

YEMLERİN RESMÎ KONTROLÜ İÇİN NUMUNE ALMA VE ANALİZ METOTLARINA DAİR YÖNETMELİĞİN 13 ÜNCÜ MADDESİNİN BİRİNCİ FIKRASINA GÖRE HAZIRLANMIŞTIR

YEM MADDELERİ VE KARMA YEMLERİN BİLEŞİMİNİN KONTROL EDİLMESİNDE KULLANILAN ANALİZ METOTLARI

A. Nem tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemdeki nem içeriğinin tayinini mümkün kılar. Yemin organik asitler gibi uçucu maddeler içermesi durumunda, önemli miktarda uçucu maddenin de nem içeriğı ile birlikte tayin edilir.

Bu metot; yem maddeleri olarak kullanılan süt ürünlerinin analizini, mineral maddelerin ve çoğunlukla mineral maddelerden oluşan karışımların analizini, hayvansal ve bitkisel yağların analizini ya da yağlı tohumlar ve yağlı meyvelerin analizini kapsamaz.

2. Prensip

Numune, yemin yapısına göre değışen, belirtilmiş koşullar altında kurutulur. Ağırlıktaki kayıp tartılarak tayin edilir. Yüksek nem içeriğine sahip katı yem söz konusu olduğunda, birincil kurutma işlemi gereklidir.

3. Cihaz

3.1. Temizlenmesi kolay, belirgin bir ısınmaya neden olmadan hızlı ve homojen ezme işlemine olanak tanıyan, dışarıdaki havayla teması olabildiğince önleyen ve 4.1.1. ile 4.1.2.'deki gereklilikleri karşılayan, nem absorbe etmeyen materyallerden üretilmiş ezici (örneğin çekiç ya da su soğutmalı mikro eziciler, katlanabilir konik değirmenler, yavaş hareket eden ya da dişli eziciler).

3.2. Analitik terazi, 1 mg hassaslığında.

3.3. Hava sızdırmaz kapaklı, çalışma yüzeyi, test numunesinin yaklaşık 0,3 g/cm²'ye yayılmasını sağlayan aşınmaz metal ya da camdan yapılmış kuru kaplar.

3.4. Uygun şekilde havalandırılan ve hızlı sıcaklık düzenlemesi sağlayan elektrik ısıtmalı izotermal etüv. ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) ⁽¹⁾

3.5. Bir yağ pompası takılmış ve sıcak kurutulmuş havanın girişı için bir mekanizma ya da bir nem çekici madde (kalsiyum oksit gibi) içeren ayarlanabilir elektrik ısıtmalı vakumlu etüv.

3.6. Kalın, delikli metal ya da porselen tablalı, uygun bir nem çekici içeren desikatör.

4. Metot

Bu bölümde açıklanan işlemler numune paketleri açıldıktan hemen sonra gerçekleştirilmelidir. Analiz en az iki paralel olarak gerçekleştirilmelidir.

4.1. Hazırlama

4.1.1. 4.1.2 ve 4.1.3 kapsamında gelenler dışındaki yemler

En az 50 g numune alınır. Gerekliyse, nem içeriğinde herhangi bir varyasyonu önleyecek şekilde ezilir ya da bölünür. (bakınız 6)

4.1.2. Tahıllar ve Ürünleri

En az 50 g numune alınır. En az %50'sinin 0,5 mm gözlü bir elekten geçeceği ve en fazla %10'unun 1 mm yuvarlak gözlü elekte kalacağı şekilde öğütülür.

4.1.3. Sıvı ya da ezme biçimindeki yüksek yoğunlukta yağ içeren yemler

Yaklaşık 25 g numune alınır, 10 mg hassasiyetle tartılır, tartılan numuneye uygun miktarda daha önce etüvde kurutulmuş kuvars kumu 10 mg hassasiyetle tartılır ve eklenir, homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılır.

4.2. Kurutma

4.2.1. 4.2.2 ve 4.2.3 kapsamı dışındaki yemler

⁽¹⁾Tahıl ve ürünlerinin kurutulması için etüvün termal kapasitesinin 131°C'lik bir ön ayarda olması ve eş zamanlı kurutma için maksimum sayıda test numunesi yerleştirildikten sonra en fazla 45 dakika içinde bu sıcaklığa ulaşacak şekilde olması gerekir. Alabildiğı kadar buğday numunesi iki saat boyunca kurutulduğunda, dört saatlik kurutmaya göre sonuçlar arasındaki farkın en fazla %0,15 olacağı şekilde havalandırma sağlanmalıdır.

Kapağı ile birlikte bir kap (3.3) 1 mg hassasiyetle tartılır. Tartılan kaba 1 mg hassasiyetle yaklaşık 5 g numune tartılır ve eşit olarak yayılır. Kap, kapağı açık olarak önceden 103°C'ye ısıtılmış etüve konulur.

Etüv sıcaklığının aşırı düşmesini önlemek için kap olabildiğince hızlı yerleştirilir. Etüv sıcaklığının 103°C'ye ulaştığı saatten itibaren dört saat boyunca kurumaya bırakılır. Kapak kabın üstüne yerleştirilir, kap etüvden çıkartılır, desikatör (3.6) içinde 30-45 dakika soğumaya bırakılır 1 mg hassasiyetle tartılır.

Yağ içeriği yüksek olan yemler, 130°C'de ek olarak 30 dakika daha etüvde kurutulur. İki tartım arasındaki fark en fazla, nemin %0,1'i olmalıdır.

4.2.2. Tahıllar ve ürünleri

Kapağı ile birlikte bir kap (3.3) 0,5 mg hassasiyetle tartılır. Tartılan kaba 1 mg hassasiyetle yaklaşık 5 g öğütülmüş numune tartılır ve eşit olarak yayılır. Kap, kapağı açık olarak önceden 130°C'deki etüve koyulur. Etüv sıcaklığının aşırı düşmesini önlemek için kap olabildiğince hızlı yerleştirilir.

Etüv sıcaklığının 130°C'ye ulaşmasından itibaren iki saat boyunca kurumaya bırakılır. Kapak kabın üstüne yerleştirilir, kap etüvden çıkartılır, desikatör (3.6) içinde 30 - 45 dakika soğumaya bırakılır ve 1 mg hassasiyetle tartılır.

4.2.3. %4'ten fazla sakkaroz ya da laktoz içeren karma yem: Keçiyoynuzu, hidrolize hububat ürünleri, malt tohumları, kurutulmuş pancar posası, balık ve şeker çözümleri gibi yem materyalleri; kristalleşen suyu da dahil %25'ten fazla mineral tuz içeren karma yem.

Kapağı ile birlikte bir kap (3.3) 0,5 mg hassasiyetle tartılır. Tartılan kaba 1 mg hassasiyetle yaklaşık 5 g numune tartılır ve eşit olarak yayılır. Kapağı açık olarak önceden 80°C - 85°C'ye ısıtılmış vakumlu etüve (3.5) koyulur. Etüv sıcaklığının aşırı düşmesini önlemek için kap olabildiğince hızlı yerleştirilir.

Basınç 100 Torr'a getirilir ve bu basınçta, sıcak ve kuru bir hava akımında ya da bir nem çekici madde (20 numune için yaklaşık 300 g) kullanarak dört saat kurumaya bırakılır. Sonraki işlemde, belirtilen basınca erişildiğinde vakum pompası çıkartılır. Etüv sıcaklığının 80°C - 85°C'ye ulaştığı andaki kurutma süresi kaydedilir. Etüv dikkatle yeniden atmosfer basıncına getirilir. Etüv açılır, kapağı hemen kabın üstüne yerleştirilir, kap etüvden çıkartılır, desikatör (3.6) içinde 30- 45 dakika soğumaya bırakılır ve 1 mg hassasiyetle tartılır. 80°C - 85°C'deki vakumlu etüvde 30 dakika daha kurutulur ve yeniden tartılır. İki tartım arasındaki fark en fazla nemin % 0,1'ini aşmamalıdır.

4.3. Ön kurutma

4.3.1. 4.3.2 kapsamı dışındaki yemler

Parçalama işlemini zorlaştıran, yüksek nem içerikli katı yemler aşağıdaki şekilde ön kurutma işlemine tabi tutulmalıdır:

50 g parçalanmamış numune uygun bir kaba (örneğin 20 × 12 cm boyutlarında ve 0,5 cm kenarlı alüminyum tepsi) 10 mg hassasiyetle tartılır (gerekliyse, sıkıştırılmış ya da yığılmış yem kabaca bölünebilir). 60°C ile 70°C arasındaki bir etüvde, nem içeriği %8-%12'ye azalınca kadar kurumaya bırakılır. Etüvden çıkartılır, laboratuvarı kapaksız olarak bir saat soğumaya bırakılır ve 10 mg hassasiyetle tartılır. Hemen 4.1.1.'de belirtildiği gibi parçalanır ve yemin yapısına göre 4.2.1 ya da 4.2.3'te belirtildiği gibi kurutulur.

4.3.2. Tahıllar

%17'nin üzerinde nem içeriği olan taneler aşağıdaki şekilde ön kurutma işlemine tabi tutulmalıdır:

50 g öğütülmemiş tane uygun bir kaptan (örn. 20 × 12 cm boyutlarında ve 0,5 cm kenarlı alüminyum tepsi) 10 mg hassasiyetle tartılır. 130°C'deki etüvde 5-7 dakika kurumaya bırakılır. Etüvden çıkartılır, laboratuvarı kapaksız olarak iki saat soğumaya bırakılır ve 10 mg hassasiyetle tartılır. Hemen 4.1.2.'de belirtildiği gibi öğütülür ve 4.2.2.'de belirtildiği gibi kurutulur.

5. Sonuçların hesaplanması

Nem içeriği (X), numunenin yüzdesi olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

5.1. Ön kurutmasız kurutma

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

Burada;

m = Numunenin gram cinsinden ilk ağırlığı,

m₀ = Kuru test numunenin gram cinsinden ağırlığı,

5.2. Ön kurutmalı kurutma

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

Burada:

m = Numunenin gram cinsinden ilk ağırlığı,
m1 = Ön kurutmadan sonra numunenin gram cinsinden ağırlığı,
m2 = Kırma ya da öğütmeden sonra numunenin gram cinsinden ağırlığı,
m0 = Kuru numunenin gram cinsinden ağırlığı.

5.3. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark mutlak nem değerinin % 0,2'sini geçmemelidir.

6. Gözlem

Kırma işlemi gerekiyorsa ve bu işlem ürünün nem içeriğini değiştirecek gibi görünüyorsa, yem bileşenlerinin analiz sonuçları, numunenin ilk durumundaki nem içeriği esas alınarak düzeltilmelidir.

B. Hayvansal ve Bitkisel Yağlarda Nem Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; hayvansal ve bitkisel yağlardaki nem ve uçucu madde içeriğinin tayinini mümkün kılar.

2. Prensip

Numune, 103°C'de sabit ağırlığa ulaşana kadar kurutulur. İki tartım arasındaki ağırlık kaybı 1 mg'a eşit ya da daha az olmalıdır. Ağırlıktaki kayıp tartılarak tayin edilir.

3. Cihaz

- 3.1. Aşınmaya dirençli malzemeden üretilmiş, 8 - 9 cm çapında ve yaklaşık 3 cm yüksekliğinde düztabanlı kurutma kabı.
- 3.2. Güçlendirilmiş ampullü ve üst ucunda genişleme tüpü olan, yaklaşık 80°C ile en az 110°C'ye kadar ölçüm yapabilen ve yaklaşık 10 cm uzunluğunda termometre.
- 3.3. Kum banyosu ya da elektrikli ısıtıcı tabla.
- 3.4. Etkin bir nem çekici içeren desikatör.
- 3.5. Analitik terazi.

4. Metot

Yaklaşık 20 g homojen numune 1 mg hassasiyetle, termometre (3.2) içeren kuru, tartılmış bir kaptan (3.1) tartılır. Sıcak Kum banyosu ya da elektrikli ısıtıcı tabla (3.3) üstünde ısıtılır, termometre ile devamlı karıştırılarak yaklaşık 7 dakikada sıcaklık 90°C'ye ulaştırılır.

Isı düşürülür, kabın tabanından yükselen kabarcıkların sıklığı izlenir. Sıcaklık en fazla 105°C olmalıdır. Kabarcıkların oluşması durana kadar, kabın dibini kazıyarak karıştırmaya devam edilir.

Nemin ortadan kaldırılmasını tamamlamak için birkaç kez 103°C ± 2°C'ye tekrar ısıtılır, ardışık ısıtma arasında 93°C'ye soğutulur. Ardından desikatörün (3.4) içinde oda sıcaklığında soğumaya bırakılır ve tartılır. Bu işlem iki ardışık tartım arasındaki ağırlık kaybı en fazla 2 mg olana kadar yinelenir.

Dikkat: Yinelenen ısıtma işleminden sonra numunenin ağırlığındaki bir artış yağın oksitlendiğini gösterir, bu durumda sonucun hesaplanmasında, ağırlığın artmaya başlamasından hemen önce gerçekleştirilen tartım kullanılır.

5. Sonuçların hesaplanması

Nem içeriği (X), numunenin yüzdesi olarak aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

m = Numunenin gram cinsinden ağırlığı,
m1 = Isıtma öncesinde kabın içindekilerle birlikte gram cinsinden ağırlığı,
m2 = Isıtma sonrasında kabın içindekilerle birlikte gram cinsinden ağırlığı,

% 0,05'in altındaki sonuçlar '%0,05'ten düşük' olarak kaydedilmelidir.

6. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki nem farkı mutlak değerin % 0,05'ini geçmemelidir.

C. Ham Protein İçeriğinin Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, Kjeldahl metodu ile tayin edilen azot içeriğine dayanarak yemdeki ham protein içeriğinin tayinini mümkün kılar.

2. Prensip

Numune, bir katalizör varlığında sülfürik asit tarafından parçalanır. Asit çözeltisi, sodyum hidroksit çözeltisi tarafından bazik hale getirilir. Amonyak damıtılır ve miktarı belli olan sülfürik asit içine alınır, geri kalanı standart bir sodyum hidroksit çözeltisiyle titre edilir.

Alternatif olarak, açığa çıkan amonyak daha fazla miktarda bulunan borik asit çözeltisine damıtılır, ardından hidroklorik asit ya da sülfürik asit çözeltisi ile titre edilir.

3. Ayraçlar

3.1. Potasyum sülfat

3.2. Katalizör: bakır (II) oksit (CuO) ya da bakır (II) sülfat pentahidrat (CuSO₄.5H₂O)

3.3. Granül çinko

3.4. Sülfürik asit, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml

3.5. Sülfürik asit, standart hacimsel çözelti, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l

3.6. Sülfürik asit, standart hacimsel çözelti, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l

3.7. Sülfürik asit, standart hacimsel çözelti, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l

3.8. Metil kırmızısı indikatörü; 300 mg metil kırmızısını 100 ml etanol içinde çözündürülür, $\sigma = \%95\text{-}\%96$ (v/v)

3.9. Sodyum hidroksit çözeltisi (Teknik dereceli kullanılabilir) $\beta = 40$ g/100 ml (m/v: %40)

3.10. Sodyum hidroksit, standart hacimsel çözelti, $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l

3.11. Sodyum hidroksit, standart hacimsel çözelti, $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l

3.12. Granül kaynama taşı, hidroklorik asit içinde yıkanmış ve yakılmış

3.13. Asetanilid (erime noktası = 114°C, Azot -içeriği= %10,36)

3.14. Sakkaroz (azot içermeyen)

3.15. Borik asit (H₃BO₃)

3.16. Metil kırmızısı indikatör çözeltisi: 100 mg metil kırmızısı 100 ml etanol ya da metanol içinde çözündürülür.

3.17. Bromkrezol yeşili çözeltisi: 100 mg bromkrezol yeşili 100 ml etanol ya da metanol içinde çözündürülür.

3.18. Borik asit çözeltisi (kullanılan cihaza göre 10 g/l - 40 g/l)

Kolorimetrik olarak dönüm noktası belirleneceği zaman metil kırmızısı ve bromkrezol indikatörleri borik asit çözeltisine eklenmelidir. 1 litre borik asit çözeltisi hazırlanırsa, hacmi tamamlanmadan önce 7 ml metil kırmızısı indikatör çözeltisi (3.16) ve 10 ml bromkrezol yeşili çözeltisi (3.17) eklenmelidir.

Kullanılan suya bağlı olarak borik asit çözeltisinin pH'ı partiden partiye değişebilir. Genelde küçük hacimde alkali içeren bir ayarlama, pozitif kör elde etmek için gereklidir.

Not: Yaklaşık 3 ml-4 ml NaOH'nin (3.11) 1 litre 10 g/l borik aside eklenmesi genelde iyi ayarlamalar verir. Çözelti oda sıcaklığında depolanır ve depolama süresince ışıktan ve amonyak dumanı kaynağından korunur.

3.19. Hidroklorik asit standart hacimsel çözeltisi $c(\text{HCl}) = 0,10$ mol/l

Not: Hesaplamalar için düzeltilmişse diğer hacimsel çözelti konsantrasyonları (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 ve 3.19) kullanılabilir. Konsantrasyonlar her zaman dört ondalık haneye kadar ifade edilmelidir.

4. Cihaz

Kjeldahl metoduna göre yaş yakma, damıtma ve titrasyona uygun cihaz.

5. Metot

5.1. Yaş yakma

1 g numune 0,001 g hassasiyetle tartılır ve kjeldahl balonuna aktarılır. 15 g potasyum sülfat (3.1), uygun miktarda katalizör (3.2) (0,3 - 0,4 g bakır (II) oksit veya 0,9-1,2 g bakır (II) sülfat pentahidrat), 25 ml sülfürik asit (3.4) ve gerekiyorsa granül kaynama taşı (3.12) eklenir ve karıştırılır.

Kjeldahl balonu önce yavaşça ısıtılır, kütle karbonize olana ve köpük kaybolana kadar gerekiyorsa ara sıra döndürerek karıştırılır, ardından sıvı sürekli kaynayana kadar daha yoğun şekilde ısıtılır. Kaynayan asit cam balonun çeperinde yoğunlaşıyorsa ısıtma yeterlidir. Çeperin aşırı ısınması ve organik parçacıkların bunlara yapışması önlenir.

Çözelti berrak ve açık yeşil olduğunda iki saat daha kaynatmaya devam edilir, ardından soğumaya bırakılır.

5.2. Damıtma

Sülfatların tümüyle çözünmesini sağlamak için dikkatle yeterli miktarda su eklenir (yaklaşık 150-200 ml). Soğumaya bırakılır ve ardından gerekiyorsa birkaç granül çinko (3.3) eklenir. 5.2.1. ya da 5.2.2.'ye göre devam edilir.

5.2.1. Sülfürik aside damıtma

Damıtma cihazının toplama erlenine varsayılan azot içeriğine göre tam olarak ölçülmüş 25 ml sülfürik asit (3.5 ya da 3.7) eklenir. Birkaç damla metil kırmızısı indikatörü (3.8) eklenir.

Kjeldahl Balon damıtma cihazının yoğunlaştırıcısına bağlanır ve yoğunlaştırıcının ucu toplama erleni içindeki sıvıya en az 1 cm derinliğinde batırılır. (bakınız 8.3). 100 ml sodyum hidroksit çözeltisi (3.9) yavaşça balona amonyak kaybı olmadan eklenir (bakınız 8.1) Balon amonyak damıtma işlemi tamamlanana kadar ısıtılır.

5.2.2. Borik aside damıtma

Damıtığın amonyak içeriğinin titrasyonunun elle gerçekleştirildiği yerde aşağıda bahsedilen metot uygulanır. Damıtmanın tümüyle otomatik olduğu yerde, distilatın amonyak içeriğinin titrasyonu da dahil olmak üzere, cihaz üreticisi firmanın kullanım talimatları izlenir.

25 ml ila 30 ml borik asit çözeltisi (3.18) içeren bir toplama erleni, iletim borusunun aşırı borik asit çözeltisinin yüzeyi altında olacağı şekilde yoğunlaştırıcının altına yerleştirilir. Damıtma cihazı 50 ml sodyum hidroksit çözeltisini (3.9) dağıtacak şekilde ayarlanır. Damıtma cihazı üreticinin talimatlarına göre kullanılır ve sodyum hidroksit çözeltisi eklenmesiyle açığa çıkan amonyak damıtılır. Distilat borik asit toplama çözeltisinde toplanır. Distilatın miktarı (buhar damıtma süresi), numunedeki azot miktarına göre değişir. Üreticinin talimatlarını izlenir.

Not: Yarı otomatik bir damıtma cihazında, aşırı sodyum hidroksitin eklenmesi ve buhar damıtma işlemi otomatik olarak gerçekleştirilir.

5.3. Titrasyon

5.3.1. ya da 5.3.2.'ye göre devam edilir.

5.3.1. Sülfürik asit

Kullanılan sülfirik asidin konsantrasyonuna bağlı olarak, toplama kabı içindeki sülfirik asidin fazlası, sodyum hidroksit çözeltisi ile (3.10 ya da 3.11) dönüm noktasına ulaşıncaya kadar titre edilir

5.3.2. Borik asit

Toplama şişesinin içeriği bir büret kullanılarak hidroklorik asit standart volumetrik çözeltisi (3.19) ya da sülfürik asit standart volumetrik çözeltisi (3.6) ile titre edilir ve kullanılan miktar okunur.

Dönüm noktasına, içerikte pembe rengin ilk görüldüğü yerde ulaşılır. Büret, en yakın 0,05 ml'ye okuyarak tahmin edilir. Aydınlatmalı bir manyetik karıştırma plakası ya da fotometrik bir detektör dönüm noktasının görülmesine yardımcı olabilir. Bu, otomatik titrasyonlu buhar damıtıcı kullanılarak otomatik olarak yapılabilir. Özel damıtıcı ya da damıtıcı/titre edicinin kullanımı için üreticinin talimatları izlenir.

Not: Otomatik titrasyon sistemi kullanıldığında, titrasyon, damıtma işlemi başladıktan hemen sonra başlar ve %1 borik asit çözeltisi (3.18) kullanılır.

Tam otomatik bir damıtma cihazının kullanıldığı yerde, ayrıca amonyağın otomatik titrasyonu da bir potansiyometrik pH sistemi kullanan dönüm noktası tespiti ile yürütülebilir. Bu durumda pH metreli bir otomatik titre edici kullanılır. pH metre, normal laboratuvar pH kalibrasyon metotları izlenerek pH 4 ve pH 7 değerlerinde düzgün olarak kalibre edilmelidir. Titrasyonun pH dönüm noktasına pH 4,6'da erişilir.

5.4. Kör testi

Ayıracıların azot içermediğini doğrulamak amacıyla numune yerine 1 g sakkaroz (3.14) kullanılarak kör testi (yaş yakma, damıtma ve titrasyon) uygulanır.

6. Sonuçların hesaplanması

Hesaplamalar 6.1 ya da 6.2'ye göre gerçekleştirilir.

6.1. 5.3.1'e göre titrasyon hesabı

Ağırlıkça yüzde olarak ifade edilen ham protein içeriği, aşağıdaki formülden hesaplanır:

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

Burada;

V0 = Kör testinde kullanılan NaOH (3.10 ya da 3.11) hacmi (ml)

V1 = Numune titrasyonunda kullanılan NaOH (3.10 ya da 3.11) hacmi (ml)

c = Sodyum hidroksit (3.10 ya da 3.11) konsantrasyonu (mol/l)

m = Numunenin ağırlığı (g)

6.2. 5.3.2'ye göre titrasyon hesabı

6.2.1. Hidroklorik asitle titrasyon

Ağırlıkça yüzde olarak ifade edilen ham protein içeriği, aşağıdaki formülden hesaplanır:

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

Burada;

m = Numunenin ağırlığı (g)

c = Standart volumetrik hidroklorik asit (3.19) çözeltisinin konsantrasyonu (mol/l)

V0 = Kör testinde kullanılan hidroklorik asidin (ml cinsinden) hacmi

V1 = Numune için kullanılan hidroklorik asidin (ml cinsinden) hacmi

6.2.2. Sülfürik asitle titrasyon

Ağırlıkça yüzde olarak ifade edilen ham protein içeriği, aşağıdaki formülden hesaplanır:

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

Burada;

m = Ağırlığı (g)

c = standart volumetrik sülfürik asit (3.6) çözeltisinin konsantrasyonu (mol/l)

V0 = kör testinde kullanılan sülfürik asidin (3.6) (ml cinsinden) hacmi

V1 = Numune için kullanılan sülfürik asidin (3.6) (ml cinsinden) hacmi

7. Metodun doğrulanması

7.1. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

- %20'den az ham protein içeriği için mutlak değer olarak %0,2,
- %20 ila %40 ham protein içeriği için bulunan en yüksek değer %1,0'i kadar,
- %40'tan fazla ham protein içeriği için mutlak değer olarak %0,4.

7.2. Doğruluk

Analiz (yaş yakma, damıtma ve titrasyon) 1 g sakkaroz (3.14) varlığında, 1,5 ila 2,0 g asetanilid (3.13) üzerinde gerçekleştirilir. 1 g asetanilid 14,80 ml sülfürik asit (3.5) tüketir. Geri kazanım en az %99 olmalıdır.

8. Gözlemler

8.1. Cihaz manuel, yarı otomatik ya da otomatik tip olabilir. Yaş yakma ve damıtma adımları arasında makine aktarım gerektiriyorsa, bu aktarım kayıpsız gerçekleştirilmelidir. Damıtma cihazının şişesine damlama hunisi takılmamışsa, kjeldahl balonu yoğunlaştırıcıya bağlanmadan hemen önce sodyum hidroksit yavaşça kenardan dökülerek eklenir.

8.2. Yaş yakmaya tabi tutulan madde katılırsa, yukarıda belirtilenden daha fazla miktarda sülfürik asit (3.4) kullanarak analiz yeniden başlatılır.

8.3. Düşük azot içeriği olan ürünler için toplama erlenine koyulacak sülfürik asit (3.7) hacmi gerekiyorsa 10 ya da 15 ml'ye azaltılabilir ve su ile 25 ml'ye kadar tamamlanabilir.

8.4. Rutin analizlerde, ham protein tayini için alternatif analiz metotları uygulanabilir, ancak bu Bölüm C'de açıklanan Kjeldahl metodu referans metottur. Alternatif metotla (DUMAS gibi) elde edilen ve referans metot ile karşılaştırılan sonuçların eşdeğerliği her matriks için ayrı ayrı gösterilmelidir. Alternatif bir metotla elde edilen sonuçlar, eşdeğerlikleri doğrulanmış olsa bile referans metot ile elde edilen sonuçlardan biraz sapabildiğinden, ham protein tayini için kullanılan analiz metodundan analitik raporda bahsedilmesi gereklidir.

Not: 8.4.'te adı geçen DUMAS metodu, AOAC'de yayımlanmış metoda göre yapılabilir.

Ç. Üre Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, yemdeki üre seviyesinin tayinini mümkün kılar.

2. Prensip

Numune, berraklaştırma çözeltileriyle su içinde süspansiyon haline getirilir. Süspansiyon süzülür. Süzüntünün üre içeriği 4-dimetilaminobenzaldehid (4-DMAB) eklendikten sonra 420 nm dalga boyundaki optik yoğunluk ölçülerek tayin edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. 4-dimetilaminobenzaldehid çözeltisi: 1,6 g 4-DMAB'yi 100 ml %96 etanol içinde çözündürülür ve 10 ml hidroklorik asit (ρ_{20} 1,19 g/ml) eklenir. Bu ayıraç, en fazla iki hafta kullanılabilir.

3.2. Carrez çözeltisi I: Su içinde 21,9 g çinko asetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ve 3 g glasiyal asetik asit çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.3. Carrez çözeltisi II: Su içinde 10,6 g potasyum ferrosiyaniid $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$ çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.4. Üre absorbe etmeyen aktif karbon kullanılmalıdır. (Kontrol edilmelidir.)

3.5. Üre, %0,1 çözelti (w/v)

4. Cihazlar

4.1. Karıştırıcı: yaklaşık 35 ila 40 rpm

4.2. Test tüpleri: 160 × 16 mm, şilifli

4.3. Spektrofotometre

5. Metot

5.1. Numunenin analizi

2 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 1 g aktif karbon (3.4) ile 500 ml'lik balon jojeye koyulur. 400 ml su ve 5 ml Carrez I çözeltisi (3.2) eklenir, yaklaşık 30 saniye karıştırılır ve 5 ml Carrez II çözeltisi (3.3) eklenir. Karıştırıcıda 30 dakika karıştırılır. Su ile gereken hacme tamamlanır, çalkalanır ve süzülür.

5 ml şeffaf renksiz filtratı alınır, şilifli test tüplerine koyulur, 5 ml 4-DMAB çözeltisi eklenir (3.1) ve karıştırılır. Tüpler 20°C'deki (+/- 4°C) bir su banyosuna koyulur. 15 dakika sonra, 420 nm'de spektrofotometrede numune çözeltisinin optik yoğunluğu ölçülür. Ayıraçlar aynı şekilde kullanılarak numunesiz kör deneme çalışması yapılır ve hesaplamalarda dikkate alınır.

5.2. Kalibrasyon eğrisi

1, 2, 4, 5 ve 10 ml'lik hacimlerde üre çözeltisi (3.5) alınır, 100 ml balon jojeye koyulur ve su ile gereken hacme tamamlanır. Her bir çözeltiden 5 ml alınır, bunların her birine 5 ml 4-DMAB çözeltisi (3.1) eklenir, homojen hale getirir, 5 ml 4-DMAB ve 5 ml üre içermeyen su ihtiva eden bir kontrol çözeltisi ile karşılaştırılarak optik yoğunluğu yukarıda gösterildiği gibi ölçülür, kalibrasyon eğrisi çizilir.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon eğrisi kullanılarak numunedeki üre miktarı tayin edilir. Sonuçlar numunenin yüzdesi olarak ifade edilir. Üre hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılabilir.

$$\text{Üre(\%)}: \frac{c \times f \times 100}{m \times 1000}$$

Burada;

c: Kalibrasyon eğrisinden hesaplanan üre miktarı(mg)

f: Seyreltme faktörü

m: Numune miktarı (g)

7. Gözlemler

7.1. Üre içeriğinin %3'ü geçmesi halinde numune 1 g'a azaltılır ya da orijinal çözelti, 500 ml'de en fazla 50 mg üre olacak şekilde seyreltilir.

7.2. Üre içeriğinin düşük olması durumunda, süzüntü şeffaf ve renksiz kalana kadar numune artırılır.

7.3. Numune, amino asitler gibi basit azot bileşikleri içeriyorsa, optik yoğunluk 435 nm'de ölçülmelidir.

D. Uçucu Azotlu Bazların Tayini

I. Mikro Difüzyon İle

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemdeki, amonyak olarak ifade edilen uçucu azotlu bazların tayinini mümkün kılar.

