31993L0117

L 329/54 *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* 1993.12.30.

A BIZOTTSÁG 93/117/EK TIZENKETTEDIK IRÁNYELVE

(1993. december 17.)

a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb a 3768/85/EGK rendelettel ([1]) módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésénél alkalmazandó közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i 70/373/EGK tanácsi irányelvre ([2]) és különösen annak 2. cikkére,

mivel 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 közösségi analitikai módszereket kell meghatározni a robenidin és metil-benzokvát adalékanyagok takarmányokban történő felhasználási feltételei betartásának ellenőrzése céljából;

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

ELFOGADTA EZT A IRÁNYELVET:

1. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok robenidin- és metil-benzokvát-tartalmának meghatározására szolgáló, hatósági ellenőrzés keretében végzett analitikai vizsgálatát, ezen irányelv mellékletében ismertetett módszerek alkalmazásával kell végrehajtani.

2. cikk

A tagállamok legkésőbb 1994. november 30-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek, és erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Amikor a tagállamok elfogadják ezen rendelkezéseket, azokban hivatkozni kell ezen irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

3. cikk

Ezen irányelv az *Európai Közösségek Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

Kelt Brüsszelben, 1993. december 17-én.

a Bizottság részéről

René STEICHEN

a Bizottság tagja

([1]) HL L 362., 1985.12.31., 8. o.
([2]) HL L 170., 1970.8.3., 2. o.

MELLÉKLET

1. **A ROBENIDIN MEGHATÁROZÁSA**

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

1. **Cél és alkalmazási terület**

A módszer a robenidin takarmányokban történő kimutatására szolgál. A meghatározás alsó méréshatára 5 mg/kg.

2. **Vizsgálati alapelv**

A mintát savanyított metil-alkohollal extraháljuk. A kivonatot szárítjuk, és egy aliquot részét alumínium-oxid oszlopon tisztítjuk. A robenidint az oszlopról metil-alkohollal eluáljuk, koncentráljuk, majd a mobil fázissal megfelelő térfogatra töltjük fel. A robenidin-tartalom meghatározását fordított fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC), UV detektor alkalmazásával végezzük.

3. **Reagensek**

3.1. *Metil-alkohol*

3.2. *Savanyított metil-alkohol*

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

3.3. *Acetonitril, HPLC minőségű*

3.4. *Molekuláris szűrő*

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

3.5. *Alumínium-oxid: I. savas aktivitású 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 tartsuk.

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 1 000 ml-es mérőlombikban, töltsük fel jelig, és keverjük el.

3.8. *HPLC mobil fázis*

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.) az oldatot, majd gázmentesítsük (például tíz perces ultrahangos kezeléssel).

3.9. *Standard anyag*

Tiszta robenidin: 1.3-bisz[4-klorobenzilidén)amino] gvanidin hidroklorid, E 750.

3.9.1. Robenidin standard törzsoldat: 300 µg/ml:

Mérjünk ki 0,1 mg-os pontossággal, 30 mg robenidin standard anyagot (3.9.). Oldjuk fel savanyított 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 standard közbenső oldat: 12 µg/ml

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

3.9.3. Kalibráló oldatok

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

4. **Eszközök**

4.1. *Üvegoszlop*

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

4.2. *Körkörös laboratóriumi rázógép*

4.3. *Rotációs, vékonyfilmes bepárló*

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

4.4.1. Folyadékkromatográfiás oszlop, 300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 µm-es töltet vagy egy ezzel egyenértékű oszlop

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

4.6. *Membránszűrők, 0,22 µm*

4.7. *Membránszűrők, 0,45 µm*

5. **A vizsgálat módja**

Megjegyzés: A robenidin fényérzékeny. Minden műveletnél borostyánüveg-eszközöket kell használni.

5.1. *Általános tudnivalók*

5.1.1. Végezzünk vakpróbát egy referenciamintán annak ellenőrzésére, hogy sem robenidin, sem interferáló anyagok nincsenek jelen.

5.1.2. A mintában találhatóval azonos mennyiségű robenidin hozzáadásával dúsított referenciaminta (5.1.1.) analízisével végezzünk visszanyerési próbát. 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 referenciamintát, keverjük el, és 10 percig várjunk, mielőtt folytatnánk a műveletet az extrakcióval (5.2.).

Megjegyzés: e módszer alkalmazásában a referenciaminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen, amelyben az analízis során robenidin nem mutatható ki.

