennyi műveletet tompított fénynél végezzük, vagy borostyánszínű üvegedényeket használjunk.

5.1. *Általános rész*

5.1.1. Egy vakpróbaként használt takarmányt kell analizálni annak ellenőrzésére, hogy sem olaquindox, sem pedig interferáló anyagok nincsenek jelen.

5.1.2. Visszanyerési próbát kell végezni a vakpróbaként használt takarmány analizálásával, amit a minta olaquindox tartalmához közelítő mennyiségű olaquindox hozzáadásával dúsítunk fel. Ahhoz, hogy 50 mg/kg értékre dúsítsuk a vakpróbaként használt takarmányt, töltsünk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.5.1.) egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, és pároljuk be az oldatot kb. 0,5 ml-re. Adjunk hozzá 50 g vakpróbaként használt takarmányt, alaposan keverjük össze, és hagyjuk 10 percig állni, majd többször keverjük meg újra, mielőtt folytatjuk a műveletet az extrahálással (5.2.).

Megjegyzés: a módszer során vakpróbaként használt takarmány a mintával hasonló típusú legyen és benne olaquindox ne legyen kimutatható.

5.2. *Extrahálás*

0,01 g pontossággal mérjünk ki körülbelül 50 g mintát. Töltsük át egy 1000 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 szűrjünk át egy membránszűrőn (4.4.) (lásd Észrevételek, 9. pont). Folytassuk a műveletet a HPLC meghatározással (5.3.).

5.3. *HPLC meghatározás*

5.3.1. Paraméterek:

A következő vizsgálati feltételek iránymutatóként szolgálnak, más feltételeket is lehet alkalmazni, feltéve, hogy azok egyenértékű eredményeket adnak.

Analitikai oszlop (4.3.1.)

Mozgó fázis (3.4.): víz (3.3.)-metil-alkohol (3.2.) keveréke, 900 + 100 (V + V)

Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/perc

Észlelési hullámhossz: 380 nm

Befecskendezett térfogat: 20 µl–100 µl

Ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását 2,5 µg/ml-t tartalmazó kalibrálóoldat (3.5.3.) többszöri befecskendezésével addig, amíg a csúcsmagasságok és retenciós idők stabilakká nem válnak.

5.3.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször mindegyik kalibrációs oldatot (3.5.3.), és határozzuk meg az átlag csúcsmagasságot (terület) minden egyes koncentráció esetében. Vegyük a kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibrálóoldatok átlagos csúcsmagasságait (területeit) az ordinátán, a megfelelő koncentrációkat µg/ml-ben pedig az abszcisszán ábrázoljuk.

5.3.3. Mintaoldatok

Fecskendezzük be többször a mintakivonatokat (5.2.) ugyanazzal a mennyiséggel, amelyeket a kalibrálóoldatoknál használtunk, és határozzuk meg az átlag csúcsmagasságot (területet) az olaquindox csúcsokra.

6. **Az eredmények kiszámítása**

A mintaoldat olaquindox csúcsainak átlagmagasságából (területéből) határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben, a kalibrációs görbe alapján (5.3.2.).

A minta w olaquindox-tartalmát mg/kg egységben a következő képlet adja:

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

amelyben:

c = a mintakivonat (5.2.) olaquinox-koncentrációja µg/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 µg/ml koncentrációjú kalibrálóoldat (3.5.3.) spektruma összehasonlítható.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

Egy mintakivonatot (5.2.) megfelelő mennyiségű kalibrálóoldattal (3.5.3.) dúsítunk. A hozzáadott olaquindox mennyisége közel azonos legyen a mintakivonatban található olaquindox mennyiségével.

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

7.1.2. Diódasugaras detektálás

Az eredményeket a következő kritériumok szerint értékeljük:

a) A minta és a standard spektrumának, a kromatogram csúcspontján mért legnagyobb abszorpciós hullámhossza, az észlelő rendszer felbontási képessége alapján meghatározott tűréshatáron belül meg kell, hogy egyezzen. A diódasoros detektálás esetében ez tipikusan ± 2 nm-es határon belül van.

b) 220 és 400 nm között a minta és a standard, a kromatogram csúcspontján mért spektruma nem különbözhet a spektrum olyan részeinél, amelynek relatív abszorpciója 10–100 % között van. Ez a kritérium akkor teljesül, amikor ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum közti eltérés egyetlen vizsgált ponton sem haladja meg a standard analizált anyag abszorpciójának 15 %-át.

c) 220 és 400 nm között, a mintakivonat által kiváltott görbe felszálló, csúcsponti és leszálló ágának spektrumai nem különbözhetnek egymástól, a spektrumnak olyan részeinél, melynek relatív abszorpciója 10–100 %-os. Ez a kritérium akkor teljesül, amikor ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és amikor a spektrumok közötti eltérés, az összes vizsgált ponton nem haladja meg a csúcspont abszorpciós spektrumának 15 %-át.

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

7.2. *Ismételhetőség*

Ugyanazon a mintán végzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg a 15 %-ot, a magasabb eredményhez viszonyítva a 10 és 200 mg/kg közötti olaquindox-tartalom esetében.

7.3. *Visszanyerés*

A dúsított vakpróba minta esetében a visszanyerésnek legalább 90 %-osnak kell lennie.

8. **Kollaborációs vizsgálat eredményei**

EK együttműködés keretében végeztek egy vizsgálatot, amelyben négy malactápmintát, köztük egy vakpróbaként 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 (mg/kg)	–	14,6	48,0	95,4
(S_r) (mg/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 koncentráció (mg/kg)	–	15	50	100
Kihozatal (%)	–	97,3	96,0	95,4

L : laboratóriumok száma

n : egyedi értékek száma

S_r : az ismételhetőség szórása

S_R : a reprodukálhatóság szórása

CV_r : az ismételhetőség variációs koefficiense

CV_R : a reprodukálhatóság variációs koefficiense.

9. **Észrevételek**

Bár a módszer nem lett hitelesítve a 100 mg/kg-nál több olaquindoxot 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 érje el.