2. Prensip

Numune su ile ekstrakte edilir ve çözelti berraklaştırılıp süzülür. Uçucu azotlu bazlar, bir potasyum karbonat çözeltisi kullanılarak mikro difüzyon yoluyla çıkartılır, borik asit çözeltisinde toplanır ve sülfürik asit ile titre edilir.

3. Ayırıcılar

3.1. Trikloroasetik asit, %20 (w/v) çözelti.

3.2. İndikatör: 33 mg bromokrezol yeşili ve 65 mg metil kırmızısı 100 ml %95 ila %96 (v/v) etanol içinde çözündürülür.

3.3. Borik asit çözeltisi: 1 litrelik balon jojede 10 g borik asit 200 ml %95 ila %96 (v/v) etanol ve 700 ml su içinde çözündürülür. 10 ml indikatör (3.2) eklenir. Karıştırılır ve gerekiyorsa çözeltinin rengi bir sodyum hidroksit çözeltisi ekleyerek açık kırmızıya ayarlanır. Bu çözeltinin 1 ml'si en fazla 300 µg NH₃ bağlayacaktır.

3.4. Doymuş potasyum karbonat çözeltisi: 100 g potasyum karbonat 100 ml kaynar suda çözündürülür. Soğumaya bırakılır.

3.5. Sülfürik asit 0,01 mol/l

4. Cihaz

4.1. Karıştırıcı: yaklaşık 35 ila 40 rpm

4.2. Cam ya da plastik Conway hücreleri (bakınız şekil)

4.3. 1/100 ml derecelendirilmiş mikro büretler

5. Metot

10 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 100 ml su ile 200 ml'lik balon jojeye koyulur. 30 dakika boyunca karıştırıcıda karıştırılır. 50 ml trikloroasetik asit çözeltisi (3.1) eklenir, su ile gereken hacme tamamlanır, kuvvetlice çalkalanır ve katlı bir süzgeç kağıdı ile süzülür.

Bir pipet kullanarak 1 ml borik asit çözeltisi (3.3) Conway hücresinin ortasına ve 1 ml numune süzüntüsü hücrenin başlığına eklenir. Yağlanmış kapakla kısmen kapatılır. 1 ml doymuş potasyum karbonat çözeltisi (3.4) hızlı bir şekilde başlığa damlatılır ve kapağı hücrenin hava almayacağı şekilde kapatılır. Hücre, iki ayırıcın karışacağı şekilde dikkatle yatay bir düzlemde döndürerek çevrilir. Oda sıcaklığında en az dört saat ya da 40°C'de bir saat inkübe edilmeye bırakılır. Bir mikro büret (4.3) kullanılarak uçucu bazları borik asit çözeltisi içinde sülfürik asit (3.5) ile titre edilir. Analiz edilecek bir numune olmadan aynı metot kullanılarak kör testi gerçekleştirilir.

6. Sonuçların hesaplanması

1 ml H₂SO₄ 0,01 mol/l, 0,34 mg amonyağa karşılık gelir. Sonuçlar numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

6.1. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki farkı aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

— %1'den az amonyak içeriği için bağıl değer olarak %10,

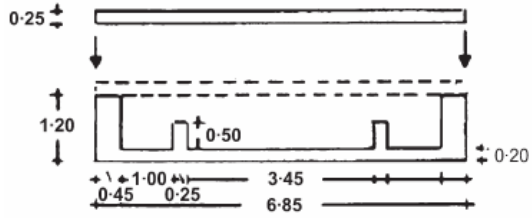
— %1 ya da daha fazla amonyak içeriği için mutlak değer olarak %0,1

7. Gözlem

Numunenin amonyak içeriği %0,6'dan fazla ise başlangıç süzüntüsü seyreltilir.

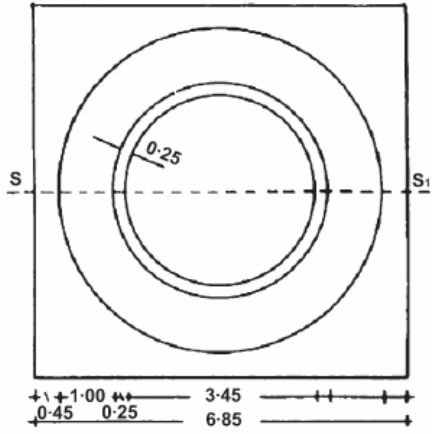
Şekil: Conway Hücresi

Ölçek 1/1

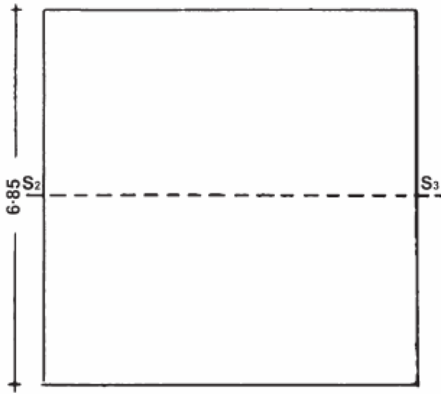


Kapağın S_2S_3 kesiti

Kapağın S_1S_2 kesiti



Hücrenin üstten görünümü



Şilifli cam kapağın üstten görünümü

II. Damıtmayla

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot; üre içermeyen balık ununda, amonyak olarak ifade edilen uçucu azotlu bazların tayinini mümkün kılar. Bu, yalnızca %0,25'ten az amonyak içeriği için geçerlidir.

2. Prensip

Numune su ile ekstrakte edilir ve çözelti berraklaştırılıp süzülür. Uçucu azotlu bazlar kaynama noktasında magnezyum oksit eklenerek çıkartılır ve belirli miktardaki sülfürik asit içinde toplanır, fazla miktarı sodyum hidroksit çözeltisi ile geri titre edilir.

3. Ayıraçlar

- 3.1. Trikloroasetik asit, %20 (w/v) çözelti
- 3.2. Magnezyum oksit
- 3.3. Köpürmeyi önleyici emülsiyon (silikon gibi)
- 3.4. Sülfürik asit 0,05 mol/l
- 3.5. Sodyum hidroksit çözeltisi, 0,1 mol/l
- 3.6. %95 ile %96 (v/v) etanol içinde %0,3 metil kırmızısı çözelti

4. Cihaz

- 4.1. Karıştırıcı: yaklaşık 35 ile 40 rpm
- 4.2. Kjeldahl tipi damıtma cihazı

5. Metot

10 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 100 ml su ile 200 ml'lik balon jojeye koyulur. 30 dakika boyunca karıştırıcıda karıştırılır. 50 ml trikloroasetik asit çözeltisi (3.1) eklenir, su ile gereken hacme tamamlanır, kuvvetlice çalkalanır ve katlı bir süzgeç kağıdı ile süzülür.

Varsayılan uçucu azotlu baz içeriği için uygun miktarda berrak süzüntü alınır. (100 ml genelde uygundur) 200 ml'ye seyreltilir ve 2 g magnezyum oksit (3.2) ile birkaç damla köpürmeyi önleyici emülsiyonu (3.3) eklenir. Çözelti turnusol kağıdına göre alkali olmalıdır, değilse biraz magnezyum oksit (3.2) eklenir.

Ham protein içeriğinin tayini için analiz metodunun 5.2 ve 5.3 maddelerine göre devam edilir. (Bakınız Bölüm C).

Numune olmadan aynı metot kullanarak kör testi gerçekleştirilir.

6. Sonuçların hesaplanması

1 ml H₂SO₄ 0,05 mol/l, 1,7 mg amonyağa karşılık gelir. Sonuçlar yüzde olarak ifade edilir.

6.1. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark, bağıl değer olarak en fazla amonyağın %10'u olmalıdır.

E. Amino Asitlerin (Tryptofan Hariç) Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, amino asit analizörü kullanarak yemdeki serbest (sentetik ve doğal) ve toplam (peptid bağlı ve serbest) amino asitlerin tayinini mümkün kılar. Sistein, metiyonin, lizin, treonin, alanin, arjinin, aspartik asit, glutamik asit, glisin, histidin, izolöysin, löysin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin ve valin amino asitleri için geçerlidir.

Metot, amino asit tuzlarını ayırt etmez ve amino asitlerin D ve L formları arasında ayırım yapmaz. Tryptofan ya da amino asitlerin hidroksi analoglarının tayini için geçerli değildir.

2. Prensip

2.1. Serbest amino asitler

Serbest amino asitler seyreltilmiş hidroklorik asit ile ekstrakte edilir. Beraber ekstrakte edilmiş azotlu makro moleküller sülfosalisilik asit ile çökteltilir ve süzülür. Süzüntünün pH'ı 2,20'ye ayarlanır. Amino asitler iyon değişim kromatografisi ile ayrılır ve ninhidrin ile reaksiyona sokularak fotometrede 570 nm dalga boyunda tespit edilir.

2.2. Toplam amino asitler

Seçilen metot inceleme altındaki amino asitlere göre değişir. Sistein ve metiyonin hidrolizden önce sırasıyla sisteik aside ve metiyonin slfona okside edilmelidir. Tirozin, oksitlenmemiş numunelerin hidrolizatlarında tayin edilmelidir. Amaç ve kapsamda listelenen diğer tüm amino asitler oksitlenmiş ya da oksitlenmemiş numunede tayin edilebilir.

Oksidasyon 0°C’de performik asit/fenol karışımı ile gerçekleştirilir. Oksitlenme ayıracının fazlası sodyum disülfit ile ayrıştırılır. Oksitlenmiş ya da oksitlenmemiş numune, hidroklorik asit (3.20) ile 23 saat boyunca hidrolize edilir. Hidrolizat pH 2,20’ye ayarlanır. Amino asitler iyon değişim kromatografisi ile ayrılır ve ninhidrin ile reaksiyona sokularak fotometrede 570 nm (prolin için 440 nm) dalga boyunda tespit edilir.

3. Ayırlar

İki kere distile edilmiş su ya da eşdeğer nitelikte su kullanılmalıdır. (iletkenlik < 10 µS).

3.1. Hidrojen peroksit, a (a/a) = %30

3.2. Formik asit, a (a/a) = %98 - %100

3.3. Fenol.

3.4. Sodyum disülfit

3.5. Sodyum hidroksit

3.6. 5-Slfosalisilik asit dihidrat

3.7. Hidroklorik asit, yaklaşık yoğunluğu 1,18 g/ml

3.8. Tri-Sodyum sitrat dihidrat

3.9. 2,2’-Tiyodietanol (tiyodiglikol)

3.10. Sodyum klorür

3.11. Ninhidrin

3.12. Petrol eteri, kaynama aralığı 40-60°C

3.13. Norlysin ya da başka bir bileşik iç standart olarak kullanılmaya uygundur.

3.14. Azot gazı (< 10 ppm oksijen)

3.15. 1-Oktanol

3.16. Amino asitler

3.16.1. Standard maddeler paragraf 1 altında listelenmiştir. Saf bileşikler kristalizasyon suyu içermezler. Kullanmadan önce bir hafta boyunca P₂O₅ ya da H₂SO₄ üzerinde vakum altında kurutulur.

3.16.2. Sisteik asit

3.16.3. Metiyonin sülfat.

3.17. Sodyum hidroksit zltisi, c = 7,5 mol/l, (300 g NaOH (3.5) su içinde zndrlr ve 1 litreye tamamlanır.)

3.18. Sodyum hidroksit zltisi, c = 1 mol/l, (40 g NaOH (3.5) su içinde zndrlr ve 1 litreye tamamlanır.)

3.19. Formik asit— fenol zltisi, (889 g formik asidi (3.2) 111 g su ile karıştırılır ve 4,73 g fenol (3.3) eklenir.)

3.20. Hidroliz karışımı, c = 6 mol/l HCl (1 g/l fenol içeren), (492 ml HCl (3,7) içine 1 g fenol eklenir ve suyla 1 litreye tamamlanır)

3.21. Ekstraksiyon karışımı, c = 0,1 mol/l HCl (%2 tiyodiglikol içeren) (8,2 ml HCl (3.7) alınır, yaklaşık 900 ml su ile seyreltilir, 20 ml tiyodiglikol (3.9) eklenir ve su ile 1 litreye tamamlanır) (3.7 ve 3.9. doğrudan karıştırılmaz).

3.22. 5- Slfosalisilik asit, β = %6, (60 g 5- sülfosalisilik asidi (3.6) su içinde zndrlr ve su ile 1 litreye tamamlanır.)

3.23. Oksidasyon karışımı (Performik asit— fenol) (0,5 ml hidrojen peroksidi (3.1) 4,5 ml formik asit-fenol zltisi (3.19) ile küçük bir beherde karıştırılır. Performik asit oluşturmak için 20-30°C’de 1 saat boyunca inkübe edilir. Numuneyi eklemeden önce (15 dakika) buz-su banyosunda soğutulur.)

Dikkat: Deriyle temasından sakınılır ve koruyucu giysiler kullanılır.

3.24. Sitrat tamponu, c = 0,2 mol/l Na⁺, pH 2,20 (19,61 g sodyum sitrat (3.8), 5 ml tiyodiglikol (3.9), 1 g fenol (3.3) ve 16,50 ml HCl’yi (3.7) yaklaşık 800 ml su içinde zndrlr. pH’sı 2,20’ye ayarlanır. Su ile 1 litreye tamamlanır.)

3.25. Elüsyon tamponları, kullanılan analizör koşullarına göre hazırlanır (4.9)

3.26. Ninhidrin ayıracı, analizör koşullarına göre hazırlanır (4.9)

3.27. Amino asitlerin standart zltileri. Bu zltiler 5°C’de saklanmalıdır.

3.27.1. Amino asitlerin stok standart zltileri (3.16.1)

c = 2,5 µmol/ml (Her birinin hidroklorik asit içindeki çözeltisi. Ticari olarak bulunur.)

3.27.2. Sisteik asit ve metiyonin sülfatın stok standart çözeltileri, c = 1,25 µmol/ml

0,2115 g sisteik asit (3.16.2) ve 0,2265 g metiyonin sülfatı (3.16.3) 1 litrelik balon jodede sitrat tamponu içerisinde çözündürülür ve sitrat tamponu ile işarete kadar tamamlanır. 5°C'nin altında ve en fazla 12 ay saklanır. Bu çözelti, stok standart çözeltisi (3.27.1) sisteik asit ve metiyonin sülfat içeriyorsa kullanılmaz.

3.27.3. İç standardın stok standart çözeltisi, örneğin norlöysin, c = 20 µmol/ml

0,6560 g norlöysin (3.13) balon jodede sitrat tamponu (3.24) içinde çözündürülür ve sitrat tamponu ile 250 ml'ye tamamlanır. 5°C'nin altında en fazla 6 ay saklanır.

3.27.4. Hidrolizatlar ile kullanılmak üzere standart amino asitlerin kalibrasyon çözeltileri, c = 5 nmol/50 µl, sisteik asit ve metiyonin sülfat ve c = 10 nmol/50 µl diğer amino asitler. 2,2 g sodyum klorit (3.10) 100 ml'lik beher içinde 30 ml sitrat tamponu (3.24) ile çözündürülür. 4,00 ml amino asit stok standart çözeltisi (3.27.1), 4,00 ml sisteik asit ve metiyonin sülfatın stok standart çözeltisi (3.27.2) ve eğer kullanılıyorsa 0,50 ml iç standardın stok standart çözeltisi (3.27.3) eklenir. Sodyum hidroksit (3.18) ile pH'sı 2,20'ye ayarlanır.

Hazırlanan kısım 50 ml'lik balon jodaye aktarılır ve sitrat tamponu (3.24) ile işarete kadar tamamlayıp karıştırılır. 5°C'nin altında en fazla 3 ay saklanır. (Bakınız gözlem 9.1.)

3.27.5. Hidrolizatlarla kullanılmak üzere standart amino asitlerin kalibrasyon çözeltileri paragraf 5.3.3.1.'e göre ve ekstraktlarla (5.2) birlikte kullanılmak üzere hazırlanır. Kalibrasyon çözeltisi 3.27.4.'e göre hazırlanır ancak sodyum klorür ilave edilmez. 5°C'nin altında en fazla 3 ay saklanır.

4. Cihaz

4.1. Geri soğutucu takılmış 100 ila 250 ml'lik yuvarlak tabanlı balon joje

4.2. Etüv kullanımı için kauçuk/teflon astarlı vida kapaklı 100 ml'lik borosilikat cam şişe (örneğin Duran, Schott)

4.3. Havalandırılmalı ve $\pm 2^\circ\text{C}$ 'den daha iyi bir hassasiyette sıcaklık düzenleyicili etüv

4.4. pH-metre (üç ondalık haneli)

4.5. Membran filtre (0,22 µm)

4.6. Santrifüj

4.7. Rotary vakum evaporatör

4.8. Mekanik çalkalayıcı ya da manyetik karıştırıcı

4.9. Amino asit analizörü ya da iyon değişimi kolonlu HPLC cihazı, ninhidrin için gereç, kolon sonrası türevlendirme ve fotometrik detektör.

Amino asitleri birbirinden ve diğer ninhidrin-pozitif materyallerden ayırabilecek kapasitede sülfonlu polistren reçineleri ile doldurulmuş kolon. Tampon ve ninhidrin hatlarındaki akış hem standart kalibrasyon çalışması ve hem de numune analizini kapsayan süreç boyunca $\pm 0,5\%$ akış stabilitesi olan pompalarla sağlanır.

Bazı amino asit analizörleri ile birlikte; hidrolizatın c = 0,8 mol/l sodyum konsantrasyonuna sahip olduğu ve oksidasyon basamağından kalan tüm formik asidi içerdiği durumlarda hidroliz metotları kullanılabilir. Hidrolizat aşırı formik asit ve/veya yüksek sodyum iyon konsantrasyonları içerirse, diğerleri belirli amino asitlerde tatmin edici bir ayırım sağlamaz. Bu durumda, asit hacmi hidrolizden sonra ve pH ayarlamasından önce buharlaştırma ile yaklaşık 5 ml'ye azaltılır. Buharlaştırma vakum altında en fazla 40°C'de yapılmalıdır.

5. Metot

5.1. Numunenin hazırlanması

Numune 0,5 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülür. Nem oranı yüksek numuneler işlemden önce ya 50°C'yi aşmayacak sıcaklıkta hava ile kurutulmalı ya da dondurularak kurutulmalıdır. Yüksek yağ oranlı numuneler işlemden önce petrol eteri ile ekstrakte edilmelidir (3.12).

5.2. Yem ve ön-karışımlarda serbest amino asitlerin belirlenmesi

Hazırlanan numuneden 0,2 mg hassasiyetle uygun bir miktar (1-5 g) (5.1) erlene tartılır ve ekstraksiyon çözeltisinden 100 ml eklenir (3.21). Mekanik bir çalkalayıcı ya da manyetik bir karıştırıcı kullanarak karışım 60 dakika boyunca çalkalanır (4.8). Çökeltinin çökmesi beklenir ve 100 ml'lik bir behere süpernatant çözeltiden 10 ml pipetlenir.

5,0 ml sülfosalisilik asit çözeltisi (3.22), karıştırılarak eklenir ve manyetik karıştırıcı yardımı ile 5 dakika boyunca karıştırmaya devam edilir. Çökeltiyi ayırmak için süpernatant süzülür ya da santrifüje tabi tutulur. Elde edilen çözeltiden 10 ml, 100 ml'lik bir behere alınarak sodyum hidroksit çözeltisi (3.18) eklenir pH'ı 2,20'ye ayarlanır, sitrat tamponu (3.24) kullanarak uygun hacimdeki balon jodaye aktarılır ve tampon çözeltisi (3.24) ile işarete kadar tamamlanır.

Bir iç standart kullanılacaksa, her 100 ml nihai çözelti için 1ml iç standart (3.27.3.) eklenir ve tampon çözeltisi (3.24) ile işarete kadar tamamlanır. 5.4.'e göre kromatografi işlemine geçilir. Ekstraktlar aynı gün incelenmeyecekse 5°C'nin altında saklanır.

5.3. Toplam amino asitlerin belirlenmesi

5.3.1. Oksidasyon

Hazırlanan numuneden (5.1) 0,2 mg hassasiyetle 0,1 ile 1 g'ı,

- Açık hidroliz (5.3.2.3) için 100 ml'lik yuvarlak tabanlı balon (4.1) içine ya da,
- Düşük sodyum konsantrasyonu gerekiyorsa (5.3.3.1) 250 ml'lik yuvarlak tabanlı balon (4.1) içine ya da,
- Kapalı hidroliz (5.3.2.4) için 100 ml'lik vidalı kapaklı şişe (4.2) içine tartılır.

Tartılan numune yaklaşık 10 mg azot içeriğine sahip olmalı ve su miktarı 100 mg aşmamalıdır.

Balon/şişe buz-su banyosu içine yerleştirilir ve 0°C'ye soğutulur, 5 ml oksidasyon karışımı (3.23) eklenir ve eğik uçlu bir cam spatula ile karıştırılır. Spatulayı içeren balon/şişe hava geçirmez bir filmle kapatılır, kapatılmış kap içeren buz-su banyosu 0 °C'deki buzdolabına yerleştirilir ve 16 saat bekletilir. 16 saatten sonra buzdolabından çıkarılır ve 0,84 g sodyum disülfür (3.4) ekleyerek fazla oksidasyon ayırıcı ayrılır. 5.3.2.1'e göre işleme devam edilir.

5.3.2. Hidroliz

5.3.2.1. Oksitlenmiş numunelerin hidrolizi

5.3.1.'e göre hazırlanmış oksitlenmiş numuneye, 25 ml hidroliz karışımı (3.20) kabın ve spatulanın üzerine yapışmış tüm numune kalıntılarını yıkamaya özen göstererek eklenir. Kullanılan hidroliz metotuna bağlı olarak, 5.3.2.3 ya da 5.3.2.4.'e göre ilerlenir.

5.3.2.2. Oksitlenmemiş numunelerin hidrolizi

Hazırlanan numuneden (5.1) 0,2 mg hassasiyetle 0,1 ile 1 g arasında 100 ya da 250 ml'lik yuvarlak tabanlı balona (4.1) ya da 100 ml'lik vidalı kapaklı şişeye (4.2) tartılır. Tartılan numune porsiyonu yaklaşık 10 mg'lık bir azot içeriğine sahip olmalıdır. 25 ml hidroliz karışımı (3.20) dikkatlice eklenir ve numuneyle karıştırılır. 5.3.2.3 ya da 5.3.2.4.'e göre işleme devam edilir.

5.3.2.3. Açık hidroliz

Balondaki karışıma (5.3.2.1 ya da 5.3.2.2'ye göre hazırlanmış) 3 kaynama boncuğu eklenir ve geri soğutucu altında 23 saat boyunca sürekli kabartarak kaynatılır. Hidroliz tamamlandığında, yoğunlaştırıcı 5 ml sitrat tamponu (3.24) ile yıkanır. Cam balon ayrılır ve buz banyosu içinde soğutulur. 5.3.3.'e göre işleme devam edilir.

5.3.2.4. Kapalı hidroliz

5.3.2.1 ya da 5.3.2.2.'e göre hazırlanmış karışımı içeren şişe 110°C'deki etüve (4.3) yerleştirilir. İlk bir saat içinde basınç oluşumunu engellemek için (gaz halindeki maddelerin oluşumundan kaynaklanan) ve patlamayı önlemek için, şişenin üstüne vidalı kapak yerleştirilir. Şişe kapakla kapatılmamalıdır. Bir saatten sonra şişe kapak ile kapatılır ve etüv (4.3) içinde 23 saat boyunca bırakılır. Hidroliz tamamlandığında, şişe etüvden çıkarılır, şişenin kapağı dikkatlice açılır ve buz-su banyosuna yerleştirilir. Soğumaya bırakılır.

pH ayarlama metoduna (5.3.3) bağlı olarak, hazırlanan kısım şişenin içeriği 250 ml'lik bir behere ya da 250 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona sitrat tamponu (3.24) kullanarak aktarılır. 5.3.3.'e göre işleme devam edilir.

5.3.3. pH'ın ayarlanması

Amino asit analizörünün (4.9) sodyum toleransına bağlı olarak pH ayarlaması için 5.3.3.1 ya da 5.3.3.2.'ye göre işleme devam edilir.

5.3.3.1. Düşük sodyum konsantrasyonu gerektiren kromatografik sistemler (4.9) için

Düşük bir sodyum konsantrasyonu gerektiren amino asit analizörleri kullanıldığında (asit hacmi düşürüldüğünde), bir iç stok standardı (3.27.3) kullanılması önerilir. Bu durumda buharlaştırmadan önce hidrolizata 2 ml iç stok standardı (3.27.3) eklenir. Alınan hidrolizata 5.3.2.3 ya da 5.3.2.4'e göre 2 damla 1-oktanol (3.15) eklenir.

Rotary evaporatör (4.7) kullanarak hacim vakum altında 40°C'de 5-10 ml'ye düşürülür. Kazayla hacim 5 ml'nin altına düşürülürse, hidrolizat atılır ve analiz baştan başlatılır. Sodyum hidroksit çözeltisi (3.18) ile pH 2,20'ye ayarlanır ve paragraf 5.3.4'e göre işleme devam edilir.

5.3.3.2. Tüm diğer amino asit analizörleri için (4.9)

5.3.2.3 ya da 5.3.2.4.'e göre elde edilen hidrolizatlar alınır ve 17 ml sodyum hidroksit çözeltisi (3.17) karıştırılarak eklenir kısmen nötrleştirilir, bu durumda sıcaklık 40°C'nin altında olmalıdır. Oda sıcaklığında sodyum hidroksit çözeltisi (3.17) ve sonra diğer sodyum hidroksit çözeltisi (3.18) ekleyerek pH 2,20'ye ayarlanır. 5.3.4'e göre işleme devam edilir.

5.3.4. Kromatografi için numuneler

pH'ı ayarlanmış hidrolizat (5.3.3.1 ya da 5.3.3.2) sitrat tamponu (3.24) ile birlikte 200 ml'lik balon jöjeye aktarılır ve tamponla (3.24) işaretle kadar tamamlanır. İç standart henüz kullanılmadıysa, 2 ml iç standart (3.27.3) eklenir ve sitrat

tamponuyla (3.24) işarete kadar tamamlanır. İyice karıştırılır. Kromatografi basamağına (5.4) geçilir. Numune çözeltileri aynı gün içinde incelenmeyecekse, 5°C'nin altında saklanmalıdır.

5.4. Kromatografi

Kromatografiden önce ekstrakt (5.2) ya da hidrolizat (5.3.4) oda sıcaklığına getirilir, karışım çalkalanır ve uygun bir miktar 0,22 µm membran filtreden (4.5) süzülür. Elde edilen berrak çözelti, amino asit analizörü (4.9) kullanılarak iyon değişim kromatografisine enjekte edilir.

Enjeksiyon elle ya da otomatik olarak uygulanabilir. Bir iç standart kullanıldığı durumlar dışında standartlar ve numunelerin analizi için kolona aynı miktarda ± %0,5 çözelti eklenmesi önemlidir ve standartlarla numune çözeltileri içindeki sodyum/amino asit oranları benzerdir.

Genel olarak uygulanan kalibrasyon sıklığı ninhidrin ayırıcının stabilitesine ve analitik sisteme bağlıdır. Numune amino asit pik alanının %30-200'ü oranında bir standart pik alanı vermesi için standart ya da numune sitrat tamponu (3.24) ile seyreltilir.

Amino asitlerin kromatografisi kullanılan analizör türüne ve kullanılan reçineye göre çok az değişim gösterebilir. Kullanılan sistem amino asitleri birbirinden ve diğer ninhidrin-pozitif materyallerden ayırabilecek kapasitede olmalıdır. Çalışma aralığında kromatografik sistem, kolona eklenen amino asitlerin miktarlarındaki değişime doğrusal bir tepki vermelidir.

Kromatografi basamağında; eşmolar bir çözelti (belirlenen aminoasitlerin) analiz edildiğinde aşağıda bahsedilen çukur/pik yükseklik oranları uygulanır. Bu eşmolar çözelti amino asit analizör sistemi (4.9) ile hassas bir biçimde ölçülebilecek olan her bir amino asidin en azından %30'unu içermelidir.

Treonin-serin ayrımı için kromatogramdaki iki çıkışan amino asidin daha düşüğünün çukur/pik yüksekliği oranı 2:10'u geçmemelidir. (Sistein, metiyonin, treonin ve lizin belirlenecekse, birleşik piklerden kaynaklanan yetersiz ayırım belirlemeyi olumsuz etkiler). Tüm diğer amino asitlerin ayrımı 1:10'dan daha iyi olmalıdır.

Sistemde lizinin, lizin benzeri maddelerden ve ornitinden ayrıldığına emin olunmalıdır.

6. Sonuçların Hesaplanması

Numune ve standart pik alanları her bir amino asit için ayrı ayrı ölçülür ve miktar(X), her bir kilograma düşen amino asit miktarı g olarak aşağıdaki gibi hesaplanır:

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

Bir iç standart kullanılacaksa D/C ile çarpılır.

A = Pik alanı, hidrolizat ya da ekstrakt

B = Pik alanı, kalibrasyon standart çözeltisi

C = Pik alanı, hidrolizat ya da ekstrakt içinde iç standart

D = Pik alanı, iç standart, kalibrasyon standart çözeltisi

M = Belirlenen amino asidin mol ağırlığı

c = µmol/ml cinsinden standardın yoğunluğu

m = Numune ağırlığı (g) (kurutulmuşsa ya da yağı çıkarılmışsa orijinal ağırlığına göre düzeltilmelidir)

V = Toplam hidrolizat (5.3.4) ya da ekstraktın ml cinsinden hesaplanan toplam seyrelti hacmi (6.1)

Hem sistin hem de sistein, oksitlenmiş numunenin hidrolizatlarındaki sisteik asit olarak belirlenir, ancak mol ağırlığı M=120,15 g/mol (= 0,5 x 240,30 g/mol) kullanılarak sistin olarak hesaplanır (C₆H₁₂N₂O₄S₂, M 240,30 g/mol)

Oksitlenmiş numunenin hidrolizatlarındaki metiyonin, metiyonin sülfon olarak belirlenir, ancak metiyoninin mol ağırlığı M'149,21 g/ kullanılarak metiyonin olarak hesaplanır.

Metiyonin ekstraksiyonundan sonra ilave edilen serbest metiyonin belirlenir hesaplanması için aynı mol ağırlık kullanılır.

6.1. Serbest amino asitlerin (5.2) belirlenmesi için ekstraktların (F) toplam seyrelti hacmi aşağıdaki gibi hesaplanır:

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

V = Nihai ekstraktın hacmi

6. Referans materyallerin kullanımı

Metodun uygulanmasının doğrulaması bulunabildiği durumlarda sertifikalı referans materyallerin paralel ölçümünün yapılmasıyla sınanmalıdır. Kalibrasyonun; sertifikalı amino asit kalibrasyon çözeltisiyle yapılması önerilir.