5.2. *Extrakció*

Az előkészített mintából mérjünk ki 15 g-t, 0,01 g-os pontossággal. Tegyük egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, adjunk hozzá 100,0 ml savanyított 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 tartsuk meg a derítéshez (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. Mérjünk 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 ütögessük a megtöltött oszlop alsó végét, hogy a benne lévő alumínium-oxid leülepedjen.

5.3.2. A minta derítése

Az (5.2.) pontban előkészített mintakivonatból 5,0 ml-t pipettázzunk 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 mobil fázisban (3.8.), és öntsük át teljes mennyiségben egy 10 ml-es mérőlombikba. Többször öblítsük el a lombikot 1–2 ml mobil fázissal, és az öblítő folyadékot is öntsük bele a mérőlombikba. Töltsük fel jelig ugyanezzel az oldószerrel, majd keverjük el. Egy aliquot részt szűrjünk át egy 0,45 µm-es szűrőn (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 iránymutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, amennyiben azok ezzel egyenértékű eredményt adnak:

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.4.1.)

HPLC mobil fázis (3.8.)

Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/min

Észlelési hullámhossz: 317 nm

Befecskendezett mennyiség: 20–50 µl

A 3,6 µg/ml anyagot tartalmazó kalibráló oldat (3.9.3.) többszöri befecskendezésével ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását, míg a csúcsok magassága és a retenciós idők stabilakká nem válnak.

5.4.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibráló oldatokat (3.9.3.), majd mérjük meg az egyes koncentrációkra eső csúcsok magasságát (görbék alatti területét). A kalibrációs oldatok átlagos magassága vagy görbe alatti területe legyen az ordináta tengelyen, 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 kalibráló oldatokhoz használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatot (5.3.2.) egymás után többször, és határozzuk meg a robenidin-csúcsok átlagos magasságát (görbe alatti területét).

6. **Az eredmények kiszámítása**

A mintaoldat által kiváltott robenidin-csúcsok átlagos magasságát (görbe alatti területét) a kalibrációs görbével (5.4.2.) egybevetve, határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben.

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

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

amelyben:

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

m = a mintadarab tömege, grammban.

7. **Az eredmények validálása**

7.1. *Azonosítás*

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

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot a kalibráló oldat (3.9.3.) megfelelő mennyiségének hozzáadásával dúsítjuk. A hozzáadott robenidin mennyisége és a mintakivonatban található robenidin becsült mennyisége közel azonos legyen.

A hozzáadott mennyiség és a kivonat hígításának figyelembe vétele után csak a robenidin-csúcsnak magassága emelkedhet. A csúcs szélességének, a legnagyobb magasság felénél, az eredeti szélesség megközelítőleg 10 %-án belül kell lennie.

7.1.2. Diódasoros kimutatás

Az eredményeket az alábbi kritériumok alapján kell értékelni:

a) a minta, valamint a standard spektrumának a kromatogram csúcsán rögzített legnagyobb elnyelési hullámhossza, az észlelőrendszer felbontási képessége alapján meghatározott tűréshatáron belül meg kell egyezzen. A diódasoros észlelési módszernél ez tipikus esetben megközelítőleg 2 nm-en belül van;

b) 250 és 400 nm között a mintának, valamint a standardnak a kromatogram csúcsán rögzített spektruma, a spektrum ezen részein nem térhet el egymástól a relatív elnyelési tartomány 10 és 100 %-a között. Ezen kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a standard analizált anyag abszorpciójának 15 %-ánál nagyobb mértékben egymástól;

c) 250 és 400 nm között a mintakivonat által kiváltott görbe felszálló ága, csúcsa és leszálló ága a spektrumnak ezen a részein a relatív abszorpció 10 és 100 %-a közötti tartományban nem térhet el egymástól. Ezen kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a csúcs abszorpciós spektrumának 15 %-ánál nagyobb mértékben.

Ha ezen kritériumok közül egy nem teljesül, az analizált anyag jelentését nem sikerült megerősíteni.

7.2. *Ismételhetőség*

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

7.3. *Visszanyerés*

Dúsított referenciaminta esetén legalább 80 %-os visszanyerési arányt kell elérni.

8. **Kollaborációs vizsgálat eredményei**

A Közösség egy kollaborációs vizsgálatot szervezett, amely során őrlemény, illetve pellet formájában négy baromfi- és négy nyúltakarmány-mintát elemeztek, 12 laboratóriumban. Valamennyi mintán kettős elemzést végeztek. Az eredményeket az alábbi táblázat mutatja.