7. Gözlemler

7.1. Amino asit analizörleri arasındaki farklardan ötürü; standart amino asitlerin (bakınız 3.27.4 ve 3.27.5) ve hidrolizatların (bakınız 5.3.4) kalibrasyon çözeltilerinin son konsantrasyonları kılavuz olarak alınmalıdır. Cihazların lineer tepkilerinin aralığı tüm amino asitler için kontrol edilmelidir. Standart çözelti; aralığın ortasındaki tepe alanlarını vermesi için sitrat tamponu ile seyreltilir.

7.2. Yüksek performans sıvı kromatografik donanımların hidrolizatların analizinde kullanıldığı yerlerde, deneysel koşullar üreticinin önerilerine göre optimize edilmelidir.

7.3. %1'den fazla klorür içeren yemlere (konsantre, mineral yemler, takviye yemler) Metodun uygulanmasıyla, metiyoninin eksik tahmin edilmesi durumu oluşabilir ve özel uygulama yapılması şarttır.

F.Triptofan Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, yemdeki toplam ve serbest triptofan miktarını belirlemek içindir. D- ve L- formları arasında bir ayırım yapmaz.

2. Prensip

Toplam triptofan tayini için numune, alkali koşullar altında doymuş baryum hidroksit çözeltisi ile hidrolize edilir ve 20 saat boyunca 110°C'ye ısıtılır. Hidrolizden sonra iç standart eklenir. Serbest triptofan tayini için numune, iç standardın varlığında hafif asidik koşullar altında ekstrakte edilir. Hidrolizatın ya da ekstraktın içinde triptofan ve iç standart, HPLC flüoresan dedektör ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

- 3.1. İki kere distile edilmiş su ya da eşdeğer nitelikte su kullanılmalıdır (iletkenlik < 10 µS/cm)
- 3.2. Standard madde: Triptofan (safılık/içerik ≥ %99) fosfor pentoksit ile vakum altında kurutulmuş
- 3.3. İç standart madde: α-metil-triptofan (safılık/içerik ≥ %99), fosforlu pentoksit ile vakum altında kurutulmuş
- 3.4. Baryum hidroksit okta-hidrat (tayini bozabilecek BaCO₃ oluşumunu önlemek amacıyla havaya aşırı Ba(OH)₂·8H₂O açığa çıkmaması için gerekli önlemler alınacaktır) (bakınız gözlem 9.3)
- 3.5. Sodyum hidroksit
- 3.6. Orto-fosforik asit, w (a/a) = %85
- 3.7. Hidroklorik asit, ρ₂₀ 1,19 g/ml
- 3.8. Metanol, HPLC kalitesine eşdeğer
- 3.9. Petrol eteri, kaynama aralığı 40- 60°C
- 3.10. Sodyum hidroksit çözeltisi, c = 1 mol/l, 40,0 g NaOH (3.5) su içinde çözündürülür ve su ile 1 litreye tamamlanır (3.1)
- 3.11. Hidroklorik asit, c = 6 mol/l, 492 ml HCl (3.7) alınır ve su ile 1 litreye tamamlanır.
- 3.12. Hidroklorik asit, c = 1 mol/l, 82 ml HCl (3.7) alınır ve su ile 1 litreye tamamlanır.
- 3.13. Hidroklorik asit, c = 0,1 mol/l, 8,2 ml HCl (3.7) alınır ve su ile 1 litreye tamamlanır.
- 3.14. Orto-fosforik asit, c = 0,5 mol/l, 34 ml orto-fosforik asit (3.6) alınır ve su ile 1 litreye tamamlanır. (3.1)
- 3.15. Konsantre triptofan çözeltisi (3.2), c = 2,50 µmol/ml, 500 ml'lik balon jodede 0,2553 g triptofan (3.2) hidroklorik asit (3.13) içinde çözündürülür ve işarete kadar hidroklorik asit (3.13) ile tamamlanır. - 18°C'de en fazla 4 hafta saklanır.
- 3.16. Konsantre iç standart çözeltisi, c = 2,50 µmol/ml, 500 ml'lik balon jodede 0,2728 g α-metil-triptofan (3.3) hidroklorik asit (3.13) içinde çözündürülür ve işarete kadar hidroklorik asit (3.13) ile tamamlanır. - 18°C'de en fazla 4 hafta saklanır.
- 3.17. Triptofan ve iç standardın kalibrasyon standart çözeltisi, 2,00 ml konsantre triptofan çözeltisi (3.15) ve 2,00 ml konsantre iç standart (α-metil-triptofan) çözeltisi (3.16) alınır. Bitmiş hidrolizatta aynı hacimde ve aynı metanol konsantrasyonunda (%10 - %30) olacak şekilde eşit hacimdeki su (3.1) ve metanol (3.8) ile seyreltilir. Bu çözelti kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır. Hazırlama sırasında doğrudan güneş ışığından korunmalıdır.
- 3.18. Asetik asit
- 3.19. 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol
- 3.20. Etanolamin w (a/a) > %98
- 3.21. 100 ml metanol (3.8) içinde 1 g 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol (3.19) çözeltisi

3.22. HPLC için mobil faz: 3,00 g asetik asit (3.18) + 900 ml su (3.1) + metanol (3.8) içinde 50,0 ml 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol (3.19) çözeltisi (3.21) (1g/100ml). Etanolamin (3.20) kullanarak pH'ı 5,00'a ayarlanır. Su ile 1000 ml'ye tamamlanır (3.1)

4. Cihaz

- 4.1. Spektrofotometrik detektörlü HPLC ekipmanı
- 4.2. Sıvı kromatografik kolon, 125 mm x 4 mm, C18, 3 µm dolgu ya da eşdeğeri
- 4.3. pH metre
- 4.4. Polipropilen erlen, 125 ml kapasiteli, geniş boyunlu ve vidalı kapaklı
- 4.5. Membran filtre, 0,45 µm
- 4.6. Otoklav, 110 (± 2)°C, 1,4 (± 0,1) bar
- 4.7. Mekanik çalkalayıcı ya da manyetik karıştırıcı
- 4.8. Vorteks karıştırıcı

5. Metot

5.1. Numunelerin hazırlanması

Numune 0,5 mm elekten geçecek şekilde öğütülür. Nem içeriği yüksek numuneler en fazla 50°C sıcaklıkta hava kurutulmalı etüvde ya da öğütülmeden önce dondurularak kurutulmalıdır. Yüksek yağ içerikli numuneler öğütülmeden önce petrol eteri (3.9) ile ekstrakte edilecektir.

5.2. Serbest triptofan tayini (ekstrakt)

Hazırlanmış numuneden (5.1) uygun bir miktar (1-5 g) 1 mg hassasiyetle erlene tartılır. 100,0 ml hidroklorik asit (3.13) ve 5,00 ml konsantre iç standart çözelti (3.16) eklenir. Mekanik bir çalkalayıcı ya da manyetik bir karıştırıcı (4.7) kullanarak 60 dakika boyunca çalkalanır ya da karıştırılır. Çökeltinin çökmesi beklenir ve 10,0 ml'lik süpernatant çözelti pipetle bir behere alınır. 5 ml orto-fosforik asit (3.14) eklenir. Soydam hidroksit (3.10) kullanarak pH 3'e ayarlanır. Nihai hacimde %10 ila %30 arasında bir metanol konsantrasyonu elde etmek için yeteri kadar metanol (3.8) eklenir. Uygun hacimdeki bir balon jojeye aktarılır ve su ile kromatografi için gereken bir hacme seyreltilir (Yaklaşık olarak kalibrasyon standart çözeltisiyle (3.17) aynı hacimde).

HPLC kolonuna enjeksiyondan önce 0,45 µm'lik bir membran filtresinden (4.5) birkaç ml çözelti süzülür. 5.4.'e uygun şekilde kromatografi işleme devam edilir.

Standart çözelti ve ekstraktlar doğrudan güneş ışığından korunur. Ekstraktların aynı gün analizi mümkün değilse, ekstraktlar 5°C'de en fazla 3 gün saklanabilir.

5.3. Toplam triptofan tayini (hidrolizat)

Hazırlanmış numuneden (5.1) 0,1 ila 1 g'ı 0,2 mg hassasiyetle polipropilen malzemeye (4.4) tartılır. Tartılan numune kısmında yaklaşık 10 mg azot içeriği olmalıdır. 8,4 g baryum hidroksit okta-hidrat (3.4) ve 10 ml su eklenir. Bir vorteks karıştırıcıda (4.8) ya da mekanik karıştırıcıda (4.7) karıştırılır. Teflon kaplanmış mıknatıs karışım içinde bırakılır. Kabin duvarları 4 ml su ile yıkanır. Vidalı kapağı takılır ve balon joje gevşekçe kapatılır.

Kaynayan su içeren bir otoklava (4.6) aktarılır ve 30-60 dakika buhar verilir. Otoklav kapatılır ve 110 (± 2)°C'de 20 saat boyunca otoklavlanır.

Otoklavı açmadan önce sıcaklığı 100°C'nin biraz altına düşürülür. Ba(OH)₂ · 8 H₂O kristalleşmesini önlemek için sıcak karışma oda sıcaklığında 30 ml su eklenir. Yavaşça çalkalanır ya da karıştırılır. 2,00 ml konsantre iç standart (α-metil-triptofan) çözeltisi (3.16) eklenir. Kaplar su/buz banyosunda 15 dakika soğutulur. Ardından 5 ml orto-fosforik asit (3.14) eklenir. Kap soğutucu banyoda tutulur ve HCl (3.11) ile nötrleştirilir, bu sırada karıştırılır ve HCl (3.12) kullanılarak pH'ı 3,0'e ayarlanır. Nihai hacimde %10 ila %30 arasında bir metanol konsantrasyonu elde etmek için yeteri kadar metanol eklenir. Uygun hacimdeki bir balon jojeye aktarılır ve su ile kromatografi için gereken tanımlanmış hacme (örneğin 100 ml) seyreltilir. Metanolün eklenmesi çökeltiye neden olmayacaktır. HPLC kolonuna enjeksiyondan önce birkaç ml çözelti 0,45 µm'lik bir membran filtresinden (4.5) süzülür. 5.4'e uygun şekilde kromatografi adımına geçilir. Standart çözelti ve hidrolizatları doğrudan güneş ışığından korunur. Hidrolizatların aynı gün analizi mümkün değilse, 5°C'de en fazla 3 gün saklanabilirler.

5.4. HPLC tayini

Aşağıdaki izokratik elüsyon koşulları rehber olarak sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla başka koşullar da kullanılabilir (bakınız gözlemler 9.1 ve 9.2):

Sıvı kromatografik kolon (4.2): 125 mm x 4 mm, C18, 3 µm dolgu ya da eşdeğeri

Kolon sıcaklığı: Oda sıcaklığı

Mobil faz (3.22): 3,00 g asetik asit (3.18) + 900 ml su (3.1) + metanol içinde (3.8) 50,0 ml 1,1,1-trikloro-2- metil-2 propanol (3.19) çözeltisi (3.21) (1 g/100 ml). Etanolamin (3.20) kullanarak pH 5,00'e ayarlanır. Su ile 1000 ml'ye tamamlanır (3.1)

Akış hızı: 1 ml/dak.

Toplam çalışma süresi: Yaklaşık 34 dak.

Tespit dalga boyu: eksitasyon: 280 nm, emisyon: 356 nm.

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

6. Sonuçların hesaplanması

100g numune başına g cinsinden triptofan miktarı (X) aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$X = (A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M) / (C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m)$$

A = İç standardın pik alanı, kalibrasyon standardı çözeltisi (3.17)

B = Triptofan pik alanı, ekstrakt (5.2) ya da hidrolizat (5.3)

V1 = Kalibrasyon çözeltisine (3.17) eklenen konsantre triptofan çözeltisinin (3.15) ml cinsinden hacmi (2 ml)

c = Kalibrasyon çözeltisine (3.17) eklenen konsantre triptofan çözeltisinin (3.15) µmol/ml cinsinden konsantrasyonu (= 2,50)

V2 = Ekstraksiyonda (= 5,00 ml) (5.2) hacmi ya da hidrolizata (= 2,00 ml) (5.3) eklenen konsantre iç standart çözeltisinin (3.16) ml cinsinden

C = İç standardın pik alanı, ekstrakt (5.2) ya da hidrolizat (5.3)

D = Triptofanın pik alanı, kalibrasyon standardı çözeltisi (3.17)

V3 = Kalibrasyon standart çözeltisine (3.17) eklenen konsantre iç standardı çözeltisinin (3.16) ml cinsinden hacmi (= 2,00 ml)

m = g Cinsinden numune ağırlığı (kurutulmuş ve/veya yağı alınmışsa orijinal ağırlığa göre düzeltilmiş)

M = Triptofanın mol ağırlığı (= 204,23 g/mol)

7. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark en yüksek sonucun %10'unu geçmemelidir.

8. Gözlemler

8.1. Aşağıdaki özel kromatografik koşullar triptofan ile α-metiltriptofan arasında daha iyi bir ayırımı sunabilir.

Gradyan kolonu temizlemesiyle elde edilen izokratik elüsyon:

Sıvı kromatografik kolon: 125 mm x 4 mm, C18, 5 µm dolgu ya da eşdeğeri

kolon sıcaklığı: 32°C

Mobil faz: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/metanol, 95+5 (H+H).

B: metanol

Gradyan programı:

0 dak.	%100 A	%0 B
15 dak.	%100 A	%0 B
17 dak.	%60 A	%40 B
19 dak.	%60 A	%40 B
21 dak.	%100 A	%0 B
33 dak.	%100 A	%0 B

Akış hızı: 1,2 ml/dak.

Toplam çalışma süresi: yaklaşık 33 dak.

8.2. Kromatografi HPLC türüne ve kullanılan kolon dolgu materyaline göre değişecektir. Seçilen sistem, triptofan ile iç standart arasındaki kromatografik ayırımı verebilmelidir. Ayrıca parçalanma ürünlerinin triptofan ve iç standardından iyi ayrılması da önemlidir. Safsızlıklar için iç standart altında temel çizgiyi denetlemek amacıyla iç standart içermeyen hidrolizatlar çalıştırılacaktır. Çalışma süresinin, tüm parçalanma ürünlerinin elüsyonu için yeterince uzun olması önemlidir, aksi halde geç elüsyon pikleri sonraki kromatografik çalıştırmaları etkileyebilir.

İşlem süresince kromatografik sistem doğrusal bir yanıt verecektir. Doğrusal yanıt sabit (normal) bir iç standart konsantrasyonu ve değişen triptofan konsantrasyonları ile ölçülecektir. Hem triptofan hem de iç standart piklerinin boyutlarının, HPLC/fluoresans sisteminin doğrusal aralığı aralığında olması önemlidir. Triptofan ve/veya iç standart pik(ler)i çok küçük ya da çok büyükse analiz başka bir numune boyutu ve/veya değiştirilmiş bir nihai hacim ile yinelenmelidir.

8.3. Baryum hidroksit

Zamanla baryum hidroksitin çözünmesi zorlaşır. Bu durum HPLC tayini için, düşük triptofan sonuçları üretebilecek bulanık bir çözeltiye yol açar.

G. Ham Katı ve Sıvı Yağların Belirlenmesi

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yem içindeki ham katı ve sıvı yağların belirlenmesi için kullanılır. Bu; yağlı tohumların ve yağlı meyvelerin analizlerini kapsamaz. Aşağıda tanımlanmış olan iki metot; yemin doğasına ve bileşimine ve yapılan analizin yapılış nedenine bağlıdır.

1.1. Metot A — Doğrudan ekstrakte edilebilen ham katı ve sıvı yağlar

Bu metot; Metot B kapsamında olanlar hariç bitki kökenli yem maddeleri için uygulanabilir.

1.2. Metot B — Total ham katı ve sıvı yağlar

Bu metot; hayvansal kökenli yem maddeleri ve tüm karma yemler için uygulanabilir. Bu metot; ön bir hidroliz yapılmadan sıvı ve katı yağları ekstrakte edilemeyen tüm yemler için kullanılır (örneğin glutenler, maya, patates proteinleri ve ekstrüzyon, ezme ve ısıtma gibi işlemlerden geçirilmiş ürünler).

1.3. Sonuçların yorumlanması

Metot B' nin Metot A' dan daha yüksek sonuç verdiği tüm durumlarda, Metot B' den elde edilen sonuç doğru değer olarak kabul edilmelidir.

2. Prensiptir

2.1. Metot A

Numune petrol eteri ile ekstrakte edilir. Çözücü damıtılır, kalıntı kurutulur ve tartılır.

2.2. Metot B

Numune; hidroklorik asitle ısı altında işlem görür. Karışım soğutulur ve süzülür. Kalıntı yıkanır ve kurutulur ve Metot A' ya göre işleme devam edilir.

3. Ayırıcılar

3.1. Petrol eteri, kaynama aralığı: 40 - 60°C. Brom değeri 1' den düşük olmalı ve buharlaşmadaki kalıntı 2 mg/100 ml'den az olmalıdır.

3.2. Sodyum sülfat, susuz

3.3. Hidroklorik asit, c = 3 mol/l

3.4. Filtrasyon yardımcı malzemesi, örneğin Kieselguhr, Hyflo-supercel

4. Cihazlar

4.1. Ekstraksiyon cihazı. Eğer Ekstraksiyon cihazı sifonluysa (Soxhlet cihazı), geri akış oranı; saatte yaklaşık 10 dönüş oluşturacak kadar olmalıdır; eğer sifonsuz tipse, dakikada yaklaşık 10 ml geri akım oluşturacak kadar olmalıdır.

4.2. Ekstraksiyon; kartuşu, petrol eteri içinde çözülebilen madde içermeyen ve madde 4.1'de belirtilen gözenekli sahip

4.3. Etüv, ya 75 ± 3°C'de vakum etüv seti ya da 100 ± 3°C'de hava etüvü

5. Metot

5.1. Metot A (bakınız madde 8.1)

5 g örnek, 1 mg hassasiyetle tartılıp bir Ekstraksiyon kartuşuna (4.2) aktarılır ve yağsız bir hidrofil pamuk ile kapatılır.

Kartuş bir ekstraktöre yerleştirilir (4.1) ve 6 saat boyunca petrol eteri ile ekstrakte edilir (3.1). Petrol eteri ekstraktı; kuru, tartılmış ve sünger taşı parçaları içeren bir balona toplanır.⁽²⁾ Çözücü damıtılır. Kalıntıları; balonu bir buçuk saat boyunca etüvde tutarak kurutulur (4.3). Bir desikatörün içinde soğumaya bırakılır ve tartılır. Katı ve sıvı yağların ağırlığının aynı kaldığından emin olmak için 30 dakika boyunca tekrar kurutulur (birbirini izleyen bu iki tartım arasındaki fark 1mg'dan az ya da 1 mg' a eşit olmalıdır).

5.2. Metot B

2,5 g örnek, 1 mg hassasiyetle tartılıp (bakınız madde 8.2), 400ml'lik bir behere ya da 300 ml'lik bir konik cam balona 100 ml hidroklorik asit (3.3) ve sünger taşı parçaları eklenir. Beher bir saat camı ile kapatılır ya da konik cam balonu bir geri-soğutucuya yerleştirilir. Karışım düşük ateş ya da ısıtıcı üzerinde yavaşça kaynamaya getirilir ve bir saat boyunca orda tutulur. Ürünün; kabın duvarlarına yapışmasına izin verilmemelidir. Soğutulur ve süzme sırasında hiç

⁽²⁾ Katı ve sıvı yağların kalite testine girmesi gerektiği durumlarda, süngertaşı parçaları yerine cam boncuklar kullanılır.

katı ya da sıvı yağ kaybı olmamasına yetecek kadar süzme desteği eklenir. Nemlendirilmiş, yağsız iki katlı süzgeç kâğıdı ile süzülür. Kalanlar; nötr bir süzöntü elde edene kadar soğuk su ile yıkanır. Süzöntünün herhangi bir katı ya da sıvı yağ içermediği kontrol edilir. Katı ya da sıvı yağların varlığı; hidrolizden önce örneğin Metot A kullanılarak petrol eterile ekstrakte edilmesi gerektiğini gösterir.

Kalıntıları içeren iki katlı süzgeç kâğıdını bir saat camı üzerine yerleştirilir ve hava üfleme etüvde (4.3) bir buçuk saat boyunca $100 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de kurutulur.

Kalıntıları içeren iki katlı süzgeç kâğıdı bir Ekstraksiyon kartuşuna (4.2) yerleştirilir ve yağsız bir hidrofil pamuğu ile kapatılır. Kartuş ekstraksiyon ünitesinin (4.1) içine yerleştirilir ve madde 5.1' in ikinci ve üçüncü paragraflarında belirtildiği şekilde ilerlenir.

6. Sonuçların gösterilmesi

Kalıntının ağırlığı numunenin yüzdesi olarak gösterilir.

7. Tekrarlanabilirlik

Analizi yapan aynı kişi ve aynı numune üzerinde yapılan 2 paralel ölçümünün sonuçları arasındaki fark:

- %5' ten az ham katı ya da sıvı yağ içeriği olanlar için mutlak değerde % 0,2' den,
- İçerikleri %5 ile %10 arasındaki için en yüksek sonuçlara göre bağlı olarak %4,0' dan,
- İçerikleri %10'dan fazla olanlar için mutlak değer olarak %0,4' ten fazla olmamalıdır.

8. Gözlemler

8.1. Parçalaması zor olan ya da homojen bir numuneye dönüştürülmesi zor olan yüksek katı ve sıvı yağ içeriğine sahip olan ürünler için aşağıdaki gibi ilerlenir.

20 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 10 g ya da daha fazla anhidre (susuz) sodyum sülfat (3.2) ile karıştırılır. Madde 5.1'de belirtildiği gibi petrol eteri (3.1) ile ekstrakte edilir. Elde edilen ekstrakt petrol eteri (3.1) ile 500 ml' ye tamamlanır ve karıştırılır. 50 ml çözelti alınır ve kurutulmuş tartılmış ve süngertaşı parçaları içeren cam balona yerleştirilir. Çözücü damıtılıp, kurutulur ve madde 5.1'in son paragrafında belirtildiği gibi ilerlenir. Kartuş içinde kalan kalıntılardan çözücü ayrılır, kalıntılar 1 mm'lik incelikte parçalanıp, tekrar kartuşun içine alınır (sodyum sülfat eklenmez) madde 5.1' in ikinci ve üçüncü paragraflarında belirtildiği şekilde ilerlenir.

Aşağıdaki formülü kullanarak katı ve sıvı yağ içeriğinin numunedeki yüzdesini hesaplanır:

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

m_1 = İlk ekstraksiyondan sonraki kalıntının gram cinsinden ağırlığı (ekstraktın sıvı kısmı),

m_2 = İkinci ekstraksiyondan sonraki kalıntının gram cinsinden ağırlığı.

8.2. Katı ve sıvı yağ oranı düşük ürünlerde test numunelerinin ağırlığı 5 g'a çıkarılabilir.

8.3. Yüksek miktarda su içeren pet hayvan yemlerinin; her bir Metot B'de hidroliz ve ekstraksiyon işleminden önce susuz sodyum sülfat ile karıştırılması gerekebilir.

8.4. Paragraf 5.2'de; süzdükten sonra soğuk su yerine sıcak su ile yıkama yapmak daha etkili olabilir.

8.5. Bazı yemler için kurutma süresi olan 1,5 saatin uzatılması gerekebilir. Düşük sonuçlara sebep olmamak için aşırı kurutmadan kaçınılmalıdır. Mikrodalga etüv de kullanılabilir.

8.6. Eğer ham katı ya da sıvı yağ oranı %15'ten yüksek ise; Metot A için ön-Ekstraksiyon ve Metot B için tekrar-Ekstraksiyon önerilir. Bazı yemler için bu yemdeki katı/sıvı yağ yapısına ve yemin yapısına bağlıdır.

Ğ. Ham Selüloz Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemlerde ham selüloz miktarının belirlenmesini mümkün kılar.

2. Prensip

Gerekli ise yağı alınmış numune, belirli yoğunluktaki sülfürik asit ve potasyum hidroksit çözeltileriyle arka arkaya kaynatılır. Kalıntı; sinterlenmiş cam filtre üzerinde süzülerek ayrılır, yıkanır, kurutulur, tartılır ve 475 ile 500°C aralığında yakılır. Yanma sonunda oluşan ağırlık kaybı, numunedeki ham selüloz miktarına karşılık gelir.

3. Ayrıçlar

3.1. Sülfürik asit, $c = 0,13 \text{ mol/l}$

3.2. Köpük engelleyici madde (örneğin, n-oktanol)

3.3. Filtre yardımcı malzemesi (Celite 545 ya da eşdeğeri) dört saat boyunca 500°C’de yakılmış, (8.6)

3.4. Aseton

3.5. Petrol eteri, kaynama aralığı 40 ile 60°C olan

3.6. Hidroklorik asit, c = 0,5 mol/l

3.7. Potasyum hidroksit çözeltisi, c = 0,23 mol/l

4. Cihazlar

4.1. Isıtma ünitesi, süzme krozesi (4.2) için desteği olan ve kapaklı likit çıkışı ve vakumu –mümkünse basınçlı hava ile sağlayan sülfürik asit ve potasyum hidroksitle parçalama işleme için. Her kullanımdan önce ünite kaynayan su ile 5 dakikada boyunca ön ısıtmaya tabi tutulur.

4.2. Gözenek boyutu 40-90 µm olan sinterlenmiş cam süzgeç plakalı kroze (nuçe krozesi). İlk kullanımdan önce birkaç dakika boyunca 500°C’ ye ısıtılır ve soğutulur (8.6)

4.3. Kaynamaya uygun, geri soğutuculu en azından 270 ml kapasiteli silindir

4.4. Termostatlı kurutma etüvü

4.5. Termostatlı kül fırını

4.6. Ekstraksiyon ünitesi, süzgeç krozesi (4,2) için destek plakasından oluşan ve vakum için kapaklı boşaltım borusu ve sıvı çıkışı olan

4.7. Birleştirme halkaları, ısıtma ünitesi (4.1), kroze (4.2) ve silindiri (4.3) monte etmek ve soğuk ekstraksiyon ünitesi (4.6) ve krozeyi birbirine bağlamak için

5. Metot

1 g numune, 1 mg hassasiyetle kroze içerisine tartılır ve (bakınız gözlem 8.1, 8.2 ve 8.3) ve 1 g filtreleme desteği filtre yardımcı malzemesi eklenir (3.3).

Isıtma ünitesi (4.1) ve filtre krozesi (4.2) monte edilir daha sonra silindir (4.3) krozeyle bağlanır. 150 ml kaynayan sülfürik asit (3.1) bağlanmış silindir ve krozeyle dökülür ve eğer gerekli ise birkaç damla köpük önleyici madde (3.2) eklenir.

Sıvı 5 ± 2 dakika içinde kaynama durumuna getirilir ve aktif bir biçimde tam olarak 30 dakika boyunca kaynatılır. Boşaltım borusunun kapağı açılır (4.1) ve vakum altında sülfürik asit filtre krozedan geçirilir ve kalıntılar ardı ardına üç defa 30 ml kaynayan suyla yıkanır, her yıkamadan sonra süzülen edilen kalıntının kuru olduğundan emin olunmalıdır.

Çıkış kapağı kapatılır ve 150 ml kaynayan potasyum hidroksit çözeltisi (3.7) bağlanmış silindir ve krozeyle dökülür ve birkaç damla köpük önleyici madde (3.2) eklenir. Sıvı 5 ± 2 dakika içinde kaynama durumuna getirilir ve aktif bir biçimde tam olarak 30 dakika boyunca kaynatılır. Süzülür ve sülfürik asit için uygulanan yıkama işlemi tekrarlanır. Son yıkama ve kurutma adımıyla krozenin ve parçalarının bağlantısı ayrılır ve kroze tekrar soğuk ekstraksiyon ünitesine (4.6) bağlanır. Vakum uygulanır ve kroze içindeki kalıntılar ardı ardına üç defa 25 ml asetona (3.4) ile yıkanır, her yıkamadan sonra süzülen kalıntının kuru olduğundan emin olunmalıdır.

Kroze 130°C’ de etüvde sabit ağırlığa gelene kadar kurutulur. Kurutmadan sonra desikatörde soğutulur ve hemen tartılır. Kroze kül fırınına yerleştirilir ve sabit ağırlığa kadar 475 ile 500°C aralığında en azından 30 dakika boyunca yakılır (birbirini izleyen bu iki tartım arasındaki fark 2 mg’den az ya da 2 mg’ a eşit olmalıdır). Her yakmadan sonra önce fırın içinde daha sonra desikatörde soğutulur tartılır.

Numune içermeyen boş bir test uygulanır. Yakma sonucu oluşan ağırlık kaybı 4 mg’ı aşmamalıdır.

6. Sonuçların hesaplanması

Ham selüloz içeriğinin numunedeki yüzdesi şöyle ifade edilir:

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

m = Numune ağırlığı, g

m₀ = Yaktıktan sonraki ağırlık kaybı, g

m₁ = Numune içermeyen boş testin yaktıktan sonraki ağırlık kaybı, g

7. Tekrarlanabilirlik

Aynı numune için iki paraleller arasındaki fark:

- % 10’dan daha az ham selüloz kapsayan numunelerde mutlak değer olarak % 0.6’dan
- %10 ve daha fazla ham selüloz kapsayan numunelerde en yüksek sonucun % 6’sından fazla olmamalıdır.

8. Gözlemler

8.1. %10'dan fazla ham yağ içeriği olan yemlerin analizden önce petrol eteri (3.5) ile yağı alınmalıdır. süzme krozesi (4.2) ve parçaları soğuk ekstraksiyon ünitesine (4.6) bağlanır, Vakum uygulanır ve kroze içindeki kalıntılar ardı ardına üç defa 30 ml petrol eteri ile yıkanır, kalıntının kuru olduğundan emin olunmalıdır. Kroze ve parçaları ısıtma ünitesine (4.1) ve 5.1'e göre işleme devam edilir.

8.2. Petrol eteri (3.5) ile yağı alınamayan yemlerin yağı 8.1'de gösterildiği gibi alınmalı ve daha sonra kaynayan asit ile bir kez daha yağları alınmalıdır. Asitle kaynatılmasından sonra yıkama aşamasından sonra kroze ve parçaları soğuk Ekstraksiyon ünitesine (4.6) bağlanır ve üç defa 30 ml asetonla yıkamayı takiben üç defa 30 ml petrol eteri ile yıkanır. Vakum altında kuruyana kadar filtre edilir ve potasyum hidroksit işlemi ile başlayan 5'i işleme devam edilir.

8.3. Eğer yem %5'ten fazla karbonatlı (kalsiyum karbonat olarak) içeriyorsa olarak numune ile birlikte kroze (4.2) ısıtma ünitesine (4.1) bağlanır numune üç defa 30 ml hidroklorik asitle (3.6) yıkanır. Her bir eklemekten sonra numunenin süzülmeden önce bir dakika boyunca beklemesine izin verilir. 30 ml su ile bir defa yıkanır ve 5'e göre işleme devam edilir.

8.4. Stand şeklinde bir cihaz kullanılıyorsa (birçok kroze aynı ısıtma ünitesine bağlanmıştır) aynı numunenin iki paraleli aynı seri içinde analiz edilemeyecebilir.

8.5. Eğer kaynatmadan sonra asidik ve bazik çözeltileri süzmek zor ise ısıtma ünitesinin boşaltım borusundan basınçlı hava kullanılır ve süzmeye devam edilir.

8.6. Yakma işlemi için sıcaklık; cam filtre krozelere ömrünü uzatmak için 500°C'den daha yüksek olmamalıdır. Isıtma soğutma döngüleri sırasında aşırı termal şokun engellenmesi için dikkat edilmelidir.

H. Şeker Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; indirgen şeker ve inversiyondan sonra toplam şeker miktarını glukoz olarak veya gerekirse 0,95 faktörü ile çarpılarak sakkaroz olarak belirlemeyi mümkün kılar. Karma yemlere uygulanabilir. Diğer yemler için özel metotlar bulunmaktadır. Gerektiği noktada laktöz ayrı olarak ölçülür ve sonuçlar hesaplanırken dikkate alınır.

2. Prensip

Şekerler seyreltilmiş etanol ile ekstrakte edilir; Carrez I ve II çözeltileri ile berraklaştırılır. Etanolün ayrılmasından sonra, inversiyondan önceki ve sonraki miktarlar Luff-Schoorl metodu ile belirlenir.

3. Ayıraçlar

3.1. Etanol çözeltisi %40 (v/v) 20°C'de yoğunluk: 0,948 g/ml, fenoltalein ile nötrleştirilmiş.

3.2. Carrez I çözeltisi: 21,9 g çinko asetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ve 3 g glasiyel asetik asit su içinde çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.3. Carrez II çözeltisi: 10,6 g Potasyum ferro siyanür $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ su içinde çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.4. Metil oranj, % 0,1 (w/v)

3.5. Hidroklorik asit 4 mol/l

3.6. Hidroklorik asit 0,1 mol/l

3.7. Sodyum hidroksit çözeltisi 0,1 mol/l

3.8. Luff-Schoorli ayırıcı: Dikkatlice karıştırarak sodyum karbonat çözeltisinin (3.8.3) içine sitrik asit çözeltisi (3.8.2) dökülür. Bakır sülfat çözeltisi (3.8.1) eklenir ve su ile 1 litreye tamamlanır. Çökmesi için gece boyunca bekletilir ve süzülür. Elde edilen ayırıcın (Cu 0,05 mol/litre; Na_2CO_3 1 mol/l) konsantrasyonu kontrol edilir, (bakınız (5.4) son paragraf) Çözeltinin pH değeri yaklaşık olarak 9,4 olmalıdır.

3.8.1. Bakır sülfat çözeltisi: 25 g bakır sülfat (demir içermeyen); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 ml su içinde çözündürülür.

3.8.2. Sitrik asit çözeltisi: 50 g sitrik asit $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 50 ml su içinde çözündürülür.

3.8.3. Sodyum karbonat çözeltisi: 143,8 g susuz sodyum karbonat yaklaşık 300 ml ılık su içinde çözündürülür. Soğumaya bırakılır.

3.9. Sodyumtiyosülfat çözeltisi 0,1 mol/l

3.10. Nişasta çözeltisi: 5 g nişasta 30 ml su içinde çözülürler karışım 1 litre kaynayan suya eklenir. 3 dakika kaynatılır ve soğumaya bırakılır, gerekli ise 10 mg cıva iki iyodürü koruyucu olarak eklenir.

3.11. Sülfürik asit 3 mol/l

3.12. Potasyum iyodür, çözelti %30 (w/v)

3.13. Granül sünger taşı, hidroklorik asit içinde kaynatılmış, su ile yıkanmış ve kurutulmuş;

3.14. 3-metilbütan-1-ol

4. Cihazlar

Çalkalayıcı: yaklaşık 35 ile 40 rpm

5. Metot

5.1. Numune ekstraksiyonu

2,5 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır (numunenin yapısına göre numune miktarı arttırılabilir.) ve 250 ml'lik balon jojeye koyulur. 200 ml etanol (3.1) eklenir ve çalkalayıcıda bir saat karıştırılır. 5 ml Carrez I çözeltisi (3.2) eklenir ve yaklaşık 30 saniye karıştırılır. 5 ml Carrez II çözeltisi (3.3) eklenir ve tekrar bir dakika karıştırılır. Etanol (3.1) ile hacme tamamlanır, homojenize edilir ve süzülür. 200 ml süzüntü atılır ve etanolün çoğunu ayırma için edebilmek için yaklaşık olarak hacmin yarısına kadar buharlaştırılır. Buharlaştırma kalıntısı 200 ml'lik balon jojeye ılık su kullanılarak aktarılır, soğutulur, su ile hacmine tamamlanır, homojenize edilir ve eğer gerekiyorsa süzülür. Bu çözelti indirgen şekerlerin miktarını ve inversiyondan sonra ki toplam şeker miktarını belirlemekte kullanılır.

5.2. İndirgen şekerlerin belirlenmesi

Bir pipet kullanarak; glikoz olarak adlandırılan indirgen şekerlerden en fazla 60 mg içeren çözeltiden 25 ml'den fazla olmayacak şekilde alınır. Eğer gerekiyorsa saf su ile hacmi 25 ml'ye tamamlanır ve indirgen şekerin içeriği Luff-Schoorl metodu ile belirlenir. Sonuç numune içindeki glikoz içeriğinin yüzde olarak ifadesidir.

5.3. İnversiyondan sonra toplam şekerin belirlenmesi

Bir pipet kullanarak çözeltiden 50 ml alınır ve 100 ml'lik balon jojeye aktarılır. Birkaç damla metil oranj çözeltisi (3.4) eklenir daha sonra dikkatlice ve sürekli karıştırarak sıvı belirgin bir kırmızıya dönene kadar hidroklorik asit (3.5) eklenir. 15 ml hidroklorik asit (3.6) eklenir ve balon joje hızlı kaynayan su banyosuna daldırılır ve burada 30 dakika tutulur. Hızlıca 20°C'ye soğutulur ve 15 ml sodyum hidroksit çözeltisi (3.7) eklenir. Saf su ekleyerek 100 ml'ye tamamlanır ve homojenize edilir. İndirgen şekerden 60 mg'dan az olacak şekilde, 25 ml'ye kadar alınır 25 ml'den az alınmışsa saf su ile hacmi 25 ml'ye tamamlanır ve indirgen şekerin içeriği Luff-Schoorl metodu ile belirlenir. Sonuç numune içindeki glikoz içeriğinin ya da uygun olan yerde 0,95 çarpım faktörü ile sakaroz içeriğinin yüzde olarak ifadesidir.

5.4. Luff-Schoorl metodu ile titrasyon

Bir pipet kullanarak 25 ml Luff-Schoorl ayırıcı (3.8) alınır ve 300 ml erlene aktarılır; tam olarak 25 ml berrak şeker çözeltisi eklenir. 2 granül süngertaşı (3.13) eklenir, kontrollü bir ateş üzerinde elle karıştırarak ısıtılır ve sıvı yaklaşık iki dakika içinde kaynama noktasına getirilir. Erlen üzerinde yaklaşık 6 cm çapında bir delik bulunan ve altında ateş yakılmış olan asbest kaplı tel örgü üzerine hemen alınır. Alev sadece Erlenin merkezinin ısıtılacağı bir biçimde ayarlanmalıdır. Erlen bir geri soğutucuya bağlanır. Tam olarak 10 dk boyunca kaynatılır. Hemen soğuk su içinde soğutulur ve 5 dakika sonra aşağıdaki şekilde titre edilir:

10 ml potasyum iyodür çözeltisi (3.12) eklenir ve hemen arkasından 25 ml sülfürik asit (3.11) eklenir. (çok köpüklenme riskine karşı dikkat edilmelidir), Tiyo Sülfat çözeltisi (3.9) ile donuk bir sarı renk oluşana kadar titre edilir, nişasta indikatörü (3.10) eklenir ve titrasyon tamamlanır.

Kör deneme: Aynı titrasyon tam olarak ölçülen 25 ml Luff-Schoorl ayırıcı (3.8) ve 25 ml su karışımında 10 ml potasyum iyodür çözeltisi (3.12) ve 25 ml sülfürik asit (3.11) eklendikten sonra kaynatmadan tekrar edilir.

6. Sonuçların hesaplanması

Tablo kullanılarak iki titrasyon değerleri arasındaki (0,1 mol/litre konsantrasyondaki sodyum tiyo sülfat düzeyleri) farka karşılık gelen glikoz miktarının mg cinsinden bulunur. Sonuç numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

7. Özel Metotlar

7.1. Yemin melas bakımından zengin olduğu ya da yemin özellikle homojen olmadığı durumlarda, 20 g tartılır ve 500 ml saf su ile 1 litrelik balon jojeye aktarılır. Çalkalayıcıda bir saat boyunca karıştırılır. Carrez I (3.2) ve II (3.3) ayıraçları kullanılarak 5.1'e göre berraklaştırılır, ancak bu sefer her bir ayırıcının dört katı kullanılır. %80'lik etanol (v/v) ile hacmine tamamlanır.

Homojenize edilir ve süzülür. 5.1'e göre etanol ayrılır. Eğer hiç dekstrinaz nişasta bulunmuyor ise, saf su ile hacme getirilir.

7.2. Analiz yapılacak numunenin şeker bakımından zengin ve nişasta içermeyen (keçi boynuzu, kurutmuş şeker pancarı posası gibi) yem maddeleri ve melas olması durumunda, 5 g tartılır ve 250 ml'lik balon jojeye aktarılır, 200 ml saf su ilave edilir ve çalkalayıcıda bir saat, gerekirse daha fazla karıştırılır. Carrez I (3.2) ve II (3.3) ayıraçları kullanılarak 5.1'de anlatıldığı şekilde berraklaştırılır. Soğuk saf su ile hacmine tamamlanır, homojenize edilir ve süzülür. Toplam şeker miktarlarını belirlemek için 5.3'de anlatıldığı şekilde devam edilir.

8. Gözlemler

8.1. Köpüklenmeyi önlemek için Luff-Schoorl ayırıcı ile kaynatmadan önce (hacme bakılmaksızın) yaklaşık 1 ml 3-metilbütan-1-ol (3.14) eklenmesi önerilir.

8.2. İnversiyondan sonraki glikoz olarak belirtilen toplam şeker içeriği ile glikoz olarak belirtilen indirgen şeker miktarı arasındaki fark 0,95 ile çarpıldığında sakaroz içeriğinin yüzdesini verir.

8.3. Laktoz dışında, indirgen şeker içeriğinin belirlenmesi için iki metot uygulanabilir:

8.3.1. Yaklaşık bir hesaplama için, farklı bir analiz metodu ile bulunmuş laktoz içeriği 0,675 ile çarpılır ve elde edilen sonuç indirgen şeker içeriğinden çıkarılır.

8.3.2. Laktoz dışındaki indirgen şekerin doğru bir şekilde hesaplanması için aynı numune iki nihai belirleme için kullanılmadır. Analizlerden biri 5.1’de ifade edilen çözelti kullanılarak, diğeri; bu amaç için belirlenmiş metotla (diğer tür şekerler fermente edilerek ve berraklaştırılarak) laktoz belirlenmesi sırasında elde edilen çözelti kullanılarak gerçekleştirilir. Her iki durumda da var olan şeker miktarı Luff-Schoorl metodu ile belirlenir ve mg glikoz olarak hesaplanır. Bu değerlerden biri diğerinden çıkarılır ve fark numunenin yüzdesi olarak belirtilir.

Örnek:

Her bir belirleme için alınan iki hacim 250 mg’lık numuneye karşılık gelir. Bu ilk durumda 17 ml sodyum tiyosülfat çözeltisi (0,1 mol/l’lik) kullanılan 44,2 mg glikoza; ikincisinde 11 ml’si; 27,6 mg glikoza karşılık gelmektedir. Aradaki fark 16,6 mg glikozdur.

Glikoz olarak hesaplanan indirgen şeker içeriği (laktoz hariç) şöyledir:

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

25 ml Luff-Schoorl ayırıcı için değerler tablosu

ml Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l, iki dakika ısıtma, 10 dakika kaynatma

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glikoz, fruktoz invert şekerler C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoz C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltoz C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	Fark	mg	Fark	mg	Fark	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

I- Laktoz Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; % 0,5'ten fazla laktoz içeren yemlerdeki laktoz seviyesini belirlemeyi mümkün kılar.

2. Prensiptir

Şekerler su içinde çözülür. Çözeltili; laktozu parçalanmadan koruyan *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile fermantasyona tabi tutulur. Berraklaştırma ve süzme işleminden sonra; süzüntüdeki laktoz içeriği Luff-Schoorl metodu ile belirlenir.

3. Ayırıcılar

3.1. *Saccharomyces cerevisiae* süspansiyonu: 25 g taze maya 100 ml saf su içinde süspanse edilir. Süspansiyon buzdolabı içinde en fazla bir hafta süre ile saklanmalıdır.

3.2. Carrez I çözeltisi : 21,9 g çinko asetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ve 3 g glasiyal asetik asidi saf su içinde çözündürülür. Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.3. Carrez çözeltisi II: 10,6 g potasyum demir siyanür $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ saf su içinde çözündürülür. Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.4. Luff-Schoorl ayırıcı:

Sodyum karbonat çözeltisinin (3.4.3) içine dikkatlice karıştırılarak sitrik asit çözeltisi (3.4.2) dökülür. Bakır sülfat çözeltisi (3.4.1) eklenir ve saf su ile 1 litreye tamamlanır. Çökmesi için gece boyunca bekletilir ve süzülür. Elde edilen ayırıcı (Cu 0,05 mol/litre; Na_2CO_3 1 mol/litre) konsantrasyonu kontrol edilir. Çözeltinin pH değeri yaklaşık 9,4 olmalıdır.

3.4.1. Bakır sülfat çözeltisi: 25 g bakır sülfatı, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (demir içermeyen), 100 ml su içinde çözündürülür.

3.4.2. Sitrik asit çözeltisi: 50 g sitrik asit $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 50 ml su içinde çözündürülür.

3.4.3. Sodyum karbonat çözeltisi: 143,8 g susuz sodyum karbonat yaklaşık 300 ml ılık su içinde çözündürülür. Soğumaya bırakılır.

3.5. Granül sünger taşı, hidroklorik asit içinde kaynatılmış, su içinde yıkanmış ve kurutulmuş.

3.6. Potasyum iyodür, %30'luk çözelti (w/v)

3.7. Sülfürik asit, 3 mol/l

3.8. Sodyumtiyosülfat çözeltisi 0,1 mol/l

3.9. Nişasta çözeltisi: 5 g nişasta 30 ml saf su içinde çözündürülür, karışım 1 litre kaynayan suya eklenir. Üç dakika kaynatılır ve soğumaya bırakılır, gerekli ise 10 mg cıva iki iyodürü koruyucu olarak eklenir.

4. Cihazlar

Su banyosu, 38 - 40 °C'ye ayarlanmış termostatlı

5. Metot

1 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 100 ml'lik balon jojeye aktarılır. 25 - 30 ml saf su eklenir. Balon joje 30 dakika kaynayan su banyosunda bekletilir ve sonra yaklaşık 35 °C'ye soğutulur. 5 ml maya süspansiyonu (3.1) eklenir ve homojenize edilir. Balon joje 38 - 40 °C'deki su banyosunda iki saat süreyle bırakılır. Yaklaşık 20 °C'ye soğutulur.

2,5 ml Carrez I çözeltisi (3.2) eklenir ve yaklaşık 30 saniye karıştırılır, daha sonra 2,5 ml Carrez II çözeltisi (3.3) eklenir ve tekrar 30 saniye karıştırılır. Saf su ile 100 ml hacme tamamlanır, karıştırılır ve süzülür. Bir pipet kullanılarak; tercihen süzüntüden 40 ila 80 mg laktoz içerebilecek ve süzüntüden 25 ml'den fazla olmayacak şekilde bir miktar alınır ve 300 ml hacminde bir Erlene aktarılır. Eğer gerekiyorsa su ile hacmi 25 ml'ye tamamlanır (Alınan hacim 25 ml'den az ise).

5 ml maya süspansiyonu (3.1) ile aynı şekilde bir boş test gerçekleştirilir. Laktoz içeriğini Luff-Schoorl'a göre şu şekilde belirlenir: tam olarak 25 ml Luff-Schoorl ayırıcı (3.4) iki granül süngertaşı (3.5) eklenir. Orta yükseklikteki bir serbest ateş üzerinde elle karıştırılarak ısıtılır ve sıvı yaklaşık iki dakika içinde kaynama seviyesine getirilir. Erlene, üzerinde yaklaşık 6 cm çapında bir delik bulunan ve altında ateş yakılmış olan asbest kaplı tel örgü üzerine hemen alınır. Alev sadece Erlenin merkezinin ısıtılacağı bir biçimde ayarlanmalıdır. Bir geri soğutucu Erlene balonuna takılır. Tam olarak 10 dk boyunca kaynatılır. Hemen soğuk su içinde soğutulur ve daha sonra 5 dakikalık titrasyon aşağıdaki şekilde yapılır; 10 ml potasyum

iyodür çözeltisi (3.6) eklenir ve hemen arkasından 25 ml sülfürik asit (3.7) eklenir. (çok köpüklenme riskine karşı dikkatli olunmalıdır), Tiyosülfat çözeltisi (3.8) ile donuk bir sarı renk oluşana kadar titre edilir, nişasta ayırıcı (3.9) eklenir ve titrasyon tamamlanır.

Kör deneme: Aynı titrasyon tam olarak ölçülen 25 ml Luff-Schoorl ayırıcı (3.8) ve 25 ml su karışımında 10 ml potasyum iyodür çözeltisi (3.12) ve 25 ml sülfürik asit (3.11) eklendikten sonra kaynatmadan tekrar edilir.

6. Sonuçların hesaplanması

Tablo kullanılarak; mg olarak sodyum tiyosülfat 0,1 mol/litre ifade edilen, iki titrasyon değerleri arasındaki farka karşılık gelen laktoz miktarının mg cinsinden değeri oluşturulur. Susuz laktozun sonucu, örneğin yüzdesi değerinden ifade edilir.

7. Gözlemler

% 40'tan daha fazla fermente edilebilir şeker içeren ürünler için 5 ml'den daha fazla maya süspansiyonu (3.1) kullanılır.

25 ml Luff-Schoorl ayırıcı için değerler tablosu

ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/litre, iki dakika ısıtma, 10 dakika kaynatma

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l	Glikoz, fruktoz invert şekerler $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Laktoz $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Maltoz $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l
--	---	---	---	--

ml	mg	Fark	mg	Fark	mg	Fark	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

İ. Nişasta Tayini

Polarimetrik Metot

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; nişasta seviyelerini ve yüksek moleküler ağırlıklı nişasta bozulmuş ürünlerinin seviyelerini beyan edilen enerji değerleri (EK-7 içindeki hükümler) ile uyuşup uyuşmadığını kontrol edebilmek için kullanılır.

2. Prensiptir

Bu metot; iki aşamayı kapsamaktadır. İlkinde; numune seyreltilmiş hidroklorik asit ile işleme tabi tutulur. Berraklaştırma ve filtrelemeden sonra çözeltinin optik sapması polarimetre ile ölçülür. İkincisinde, numune % 40 etanol ile ekstrakte edilir. Süzüntü hidroklorik asit ile asitleştirilmesinden sonra, berraklaştırma ve filtreleme ile çözeltinin optik rotasyonu ilkindeki gibi belirlenir. Bilinen bir faktörle çarpılan iki ölçüm arasındaki fark örneğin nişasta içeriğini verir.

3. Ayrıracılar

3.1. Hidroklorik asit, çözeltisi %25 (w/w) yoğunluk: 1,126 g/ml

3.2. Hidroklorik asit, çözeltisi %1,13 (w/v)

Yoğunluk; %94 (v/v) etanol içindeki %0,1 (w/v) metil kırmızı varlığı ile 0,1 mol/l sodyum hidroksit çözeltisi kullanılarak titrasyon ile kontrol edilmelidir. 10 ml'nin nötrleştirilmesi için 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l gerekmektedir.

3.3. Carrez I çözeltisi: 21,9 g çinko asetat $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ve 3 g saf asetik asit su içinde çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.4. Carrez II çözeltisi: 10,6 g demir siyanür $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ su içinde çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.5. Etanol, çözelti % 40 (v/v), 20°C'de yoğunluk: 0,948 g/ml

4. Cihazlar

4.1. Geri soğutucu ve 250 ml şilifli Erlen

4.2. Polarimetre ya da sakarimetre

5. Metot

5.1. Örneğin hazırlanması

Örnek 0,5 mm yuvarlak delikli elekten geçebilecek inceliğe gelene kadar öğütülür.

5.2. Toplam optik sapma belirlenmesi (P ya da S) (bakınız gözlem 7.1)

1 mg hassasiyetle 2,5 g öğütülmüş örnek tartılır ve bu numune 100 ml'lik bir balon jojeye yerleştirilir. 25 ml hidroklorik asit (3.2) eklenir, test örneğinin homojen dağılımı sağlanana kadar çalkalanır ve bir 25 ml daha hidroklorik asit (3.2) eklenir. Balon kuvvetlice çalkalanarak kaynayan suyun içine daldırılır ve ilk üç dakika boyunca topaklanma oluşumunu önlemek için devam edilir. Su banyosundaki su miktarı balonun içine daldırıldığında kaynamanın devam etmesine yeterli olmalıdır. Çalkalanması sırasında balon; banyodan çıkarılmamalıdır. Tam olarak 15 dakika sonra, banyodan çıkarılır, 30 ml soğuk su eklenir ve hemen 20 °C'ye soğutulur. 5 ml Carrez I çözeltisi (3.3) eklenir ve yaklaşık 30 saniye boyunca çalkalanır. Daha sonra, 5 ml Carrez II çözeltisi (3.4) eklenir ve tekrar 30 saniye boyunca çalkalanır. Su ekleyerek hacme getirilir, karıştırılır ve filtre edilir. Eğer filtrat tam olarak berrak değilse (nadir bir durumdur) belirlemeyi, daha fazla miktar Carrez çözeltisi I ve II kullanarak tekrarlanır, (örneğin 10 ml). Çözeltinin optik sapması 200 mm'lik tüpte polarimetre ya da sakarimetre ile ölçülür.

5.3. %40 etanol içinde çözülebilen maddelerin optik sapmasının (P' ya da S') belirlenmesi

1mg hassasiyetle 5 g örnek tartılır. 100 ml lik balon joje içine alınır ve yaklaşık 80 ml etanol (3.5) eklenir. (bakınız gözlem (7.2)) Balon 1 saat boyunca oda sıcaklığında bırakılır; bu süre esnasında, altı kez daha kuvvetlice çalkalanır, böylece test örneği etanol ile iyice karışması sağlanır. Etanol (3.5) ekleyerek hacme getirilir, karıştırılır ve filtre edilir. Bir pipet kullanarak 50 ml filtrat (2,5 g örneğe karşılık gelir) 250 ml erlene alınır. 2,1 ml hidroklorik asit (3.1) eklenir ve kuvvetlice çalkalanır. Geri soğutucu erlene bağlanır ve kaynayan su banyosuna daldırılır. Tam olarak 15 dakika sonra erlen banyodan çıkarılır. İçerik, 100 ml'lik balon jojeye bir parça soğuk su ile çalkalayarak aktarılır ve 20 °C'ye soğutulur.

Carrez çözeltisi I (3.3) ve II (3.4) kullanarak berraklaştırılır, su ekleyerek hacme tamamlanır, karıştırılır, filtre edilir ve 5.2'nin ikinci ve üçüncü paragraflarında belirtildiği gibi optik sapmasını ölçülür.

6. Sonuçların hesaplanması

Nişasta içeriği (%) aşağıdaki gibi hesaplanır:

6.1. Polarimetre ile hesaplanma:

$$\text{Nişasta içeriği (\%)} = \frac{2000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = Derece cinsinden toplam optik sapma

P' = %40 etanol (v/v) içinde çözülebilen maddelerin derece cinsinden toplam optik sapma

$[\alpha]_D^{20}$ = Saf nişastanın özgül optik sapması Bu faktör için konvansiyonel olarak kabul edilen değerler aşağıdaki gibidir:

- + 185,9°: Pirinç nişastası
- + 185,7°: Patates nişastası
- + 184,6°: Mısır nişastası
- + 182,7°: Buğday nişastası
- + 181,5°: Arpa nişastası
- + 181,3°: Yulaf nişastası
- + 184,0°: Diğer tür nişastalar ve karma yemlerdeki nişasta karışımları

6.2. Sakarimetre ile hesaplama

$$\text{Nişasta içeriği (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

S = Sakarimetre derecelerinde toplam optik sapma

S' = %40 etanol (v/v) içinde çözülebilen maddelerin sakarimetre derecelerinde toplam optik sapması
N = 200 mm tüp kullanarak ölçüm yapıldığında 100 sakarimetre derecelik bir optik sapma yaratan 100 ml su içindeki sakaroz ağırlığı (g)
Fransız sakarimetreleri için 16,29 g
Alman sakarimetreleri için 26,00 g
Karışık sakarimetreler için 20,00 g.

$[\alpha]_D^{20}$ = Saf nişastanın özgül optik sapması (bakınız 6.1)

6.3. Tekrarlanabilirlik

Aynı numune üzerinden elde edilen iki paralel ölçümün sonuçları arasındaki fark nişasta içeriği %40'tan az olanlar için mutlak değer olarak 0,4'ü ve nişasta içeriği %40'a eşit ya da daha fazla olanlar için göreceli değer olarak %1'i aşmamalıdır.

7. Gözlemler

7.1. Eğer numune % 6'dan fazla karbonat içeriyorsa, kalsiyum karbonat olarak hesaplanmalı. Toplam optik sapma hesaplanmadan önce karbonatlar uygun miktarda seyreltilmiş sülfürik asitle işlenerek parçalanmalıdır.

7.2. Süt tozu serumu ya da yağı alınmış süt tozu gibi laktoz içeriği yüksek ürünler için, 80 ml etanol (3.5) ekledikten sonra aşağıdaki gibi ilerlenir. Geri soğutucu balona tutturulur ve 30 dakika boyunca 50°C'deki su banyosuna daldırılır. Soğumaya bırakılır ve 5.3'te belirtildiği gibi analiz edilir.

7.3. Yem içinde aşağıda belirtilen materyaller önemli miktarda olduğu zaman nişastanın polarimetrik metot ile belirlenmesi sırasında etkileşim yaratmaları ile bilinirler bu da yanlış sonuçlar ortaya çıkmasına sebep olabilir.

- Şeker pancarı ürünleri şeker pancarı pulpu gibi posası, pancar kökünden elde edilen, melas,
- Pancar şırası, (pancar) şekeri gibi (şeker) pancar ürünleri
- Turunçgil posası,
- Keten tohumu; keten tohumu expeller küspesi; keten tohumu ekstraksiyon küspesi,
- Kolza tohumu; kolza tohumu expeller küspesi; kolza tohumu ekstraksiyon küspesi; kolza tohumu kabukları,
- Ayçiçeği tohumu; ayçiçeği tohumu expeller küspesi; kısmen kabuğu soyulmuş ayçiçeği tohumu ekstraksiyon küspesi,
- Kopra (Hindistan Cevizi içi) expeller küspesi; kopra (Hindistan Cevizi içi) ekstraksiyon küspesi,
- Patates posası,
- Kurutulmuş maya,
- İnulin açısından zengin ürünler (yerelması talaşı ve unu gibi),
- Don yağı tortusu.

J. Ham Kül Tayini

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot; yemdeki ham kül içeriğinin tayinini mümkün kılar.

2. Prensip

Numune 550°C'de küllenir; kalıntı tartılır.

3. Ayıraçlar

Amonyum nitrat, %20 (w/v) çözelti

4. Cihaz

4.1. Isıtıcı plaka

4.2. Elektrikli, termostatlı kül fırını

4.3. Küllendirme için dikdörtgen (yaklaşık 60 × 40 × 25 mm) ya da dairesel (çap: 60 ila 75 mm, yükseklik: 20 ila 40 mm) formda silis, porselen ya da platin kroze.

5. Metot

Yaklaşık 5 g numune (şişme eğilimi olan ürünlerde 2,5 g) yaklaşık olarak 1 mg hassasiyetinde 550°C'de ısıtılmış, soğutulmuş ve darası alınmış bir küllendirme krozesine tartılır. Kroze sıcak plakaya konur ve madde karbonize olana kadar dereceli olarak ısıtılır 5.1 ya da 5.2'ye göre küllenir.

5.1. Kroze, 550°C'ye ayarlanmış ve kalibre edilmiş kül fırınına konur. Bu sıcaklık, görünürde karbonlu partiküller içermeyen beyaz, açık gri ya da kırmızımsı bir kül elde edilene kadar tutulur. Kroze bir desikatöre yerleştirilir, soğumaya bırakılır ve hemen tartılır.

5.2. Kroze, kalibre edilmiş 550°C'deki kül fırınına konur. 3 saat boyunca küllendirilir. Kroze bir desikatöre yerleştirilir, soğumaya bırakılır ve hemen tartılır. Kül ağırlığının sabit olduğundan emin olmak için 30 dakika daha küllendirilir (iki ardışık tartım arasındaki ağırlık kaybı 1 mg'a eşit ya da daha az olmalıdır).

6. Sonuçların hesaplanması

Darayı düşerek kalıntının ağırlığı hesaplanır. Sonuçları numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

7. Gözlemler

7.1. Küllenmesi zor maddelerin külü en az üç saat boyunca bir ilk küllendirme işlemine tabi tutulmalı, soğutulmalı ve ardından birkaç damla %20 amonyum nitrat çözeltisi ya da su eklenmelidir(bu işlem, külün dağılmasını ya da yumru oluşmasını önlemek için dikkatle yapılmalıdır). Fırında kuruttuktan sonra kalsine etme işlemine devam edilir. Küllenme tamamlanana kadar işlem gereken sayıda yinelenir.

7.2. 7.1 altında anlatılan işleme dirençli maddeler olması halinde aşağıdaki işlemler yapılır: Üç saat küllendirdikten sonra, kül sıcak suya konur ve küçük, kül içermeyen bir filtre ile filtrelendir. Filtre ve orijinal krozedeki içerik küllenir. Süzüntü soğutulmuş darası alınmış bir kroze konur, kuruyana kadar buharlaştırılır, küllendirilir ve tartılır. Sonuç hesaplanıp esas kül sonucuna eklenir.