	Baromfi		Nyúl	
	Őrlemény	Pellet	Őrlemény	Pellet
Középérték mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
Sr (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CVr (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
SR (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CVR (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Visszanyerés (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

Sr = ismételhetőség szórása.
CVr = ismételhetőség változékonysági együtthatója.
SR = reprodukálhatóság szórása.
CVR = reprodukálhatóság változékonysági együtthatója.

2. A METIL-BENZOKVÁT MEGHATÁROZÁSA

7-benziloxi-6-butil-3-metoxikarbonil-4-kvinolon

1. **Cél és alkalmazási terület**

A módszer a metil-benzokvát, takarmányokban történő kimutatására szolgál. A meghatározás alsó határértéke 1 mg/kg.

2. **Vizsgálati alapelv**

A metil-benzokvátot a mintából metil-alkoholos metánszulfonsav-oldattal extraháljuk. A kivonatot diklórmetánnal, ioncserélő kromatográfiás módszerrel derítjük, majd ismét diklórmetánnal kezeljük. A metil-benzokvát-tartalom meghatározását fordított fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) és UV detektor alkalmazásával végezzük.

3. **Reagensek**

3.1. *Diklórmetán*

3.2. Metil-alkohol, HPLC minőségű

3.3. *HPLC mobil fázis*:

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 (például tíz perces ultrahangos kezeléssel).

3.4. *Metánszulfonsav-oldat*, σ = 2 %

Hígítsunk 20,0 ml metánszulfonsav-oldatot metil-alkohollal (3.2.) 1 000 ml-re.

3.5. *Sósavoldat*, σ = 10 %

Hígítsunk 100 ml sósavat (P_{20} c. 1,18 g/ml) vízzel 1000 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 hevítsük forrásig forró főzőlapon. Hagyjuk kihűlni, és öntsük le róla a savat. Vákuum mellett 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-metoxicarbonil-4-kvinolon)*

3.7.1. Metil-benzokvát standard törzsoldat, 500 μg/ml

Mérjünk ki 0,1 mg-os pontossággal, 50 mg standard anyagot (3.7.), oldjuk fel metánszulfonsav-oldattal (3.4.) egy 100 ml-es mérőlombikban, töltsük fel jelig, és keverjük el.

3.7.2. Metil-benzokvát standard közbenső oldat, 50 μg/ml

Öntsünk át 5,0 ml metil-benzokvát standard törzsoldatot (3.7.1.) egy 50 ml-es mérőlombikba, töltsük fel metil-alkohollal (3.2.) jelig, és keverjük el.

3.7.3. Kalibráló oldatok

25 ml-es mérőlombikokba adagoljunk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, illetve 5,0 ml metil-benzokvát standard közbenső oldatot (3.7.2.). A mobil fázissal (3.3.) töltsük fel jelig, és keverjük el. Ezen oldatok 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, illetve 10,0 μg/ml metil-benzokvát koncentrációnak felelnek meg. Az oldatokat használat előtt frissen kell elkészíteni.

4. **Eszközök**

4.1. *Laboratóriumi rázógép*

4.2. *Rotációs, vékonyfilmes bepárló*

4.3. *Elzárócsappal és egy megközelítőleg 200 ml-es tartállyal ellátott, 15 mm belső átmérőjű és 250 mm magas üvegoszlop*

4.4. *HPLC készülék, változtatható hullámhosszú UV detektorral vagy diódasoros detektorral*

4.4.1. Folyadékkromatográfiás oszlop: 300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 µm-es töltet, vagy egy ezzel egyenértékű oszlop

4.5. *Membránszűrők, 0,22 µm*

4.5. *Membránszűrők, 0,45 µm*

5. **A vizsgálat módja**

5.1. *Általános tudnivalók*

5.1.1. Végezzünk vakpróbát egy referenciamintán annak ellenőrzésére, hogy sem metil-benzokvát, sem interferáló anyagok nincsenek jelen.

5.1.2. A mintában találhatóval azonos mennyiségű metil-benzokvát hozzáadásával dúsított referenciaminta analízisével, végezzünk visszanyerési próbát. 15 mg/kg-os szintre történő dúsításhoz adjunk 600 ml standard törzsoldatot (3.7.1.) 20 g referenciamintához, mindezt keverjük el, majd 10 percet várjunk, mielőtt folytatnánk a műveletet az extrakcióval (5.2.).