7.3. Sıvı yağlar ya da yağlar'da tam olarak 25 g numuneyi uygun boyutlu bir kroze tartılır. Kül içermeyen bir filtre kâğıdı şeridi ile maddeye ışık tutarak karbonize edilir. Yanma sonrasında, olabildiğince az su ile nemlendirilir. Kurutulur ve madde 5'te anlatılan şekilde küllenir.

K. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Tayini

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot yemde yer alan, hidroklorik asit içinde çözünmeyen mineral maddelerin tayinini mümkün kılar. Numunenin doğasına göre iki metot kullanılabilir.

1.1. Metot A: Organik yem ham maddeleri ve çoğu karma yem için geçerlidir.

1.2. Metot B: Mineral bileşikler ve karışımların yanı sıra Metot A ile tayin edilen hidroklorik asit içinde çözünmeyen madde içeriği %1'den büyük olan karma yemler için geçerlidir.

2. Prensip

2.1. Metot A: Numune küllenir, kül hidroklorik asit içinde kaynatılır ve çözünmeyen kalıntı filtrelendir, kurutulup, yakılıp tartılır.

2.2. Metot B: Hidroklorik asitle işlem görmüş numune. Çözelti filtre edilir, kalıntı küllenir ve bu sayede Metot A'ya uygun şekilde işlem görmüş kül elde edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Hidroklorik asit 3 mol/l

3.2. Trikloroasetik asit, %20 (w/v) çözelti

3.3. Trikloroasetik asit, %1 (w/v) çözelti

4. Cihaz

4.1. Isıtıcı plaka

4.2. Elektrikli, termostatlı kül fırını

4.3. Küllendirme için dikdörtgen (yaklaşık 60 × 40 × 25 mm) ya da dairesel (çap: 60 ile 75 mm, yükseklik: 20 ile 40 mm) formda silis, porselen ya da platinden üretilen kroze

5. Metot

5.1. Metot A:

Numune ham kül tayini için anlatılan metot kullanarak küllendirilir. Ayrıca bu analizden elde edilen kül de kullanılabilir.

Kül, 75 ml hidroklorik asit (3.1) kullanarak 250 ila 400 ml'lik bir behere konur. Yavaş yavaş kaynama noktasına getirilir ve 15 dakika hafifçe kaynatılır. Sıcak çözelti kül içermeyen bir filtre kâğıdıyla süzülür ve kalıntı, asit reaksiyonu görünmez hale gelene kadar sıcak su ile yıkanır. Kalıntı içeren filtre kurutulur ve darası alınmış bir kroze içinde en az 550°C ve en fazla 700°C sıcaklıkta 30 dakika küllenir. Bir desikatörde kurutulur ve tartılır.

5.2. Metot B:

5 g numune yaklaşık 1 mg hassasiyetle tartılır ve 250 ila 400 ml'lik bir behere konur. 25 ml su ve 25 ml hidroklorik asit (3.1) art arda eklenir, karıştırılır ve köpürmenin durması beklenir. 50 ml daha hidroklorik asit (3.1) eklenir. Tüm gazların açığa çıkışının durmasını beklenir ardından beheri kaynayan su banyosuna yerleştirilir ve olası tüm nişastanın hidrolize olması için en az 30 dakika ya da daha uzun süre bekletilir.

Sıcakken kül içermeyen bir filtreden süzülür ve filtre 50 ml sıcak su ile yıkanır (bakınız gözlem 7). Kalıntı içeren filtre bir küllendirme krozesine konur, kurutulur ve en az 550°C ve en fazla 700°C sıcaklıkta 3 saat küllendirilir. Kül, 75 ml hidroklorik asit (3.1) kullanılarak 250 ila 400 ml'lik bir behere konur; 5.1 maddesinin ikinci alt paragrafından anlatılan şekilde devam edilir.

6. Sonuçların hesaplanması

Dara düşülerek kalıntının ağırlığı hesaplanır. Sonuçlar numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

7. Gözlem

Filtrasyon işlemi zorsa, yeni bir analiz numunesi hazırlanarak 50 ml hidroklorik asit (3.1) yerine 50 ml %20 trikloroasetik asit (3.2) ile değiştirerek ve filtreyi sıcak bir %1 trikloroasetik asit (3.3) çözeltisi ile yıkayarak analiz yeniden başlanır.

L. Karbonatların Tayini

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot, çoğu yemde genelde kalsiyum karbonat olarak ifade edilen karbonatların tayinini mümkün kılar. Ancak belirli durumlarda (örneğin demir karbonatla) özel bir metot kullanılmalıdır.

2. Prensipte

Karbonatlar hidroklorik asitte bozunur; açığa çıkan karbon dioksit derecelendirilmiş bir tüpte toplanır ve hacmi, aynı koşullar altında açığa çıkan bilinen miktardaki kalsiyum karbonat ile karşılaştırılır.

3. Ayıraçlar

3.1. Hidroklorik asit, 1,10 g/ml yoğunluğunda

3.2. Kalsiyum karbonat

3.3. Sülfürik asit, yaklaşık 0,05 mol/litre, metil kırmızısı ile renklendirilmiş

4. Cihaz

Scheibler-Dietrich cihazı (bkz. diyagram) ya da eşdeğeri bir cihaz

5. Metot

Numunenin karbonat içeriğine göre numune aşağıda gösterildiği gibi tartılır:

— %50 ila %100 kalsiyum karbonat olarak ifade edilen karbonat içeren ürünlerde 0,5 g,

— %40 ila %50 kalsiyum karbonat olarak ifade edilen karbonat içeren ürünlerde 1 g,

— diğer ürünlerde 2 ila 3 g.

Tartılan numune, cihazın kırılmaz bir malzemeden üretilen küçük bir tüp takılmış ve 10 ml hidroklorik asit (3.1) içeren özel şişesine (4) konur ve balon joje cihaza bağlanır. Üç yönlü musluk (5) tüpü (1) dışarıya bağlanacak şekilde çevrilir. Renklendirilmiş sülfürik asit doldurulmuş (3.3) ve derecelendirilmiş tüpe (1) bağlanmış hareketli tüpü (2) kullanarak sıvı seviyesi sıfır işaretine kadar getirilir. Musluk, (1) ve (3) tüpleri bağlayacak şekilde çevrilir ve seviyenin sıfırda olduğu kontrol edilir.

Balon joje (4) eğilerek hidroklorik asit (3.1) yavaşça numuneye akıtılır. Tüp (2) alçaltılarak basınç eşitlenir. Karbon dioksitin açığa çıkması tamamen durana kadar balon joje (4) çalkalanır.

Sıvı (1) ve (2) tüpleride aynı seviyeye getirilerek yeniden basınç oluşturulur. Birkaç dakika sonra, gaz hacmi sabit olduğunda değeri okunur. Aynı koşullarda 0,5 g kalsiyum karbonat (3.2) ile bir kontrol testi yapılır.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalsiyum karbonat olarak ifade edilen karbonat içeriği aşağıdaki formülle hesaplanır:

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

burada:

X = Numune içinde kalsiyum karbonat olarak ifade edilen karbonat %'si (w/w)

V = Numuneden açığa çıkan CO₂'nin ml cinsinden hacmi
V₁ = 0,5 g CaCO₃'ten açığa çıkan CO₂'nin ml cinsinden hacmi
m = Numunenin gram cinsinden ağırlığı

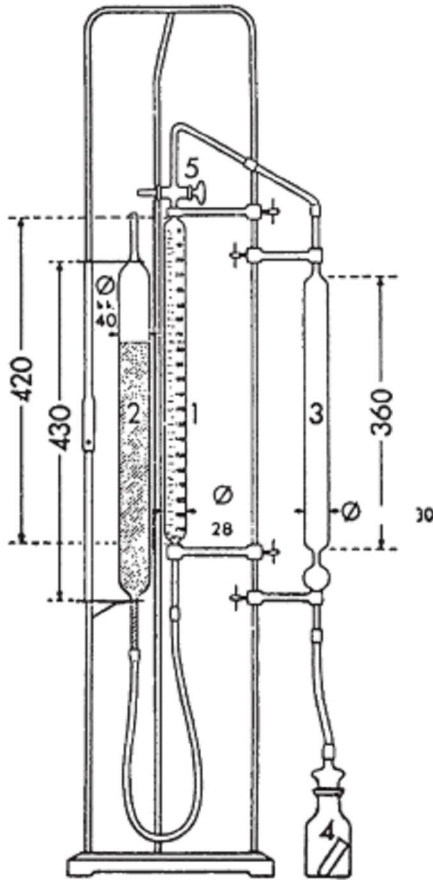
ifade eder.

7. Gözlemler

7.1. Numune 2 g'dan fazla tartıldığında, önce 15 ml damıtılmış su cam malzemeye (4) konur ve teste başlamadan önce karıştırılır. Kontrol testi için aynı hacimde su kullanılır.

7.2. Kullanılana cihazın Scheibler-Dietrich cihazından farklı bir hacmi varsa, numuneden ve kontrol maddesinden alınan miktarlar ile sonuçların hesaplanması, uygun şekilde ayarlanmalıdır.

SCHEIBER-DEITRICH CO₂ TAYİN CİHAZI



(ölçüler mm cinsinden verilmiştir)

M. Toplam fosfor tayini

Fotometrik Metot

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot, yemdeki toplam fosfor içeriğinin tayinini mümkün kılar. Özellikle fosfor içeriği düşük ürünlerin analizi için uygundur. Belirli durumlarda (fosfor açısından zengin ürünler), gravimetrik bir metot da kullanılabilir.

2. Prensip

Numune, kuru yanma (organik yemde) ya da asitle parçalama (mineral bileşikler ve sıvı yemde) yoluyla mineraleştirilir ve bir asit çözeltisinin içinde koyulur. Çözelti, molibdovanadat reaktifi ile işleme tabi tutulur. Bu şekilde oluşan sarı çözeltinin optik yoğunluğu 430 nm'de spektrofotometre ile ölçülür.

3. Ayıraçlar

3.1. Kalsiyum karbonat.

3.2. Hidroklorik asit, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (yaklaşık 6 mol/l)

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

3.4. Nitrik asit, $\rho_{20} = 1,38$ ila $1,42$ g/ml

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

3.6. Molibdovanadat ayırıcı: 200 ml amonyum heptamolibdat çözeltisi (3.6.1), 200 ml amonyum monovanadat çözeltisi (3.6.2) ve 134 ml nitrik asit (3.4) 1 litrelik balon jojede karıştırılır. Su ile gereken hacme tamamlanır.

3.6.1. Amonyum heptamolibdat çözeltisi: Sıcak su içinde 100 g amonyum heptamolibdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) çözündürülür. 10 ml amonyak (0,91 g/ml yoğunluğunda) eklenir ve su ile 1 litreye tamamlanır.

3.6.2. Amonyum monovanadat çözeltisi: 2,35 g amonyum monovanadat NH_4VO_3 , 400 ml sıcak suda çözündürülür. Sürekli karıştırılırken, yavaşça 20 ml seyreltik nitrik asit (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) eklenir ve su ile 1 litreye tamamlanır.

3.7. 1 mg/ml fosfor standart çözeltisi: 4,387 g potasyum dihidrojen fosfat KH_2PO_4 suda çözündürülür. Su ile 1 litreye tamamlanır.

4. Cihaz

4.1. Silis, porselen ya da platin küllendirme krozeleri

4.2. Elektrikli, 550°C 'ye ayarlanmış termostatl kıl fırını

4.3. 250 ml'lik Kjeldahl şişesi

4.4. Balon joje ve hassas pipetler

4.5. Spektrofotometre

4.6. Yaklaşık 16 mm çapında, 14,5 mm çapında tapalı ve 25 ila 30 ml kapasiteli test tüpleri

5. Metot

5.1. Çözeltinin hazırlanması

Numunenin doğasına göre 5.1.1 ya da 5.1.2'de anlatılan şekilde bir çözelti hazırlanır.

5.1.1. Genel Metot

1 g ya da daha fazla numune 1 mg hassasiyetle tartılır. Test numunesi bir Kjeldahl şişesine konur, 20 ml sülfürik asit (3.5) eklenir, madde tamamen asitle ısıtmak ve şişenin yanlarına yapışmasını önlemek için çalkalanır, ısıtılır ve 10 dakika boyunca kaynama noktasında tutulur. Biraz soğumaya bırakılır, 2 ml nitrik asit (3.4) eklenir, hafifçe ısıtılır, biraz soğumaya bırakılır, biraz daha nitrik asit (3.4) eklenir ve yeniden kaynama noktasına getirilir. Renksiz bir çözelti elde edilene kadar bu metot yinelenir. Soğutulur, biraz su ekleyip, sıvı 500 ml'lik balon jojeye aktarılır, Kjeldahl şişesi sıcak su ile çalkalanır. Soğumaya bırakılır, su ile gereken hacme tamamlanır, homojenleştirilir ve filtre edilir.

5.1.2. Organik maddeler içeren, kalsiyum ve magnezyum dihidrojen fosfatları içermeyen numuneler:

2,5 g numune en yakın 1 mg hassasiyetle bir küllendirme krozesine konur. Test numunesi, tamamen karışana kadar 1 g kalsiyum karbonat (3.1) ile karıştırılır. Beyaz ya da gri kül elde edilene kadar 550°C fırında küllendirilir (bir miktar kömür sorun oluşturmaz). Kül, 250 ml'lik bir behere aktarılır. Köpürme durana kadar 20 ml su ve hidroklorik asit (3.2) eklenir. 10 ml daha hidroklorik asit (3.2) eklenir. Beher bir kum banyosuna konur ve çözünmeyen silika oluşturarak kuruyana kadar buharlaştırılır. Kalıntı 10 ml nitrik asitte (3.3) yeniden çözündürülür ve kum banyosunda ya da ısıtıcı plakada 5 dakika boyunca kuruyana kadar buharlaştırmadan kaynatılır. Sıvı 500 ml'lik balon jojeye boşaltılır, beher birkaç kez sıcak su ile durulanır. Soğumaya bırakılır, su ile gereken hacme tamamlanır, homojenleştirilir ve filtrelendir.

5.2. Renk oluşumu ve optik yoğunluğun ölçümü

5.1.1 ya da 5.1.2 ile elde edilen filtratın temsili bir miktarı, en fazla $40 \mu\text{g/ml}$ 'lik bir fosfor konsantrasyonu elde etmek için seyreltilir. Bu çözeltinin 10 ml'si bir test tüpüne (4.6) konur ve 10 ml molibdovanadat ayırıcı (3.6) eklenir.

Homojenleştirilir ve 20°C 'de en az 10 dakika boyunca bekletilir. 10 ml suya 10 ml molibdovanadat ayırıcı (3.6) eklenerek elde edilen bir çözeltiye karşılık 430 nm 'de bir spektrofotometre ile optik yoğunluk ölçülür.

5.3. Kalibrasyon eğrisi

Standart çözeltiden (3.7), sırasıyla 5, 10, 20, 30 ve $40 \mu\text{g/ml}$ fosfor içeren çözeltiler hazırlanır. Bu çözeltilerin her birinden 10 ml alınır ve ilaveten 10 ml molibdovanadat ayırıcı (3.6) eklenir. Homojenleştirilir ve 20°C 'de en az 10 dakika boyunca bekletilir. Optik yoğunluk 5.2'de belirtildiği gibi ölçülür. Karşılık gelen fosfor miktarlarına göre optik yoğunlukları çizerek kalibrasyon eğrisi çizilir. 0 ile $40 \mu\text{g/ml}$ arasındaki konsantrasyonlarda eğri doğrusal olacaktır.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon eğrisini kullanılarak test numunesindeki fosfor miktarını tayin edilir. Sonuçları numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki farkı aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

- %5'ten az fosfor içeriği için daha yüksek sonuca bağlı %3
- %5 ve daha fazla fosfor içeriği için mutlak değer olarak %0,15.

N. Suda Çözünebilen Klorür İçeriğinin Tayini

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot; yemlerde sodyum klorür olarak suda çözünebilen klorür tayinini mümkün kılar. Tüm yemler için geçerlidir.

2. Prensip

Klorürler suda çözünür. Ürün organik madde içeriyorsa berraklaştırılır. Çözelti nitrik asitle biraz asitleştirilir ve klorürler, gümüş nitrat çözeltisi ile gümüş klorür formunda çöktürülür. Gümüş nitratin fazlası amonyum tiyosiyanat çözeltisi ile Volhard metoduna göre titre edilir.

3. Ayırıcılar

- 3.1. 0,1 mol/l'lik amonyum tiyosiyanat çözeltisi
- 3.2. 0,1 mol/l'lik gümüş nitrat çözeltisi
- 3.3. Doymuş amonyum demir sülfat $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ çözeltisi
- 3.4. Nitrik asit, yoğunluk: 1,38 g/ml
- 3.5. Dietil eter
- 3.6. Aseton
- 3.7. Carrez I çözeltisi: Su içinde 21,9 g çinko asetat $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 3 g glasiyal asetik asit çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- 3.8. Carrez II çözeltisi: Su içinde 10,6 g potasyum ferrosiyaniid $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözündürülür. Su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- 3.9. Aktif karbon (klorür içermeyen ve klorürleri absorbe etmeyen).

4. Cihaz

Karıştırıcı (çalkalayıcı): yaklaşık 35 ila 40 rpm

5. Metot

5.1. Çözeltinin hazırlanması

Numunenin yapısına göre 5.1.1, 5.1.2 ya da 5.1.3'te gösterilen şekilde bir çözelti hazırlanır. Aynı zamanda analiz edilecek numuneyi içermeyen bir kör testi gerçekleştirilir.

5.1.1. Organik madde içermeyen numuneler

En fazla 10 g ağırlığında ve klorür formunda en fazla 3 g klor içeren numune 1 mg hassasiyetle tartılır. Yaklaşık 20°C'deki 400 ml su ile birlikte 500 ml'lik bir balon jojeye konur. Karıştırıcıda 30 dakika karıştırılır, hacmine tamamlanır, homojenleştirilir ve süzülür.

5.1.2. 5.1.3'te listelenenler dışındaki organik maddeleri içeren numuneler

Yaklaşık 5 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 1 g aktif karbon (3.4) ile 500 ml'lik balon jojeye konur. Yaklaşık 20°C'deki 400 ml su ve 5 ml Carrez I çözeltisi (3.7) eklenip, 30 saniye karıştırılır, ardından 5 ml Carrez II çözeltisi (3.8) eklenir. Karıştırıcıda 30 dakika karıştırılır, hacmine tamamlanır, homojenleştirilir ve süzülür.

5.1.3. Pişirilmiş yem, keten tohumu küspesi ve unu, keten tohumu unu açısından zengin ürünler ve müsiliş ya da koloidal maddeler açısından zengin ürünler (örneğin; dekstrine edilmiş nişasta):

Çözelti 5.1.2'de anlatılan şekilde hazırlanır ancak süzülmez. Gerekiyorsa santrifüjlenir, 100 ml süpernatant sıvı alınır ve 200 ml'lik bir balon jojeye aktarılır. Aseton (3.6) ile karıştırılır ve bu çözütü ile hacmine tamamlanır, homojenleştirilir ve süzülür.

5.2. Titrasyon

Bir pipet ile 5.1.1, 5.1.2 ya da 5.1.3'te açıklanan şekilde elde edilen 25 ml - 100 ml süzöntü (varsayılan klorür içeriğine göre) bir erlene aktarılır. Alınan çözelti en fazla 150 mg klorür (Cl) içermelidir. Gerekliyse en az 50 ml su ile seyreltilir, 5 ml nitrik asit (3.4), 20 ml doymuş amonyum demir sülfat çözeltisi (3.3) ve sıfır işaretine kadar doldurulmuş bir büretle aktarılan iki damla amonyum tiyosiyanat çözeltisi (3.1) eklenir. Bir büret kullanarak gümüş nitrat çözeltisi (3.2) 5 ml'lik bir fazlalık elde edecek şekilde aktarılır. 5 ml dietil eter (3.5) eklenir ve çökelti oluşturmak için sertçe çalkalanır. Gümüş nitratın fazlası amonyum tiyosiyanat çözeltisi (3.1) ile kırmızımsı kahverengi renk (bir dakika süreyle) kaybolmayıncaya kadar titre edilir.

6. Sonuçların hesaplanması

Klorür miktarı % sodyum klorür olarak (X) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

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

burada:

V1 = Eklenen 0,1 mol/l gümüş nitrat çözeltisinin miktarı, ml

V2 = Titrasyon için kullanılan 0,1 mol/l amonyum tiyosiyanat çözeltisinin miktarı, ml

m = Numunenin ağırlığı.

Kör testi için 0,1 mol/l gümüş nitrat çözeltisi tüketiliyorsa, bu değer hacimden düşülür ($V_1 - V_2$).

7. Gözlemler

7.1. Ayrıca titrasyon potansiyometre ile de gerçekleştirilebilir.

7.2. Sıvı ya da katı yağlar açısından çok zengin ürünlerde, önce dietil eter ya da petrol eteri ile yağ alınır.

7.3. Balık ununda, titrasyon Mohr metodu ile yürütülebilir.

EK-3

YEMDEKİ ONAYLAMIS KATKI MADDELERİNİN SEVİYESİNİ KONTROL ETMEK İÇİN ANALİZ METOTLARI

A. A Vitamini Tayini

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot; yemlerdeki ve premikslerdeki A vitamini (retinol) seviyesinin tayinini mümkün kılar. A vitamini all-*trans*-retinil alkol ve bunun *cis*-izomerlerini içerir; bu bileşenler bu metot ile tayin edilir. A vitamininin içeriği kg başına Uluslararası Birim (IU) cinsinden ifade edilir. Bir IU, 0,300 µg all-*trans*-vitamin A alkol ya da 0,344 µg all-*trans*-vitamin A asetat veya 0,550 µg all-*trans*-vitamin A palmitat etkinliğine karşılık gelir. Ölçüm limiti 2.000 IU/kg vitamin A'dır.

2. Prensipte

Numune etanolü potasyum hidroksit çözeltisi ile hidrolize edilir ve vitamin A petrol eter içinde ekstrakte edilir. Çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve kalıntı metanol içinde çözündürülür ve gerekiyorsa gereken konsantrasyona seyreltilir. Vitamin A miktarı UV veya floresans dedektör kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile belirlenir. Kromatografik parametreler all-*trans*-vitamin A alkolü ile *cis* izomerleri arasında ayrım olmayacak şekilde seçilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Etanol, σ = %96

3.2. Petrol eteri, kaynama aralığı 40-60°C

3.3. Metanol

3.4. Potasyum hidroksit çözeltisi, c = 50 g/100 ml

3.5. Sodyum askorbat çözeltisi, c = 10 g/100 ml (bakınız 7.7)

3.6. Sodyum sülfid, Na₂S · x H₂O (x = 7-9)

3.6.1. Sodyum sülfid çözeltisi, gliserol içinde c = 0,5 mol/l, β = 120 g/l (x = 9 için) (bakınız 7.8)

3.7. Fenoltalein çözeltisi, etanol (3.1) içinde c = 2 g/100 ml

3.8. 2-Propanol

3.9. HPLC için mobil faz: metanol (3.3) ve su karışımı, örn. 980 + 20 (v + v) Tam oran kullanılan kolon özellikleri ile belirlenebilir.

3.10. Azot, oksijen içermeyen

3.11. All-*trans*-vitamin A asetat, ekstra saf, onaylanan etkinlikte, (örneğin 2,80 x 10⁶ IU/g)

3.11.1. All-*trans*-vitamin A asetat stok çözeltisi: 50 mg vitamin A asetatı (3.11) 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jojeye tartılır. 2-propanol (3.8) içinde çözündürülür ve aynı çözücü ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 1 400 IU/ml vitamin A'dır. Tam içerik 5.6.3.1'e göre tayin edilir.

3.12. All-*trans*-vitamin A palmitat, ekstra saf, onaylanan aktivitede, örn. 1,80 x 10⁶ IU/g

3.12.1. All-*trans*-vitamin A palmitatın stok çözeltisi: 80 mg vitamin A palmitatı (3.12) 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jojeye tartılır. 2-propanol (3.8) içinde çözündürülür ve aynı çözücü ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 1 400 IU/ml vitamin A'dır. Tam içerik 5.6.3.2'ye göre tayin edilir.

3.13. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (bakınız 7.5)

4. Cihazlar

4.1. Vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporator)

4.2. Amber renkli cam malzemeler

4.2.1. 500 ml'lik, şilif cam soketli, düztabanlı ya da konik şişe.

4.2.2. Şilif tapalı, dar ağızlı, 10, 25, 100 ve 500 ml'lik balon jojeler

4.2.3. 1000 ml'lik, şilif cam tapalı, konik, ayırma hunileri

4.2.4. 250 ml'lik, buzlu cam soketli, armut şekilli balon

4.3. Allihn yoğunlaştırıcı, ceket uzunluğu 300 mm, rodajlı bağlantılı, gaz besleme borusu için adaptör

4.4. Faz ayrımı için, 185 mm çapında katlı filtre kağıdı (örn. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Enjeksiyon sistemli HPLC cihazı

4.5.1. Sıvı kromatografik kolon, 250 mm x 4 mm, C₁₈, 5 ya da 10 µm dolgu ya da eşdeğeri (performans kriteri: HPLC koşulları altında tüm retinol izomerleri için yalnızca tek bir pik)

4.5.2. UV ya da flüoresans detektörü, değişken dalga boyu ayarlı

4.6. 10 mm kuvars hücreli spektrofotometre

4.7. Manyetik karıştırıcı su banyosu

4.8. Aşağıdakilerden oluşan ekstraksiyon cihazı (bakınız şekil 1):

4.8.1. 1 litre kapasiteli, şilifli camdan bir boyun ve tıpa takılmış cam silindir

4.8.2. Bir yan kol ve merkezden geçen ayarlanabilir bir tüp takılmış şilifli cam ek. Ayarlanabilir tüpün, silindirdeki üst sıvı katmanının ayırıcı bir huniye aktarılabilmesi şeklinde U şekilli bir alt ucu ve karşı ucu bir jeti olmalıdır.

5. Metot

Not: Vitamin A (UV-) ışığa ve oksitlenmeye duyarlıdır. Tüm işlemler ışık (amber cam malzemeler ya da alüminyum folyo ile korunan cam malzemeler kullanılarak) ve oksijenden korunmalı (azot akımında) bir ortamda gerçekleştirilmelidir.

Ekstraksiyon sırasında sıvı üzerindeki hava azotla yer değiştirmelidir (ara sıra tıpa gevşetilerek aşırı basınç oluşması engellenmelidir).

5.1. Numunenin hazırlanması

Numune 1 mm gözenekli elekten geçecek şekilde öğütülür, ısı oluşumunun önlenmesine dikkat edilir. Öğütme işlemi tartım ve sabunlaştırmanın hemen öncesinde gerçekleştirilmelidir, aksi halde vitamin A kaybı olabilir.

5.2. Sabunlaştırma

Vitamin A yoğunluğuna bağlı olarak 2 g - 25 g numune 1 mg hassasiyetle 500 ml'lik bir düztabanlı ya da konik cam malzemeye (4.2.1) koyulur. Karıştırarak sırasıyla 130 ml etanol (3.1), yaklaşık 100 mg BHT (3.13), 2 ml sodyum askorbat çözeltisi (3.5) ve 2 ml sodyum sülfid çözeltisi (3.6) eklenir. Cam malzemeye bir yoğunlaştırıcı (4.3) takılır ve balon joje manyetik karıştırıcı su banyosuna (4.7) daldırılır. Kaynama noktasına ısıtılır ve 5 dakika boyunca geri soğutucuda tutulur. Ardından 25 ml potasyum hidroksit çözeltisi (3.4) yoğunlaştırıcı (4.3) içinden eklenir ve yavaş bir azot akımı altında karıştırılarak 25 dakika daha geri soğutucuda tutulur. Ardından yoğunlaştırıcı yaklaşık 20 ml su ile durulanır ve şişenin içeriği oda sıcaklığına soğutulur.

5.3. Ekstraksiyon

Sabunlaştırma çözeltisi toplam hacmi 250 ml olan su ile durulayarak nicel olarak 1000 ml'lik bir ayırma hunisine (4.2.3) ya da ekstraksiyon cihazına (4.8) boşaltılarak aktarılır. Sabunlaştırma şişesi sırasıyla 25 ml etanol (3.1) ve 100 ml petrol eteri (3.2) ile durulanır ve durulama çözeltileri ayırma hunisine ya da ekstraksiyon cihazına aktarılır. Birleştirilmiş çözeltilerdeki su ve etanol oranı yaklaşık 2:1 olmalıdır. 2 dakika boyunca kuvvetlice çalkalanır ve 2 dakika durulması beklenir.

5.3.1. Bir ayırma hunisi (4.2.3) kullanarak ekstraksiyon

Katmanlar ayrıldığında (bakınız 7.3) petrol eteri katmanı başka bir ayırma hunisine (4.2.3) aktarılır. Bu ekstraksiyon işlemi 100 ml petrol eteri ile (3.2) iki kez ve 50 ml petrol eteri ile (3.2) iki kez yinelenir.

Ayırma hunisindeki birleştirilmiş ekstraktları, 100 ml'lik su ile hafifçe karıştırarak (emülsiyon oluşumunu önlemek için) ve ardından fenoltalein çözeltisi (3.7) eklendiğinde su renksiz kalana kadar 100 ml'lik su ile yeniden çalkalayarak (dört kez yıkamak genelde yeterlidir) yıkanır.

Yıkamış ekstrakt, süspansiyon halindeki suyu çıkartmak amacıyla faz ayrımı (4.4) için bir kuru katmanlı filtreden 500 ml'lik balon jojeye (4.2.2) süzülür. Ayırma hunisi ve filtre 50 ml petrol eteri ile (3.2) durulanır, petrol eteri ile (3.2) işarete kadar tamamlanır ve iyice karıştırılır.

5.3.2. Ekstraksiyon cihazı (4.8) kullanarak ekstraksiyon

Katmanlar ayrıldığında (bakınız 7.3) cam silindirin tıpası (4.8.1) şilifli cam ek (4.8.2) ile değiştirilir ve ayarlanabilir tüpün U şekilli alt ucu, birleşme yüzeyi seviyesinin hemen üzerinde olacak şekilde yerleştirilir. Azot hattından yan kola basınç uygulayarak üstteki petrol eteri 1000 ml'lik bir ayırma hunisine (4.2.3) aktarılır. 100 ml petrol eteri (3.2) cam silindire eklenir, ağzı kapatılır ve iyice çalkalanır. Katmanların ayrılmasına izin verilir ve üstteki katmanı önceki gibi ayırma hunisine aktarılır. Ekstraksiyon işlemi 100 ml petrol eteri ile (3.2), ardından iki kez 50 ml'lik petrol eteri ile (3.2) yinelenir ve petrol eteri katmanları ayırma hunisine eklenir. Birleştirilmiş petrol eteri ekstraktları 5.3.1'de anlatıldığı gibi yıkanır ve devam edilir.

5.4. HPLC için numune çözeltisinin hazırlanması

Belirli miktarda petrol eteri çözeltisi (5.3.1 ya da 5.3.2'den elde edilen) 250 ml'lik armut şekilli balona (4.2.4) pipetle alınır. En fazla 40°C'lik bir su banyosunda azaltılan basınçla döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) (4.1) çözücü neredeyse kuruyana kadar buharlaştırılır. Azot (3.10) içeri alınarak atmosferik basınç yeniden sağlanır ve balon joje döner buharlaştırıcıdan (rotary evaporator) çıkartılır. Kalan çözücü bir azot (3.10) buharı ile çıkartılır ve kalıntı hemen bilinen

hacimdeki (10-100 ml) metanol (3.3) (vitamin A konsantrasyonu 5 IU/ml ile 30 IU/ml arasında olmalıdır) içinde çözündürülür.

5.5. HPLC ile tayin

Vitamin A, bir C18 ters faz kolonunda (4.5.1) ayrılır ve konsantrasyon bir UV detektörü (325 nm) ya da bir flüoresans detektörü ile ölçülür. (eksitasyon: 325 nm, emisyon: 475 nm) (4.5.2)

5.4'te elde edilen metanolik çözeltiden belirli miktarda (örneğin 20 µl) enjekte edilir ve mobil faz (3.9) ile elüe edilir. Aynı numune çözeltisinin çeşitli enjeksiyonlarının ortalama pik yüksekliği (alan) ve kalibrasyon çözeltilerinin (5.6.2) çeşitli enjeksiyonlarının ortalama pik yükseklikleri (alanlar) hesaplanır.

HPLC koşulları

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir.

Sıvı kromatografik kolon (4.5.1):250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 ya da 10 µm dolgu ya da eşdeğeri

Mobil faz (3.9) :Metanol (3.3) ve su karışımı, örn. 980 + 20 (h+h).

Akış hızı :1-2 ml/dak.

Dedektör (4.5.2) :UV detektörü (325 nm) ya da floresans detektörü (eksitasyon: 325 nm/emisyon: 475 nm)

5.6. Kalibrasyon

5.6.1. Çalışma standardı çözeltilerinin hazırlanması

20 ml vitamin A asetat stok çözeltisi (3.11.1) ya da 20 ml vitamin A palmitat stok çözeltisi (3.12.1) 500 ml'lik düz tabanlı ya da konik cam balona (4.2.1) pipet ile alınır ve BHT eklenmeden 5.2'de anlatıldığı gibi hidrolize edilir. Ardından petrol eteri ile (3.2) 5.3'e göre ekstrakte edilir ve petrol eteri ile (3.2) 500 ml'ye tamamlanır. Bu ekstraktın 100 ml'si döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) (bakınız 5.4) neredeyse kuruyana kadar buharlaştırılır, kalan çözücü bir azot (3.10) buharı ile çıkartılır ve kalıntı 10,0 ml metanol (3.3) içinde yeniden çözündürülür. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 560 IU/ml vitamin A'dır. Tam içerik 5.6.3.3'e göre tayin edilir. Çalışma standardı çözeltisi, kullanılmadan önce taze hazırlanmalıdır. Bu çalışma standardı çözeltisinin 2,0 ml'sini 20 ml'lik balon jojeye pipetlenir, metanol (3.3) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu seyreltilmiş çalışma standardının nominal konsantrasyonu 56 IU/ml vitamin A'dır.

5.6.2. Kalibrasyon çözeltilerinin ve kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

1,0- 2,0- 5,0 ve 10,0 ml seyreltilmiş çalışma standardı çözeltisi bir dizi 20 ml'lik balon jojeye aktarılır, metanol (3.3) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltilerin nominal konsantrasyonları 2,8- 5,6- 14,0 ve 28,0 IU/ml vitamin A'dır.

Her bir kalibrasyon çözeltisinin 20 µl'si birkaç kez enjekte edilir ve ortalama pik yükseklikleri (alanlar) tayin edilir. Ortalama pik yükseklikleri (alanlar) ve UV kontrolünün (5.6.3.3) sonuçları göz önünde bulundurularak bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.6.3. Standart çözeltilerinin UV standardizasyonu

5.6.3.1. Vitamin A asetat stok çözeltisi

2,0 ml vitamin A asetat stok çözeltisi (3.11.1) 50 ml'lik bir balon jojeye (4.2.2) pipet ile alınır ve 2-propanol (3.8) ile işarete kadar tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 56 IU/ml vitamin A'dır. Bu seyreltilmiş vitamin A asetat çözeltisinin 3,0 ml'si 25 ml'lik balon jojeye pipet ile alınır ve 2-propanol (3.8) ile işarete kadar tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 6,72 IU/ml vitamin A'dır. Bu çözeltinin UV spektrumu 2-propanole (3.8) göre, 300 nm ile 400 nm arasında spektrofotometrede (4.6) ölçülür. Ekstinksiyon maksimumu 325 nm ile 327 nm arasında olmalıdır.

Vitamin A içeriğinin hesabı:

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

Vitamin A asetat için $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 326\text{ nm'de 2-propanol içinde 1530}$

5.6.3.2. Vitamin A palmitat stok çözeltisi

2,0 ml vitamin A palmitat stok çözeltisi (3.12.1) 50 ml'lik (3.8) ile işarete kadar tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 56 IU/ml vitamin A'dır.

Bu seyreltilmiş vitamin A palmitat çözeltisinin 3,0 ml'si 25 ml'lik bir balon jojeye pipetlenir ve 2-propanol (3.8) ile işarete kadar tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 6,72 IU/ml vitamin A'dır. Bu çözeltinin UV spektrumu 2-propanole (3.8) göre, 300 nm ile 400 nm arasında spektrofotometrede (4.6) ölçülür. Ekstinksiyon maksimumu 325 nm ile 327 nm arasında olmalıdır.

Vitamin A içeriğinin hesabı:

$$\text{IU vitamin A/ml} = E_{326} \times 19,0 \text{ balon jojeye (4.2.2) pipetle alınır ve 2-propanol}$$

Vitamin A palmitat için ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 326\text{ nm'de 2-propanol içinde 957}$)

5.6.3.3. Vitamin A çalışma standardı çözeltisi

5.6.1'e göre hazırlanan seyreltilmiş vitamin A çalışma standardı çözeltisinin 3,0 ml'si 50 ml'lik bir balon jojeje (4.2.2) pipetle alınır ve 2-propanol (3.8) ile işaretine kadar tamamlanır. Bu çözeltinin 5,0 ml'si 25 ml'lik bir balon jojeje pipetle alınır ve 2-propanol (3.8) ile işaretine kadar tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu 6,72 IU/ml vitamin A'dır. Bu çözeltinin UV spektrumu 2-propanole (3.8) göre, 300 nm ile 400 nm arasında spektrofotometrede (4.6) ölçülür. Ekstinksiyon maksimumu 325 nm ile 327 nm arasında olmalıdır.

Vitamin A içeriğinin hesabı:

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

Vitamin A alkol için ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 325\text{ nm'de 2-propanol içinde 1821}$)

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon grafiğini (5.6.2) referans alarak, çözeltinin vitamin A piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan), aynı çözeltisinin konsantrasyonu IU/ml cinsinden tayin edilir.

Numunenin IU/kg cinsinden vitamin A içeriği "w" aşağıdaki formülle elde edilir:

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

burada:

c = Numune çözeltisinin (5.4) vitamin A konsantrasyonu, IU/ml

V1 = Numune çözeltisinin (5.4) hacmi, ml

V2 = 5.4'te alınan temsili miktarının hacmi, ml

m = Test porsiyonunun ağırlığı, g

7. Gözlemler

7.1. Düşük vitamin A konsantrasyonu olan numunelerde iki sabunlaştırma yükünün (tartılan miktar: 25 g) petrol eteri ekstraktlarının HPLC tayini için bir numune çözeltisinde birleştirilmesi yararlı olabilir.

7.2. Analiz için alınan numunenin ağırlığı 2 g'dan fazla yağ içermemelidir.

7.3. Faz ayrımı oluşmazsa emülsiyonu kırmak için yaklaşık 10 ml etanol (3.1) eklenir.

7.4. Balık yağı ve diğer saf yağlarla sabunlaştırma süresi 45-60 dakikaya kadar uzatılabilir.

7.5. BHT yerine hidrokinon kullanılabilir.

7.6. Normal bir faz kolonu kullanılarak retinol izomerlerinin ayrımı mümkündür. Ancak bu durumda tüm cis ve trans izomer piklerinin yükseklikleri (alanlar) hesaplar için toplanmalıdır.

7.7. Sodyum askorbat çözeltisi yerine yaklaşık 150 mg askorbik asit kullanılabilir.

7.8. Sodyum sülfid çözeltisi yerine yaklaşık 50 mg EDTA kullanılabilir.

7.9. Süt ikame yemlerindeki vitamin A'nın analizinde, aşağıdakilere özellikle dikkat edilmelidir

— sabunlaştırmada (5.2): Numunede mevcut yağ miktarı nedeniyle potasyum hidroksit çözeltisi (3.4) miktarının artırılması gerekebilir,

— ekstraksiyonda (5.3): emülsiyonların varlığı nedeniyle, su/etanol 2:1 oranının adaptasyonu gerekebilir.

Uygulanan analiz metodunun bu spesifik matrikste (süt ikame yemi) güvenilir sonuçlar verip vermediğini kontrol etmek için, ilave test porsiyonunda bir geri kazanım testi uygulanmalıdır. Geri kazanım oranı %80'den düşükse analitik sonucun geri kazanım için düzeltilmesi gerekir.

8. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark daha yüksek sonuca bağlı %15'i geçmemelidir.

9. Ortak bir çalışmanın sonuçları

	Premiks	Premiks-yem	Mineral konsantresi	Protein yemi	Domuz yavrusu
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
ortalama [IU/kg]	17,02 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁶	537.100	151.800	18.070
S _r [IU/kg]	0,51 x 10 ⁶	0,039 x 10 ⁶	22.080	12.280	682
r [IU/kg]	1,43 x 10 ⁶	0,109 x 10 ⁶	61.824	34.384	1.910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [IU/kg]	1,36 x 10 ⁶	0,069 x 10 ⁶	46.300	23.060	3.614
R [IU/kg]	3,81 x 10 ⁶	0,193 x 10 ⁶	129.640	64.568	10.119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = Laboratuvarların sayısı

n= Tekil değerlerin sayısı

sr = Tekrarlanabilirlik standart sapması

SR = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

r = Tekrarlanabilirlik

R = Tekrar üretilebilirlik

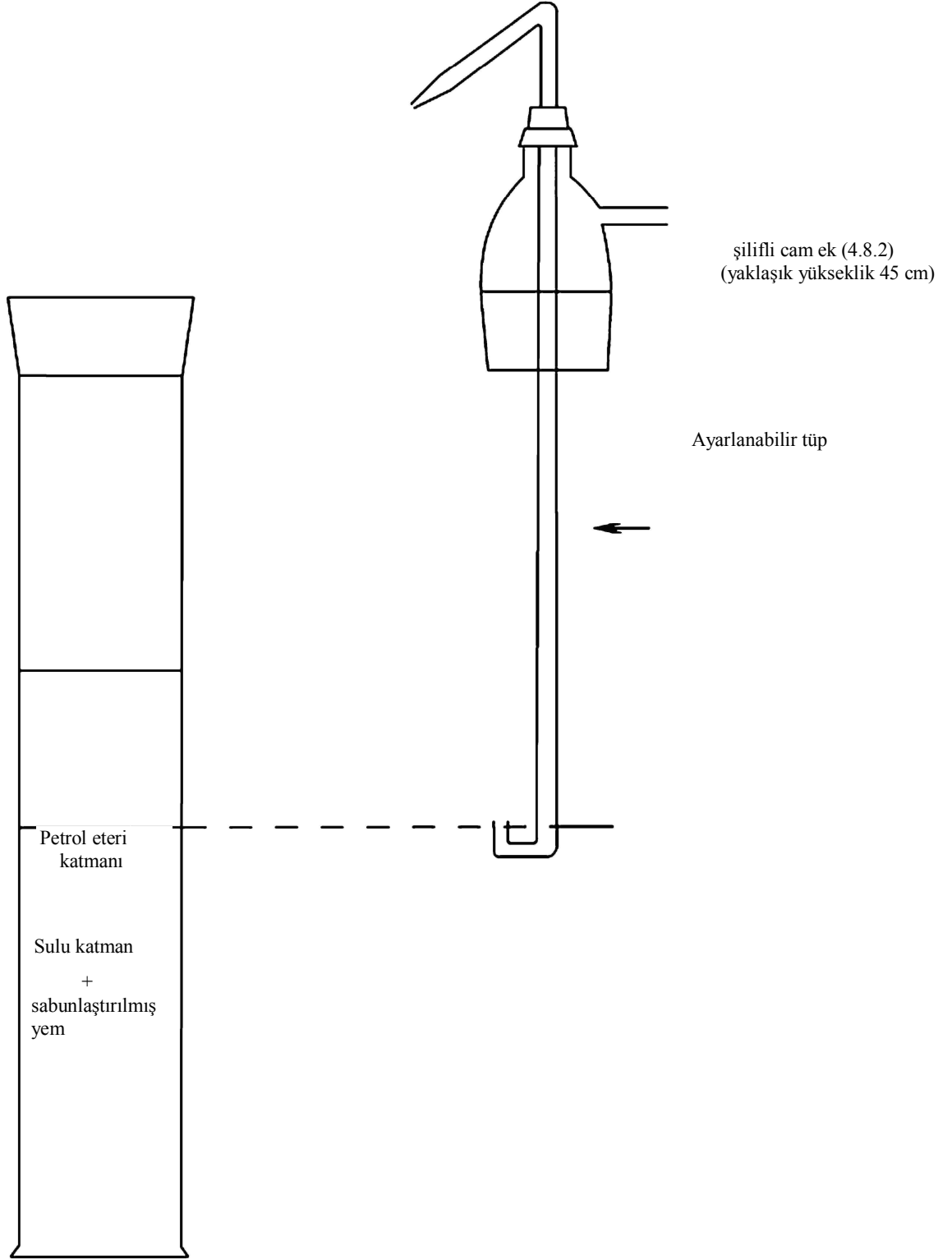
CVr = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı

CVR = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı.

Ekstraksiyon Cihazları

Cam silindir (4.8.1) (yaklaşık yükseklik 48 cm)

Şekil 1: Ekstraksiyon cihazı (4.8)



B. E Vitamini Tayini

1. Amaç ve Kapsam

Bu metod; yemdeki ve premikslerdeki E vitamini seviyesinin tayinini mümkün kılar. Vitamin E içeriği mg/kg DL- α -tokoferol asetat olarak ifade edilir. 1 mg DL- α -tokoferol asetat 0,91 mg DL- α -tokoferole (vitamin E) karşılık gelir.

Ölçüm limiti 2 mg/kg vitamin E'dir. Bu ölçüm limiti yalnızca floresans detektörüyle geçerlidir. Bir UV detektöründe ölçüm limiti 10 mg/kg'dır.

2. Prensiptir

Numune etanolli potasyum hidroksit çözeltisi ile hidrolize edilir ve vitamin E petrol eteri ile ekstrakte edilir. Çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve kalıntı metanol içinde çözündürülür ve gerekiyorsa gereken konsantrasyona seyreltilir. Vitamin E içeriği, bir UV ya da floresans detektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayrıraçlar

3.1. Etanol, $\sigma = \%96$.

3.2. Petrol eteri, kaynama aralığı 40-60°C.

3.3. Metanol.

3.4. Potasyum hidroksit çözeltisi, c = 50 g/100 ml.

3.5. Sodyum askorbat çözeltisi, c = 10 g/100 ml (bakınız 7.7).

3.6. Sodyum sülfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ (x = 7-9).

3.6.1. Sodyum sülfid çözeltisi, gliserol içinde c = 0,5 mol/l, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (x = 9 için) (bakınız 7.8)

3.7. Fenoltalein çözeltisi, etanol (3.1) içinde c = 2 g/100 ml.

3.8. HPLC için mobil faz: metanol (3.3) ve su karışımı, örn. 980 + 20 (h + h). Tam oran, kullanılan kolon özellikleri ile tayin edilecektir.

3.9. Azot, oksijen içermemeli.

3.10. DL- α -tokoferol asetat, ekstra saf, onaylanan aktivitede.

3.10.1. DL- α -tokoferol asetatın stok çözeltisi: 100 mg DL- α -tokoferol asetat (3.10) 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jöjeye tartılır. Etanol (3.1) içinde çözündürülür ve aynı çözücü ile işaret çizgisine kadar tamamlanır. Bu çözeltinin 1 ml'si 1 mg DL- α -tokoferol asetat içerir (UV kontrolü için bakınız 5.6.1.3; stabilizasyon için bakınız 7.4).

3.11. DL- α -tokoferol, ekstra saf, onaylanan aktivitede.

3.11.1. DL- α -tokoferol stok çözeltisi: 100 mg DL- α -tokoferol (3.10) 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jöjeye tartılır. Etanol (3.1) içinde çözündürülür ve aynı çözücü ile işaret çizgisine kadar tamamlanır. Bu çözeltinin 1 ml'si 1 mg DL- α -tokoferol içerir. (UV kontrolü için bakınız 5.6.2.3; stabilizasyon için bakınız 7.4 gözlemleri).

3.12. 2,6-Di-tert-bütill-4-metilfenol (BHT) (bakınız 7.5).

4. Cihazlar

4.1. Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporator).

4.2. Amber renkli cam malzemeler.

4.2.1. 500 ml'lik, şilifli, düz tabanlı ya da konik şişe.

4.2.2. Şilifli , dar ağızlı, 10, 25, 100 ve 500 ml'lik balon jöjeler.

4.2.3. 1000 ml'lik, şilifli, konik, ayırma hunileri.

4.2.4. 250 ml'lik, şilifli , armut şekilli balon jöje.

4.3. Allihn yoğunlaştırıcı, ceket uzunluğu 300 mm, şilifli cam ekleme, gaz besleme borusu için adaptör.

4.4. Faz ayrımı için, 185 mm çapında katlı filtre kağıdı (örn. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Enjeksiyon sistemli HPLC cihazı

4.5.1. Sıvı kromatografik kolon, 250 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , 5 ya da 10 μm dolgu ya da eşdeğeri.

4.5.2. UV ya da flüoresans detektörü, değişken dalga boyu ayarlı.

4.6. 10 mm kuvars hücreli spektrofotometre.

4.7. Manyetik karıştırıcı su banyosu.

4.8. Aşağıdakilerden oluşan ekstraksiyon cihazı (bakınız şekil 1)

4.8.1. 1 litre kapasiteli, şilifli camdan bir boyun ve tıpa takılmış cam silindir.

4.8.2. Bir yan kol ve merkezden geçen ayarlanabilir bir tüp takılmış şilifli cam ek. Ayarlanabilir tüpün, silindirdeki üst sıvı katmanının ayırıcı bir huniye aktarılabileceği şekilde U şekilli bir alt ucu ve karşı uçta bir jeti olmalıdır.

5. Metot

Not: Vitamin E (UV-) ışığa ve oksitlenmeye duyarlıdır. Tüm işlemler ışık (amber cam malzemeler ya da alüminyum folyo ile korunan cam malzemeler kullanılarak) ve oksijen (azot ile yıkama) korunmalı bir ortamda gerçekleştirilmelidir.

Ekstraksiyon sırasında sıvı üzerindeki hava, azotla değiştirilmelidir (ara sıra tıpayı gevşeterek aşırı basınç oluşması engellenmelidir).

5.1. Numunenin hazırlanması

Numune 1 mm gözenekli elekten geçecek şekilde öğütülür, ısı oluşumunun önlemesine dikkat edilir. Öğütme işlemi tartım ve sabunlaştırmanın hemen öncesinde gerçekleştirilmelidir, aksi halde vitamin E kaybı olabilir.

5.2. Sabunlaştırma

Vitamin E yoğunluğuna bağlı olarak 2 g - 25 g numune 0,01 g hassasiyetle 500 ml'lik bir düz tabanlı ya da konik cam balona (4.2.1) koyulur. Karıştırarak sırasıyla 130 ml etanol (3.1), yaklaşık 100 mg BHT (3.12), 2 ml sodyum askorbat çözeltisi (3.5) ve 2 ml sodyum sülfid çözeltisi (3.6) eklenir. Cam malzemeye yoğunlaştırıcı (4.3) takılır ve balon manyetik karıştırıcı bir su banyosuna (4.7) daldırılır. 5 dakika boyunca geri soğutucuda kaynama noktasına ısıtılır. Ardından 25 ml potasyum hidroksit çözeltisi (3.4) yoğunlaştırıcı (4.3) içinden eklenir ve yavaş bir azot akımı altında karıştırılarak 25 dakika daha geri soğutucuda bırakılır. Ardından yoğunlaştırıcı yaklaşık 20 ml su ile durulanır ve balonun içeriği oda sıcaklığına soğutulur.

5.3. Ekstraksiyon

Sabunlaştırma çözeltisi, toplam hacmi 250 ml olan su ile durulanarak nicel olarak 1000 ml'lik bir ayırma hunisine (4.2.3) ya da ekstraksiyon cihazına (4.8) boşaltılarak aktarılır. Sabunlaştırma şişesi sırasıyla 25 ml etanol (3.1) ve 100 ml petrol eteri (3.2) ile durulanır ve durulama suyu ayırma hunisine ya da ekstraksiyon cihazına aktarılır. Birleştirilmiş çözeltilerdeki su ve etanol oranı yaklaşık 2:1 olmalıdır. 2 dakika boyunca kuvvetlice çalkalanır ve 2 dakika çökmesi için (faz ayrımı için) beklenir.

5.3.1. Ayırma hunisi (4.2.3) kullanarak ekstraksiyon

Katmanlar ayrıldığında (bakınız 7.3) petrol eteri katmanı başka bir ayırma hunisine (4.2.3) aktarılır. Bu ekstraksiyon işlemi 100 ml hafif petrolle (3.2) iki kez ve 50 ml hafif petrolle (3.2) iki kez yinelenir.

Ayırma hunisindeki birleştirilmiş ekstraktlara, 100 ml'lik su ekleyip hafifçe karıştırarak (emülsiyon oluşumunu önlemek için) ve ardından fenoltalein çözeltisi (3.7) eklenerek su renksiz kalana kadar 100 ml'lik su ile yeniden çalkalayarak (dört kez yıkamak genelde yeterlidir) iki kez yıkanır.

Yıkanmış ekstrakt, süspansiyon halindeki suyu ayırmak amacıyla faz ayrımı (4.4) için bir kuru katmanlı filtreden 500 ml'lik balon jöjeye (4.2.2) süzülür. Ayırma hunisi ve filtre 50 ml petrol eteri ile (3.2) durulanır, petrol eteri ile (3.2) işaretine kadar tamamlanır ve iyice karıştırılır.

5.3.2. Ekstraksiyon cihazı (4.8) kullanarak ekstraksiyon

Katmanlar ayrıldığında (bakınız 7.3) cam silindirin tıpası (4.8.1) buzlu cam ek (4.8.2) ile değiştirilir ve ayarlanabilir tüpün U şekilli alt ucu, birleşme yüzeyi seviyesinin hemen üzerinde olacak şekilde yerleştirilir. Azot hattından yan kola basınç uygulayarak üstteki hafif petrol 1000 ml'lik bir ayırma hunisine (4.2.3) aktarılır. 100 ml petrol eteri (3.2) cam silindire eklenir, ağzı kapatılır ve iyice çalkalanır. Katmanların ayrılmasına izin verilir ve üstteki katman önceki gibi ayırma hunisine aktarılır. Ekstraksiyon işlemi 100 ml petrol eteri ile (3.2), ardından iki kez 50 ml'lik petrol eteri ile (3.2) yinelenir ve hafif petrol eteri katmanları ayırma hunisine eklenir. Birleştirilmiş petrol eteri ile ekstraktları 5.3.1'de anlatıldığı gibi yıkanır ve devam edilir.

5.4. HPLC için numune çözeltisinin hazırlanması

Belli bir miktarda petrol eteri çözeltisi (5.3.1 ya da 5.3.2'den elde edilen) 250 ml'lik armut şekilli balona (4.2.4) pipetle alınır. En fazla 40°C'lik bir su banyosunda azaltılan basınçla döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) (4.1) çözücü neredeyse kuruyana kadar buharlaştırılır. Azot (3.9) içeri alınarak atmosferik basınç yeniden sağlanır ve balon jöje döner buharlaştırıcıdan (rotary evaporator) çıkartılır. Kalan çözücü bir azot (3.9) buharı ile çıkartılır ve kalıntı hemen bilinen hacimdeki (10-100 ml) metanol (3.3) (DL- α -tokoferol konsantrasyonu 5 μ g/ml ile 30 μ g/ml arasında olmalıdır) içinde çözündürülür.

5.5. HPLC ile tayin

Vitamin E, bir C₁₈ ters faz kolonunda (4.5.1) ayrılır ve konsantrasyon bir floresans detektörü (eksitasyon: 295 nm, emisyon: 330 nm) ya da UV detektörü (292 nm) (4.2.1) kullanılarak ölçülür.

5.4'te elde edilen metanollü çözeltiden belli miktarda (örn. 20 μ l) enjekte edilir ve mobil faz (3.8) ile elüe edilir. Aynı numune çözeltisinin çeşitli enjeksiyonlarının ortalama pik yükseklikleri (alanlar) ve kalibrasyon çözeltilerinin (5.6.2) çeşitli enjeksiyonlarının ortalama pik yükseklikleri (alanlar) hesaplanır..

HPLC koşulları

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir.

Sıvı kromatografik kolon (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 ya da 10 µm dolgu ya da eşdeğeri
Mobil faz (3.8):	Metanol (3.3) ve su karışımı, örn. 980 + 20 (h+h).
Akış hızı:	1-2 ml/dak.
Detektör (4.5.2)	Floresans detektörü (eksitasyon: 295 nm/emisyon: 330 nm) ya da UV detektörü (292 nm)

5.6. Kalibrasyon (DL-α-tokoferol asetat ya da DL-α-tokoferol)

5.6.1. DL-α- tokoferol asetat standardı

5.6.1.1. Çalışma standardı çözeltisinin hazırlanması

25 ml DL-α-tokoferol asetat stok çözeltisi (3.10.1) 500 ml'lik düz tabanlı ya da konik erlene (4.2.1) pipetle aktarılır ve 5.2'de anlatıldığı gibi hidrolize edilir. Ardından petrol eteri ile (3.2) 5.3'e göre ekstrakte edilir ve petrol eteri ile 500 ml'ye tamamlanır. Bu ekstraktın 25 ml'si döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) (bakınız 5.4) neredeyse kuruyana kadar buharlaştırılır, kalan çözücü azot (3.9) buharı ile çıkartılır ve kalıntı 25,0 ml metanol (3.3) içinde yeniden çözündürülür. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu, 50 µg/ml DL-α-tokoferol asetata eşdeğer 45,5 µg/ml DL-α-tokoferoldür. Çalışma standardı çözeltisi, kullanılmadan önce taze hazırlanmalıdır.

5.6.1.2. Kalibrasyon çözeltilerinin ve kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

1,0- 2,0- 4,0 ve 10,0 ml çalışma standardı çözeltisi bir dizi 20 ml'lik balon jojeye aktarılır, metanol (3.3) ile işaretine kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltilerin nominal konsantrasyonları 2,5- 5,0- 10,0 ve 25,0 µg/ml DL-α-tokoferol asetatı ya da 2,28- 4,55- 9,10 µg/ml ve 22,8 µg/ml DL-α-tokoferoldür. Her bir kalibrasyon çözeltisinin 20 µl'si birkaç kez enjekte edilir ve ortalama pik yükseklikleri (alanlar) tayin edilir. Ortalama pik yükseklikleriyle (alanlar), bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.6.1.3. DL-α-tokoferol asetat stok çözeltisinin UV standardizasyonu (3.10.1)

5,0 ml DL-α-tokoferol asetat stok çözeltisi (3.10.1) etanol ile 25,0 ml'ye seyreltilir ve bu çözeltinin UV spektrumu etanole (3.1) göre, 250 nm ile 320 nm arasında spektrofotometrede (4.6) ölçülür.

Absorpsiyon maksimumu 284 nm'de olmalıdır:

$$E1^{1\%}_{1\text{cm}} = 284 \text{ nm'de etanol içinde } 43,6$$

Bu seyreltmede 0,84 ila 0,88 arasında bir ekstinksiyon değeri elde edilmelidir.

5.6.2. DL-α- tokoferol standardı

5.6.2.1. Çalışma standardı çözeltisinin hazırlanması

2 ml DL-α-tokoferol stok çözeltisi (3.11.1) 50 ml'lik balon jojeye pipetle alınır, metanol (3.3) içinde çözündürülür ve metanol ile işarete kadar tamamlanır. Bu çözeltinin nominal konsantrasyonu, 44,0 µg/ml DL-α-tokoferol asetata eşdeğer 40 µg/ml DL-α-tokoferoldür. Çalışma standardı çözeltisi, kullanılmadan önce taze hazırlanmalıdır.

5.6.2.2. Kalibrasyon çözeltilerinin ve kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

1,0- 2,0- 4,0 ve 10,0 ml çalışma standardı çözeltisi bir dizi 20 ml'lik balon jojeye aktarılır, metanol (3.3) ile işaretine kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltilerin nominal konsantrasyonları 2,0- 4,0- 8,0 ve 20,0 µg/ml DL-α-tokoferol ya da 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml ve 22,0 µg/ml DL-α-tokoferol asetatıdır.

Her bir kalibrasyon çözeltisinin 20 µl'si birkaç kez enjekte edilir ve ortalama pik yükseklikleri (alanlar) tayin edilir. Ortalama pik yükseklikleriyle (alanlar), bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.6.2.3. DL-α-tokoferol stok çözeltisinin UV standardizasyonu (3.11.1)

2,0 ml DL-α-tokoferol stok çözeltisi (3.11.1) etanol ile 25,0 ml'ye seyreltilir ve bu çözeltinin UV spektrumu etanole (3.1) göre, 250 nm ile 320 nm arasında spektrofotometrede (4.6) ölçülür.

Absorpsiyon maksimumu 292 nm'de olmalıdır:

$$E1^{1\%}_{1\text{cm}} = 292 \text{ nm'de etanol içinde } 75,8$$

Bu seyreltmede ekstinksiyon değeri 0,6 elde edilmelidir.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon grafiğini (5.6.1.2 ya da 5.6.2.2) referans alarak, numune çözeltisinin vitamin E piklerinin ortalama yüksekliği (alan), aynı çözeltinin konsantrasyonu µg/ml (α-tokoferol asetat olarak hesaplanan)cinsinden tayin edilir.