Megjegyzés: e módszer alkalmazásában a referenciaminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen, és abban az analízis során metil-benzokvát ne legyen kimutatható.

5.2. *Extrakció*

Mérjünk ki az előkészített mintából 0,01 g pontossággal 20 g-ot, és öntsük át egy 250 ml-es Erlenmeyer lombikba. Adjunk hozzá 100,0 ml metánszulfonsav-oldatot (3.4.), és rázzuk mechanikus rázógépben (4.1.) 30 percig. Szűrjük át az oldatot szűrőpapíron, és tegyük félre a szűrletet a folyadék-folyadék elválasztáshoz (5.3.).

5.3. *Folyadék-folyadék elválasztás*

Egy 100 ml sósavoldatot (3.5.) tartalmazó 500 ml-es elválasztótölcsérbe öntsünk át 25,0 ml-t az (5.2.) lépésben nyert szűrletből. Adjunk hozzá 100 ml diklórmetánt (3.1.) a tölcsérhez, és rázzuk egy percen keresztül. Engedjük, hogy a rétegek elváljanak egymástól, és az alsó réteget (a diklórmetánt) eresszük bele egy 500 ml-es gömblombikba. Ismételjük meg a vizes fázis extrakcióját még kétszer, további 40–40 ml diklórmetánnal, majd vegyítsük az első kivonattal a gömblombikban. A rotációs, vékonyfilmes bepárlókészüléken (4.2.) csökkentett nyomás és 40 °C hőmérséklet mellett teljes száradásig pároljuk be a diklórmetán kivonatot. Oldjuk fel a maradékot 20–25 ml metil-alkoholban (3.2.), zárjuk le az üveget, és tartsuk meg az egész kivonatot az ioncserélő kromatográfiához (5.4.).

5.4. *Ioncserélő kromatográfia*

5.4.1. A kationcserélő oszlop előkészítése

Az üvegoszlop (4.3.) alsó végébe illesszünk egy kis üvegvatta 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 leszivárogjon a gyanta felszínén.

5.4.2. Oszlopkromatográfia

Az (5.3.) pontban készített mintakivonatot pipettázzuk óvatosan az oszlop tetejére. A gömblombikot két adag, 5–10 ml mennyiségű metil-alkohollal (3.2.) öblítsük, és öntsük ezen mosófolyadékot is rá az oszlopra. Futtassuk le a kivonatot a gyanta felszínén, és mossuk az oszlopot 50 ml metil-alkohollal, ügyelve arra, hogy az átfolyási sebesség ne haladja meg az 5 ml/percet. Öntsük el a szüredéket. Eluáljuk az oszlopról a metil-benzokvátot 150 ml metánszulfonsav-oldattal (3.4.), majd vegyük fel az eluátumot egy 250 ml-es gömblombikban.

5.5. *Folyadék-folyadék elválasztás*

Egy 1 literes elválasztótölcsérbe öntsük át az (5.4.2.) lépésben nyert eluátumot. Az Erlenmeyer-lombikot 5–10 ml metil-alkohollal (3.2.) öblítsük, és a mosófolyadékot öntsük össze az elválasztó tölcsér tartalmával. Adjunk hozzá 300 ml sósavoldatot (3.5.) és 130 ml diklórmetánt (3.1.). Rázzuk egy percen keresztül, és engedjük, hogy a fázisok elváljanak egymástól. Az alsó réteget (a diklórmetánt) eresszük bele egy 500 ml-es gömblombikba. Ismételjük meg a vizes fázis extrakcióját még kétszer, további 70–70 ml diklórmetánnal, és ezen kivonatokat öntsük össze a gömblombikban lévő első kivonattal.

A rotációs, vékonyfilmes bepárlókészüléken (4.2.), csökkentett nyomás és 40 °C hőmérséklet mellett teljes szárazásig pároljuk be a diklórmetán 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 egy 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 iránymutatóként szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, amennyiben azok ezzel egyenértékű eredményt adnak.

– folyadékkromatográfiás oszlop (4.4.1.),

– HPLC mobil fázis: metil-alkohol és víz keveréke (3.3.),

– átáramlási sebesség: 1–1,5 ml/min,

– észlelési hullámhossz: 265 nm,

– befecskendezett mennyiség: 20–50 µl.