Numunenin mg/kg cinsinden vitamin E içeriği “w” aşağıdaki formülle elde edilir:

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

c = Numune çözeltisinin (5.4) vitamin E konsantrasyonu (α -tokoferol asetat olarak), $\mu\text{g/ml}$

V1 = Numune çözeltisinin (5.4) hacmi, ml

V2 = 5.4’te alınan belirli miktarın hacmi, ml

m = Numunenin ağırlığı, g

7. Gözlemler

7.1. Düşük vitamin E konsantrasyonu olan numunelerde iki sabunlaştırma yükünün (tartılan miktar: 25 g) petrol eteri ekstraktlarının HPLC tayini için bir numune çözeltisinde birleştirilmesi yararlı olabilir.

7.2. Analiz için alınan numunenin ağırlığı 2 g’den fazla yağ içermemelidir.

7.3. Faz ayrımı oluşmazsa emülsiyonu kırmak için yaklaşık 10 ml etanol (3.1) eklenir.

7.4. DL- α -tokoferol asetat ya da DL- α -tokoferol çözeltisinin sırasıyla 5.6.1.3 ya da 5.6.2.3’e göre spektrofotometrik ölçümlerden sonra yaklaşık 10 mg BHT’yi (3.12) çözeltiye (3.10.1 ya da 3.10.2) eklenir ve çözelti bir buzdolabında tutulur (saklama ömrü en fazla 4 haftadır).

7.5. BHT yerine hidrokinon kullanılabilir.

7.6. Normal bir faz kolonu kullanılarak α -, β -, γ - ve δ -tokoferol ayrımı mümkündür.

7.7. Sodyum askorbat çözeltisi yerine yaklaşık 150 mg askorbik asit kullanılabilir.

7.8. Sodyum sülfat çözeltisi yerine yaklaşık 50 mg EDTA kullanılabilir.

7.9. Vitamin E asetat, alkali koşullar altında son derece hızlı hidrolize olur ve bu nedenle özellikle demir ve bakır gibi iz elementlerin varlığında oksitlenmeye çok duyarlıdır. 5000 mg/kg’dan yüksek seviyelerdeki Premikslerde vitamin E tayini yapılırken, bir vitamin E parçalanması oluşabilir. Bu nedenle onay için, alkalın sabunlaştırma adımı olmayan vitamin E formülasyonu enzimatik parçalanmasını içeren bir HPLC metodu önerilir.

8. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark daha yüksek sonuca bağlı %15’i geçmemelidir.

9. Ortak bir çalışmanın sonuçları

	Premiks	Premiks yem	Mineral konsantresi	Protein yemi	Domuz yavrusu
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
ortalama [mg/kg]	17.380	1.187	926	315	61,3
S _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/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 [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2.324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = Laboratuvarların sayısı

N = Tekil değerlerin sayısı

S_r = Tekrarlanabilirlik standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

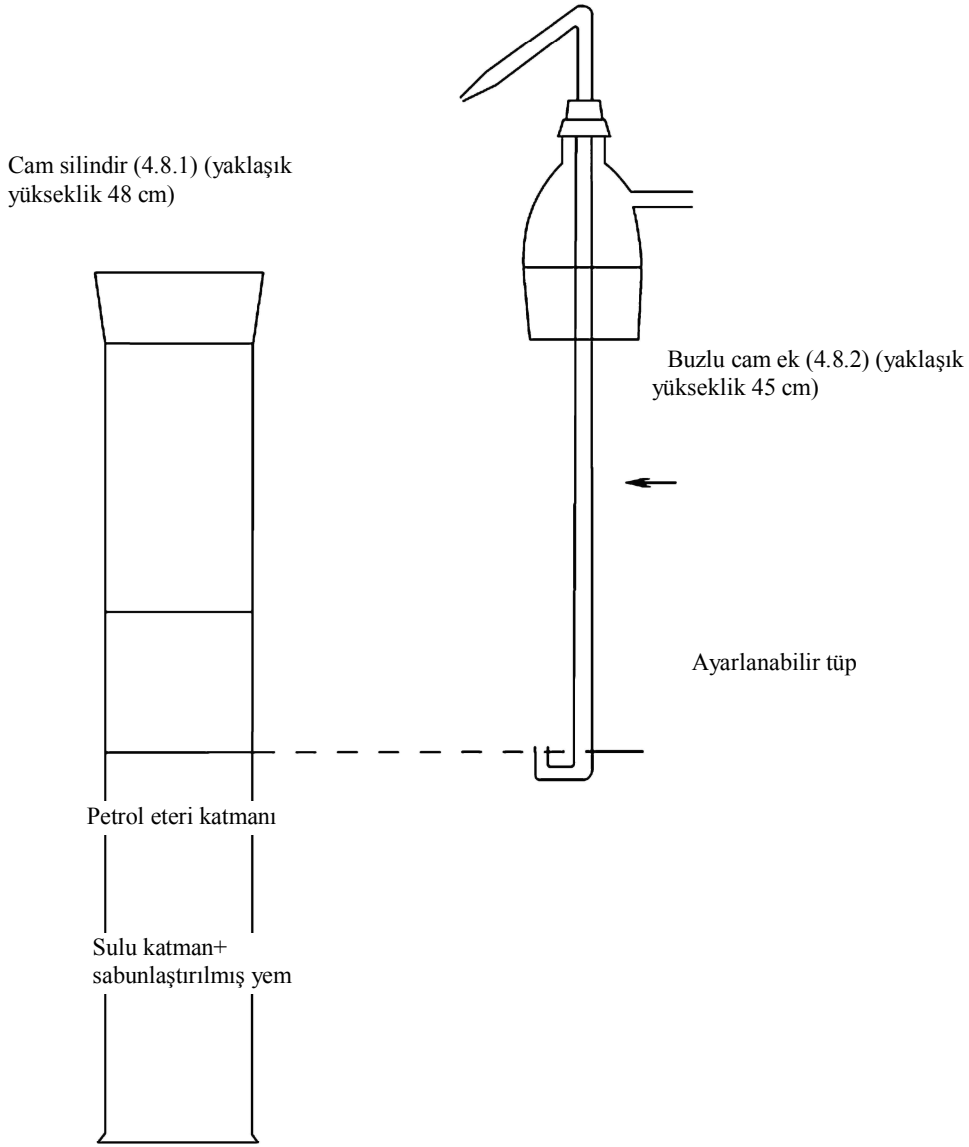
r = Tekrarlanabilirlik

R = Tekrar üretilebilirlik

CV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı

CV_R = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı

Şekil 1: Ekstraksiyon cihazı (4.8)



C. Demir, Bakır, Mangan ve Çinko İz Elementlerinin Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemdeki iz miktardaki demir, bakır, mangan ve çinko elementlerinin tayinini mümkün kılar. Miktar tayini sınırları şunlardır:

- demir (Fe): 20 mg/kg
- bakır (Cu): 10 mg/kg
- mangan (Mn): 20 mg/kg
- çinko (Zn): 20 mg/kg.

2. Prensiptir

Numune, organik maddeler hidroklorik asit içinde parçalandıktan sonra çözelti haline getirilir. Demir, bakır, mangan ve çinko elementleri, uygun bir seyreltmeden sonra atomik absorpsiyon spektrometresi ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

Tanıttıcı yorumlar

Ayırıcıların ve analitik çözeltilerin hazırlanmasında tayin edilecek maddeleri içermeyen, borosilikat cam ya da kuvars imbikte iki kere damıtılarak ya da iyon değişimi reçinesinde iki kez işlem görerek elde edilen su kullanılır.

Ayırıcılar en azından analitik saflıkta olmalıdır. Tayin edilecek elementlerin var olmadığı, bir kör deneyle kontrol edilmelidir. Gerekiyorsa, ayırıcılar daha da saflaştırılmalıdır.

Aşağıda açıklanan standart çözeltiler yerine, garantili olmaları ve kullanmadan önce kontrol edilmeleri kaydıyla ticari standart çözeltiler de kullanılabilir.

3.1. Hidroklorik asit (d:1,19 g/ml).

3.2. Hidroklorik asit (6 mol/litre).

3.3. Hidroklorik asit (0,5 mol/litre).

3.4. En fazla 1 mg/litre demir (Fe) içeriği olan ve buharlaştırmadan sonra en fazla 10 mg (sülfat olarak)/litre kalıntı bırakan hidroflorik asit, %38 - %40'lık (v/v).

3.5. Sülfürik asit (d: 1,84 g/ml).

3.6. Hidrojen peroksit (yaklaşık 100 hacim oksijen (ağırlıkça %30)).

3.7. Aşağıdaki gibi hazırlanan standart demir çözeltisi (1000 µg Fe/ml) ya da ticari olarak satın alınabilir eşdeğer bir çözelti: 1 g demir teli 200 ml 6 mol/litre hidroklorik asitte (3.2) çözündürülür, 16 ml hidrojen peroksit (3.6) eklenir ve suyla bir litreye tamamlanır.

3.7.1. Çalışma standardı demir çözeltisi (100 µg Fe/ml), standart çözeltinin bir kısmının (3.7) 9 kısım suyla seyreltilmesiyle hazırlanmaktadır.

3.8. Aşağıdaki gibi hazırlanan standart bakır çözeltisi (1000 µg Cu/ml) ya da ticari olarak satın alınabilir eşdeğer bir çözelti:

— 1 g toz formundaki bakır 25 ml 6 mol/litre hidroklorik asitte (3.2) çözündürülür, 5 ml hidrojen peroksit (3.6) eklenir ve suyla bir litreye tamamlanır.

3.8.1. Çalışma standardı bakır çözeltisi (10 µg Cu/ml), standart çözeltinin 1 kısmının (3.8) 9 kısım suyla seyreltilmesiyle ve ardından ortaya çıkan çözeltinin 1:9 suyla seyreltilmesiyle hazırlanır.

3.9. Aşağıdaki gibi hazırlanan standart mangan çözeltisi (1000 µg Mn/ml) ya da ticari olarak satın alınabilir eşdeğer bir çözelti:

— 1 g toz formundaki bakır 25 ml 6 mol/litre hidroklorik asitte (3.2) çözündürülür ve suyla bir litreye tamamlanır.

3.9.1. Çalışma standardı mangan çözeltisi (10 µg Mn/ml), standart çözeltinin bir kısmının (3.9) 9 kısım suyla seyreltilmesiyle ve ardından ortaya çıkan çözeltinin 1:9 suyla seyreltilmesiyle hazırlanır.

3.10. Aşağıdaki gibi hazırlanan standart çinko çözeltisi (1000 µg Zn/ml) ya da ticari olarak satın alınabilir eşdeğer bir çözelti:

— 1 g şerit ya da yaprak formundaki çinko 25 ml 6 mol/litre hidroklorik asitte (3.2) çözündürülür ve suyla bir litreye tamamlanır.

3.10.1. Çalışma standardı çinko çözeltisi (10 µg Zn/ml), standart çözeltinin bir kısmının (3.10) 9 kısım suyla seyreltilmesiyle ve ardından ortaya çıkan çözeltinin 1:9 suyla seyreltilmesiyle hazırlanır.

3.11. Lantan klorür çözeltisi: 12 g lantan oksit 150 ml suda çözündürülür, 100 ml 6 mol/litre hidroklorik asit (3.2) eklenir ve suyla bir litreye tamamlanır.

4. Cihazlar

4.1. Sıcaklık düzenlemesi ve tercihen kaydedicisi olan kül fırını.

4.2. Cam malzemeler dayanıklı borosilikat tipi olmalıdır ve özellikle eser element tayini için kullanıma ayrılmış cihaz kullanılması önerilir.

4.3. Gerekli aralıktaki hassasiyet ve kesinlik açısından metodun gerekliliklerini karşılayan atomik absorpsiyon spektrofotometresi.

5. Metot ⁽³⁾

5.1. Organik madde içeren numuneler

5.1.1. Yakma ve analiz için çözeltinin hazırlanması ⁽⁴⁾

5.1.1.1. 5 ila 10 g numune 0,2 mg hassasiyetle tartılarak kuvars ya da platin kroze (bakınız Not (b)) yerleştirilir, 105°C'deki bir etüvde kurutulur ve kroze soğuk kül fırınına (4.1) alınır. Fırın kapatılır (bakınız Not (c)) ve sıcaklığı, yaklaşık 90 dakika içinde kademeli olarak 450 ila 475°C'ye yükseltilir. Karbonlu materyali ortadan kaldırmak için bu sıcaklık 4 ila 16 saat (örneğin Gece boyunca) sürdürülür, ardından fırın açılır ve soğumaya bırakılır (bakınız Not (d)).

Küller su ile nemlendirilir ve bunlar 250 ml'lik bir behere aktarılır. Kroze toplamda yaklaşık 5 ml hidroklorik asit (3.1) ile yıkanır ve hidroklorik asit yavaşça ve dikkatle behere eklenir (CO₂ oluşumu nedeniyle şiddetli bir reaksiyon olabilir). Tüm köpürme durana kadar damla damla hidroklorik asit (3.1) eklenir. Kuruyana kadar buharlaştırılır, ara sıra cam bir çubukla karıştırılır.

Sonra kalıntıya 15 ml 6 mol/l hidroklorik asit (3.2) ve ardından yaklaşık 120 ml su eklenir. Cam çubuk ile karıştırılır (çubuk beherin içinde bırakılmalıdır) ve beher bir saat camı ile örtülür. Yavaşça kaynama noktasına getirilir ve çözünecek kül kalmayana kadar kaynama noktasında tutulur. Kül içermeyen süzgeç kağıdından süzülür ve süzüntü 250 ml'lik bir balon jojeye alınır. Beher ve süzgeç kağıdı 5 ml sıcak 6 mol/litre hidroklorik asitle (3.2) ve iki kez kaynar suyla yıkanır. Balon joje işaretine kadar suyla doldurulur (HCl konsantrasyonu yaklaşık 0,5 mol/l).

5.1.1.2. Süzgeçteki kalıntı siyah (karbon) görünüyorsa, yeniden fırına koyulur ve yeniden 450 ile 475°C'de yakılır. Bu yakma (yalnızca üç ila beş saat yeterlidir) işlemi, kül beyaz ya da beyaza yakın görüldüğünde tamamlanır. Kalıntı yaklaşık 2 ml hidroklorik asit (3.1) ile çözündürülür, kuruyana kadar buharlaştırılır ve 5 ml 6 mol/litre hidroklorik asit (3.2) eklenir. Isıtılır, çözelti balon joje içerisine süzülür ve su ile işarete kadar tamamlanır (HCl konsantrasyonu yaklaşık 0,5 mol/l).

Notlar:

(a) İz elementlerin tayininde özellikle çinko, bakır ve demir kaynaklı kontaminasyon risklerine karşı dikkatli olmak önemlidir. Bu nedenle numunelerin hazırlanmasında kullanılan ekipman bu metalleri içermemelidir.

Genel kontaminasyon riskini azaltmak için tozsuz bir ortamda, dikkatlice temiz ekipmanla ve iyice yıkanmış cam malzemelerle çalışılır. Çinko tayini özellikle cam malzeme, reaktifler, toz vb. birçok kontaminasyon türüne duyarlıdır.

(b) Yakılacak numunenin ağırlığı, kullanılan spektrofotometre duyarlılığına uygun olarak yemdeki yaklaşık iz element içeriğinden hesaplanır. İz element içeriği düşük belirli yemlerde 10 ila 20 g numune ile başlamak ve son çözeltiyi yalnızca 100 ml'ye tamamlamak gerekebilir.

(c) Yakma işlemi, hava ya da oksijen girmeyen kapalı bir kül fırınında gerçekleştirilmelidir.

(d) Pirometre ile gösterilen sıcaklık en fazla 475°C olmalıdır.

5.1.2. Spektrofotometrik tayin

5.1.2.1. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Tayin edilecek her element için madde 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 ve 3.10.1'de verilen çalışma standardı çözeltisinden bir dizi kalibrasyon çözeltisi hazırlanır, her bir kalibrasyon çözeltisi yaklaşık 0,5 mol/litrelik bir HCl konsantrasyonu demir, mangan ve çinko söz konusu olduğunda %0,1 Lantanyuma (a/h) eşdeğer bir lantan klorür konsantrasyonu içermelidir.

⁽³⁾ Aynı sonuçları vermeleri kaydıyla diğer parçalama metotları (mikrodalga basınçlı parçalama) de kullanılabilir.

⁽⁴⁾ Yeşil kaba yem (taze ya da kuru), eser elementleri tutabilecek çok miktarda bitkisel silis içermeye eğilimindedir ve ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bu nedenle bu yemlerin numunelerinde aşağıdaki değiştirilmiş metod izlenmelidir. Süzme işlemine kadar 5.1.1.1 işlemini uygulanır. Çözünmeyen kalıntıyı içeren süzgeç kağıdı iki kez kaynar suyla yıkanır ve kuvars ya da platin bir kroze içine koyulur. Kül fırınında (4.1) 550°C'nin altında bir sıcaklıkta tüm karbonlu materyaller tümüyle yanana kadar yakılır. Soğumaya bırakılır, birkaç damla su ve ardından 10 ila 15 ml hidroflorik asit (3.4) eklenir ve yaklaşık 150°C'de kuruyana kadar buharlaştırılır. Kalıntıda herhangi bir silis içeriği kalırsa, birkaç ml hidroflorik asit (3.4) içinde yeniden çözündürülür ve kuruyana kadar buharlaştırılır. Beş damla sülfürik asit (3.5) eklenir ve beyaz duman çıkmayana kadar ısıtılır. 5 ml 6 mol/litre hidroklorik asit (3.2) ve yaklaşık 30 ml su ekledikten sonra, ısıtılır, çözelti 250 ml'lik balon jojeye filtrelendir ve su ile işarete kadar tamamlanır (HCl konsantrasyonu yaklaşık 0,5 mol/l). Tayin işlemine madde 5.1.2'den devam edilir.

Seçilen iz element konsantrasyonları kullanılan spektrofotometrenin hassaslık sınırı aralığında olmalıdır.

Aşağıdaki tablolarda kalibrasyon çözeltilerinin bileşim aralıkları gösterilmektedir; bununla birlikte kullanılan spektrofotometrenin türüne ve duyarlılığına göre başka konsantrasyonlar seçmek gerekebilir.

Demir

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
Çalışma standardı çözeltisi (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe), ml	0	0,5	1	2	3	4	5
HCl (3.2), ml	7	7	7	7	7	7	7
10 ml of lantan klorür çözeltisi (3.11) eklenir ve suyla 100 ml'ye tamamlanır							

Bakır

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Çalışma standardı çözeltisi (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu), ml	0	1	2	4	6	8	10
HCl (3.2), ml	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Çalışma standardı çözeltisi (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn), ml	0	1	2	4	6	8	10
HCl (3.2), ml	7	7	7	7	7	7	7
10 ml of lantan klorür çözeltisi (3.11) eklenir ve suyla 100 ml'ye tamamlanır							

Çinko

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
Çalışma standardı çözeltisi (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn), ml	0	0,5	1	2	4	6	8
HCl (3.2), ml	7	7	7	7	7	7	7
10 ml of lantan klorür çözeltisi (3.11) eklenir ve suyla 100 ml'ye tamamlanır							

5.1.2.2. Analiz için çözeltinin hazırlanması

Bakır tayini için madde 5.1.1'den hazırlanan çözelti normalde doğrudan kullanılabilir. Konsantrasyonunu kalibrasyon çözeltilerinin sınırına çekmek gerekiyorsa, belli bir miktarı 100 ml'lik bir balon jöjeye pipetle alınır ve 0,5 mol/litre hidroklorik asit (3.3) ile işarete kadar tamamlanabilir.

Demir, mangan ve çinko tayini için madde 5.1.1'den hazırlanan çözeltiden belli bir miktar 100 ml'lik balon jöjeye pipetle alınır, 10 ml lantan klorür çözeltisi (3.11) eklenir ve 0,5 mol/litre hidroklorik asit (3.3) ile işarete kadar tamamlanır (ayrıca bkz. madde 8 'Gözlem').

5.1.2.3. Kör deney

Kör deney metodun belirtilen tüm adımlarını içermeli, ancak numune materyali göz ardı edilmelidir. Kalibrasyon özeltisi '0', kör olarak kullanılmamalıdır.

5.1.2.4. Atomik absorpsiyon ölçümü

Kalibrasyon özeltilerinin ve analiz edilecek çözeltinin atomik absorpsiyonu, oksitlendirici bir hava-asetilen alevi kullanarak aşağıdaki dalga boylarında ölçülür:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Her ölçüm dört kez gerçekleştirilir.

5.2. Mineral yem

Numune organik madde içermiyorsa, önceden yakmak gerekli değildir. Madde 5.1.1.1'de belirtilen şekilde ve ikinci paragraftan başlatılarak devam edilir. Hidroflorik asidin buharlaştırılması göz ardı edilebilir.

6. Sonuçların hesaplanması

Bir kalibrasyon eğrisi kullanarak, analiz edilecek çözeltideki iz element konsantrasyonunu hesaplanır ve sonuçlar bir kg numunede bulunan iz element miktarı, mg şeklinde (ppm) ifade edilir.

7. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin, aynı analist ile gerçekleştirilen iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

- en fazla 50 mg/kg'a kadar iz element içeriği için mutlak değer olarak 5 mg/kg,
- 50 ila 100 mg/kg'a kadar iz element içeriği için daha yüksek sonucun %10'u,
- 100 ila 200 mg/kg'a kadar iz element içeriği için mutlak değer olarak 10 mg/kg,
- 200 mg/kg'dan fazla iz element içeriği için daha yüksek sonucun %5'i,

8. Gözlem

Çok miktarda fosfat varlığı demir, mangan ve çinko tayinini etkileyebilir.

Bu etkileşim lantanyum klorür çözeltisi (3.11) eklenerek düzeltilmelidir. Ancak numunedeki ağırlık oranı $Ca + Mg/P = > 2$ ise, analiz çözeltisine ve kalibrasyon çözeltilerine lantanyum klorür çözeltisi (3.11) eklenmesi göz ardı edilebilir.

Ç. Halofuginon Tayini

DL-trans-7-bromo-6-kloro-3- [3-(3-hidroksi-2-piperidil)asetonil]-kuinazolin-4-(3H)-bir hidrobromür

1. Amaç ve kapsam

Metot, yemdeki halofuginon seviyesinin tayinini mümkün kılar. Miktar tayinlerinin sınırı 1 mg/kg'dır.

2. Prensip

Sıcak su ile işleme tabi tuttuktan sonra, halofuginon serbest baz olarak etil asetata ekstrakte edilir ve ardından hidroklorür olarak sulu asit çözeltisine ayrıştırılır. Ekstrakt iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılır. Halofuginon içeriği, bir UV detektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayrıntılar

3.1. Asetonitril, HPLC kullanım saflığında

3.2. Amberlit XAD-2 reçinesi.

3.3. Amonyum asetat.

3.4. Etil asetat.

3.5. Asetik asit, Glasiyal.

3.6. Halofuginon standart maddesi DL-trans-7-bromo-6-kloro-3- [3-(3-hidroksi-2-piperidil)asetonil]- (quinazoline) -4-(3H)- bir hidrobromür, E 764).

3.6.1. Halofuginon stok standart çözeltisi, 100 µg/ml

50 mg halofuginon (3.6) 0,1 mg hassasiyetle 500 ml'lik balon jöjeye tartılır, amonyum asetat tampon çözeltisinde (3.18) çözündürülür, tampon çözeltiyle işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözelti, karanlıkta 5°C'de saklanırsa üç hafta boyunca stabildir.

3.6.2. Kalibrasyon çözeltileri

Bir dizi 100 ml'lik balon jöjeye 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 6,0 ml stok standart çözelti (3.6.1) aktarılır. Mobil faz (3.21) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltiler sırasıyla 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 6,0 µg/ml halofuginon konsantrasyonlarına sahiptir. Bu çözeltiler kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.7. Hidroklorik asit (p_{20} yaklaşık 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Gümüş nitrat.

3.10. Sodyum askorbat.

3.11. Sodyum karbonat.

3.12. Sodyum klorür.

3.13. EDTA (etilenediamintetraasetik asit, disodyum tuzu).

3.14. Su, HPLC kullanım saflığında

3.15. Sodyum karbonat çözeltisi, c = 10 g/100 ml.

3.16. Sodyum klorürce doymuş sodyum karbonat çözeltisi, c = 5 g/100 ml.

50 g sodyum karbonat (3.11) suda çözündürülür, 1 litreye seyreltilir ve çözelti doymuş hale gelene kadar sodyum klorür (3.12) eklenir.

3.17. Hidroklorik asit, yaklaşık 0,1 mol/l.

10 ml HCl (3.7) suyla 1 litreye seyreltilir.

3.18. Amonyum asetat tampon çözeltisi, yaklaşık 0,25 mol/l.

19,3 g amonyum asetat (3.3) ve 30 ml asetik asid (3.5) suda çözündürülür (3.14) ve 1 litreye seyreltilir.

3.19. Amberlit XAD-2 reçinesi hazırlama.

Uygun miktarda Amberliti (3.2) tüm klorür iyonları giderilene kadar suyla yıkanır; bu, atılmış sulu faz üstünde gerçekleştirilen bir gümüş nitrat (3.20) testi ile belirlenebilir. Ardından reçine 50 ml metanol (3.8) ile yıkanır, metanolü atılır ve reçine taze metanol altında saklanır.

3.20. Gümüş nitrat çözeltisi, yaklaşık 0,1 mol/l.

0,17 g gümüş nitrati (3.9) 10 ml suda çözündürülür.

3.21. HPLC Mobil faz.

500 ml asetonitril (3.1) 300 ml amonyum asetat tampon çözeltisi (3.18) ve 1200 ml su (3.14) ile karıştırılır. Asetik asit (3.5) kullanarak pH'ı 4,3'e ayarlanır. 0,22 µm filtreden (4.8) süzülür ve çözelti gazdan arındırılır (örn. 10 dakika ultrason ses dalgaları uygulayarak). Bu çözelti, kapalı bir kapta ve karanlıkta saklanırsa bir ay boyunca stabildir.

4. Cihazlar

4.1. Ultrasonik banyo

4.2. Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporator)

4.3. Santrifüj

4.4. HPLC cihazı, değişken dalga boyu mor ötesi detektörlü (UV Dedektör) ya da Diode Array detektörlü

4.4.1. Sıvı kromatografik kolon, 300 mm × 4 mm, C18, 10 µm dolgu ya da eşdeğeri bir kolon.

4.5. Sinterlenmiş bir cam filtre ve bir musluk takılmış cam kolon (300 mm x 10 mm)

4.6. Fiberglas filtreler, 150 mm çapında

4.7. Membran filtreler, 0,45 µm

4.8. Membran filtreler, 0,22 µm

5. Metot

Not: Halofuginon serbest baz olduğundan, alkali ya da etil asetat çözeltilerinde stabil değildir. Etil asetat içinde en fazla 30 dakika kalır.

5.1. Genel

5.1.1. Halofuginon ya da etkileyen maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem testi yapılmalıdır.

5.1.2. Numunedeki varlığına yakın miktarda halofuginon eklenerek zenginleştirilen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 3 mg/kg düzeyine ulaştırmak için 300 µl stok standart çözelti (3.6.1) 10 g kör yeme eklenir, karıştırılır ve ekstraksiyon basamağından (5.2) önce 10 dakika bekletilir.

Not: Bu metodun amacı doğrultusunda, kör yem, numunedekine benzer olmalı ve analizde halofuginon tespit edilmemelidir.

5.2. Ekstraksiyon

10 g hazırlanmış numune 0,1 mg hassasiyetle 200 ml'lik santrifüj tüpüne tartılır, 0,5 g sodyum askorbat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) ve 20 ml su eklenip karıştırılır. Tüp 5 dakika süreyle bir su banyosuna (80°C) konulur. Oda sıcaklığına soğuttuktan sonra 20 ml sodyum karbonat çözeltisi (3.15) eklenir ve karıştırılır. Hemen 100 ml etil asetat (3.4) eklenir ve elle 15 saniye boyunca şiddetle çalkalanır. Ardından tüp üç dakika ultrasonik banyoya (4.1) konulur ve tapası gevşetilir. İki

dakika santrifüje tabi tutulur ve etil asetat fazı boşaltılır fiberglas bir filtreden (4.6) 500 ml'lik ayırma hunisine boşaltılır. Numunenin ekstraksiyonu 100 ml'lik ikinci bir etil asetat ile yinelenir. Birleştirilen ekstraktlar bir dakika boyunca 50 ml sodyum karbonat bakımından doymuş sodyum klorür çözeltisiyle (3.16) yıkanır ve sulu katman atılır.

Organik katman 1 dakika boyunca 50 ml hidroklorik asitle (3.17) ekstrakte edilir. Alttaki asit katmanını 250 ml'lik ayırma hunisine akıtılır. Organik katman 1,5 dakika boyunca 50 ml'lik ilave hidroklorik asit ile yeniden ekstrakte edilir ve ilk ekstrakt ile birleştirilir. Birleştirilmiş asit ekstraktları yaklaşık 10 saniye 10 ml etil asetatla (3.4) karıştırılarak yıkanır.

Sulu katman nicel olarak 250 ml'lik yuvarlak tabanlı cam balona aktarılır ve organik faz atılır.

Kalan tüm etil asetat, bir döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) (4.2) kullanılarak asit çözeltisinden buharlaştırılır. Su banyosunun sıcaklığı en fazla 40°C olmalıdır. Tüm etil asetat kalıntısı, yaklaşık 25 mbar'lık bir vakum altında, 38°C'de 5 dakika içinde ayrılır.

5.3. Temizleme

5.3.1. Amberlit Kolonunun Hazırlanması

Her numune ekstraktı için bir XAD-2 kolunu hazırlanır. 10 g hazırlanmış amberliti (3.19), metanol (3.8) ile cam kolona (4.5) aktarılır. Reçine yatağının üstüne cam yünüden küçük bir tıpa eklenir. Metanol kolondan tahliye edilir ve reçine 100 ml suyla yıkanır, sıvı reçine yatağının üstüne ulaştığında akışı durdurulur. Kullanmadan önce kolonun dengeye ulaşması için 10 dakika beklenir. Kesinlikle kolonun kurummasına izin verilmemelidir.