A 4,0 µg/ml anyagot tartalmazó kalibráló oldat (3.7.3.) többszöri befecskendezésével ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását, míg a csúcsok magassága vagy görbe alatti területe, illetve a retenciós idők stabilakká nem válnak.

5.6.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibráló oldatokat (3.7.3.), és mérjük meg az egyes koncentrációkra eső csúcsok magasságát (görbe alatti területét). A kalibráló oldatok átlagos magassága vagy területe legyen az ordináta tengelyen, 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 kalibrációs oldatokhoz használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatot (5.5.) egymás után többször, és határozzuk meg a metilbenzokvát-csúcsok átlagos magasságát (területét).

6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat által kiváltott metil-benzokvát-csúcsok átlagos magasságát (görbe alatti területét) a kalibrációs görbével egybevetve (5.6.2.), határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben.

A minta, w (mg/kg)-ben kifejezett metilbenzokvát-tartalma a következő képlet alapján számítható ki:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

amelyben:

c = a mintaoldat metil-benzokvát-koncentrációja µg/ml-ben,

m = a minta tömege grammban.

7. Az eredmények validálása

7.1. *Azonosítás*

Az analizált anyag azonosítását párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektorral lehet megerősíteni, amely során a mintakivonat és a 10,0 µg/ml metil-benzokvátot tartalmazó kalibráló oldat (3.7.3.) spektrumát hasonlítjuk össze.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot a standard közbenső oldat (3.7.2.) megfelelő mennyiségének hozzáadásával dúsítjuk. A hozzáadott metil-benzokvát mennyiségének a mintakivonatban található metil-benzokvát becsült mennyiségével azonosnak kell lennie.

A hozzáadott mennyiség és a kivonat hígításának figyelembe vétele után csak a metilbenzokvát-csúcs magassága emelkedhet. A csúcs szélességének, a legnagyobb magasság felénél, az eredeti szélesség megközelítőleg 10 %-án belül kell lennie.

7.1.2. Diódasoros kimutatás

Az eredményeket az alábbi kritériumok alapján kell értékelni:

a) a minta, valamint a standard spektrumának, a kromatogram csúcsán rögzített legnagyobb elnyelési hullámhossza, az észlelő rendszer felbontási képessége alapján meghatározott tűréshatáron belül meg kell egyezzen. A diódasoros észlelési módszernél ez tipikus esetben megközelítőleg 2 nm-en belül van;

b) 220 és 350 nm között a mintának, valamint a standardnak a kromatogram görbe csúcsán rögzített spektruma, a spektrum ezen részein nem térhet el egymástól a relatív abszorpciós tartomány 10 és 100 %-a között. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a standard analizált anyag abszorpciójának 15 %-ánál nagyobb mértékben egymástól;

c) 220 és 350 nm között a mintakivonat által kiváltott görbe felszálló ága, csúcsa és leszálló ága, a spektrumnak ezen a részein a relatív abszorpció 10 és 100 %-a közötti tartományban nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximális értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a csúcs abszorpciós spektrumától 15 %-nál nagyobb mértékben.

Ha ezen kritériumok közül egy nem teljesül, az analizált anyag jelentétét nem sikerült megerősíteni.

7.2. *Ismételhetőség*

Két azonos mintán végzett, párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség 4–20 mg/kg metilbenzokvát-tartalom esetén, nem haladhatja meg a magasabb érték 10 %-át.

7.3. *Visszanyerés*

Dúsított referenciaminta esetében legalább 90 %-os visszanyerési arányt kell elérni.

8. **Kollaborációs vizsgálat eredményei**

Tíz laboratóriumban öt minta elemzésére került sor. Minden egyes mintán kettős elemezést végeztek.

Eredmények:

	Vak	1. liszt	1. pellet	2. liszt	2. pellet
Középérték mg/kg	n.k.	4,50	4,50	8,90	8,70
Sr (mg/kg)	–	0,30	0,20	0,60	0,50
CVr (%)	–	6,70	4,40	6,70	5,70
SR (mg/kg)	–	0,40	0,50	0,90	1,00
CVR (%)	–	8,90	11,10	10,10	11,50
Visszanyerés (%)	–	92,00	93,00	92,00	89,00

n.k. = nem kimutatható.
Sr = ismételhetőség szórása.
CVr = ismételhetőség változékonysági együtthatója.
SR = reprodukálhatóság szórása.
CVR = reprodukálhatóság változékonysági együtthatója.