5.3.2. Numune Temizleme

Ekstrakt (5.2), nicel olarak, hazırlanmış Amberlit kolonunun (5.3.1) üstüne aktarılır ve elüe edilir, elüatı atılır. Elüasyon hızı en fazla 20 ml/dakika olmalıdır. Yuvarlak tabanlı balon joje 20 ml hidroklorik asitle (3.17) yıkanır ve bu reçine kolonunu yıkamak için kullanılır. Kalan asit çözeltisi hava üfleyerek giderilir. Yıkama suları atılır. 100 ml metanol (3.8) kolona eklenir ve 5 ila 10 ml'sinin elüe olmasına izin verilir, elüatı 250 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona alınır. Kalan metanolün reçine ile dengelenmesi için 10 dakika beklenir ve elüasyon işlemine en fazla 20 ml/dakika hızda devam edilir, elüatı aynı yuvarlak tabanlı cam balona alınır. Metanol döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) (4.2) buharlaştırılır, su banyosunun sıcaklığı en fazla 40°C olmalıdır. Kalıntı, mobil faz (3.21) kullanarak ve nicel olarak 10 ml'lik kalibre edilmiş balon jöjeye aktarılır. Mobil faz ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Sulu kısım bir membran filtreden (4.7) süzülür. Bu çözelti HPLC tayini (5.4) için saklanır.

5.4. HPLC Tayini

5.4.1. Parametreler

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir.

Sıvı kromatografik kolon (4.4.1)

HPLC Mobil faz (3.21)

Akış hızı: 1,5 - 2 ml/dak.

Dalga boyu: 243 nm

Enjeksiyon hacmi: 40 ila 100 µl.

3,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisi (3.6.2), tutarlı pik yükseklikleri (alanlar) ve alıkonma süreleri elde edilene kadar birkaç kez enjekte edilerek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.4.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltisi (3.6.2) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun pik yükseklikleri (alanları) ölçülür.

Kalibrasyon çözeltilerinin apisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlarına ordinatlarda denk gelen ortalama pik yükseklikleri ya da alanları kullanılarak bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.4.3. Numune çözeltisi

Kalibrasyon çözeltileri için alınanla aynı hacmi kullanarak numune ekstraktı (5.3.2) birkaç kez enjekte edilir ve halofuginon piklerinin ortalama yüksekliği (alan) belirlenir.

6. Sonuçların hesaplanması

Numune çözeltisinin konsantrasyonunu, kalibrasyon grafiğini (5.4.2) referans alarak numune çözeltisinin halofuginon piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan) ve µg/ml cinsinden belirlenir.

Numunenin mg/kg cinsinden halofuginon içeriği "w" aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;
c = Numune çözeltisinin µg/ml cinsinden halofuginon konsantrasyonu,
m = Test porsiyonunun gram cinsinden ağırlığı.

7. Sonuçların Validasyonu

7.1. Tanıma

Analitin tanınması ortak kromatografi ile ya da numune ekstraktının ve 6,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisinin (3.6.2) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array detektörü kullanılarak onaylanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi

Bir numune ekstraktı, uygun miktarda kalibrasyon çözeltisi (3.6.2) eklenerek zenginleştirilir. Eklenen halofuginon miktarı numune ekstraktında bulunan tahmini halofuginon miktarına benzer olmalıdır.

Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca halofuginon pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Maksimum yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği orijinal genişliğin ±%10 aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array ile Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) numunenin ve standart spektrumlarının, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen maksimum absorpsiyon dalga boyu, tespit sisteminin çözülme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array tespit için bu tipik olarak ± 2 nm'dir;

(b) 225 ile 300 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır;

(c) 225 ile 300 nm arasında, aynı ekstrakt tarafından üretilen pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, apeks spektrumunun absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark, halofuginon içeriği için 3 mg/kg'a kadar 0,5 mg/kg'ı geçmemelidir.

7.3. Geri kazanım

Zenginleştirilmiş kör numune için geri kazanım en az %80 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

Üç numunenin 8 laboratuvarında analiz edilmesi için bir çalışma düzenlenmiştir.

Sonuçlar

	Numune A (kör): Alındığında	Numune B (Öğütülmüş halde İnce yem):		Numune C (Pelet halde yem):	
		Alındığında	İki ay sonra	Alındığında	İki ay sonra
Ortalama [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
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = Tespit edilmedi

SR = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

CVR = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı (%)

Rec. = Geri kazanım (%)

D. Robenidin Tayini

1,3-bis [(4-klorobenziliden)amino]guanidin — hidroklorür

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemdeki robenidin seviyelerinin tayinini mümkün kılar. Miktar tayinlerinin sınırı 5 mg/kg'dır.

2. Prensiip

Numune asitleştirilmiş metanol ile ekstrakte edilir. Ekstrakt kurutulur ve temsili bir miktarı bir alüminyum oksit kolonunda temizlemeye tabi tutulur. Robenidin, metanol ile kolondan elüe edilir, konsantre edilir ve mobil faz ile uygun hacme tamamlanır. Robenidin içeriği, bir UV detektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Metanol.

3.2. Asitleştirilmiş metanol.

4,0 ml hidroklorik asidi ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) 500 ml'lik balon jojeye aktarılır, metanol (3.1) ile işarete kadar tamamlanılır ve karıştırılır. Bu çözelti kullanılmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.3. Asetonitril, HPLC kullanım saflığında

3.4. Moleküler elek.

Tip 3A, 8 ila 12 gözlü inciler (tanecik) (1,6-2,5 mm'lik inciler (tanecik), kristalimsi alüminyum silikat, 0,3 mm'lik gözenek çapı).

3.5. Kolon kromatografisi için alüminyum oksit asidik etkinlik sınıfı I.

100 g alüminyum oksidi uygun bir kaba aktarılır ve 2,0 ml su eklenir. Kapatılır ve yaklaşık 20 dakika çalkalanır. İyi kapatılmış bir kaptaki saklanır.

3.6. Potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi, $c = 0,025$ mol/l.

3,40 g potasyum dihidrojen fosfatı 1000 ml'lik balon jodede suda (HPLC kullanım saflığında) çözündürülür, işarete kadar tamamlanılır ve karıştırılır.

3.7. Disodyum hidrojen fosfat çözeltisi, $c = 0,025$ mol/l.

3,55 g susuz (ya da 4,45 g dihidrat ya da 8,95 g dodesahidrat) di-sodyum hidrojen fosfatı 1 litrelik balon jodede su (HPLC kullanım saflığında) içinde çözündürülür, işarete kadar tamamlanılır ve karıştırılır.

3.8. HPLC mobil faz.

Aşağıdaki reaktiflerle birlikte karıştırılır:

650 ml asetonitril (3.3),

250 ml su (HPLC kullanım saflığında),

50 ml potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (3.6),

50 ml di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi (3.7).

0,22 µm filtreden (4,6) süzülür ve çözelti gazdan arındırılır (örn. 10 dakika ultrason ses dalgaları uygulayarak).

3.9. Standard madde.

Saf robenidin: 1,3-bis [(4-klorobenziliden)amino]guanidin — hidroklorür

3.9.1. Robenidin stok standart çözeltisi: 300 µg/ml

30 mg robenidin standart maddesi (3.9) 0,1 mg hassasiyetle tartılır. Asitleştirilmiş metanol (3.2) içinde 100 ml'lik balon jodede çözündürülür, aynı çözücüyle işarete kadar tamamlanılır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ve karanlık bir yerde saklanır.

3.9.2. Robenidin ara standart çözeltisi: 12 µg/ml

10,0 ml stok standart çözeltisi (3.9.1) 250 ml'lik balon jojeye aktarılır, mobil fazla (3.8) işarete kadar tamamlanılır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ve karanlık bir yerde saklanır.

3.9.3. Kalibrasyon çözeltileri

Bir dizi 50 ml'lik kalibre edilmiş balon jojeye 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ve 25,0 ml ara standart çözeltisi (3.6.1) aktarılır. Mobil faz (3.8) ile işarete kadar tamamlanılır ve karıştırılır. Bu çözeltiler sırasıyla 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 ve 6,0 µg/ml robenidine karşılık gelir. Bu çözeltiler kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.10. Su, HPLC kullanım saflığında

4. Cihazlar

4.1. Cam kolon.

Amber camdan üretilmiş, musluk ve yaklaşık 150 ml kapasiteli bir hazne takılmış, iç çapı 10 – 15 mm, uzunluğu 250 mm.

4.2. Mekanik çalkalayıcı ya da manyetik karıştırıcı.

4.3. Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporator).

4.4. HPLC cihazı, değişken dalga boyu mor ötesi detektörlü (ultraviolet detector) ya da 250 – 400 nm aralığında çalışan Diode Array detektörlü.

4.4.1. Sıvı kromatografik kolon: 300 mm x 4 mm, C18, 10 µm dolgu ya da eşdeğeri.

4.5. Fiberglas süzgeç kağıdı (Whatman GF/A ya da eşdeğeri).

4.6. Membran filtreler, 0,22 µm.

4.7. Membran filtreler, 0,45 µm.

5. Metot

Not: Robenidin ışığa duyarlıdır. Tüm işlemlerde amber renkli cam malzeme kullanılmalıdır.

5.1. Genel

5.1.1. Robenidin ya da etkileyen maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir.

5.1.2. Numunedeki varlığına yakın miktarda robenidin eklenen kör yem (5.1.1) analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 60 mg/kg seviyesine ulaştırmak için 3,0 ml stok standart çözeltisi (3.9.1) 250 ml'lik erlene aktarılır. Çözelti, bir azot akışında yaklaşık 0,5 ml'ye buharlaştırılır. 15 g kör yem eklenir, karıştırılır ve ekstraksiyon aşamasına (5.2) devam etmeden önce 10 dakika bekleyin.

Not: Bu metodun amacı doğrultusunda, kör yem numunedekine benzer olmalı ve analizde robenidin tespit edilmemelidir.

5.2. Ekstraksiyon

Yaklaşık 15 g hazırlanmış numune 0,01 g hassasiyetle tartılır. 250 ml'lik bir konik cam balona aktarılır ve 100,0 ml asitleştirilmiş metanol (3.2) eklenilir, kapatılır ve çalkalayıcı (4.2) ile bir saat çalkalanılır. Çözelti fiberglas süzgeç kağıdından (4.5) süzülür ve süzütünün tümü 150 ml'lik konik cam balona alınır. 7,5 g moleküler elek (3.4) eklenir, kapatılır ve beş dakika çalkalanılır. Hemen fiberglas süzgeç kağıdından süzülür.

Bu çözelti saflaştırma adımı (5.3) için tutulur.

5.3. Saflaştırma

5.3.1. Alüminyum oksit kolonunun hazırlanması

Bir cam kolonunun (4.1) alt ucuna cam yününden küçük bir tıpa sokulur ve bir cam çubuk kullanılarak sıkıştırılır. 11,0 g hazırlanmış alüminyum oksit (3.5) tartılır ve kolona aktarılır. Bu aşamada havayla temasın en az düzeyde olmasına dikkat edilmelidir. Yüklenen kolona alt ucundan nazikçe vurarak alüminyum oksidin çökmesi sağlanır.

5.3.2. Numune saflaştırma

Pipetle kolona (5.2) maddesinde hazırlanan 5,0 ml numune ekstraktı aktarılır. Pipetin ucu kolon duvarına yakın tutulur ve çözeltinin alüminyum okside absorbe edilmesi beklenilir. 100 ml metanol (3.1) kullanılarak, 2 - 3 ml/dakikalık bir hızla robenidini kolondan elüe edilir ve elüatı 250 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona alınır. Metanol çözeltisi, azaltılmış basınç altında, 40°C'de, bir döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) (4.3) ile kuruyana kadar buharlaştırılır. Kalıntı 3 - 4 ml mobil faz (3.8) içinde yeniden çözündürülür ve nicel olarak 10 ml'lik balon jojeye aktarılır. Balon birkaç kez 1 ila 2 ml'lik mobil faz ile durulanır ve bu durulama suları balon jojeye aktarılır. Aynı çözücü ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Temsili bir miktar, 0,45 µm'lik bir membran filtreden (4.7) süzülür. Bu çözelti HPLC tayini (5.4) için saklanır.

5.4. HPLC tayini

5.4.1. Parametreler

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir:

Sıvı kromatografik kolon (4.4.1),

HPLC Mobil faz (3.8),

Akış hızı: 1,5 - 2 ml/dakika,

Detektör dalga boyu: 317 nm,

Enjeksiyon hacmi: 20 ila 50 µl.

3,6 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisini (3.9.3), tutarlı pik yükseklikleri ve alıkonma süreleri elde edene kadar birkaç kez enjekte ederek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.4.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltisi (3.9.3) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun pik yükseklikleri (alanları) ölçülür.

Kalibrasyon çözeltilerinin apisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlarına ordinatlarda denk gelen ortalama pik yüksekliklerini ya da alanlarını kullanarak bir kalibrasyon eğrisi çizilir.

5.4.3. Numune çözeltisi

Kalibrasyon çözeltileri için alınanla aynı hacmi kullanarak numune ekstraktı (5.3.2) birkaç kez enjekte edilir ve robenidin piklerinin ortalama pik yüksekliği (alan) belirlenir.

6. Sonuçların Hesaplanması

Kalibrasyon grafiğini (5.4.2) referans alarak, aynı çözeltinin robenidin piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan), numune çözeltisinin konsantrasyonunu µg/ml cinsinden tayin edilir.

Numunedeki mg/kg cinsinden robenidin içeriği “w” aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

c = Numune çözeltisinin µg/ml cinsinden robenidin konsantrasyonu,

m = Test porsiyonunun gram cinsinden ağırlığı.

7. Sonuçların Validasyonu

7.1. Tanıma

Analitin tanınması ortak kromatografi ile ya da numune ekstraktının ve 6 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisinin (3.9.3) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array dedektörü kullanılarak onaylanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi

Bir numune ekstraktı, uygun miktarda kalibrasyon çözeltisi (3.9.3) eklenerek güçlendirilir. Eklenen robenidin miktarı numune ekstraktında bulunan tahmini robenidin miktarına benzer olmalıdır.

Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca robenidin pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Maksimum yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği orijinal genişliğin yaklaşık %10'u aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) numunenin ve standart spektrumlarının, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen maksimum absorpsiyon dalga boyu, tespit sisteminin çözünüme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array ile tespit için bu tipik olarak yaklaşık 2 nm'dir;

(b) 250 ile 400 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır;

(c) 250 ile 400 nm arasında, aynı ekstrakt tarafından üretilen pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, apeks spektrumunun absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunede gerçekleştirilen iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark, 15 mg/kg'den yüksek robenidin içeriği için daha yüksek sonucun %10'unu geçmemelidir.

7.3. Geri kazanım

Güçlendirilmiş bir kör numune için geri kazanım en az %85 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

Bir EC ortak çalışması düzenlenmiş, bu çalışmada 12 laboratuvar tarafından toz Öğütülmüş ya da pelet formunda dört kanatlı ve tavşan yemi numunesi analiz edilmiştir. Her numunede analizler paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

	Kanatlı		Tavşan	
	Öğütülmüş toz ince formda	Pelet formda	Öğütülmüş toz ince formda	Pelet formda
Ortalama [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
Geri kazanım [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = Tekrarlanabilirlik standart sapması,
 CV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı, %
 S_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması,
 CVR = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı. %

E. Diklazuril Tayini

(+)-4-klorfenil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil] asetonitril

1. Amaç ve kapsam

Metot, yemdeki ve premikslerdeki diklazuril seviyesinin tayinini mümkün kılar. Tespit limiti 0,1 mg/kg, ölçüm limiti 0,5 mg/kg'dır.

2. Prensiptir

Bir iç standart ekledikten sonra, numune asitleştirilmiş metanol ile ekstrakte edilir. Yem için temsili bir miktar ekstrakt, bir C18 katı fazlı ekstraksiyon kartuşunda saflaştırılır. Diklazuril, asitleştirilmiş metanol ve su karışımı ile kartuştan elüe edilir. Buharlaştırmadan sonra kalıntı DMF/su içinde çözündürülür. Premiksler için ekstrakt buharlaştırılır ve kalıntı, DMF/su içinde çözündürülür. Diklazuril içeriği, bir UV dedektörü kullanılarak gradyan ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Su, HPLC kullanım saflığında

3.2. Amonyum asetat.

3.3. Tetrautilamonyum hidrojen sülfat (TBHS)

3.4. Asetonitril, HPLC kullanım saflığında

3.5. Metanol, HPLC kullanım saflığında.

3.6. N, N-dimetilformamid (DMF)

3.7. Hidroklorik asit, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.

3.8. Standard madde: diklazuril II-24: (+)-4-klorfenil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil] asetonitril, garantili saflıkta,

3.8.1. Diklazuril stok standart çözeltisi, 500 µg/ml

25 mg diklazuril standart maddesi (3.8) 0,1 mg hassasiyetle 50 ml'lik balon jojeye tartılır. DMF (3.6) içinde çözündürülür ve DMF (3.6) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ya da amber renkli cam malzeme kullanılır ve buzdolabında saklanır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.8.2. Diklazuril standart çözeltisi, 50 µg/ml

5,00 ml stok standart çözeltisi (3.8.1) 50 ml'lik balon jojeye aktarılır, DMF (3.6) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ya da amber renkli cam malzeme kullanılır ve buzdolabında saklanır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.9. İç standart maddesi: 2,6 dikloro- α -(4-klorofenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazine-2 (3H) —il) α -metilbenzen-asetonitril

3.9.1. İç stok standart çözeltisi, 500 µg/ml

25 mg iç standart maddesini (3.9) 0,1 mg hassasiyetle 50 ml'lik balon jojeye tartın. DMF (3.6) içinde çözündürülür ve DMF (3.6) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ya da amber renkli balon joje kullanılır ve buzdolabında saklanır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.9.2. İç standart çözeltisi, 50 µg/ml

5,00 ml iç stok standart çözeltisi (3.9.1) 50 ml'lik balon jojeye aktarılır, DMF (3.6) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ya da amber renkli balon joje kullanılır ve bir buzdolabında saklanır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.9.3. Premiksler için iç standart çözeltisi, p/1000 mg/ml

(p = premiksdeki diklazuril'in nominal içeriği, mg/kg)

p/10 mg iç standart maddesi 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jojeye tartılır, DMF (3.6) içinde, ultrasonik banyoda (4.6) çözündürülür, DMF ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ya da amber renkli cam malzeme kullanılır ve bir buzdolabında saklanılır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.10. Kalibrasyon çözeltisi, 2 µg/ml.

2,00 ml diklazuril standart çözeltisi (3.8.2) ve 2,00 ml iç standart çözeltisi (3.9.2) 50 ml'lik balon jojeye pipetle alınır. 16 ml DMF (3.6) eklenir, DMF (3.6) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözelti kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.11. C18 katı fazlı ekstraksiyon kartuşu, örn. Bond Elut, boyut: 1 cc, sorban ağırlığı: 100 mg.

3.12. Ekstraksiyon çözücüsü: asitleştirilmiş metanol.

5,0 ml hidroklorik asit (3.7) pipetle alınarak 1000 ml metanol (3.5) içerisine koyulur ve karıştırılır.

3.13. HPLC için mobil faz

3.13.1. Elüent A: amonyum asetat — tetrabutilamonyum hidrojen sülfat çözeltisi.

5 g amonyum asetat (3.2) ve 3,4 g TBHS (3.3) 1000 ml suda (3.1) çözündürülür ve karıştırılır.

3.13.2. Elüent B: asetonitril (3.4).

3.13.3. Elüent C: metanol (3.5).

4. Cihaz

4.1. Mekanik çalkalayıcı

4.2. Üçlü gradyan HPLC cihazı

4.2.1. Sıvı kromatografik kolon, Hipersil ODS, 3 µm dolgu, 100 mm x 4,6 mm, ya da eşdeğeri.

4.2.2. Değişken dalga boyu ayarlı UV dedektörü ya da Diode Array dedektörü

4.3. Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporator)

4.4. Membran filtre, 0,45 µm.

4.5. Vakumlu manifold

4.6. Ultrasonik banyo

5. Metot

5.1. Genel

5.1.1. Kör yem

Diklazuril ya da etkileşime giren maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir. Kör yem numunedekine benzer türde olmalı ve analizde, diklazuril ya da etkileyen maddeler tespit edilmemelidir.

5.1.2. Geri kazanım testi

Numunedeki varlığına yakın miktarda diklazuril eklenen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 1 mg/kg düzeyine ulaştırmak için 0,1 ml stok standart çözeltisi (3.8.1) 50 g'lık kör yeme eklenir, iyice karıştırılır ve 10 dakika dinlendirilir. (5.2) maddesine geçmeden önce birkaç kez yeniden karıştırılır.

Alternatif olarak, numune ile benzer türde bir kör yem mümkün değilse (bkz. 5.1.1), standart ekleme metodu yoluyla bir geri kazanım testi gerçekleştirilebilir. Bu durumda analiz edilecek numune, zaten numune içinde mevcut olana benzer bir miktar diklazuril ile zenginleştirilir. Bu numune zenginleştirilmemiş numune ile birlikte analiz edilir ve çıkartma yoluyla geri kazanım hesaplanabilir.

5.2. Ekstraksiyon

5.2.1. Yem

Yaklaşık 50 g numune 0,01 g hassasiyetle tartılır. 500 ml'lik bir erlene aktarılır, 1,00 ml iç standart çözeltisi (3.2), 200 ml ekstraksiyon çözütüsü (3.12) eklenilir ve balon joje kapatılır. Karışım çalkalayıcıda (4.1) gece boyunca çalkalanır. Çökmesi için 10 dakika dinlendirilir. 20 ml temsili miktarda süpernatant uygun bir cam kaba aktarılır ve 20 ml su ile seyreltilir. Bu çözelti bir ekstraksiyon kartuşuna (3.11) aktarılır ve vakum (4.5) uygulayarak geçirilir. Kartuş 25 ml ekstraksiyon çözütücü karışımı (3.12) ve suyla [65 + 35 (V + V)] yıkanır. Toplanan fraksiyonlar atılır ve bileşikler 25 ml ekstraksiyon çözütücü karışımı (3.12) ve suyla [80 + 20 (V + V)] elüe edilir. Bu fraksiyonu, döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) (4.3) ile 60°C'de kuruyana kadar buharlaştırılır. Kalıntı 1,0 ml DMF (3.6) içinde çözündürülür, 1,5 ml su (3.1) eklenir ve karıştırılır. Bir membran filtreden (4.4) süzülür. HPLC tayinine (5.3) geçilir.

5.2.2. Premiksler

Yaklaşık 1 g numune 0,001 g hassasiyetle tartılır. 500 ml'lik konik erlene aktarılır, 1,00 ml iç standart çözeltisi (3.9.2), 200 ml ekstraksiyon çözütüsü (3.12) eklenir ve erlenin ağzı kapatılır. Karışım çalkalayıcıda (4.1) gece boyunca çalkalanır. Çökmesi için 10 dakika dinlendirilir. 10.000/p ml'lik (p = premiksdeki diklazuril'in nominal içeriği, mg/kg) temsili miktarda süpernatant uygun boyuttaki yuvarlak tabanlı bir balona aktarılır.

Azaltılan basınç altında, 60°C'de, döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) (4.3) ile kuruyana kadar buharlaştırılır. Kalıntı 10,0ml DMF (3.6) içinde yeniden çözündürülür, 15,0 ml su (3.1) eklenir ve karıştırılır. HPLC tayinine (5.3) geçilir.

5.3. HPLC tayini

5.3.1. Parametreler

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir.

Sıvı kromatografik kolon (4.2.1):

100 mm x 4,6 mm, Hipersil ODS, 3 µm dolgu ya da eşdeğeri

Mobil faz: Elüent A (3.13.1): Sulu amonyum asetat ve tetrabutyl-amonyum hidrojen sülfat çözeltisi.

Elüent B (3.13.2): asetonitril

Elüent C (3.13.3): metanol

Elüsyon modu: — doğrusal gradyan

— başlangıç koşulları: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)

— 10 dakika gradyan elüsyonundan sonraki 30 dakika boyunca hedef: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)

10 dakika boyunca B ile yıkanır.

Akış hızı: 1,5-2 ml/dak.

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Detektör dalga boyu: 280 nm.

2 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisini (3.10), tutarlı pik yükseklikleri ve alıkonma süreleri elde edene kadar birkaç kez enjekte ederek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.3.2. Kalibrasyon çözeltisi

20 µl kalibrasyon çözeltisi (3.10) birkaç kez enjekte edilir ve diklazuril ortalama pik yüksekliği (alan) ile iç standart pikleri tayin edilir.

5.3.3. Numune çözeltisi

20 µl numune çözeltisi (5.2.1 ya da 5.2.2) birkaç kez enjekte edilir ve diklazuril ortalama pik ile iç standart piklerinin yüksekliği (alan) tayin edilir.

6. Sonuçların hesaplanması

6.1. Yemler

Numunedeki mg/kg cinsinden diklazuril içeriği "w" aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

$h_{d,s}$ = Diklazurilin numune çözeltisindeki (5.2.1) pik yüksekliği (alan)
 $h_{i,s}$ = İç standardın numune çözeltisindeki (5.2.1) pik yüksekliği (alan)
 $h_{d,c}$ = Diklazurilin kalibrasyon çözeltisindeki (3.10) pik yüksekliği (alan)
 $h_{i,c}$ = İç standardın kalibrasyon çözeltisindeki (3.10) pik yüksekliği (alan)
 cd,c = Kalibrasyon çözeltisindeki diklazuril konsantrasyonu (3.10), µg/ml
 m = Test porsiyonunun ağırlığı, g
 V = Numune ekstraktının 5.2.1'e göre hacmi (örneğin 2,5 ml)

6.2. Premiksler

Numunedeki mg/kg cinsinden diklazuril içeriği "w" aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

$h_{d,c}$ = Diklazurilin kalibrasyon çözeltisindeki (3.10) pik yüksekliği (alan)
 $h_{i,c}$ = İç standardın kalibrasyon çözeltisindeki (3.10) pik yüksekliği (alan)
 $h_{d,s}$ = Diklazurilin numune çözeltisindeki (5.2.2) pik yüksekliği (alan)
 $h_{i,s}$ = İç standardın numune çözeltisindeki (5.2.2) pik yüksekliği (alan)
 cd,c = Kalibrasyon çözeltisindeki diklazuril konsantrasyonu (3.10), µg/ml
 m = Test porsiyonunun ağırlığı, g
 V = Numune ekstraktının 5.2.2'ye göre hacmi (örneğin 25 ml)
 p = Premiksdeki diklazuril'in nominal içeriği, mg/kg

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanıma

Analitin tanınması ortak kromatografi ile ya da numune ekstraktının (5.2.1 ya da 5.2.2) ve kalibrasyon çözeltisinin (3.10) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array dedektörü kullanılarak onaylanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi

Bir numune ekstraktı (5.2.1 ya da 5.2.2), uygun miktarda kalibrasyon çözeltisi (3.10) eklenerek zenginleştirilir.

Eklenen diklazuril miktarı numune ekstraktında bulunan diklazuril miktarına benzer olmalıdır.

Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katıldıktan sonra yalnızca diklazuril piki ve iç standart pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği, orijinal diklazuril piki genişliğinin ya da zenginleştirilmemiş numune ekstraktının iç standart piki $\pm 10\%$ aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) Numunenin ve standart spektrumlarının, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen maksimum absorpsiyon dalga boyu, tespit sisteminin çözölleme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array metodu için bu tipik olarak $\pm 2 \text{ nm}$ 'dir.

(b) 230 - 320 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır.

(c) 230 - 320 nm arasında, aynı ekstrakt tarafından üretilen pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, pik apeksi spektrumunun absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki farkı aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

- 0,5 mg/kg ila 2,5 mg/kg diklazuril içeriği için daha yüksek değere bağıl %30,
- 2,5 mg/kg ile 5 mg/kg arasındaki diklazuril içeriği için 0,75 mg/kg,
- 5 mg/kg'dan fazla diklazuril içeriği için daha yüksek değere bağıl %15,

7.3. Geri kazanım

Zenginleştirilmiş bir (kör) numune için geri kazanım en az %80 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

Bir EC ortak çalışması düzenlenmiş, bu çalışmada 11 laboratuvar tarafından 5 numune analiz edilmiştir. Bu numuneler iki premiksten oluşmaktadır; biri organik bir matris (O 100) ile ve diğeri inorganik bir matris (A 100) ile karıştırılmıştır. Teorik içerik 100 mg/kg diklazurildir. 3 farklı üreticiden (NL) (L1/Z1/K1) üç karışık kanatlı yemi oluşturulmuştur. Teorik içerik 1 mg/kg diklazurildir. Laboratuvarlara numunelerin her birini bir kez ya da iki kez analiz etme talimatı verilmiştir. (Bu ortak çalışma hakkında daha ayrıntılı bilgi için bkz. *Journal of AOAC International*, Volume 77, No 6, 1994, p. 1359-1361). Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

	Numune 1 A 100	Numune 2 O 100	Numune 3 L1	Numune 4 Z1	Numune 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Ortalama	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
Nominal içerik (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = Laboratuvarların sayısı

n = Tekil değerlerin sayısı

S_r = Tekrarlanabilirlik standart sapması

CV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı

S_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

CV_R = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı

9. Gözlemler

Diklazuril yanıtının ölçülen konsantrasyon dizisinde doğrusal olduğu önceden gösterilmiş olmalıdır.

F. Lasalosid Sodyum Tayini

Streptomyces lasaliensis ile üretilen bir poliyeter monokarboksilik asidin sodyum tuzu

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemlerdeki ve premikslerdeki lasalosid sodyum seviyesinin tayinini mümkün kılar. Tespit limiti 5 mg/kg. Ölçüm limiti 10 mg/kg'dır.

2. Prensip

Lasalosid sodyum numuneden asitleştirilmiş metanolle ekstrakte edilir ve spektrofotometrik bir detektör kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄)

3.2. Ortofosforik asit, w (w/w) = %85

3.3. Ortofosforik asit çözeltisi, c = %20, 23,5 ml ortofosforik asit (3.2) suyla 100 ml'ye seyreltilir.

3.4. 6-Metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), w (w/w) = %99

3.5. Metanol, HPLC kullanım saflığında

3.6. Hidroklorik asit, yoğunluk = 1,19 g/ml

3.7. Fosfat tampon çözeltisi, c = 0,01 mol/l, 1,36 g KH₂PO₄ (3.1) 500 ml suda (3.11) çözündürülür, 3,5 ml ortofosforik asit (3.2) ve 10,0 ml 6-metil-2-heptilamin (3.4) eklenir. Ortofosforik asit çözeltisiyle (3.3) pH 4,0'e ayarlanır ve su ile (3.11) 1000 ml'ye tamamlanır.

3.8. Asitleştirilmiş metanol, 5,0 ml hidroklorik asit (3.6) 1000 ml'lik balon jojeye aktarılır, metanol (3.5) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözelti kullanılmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.9. HPLC mobil fazı, fosfat tampon metanol çözeltisi 5 + 95 (V + V), 5 ml fosfat tampon çözeltisi (3.7) 95 ml metanol (3.5) ile karıştırılır.

3.10. Garantili saflıkta lasalosid sodyum standart maddesi, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (*Streptomyces lasaliensis* ile üretilen bir poliyeter monokarboksilik asidin sodyum tuzu), E763

3.10.1. Lasalosid sodyum stok standart çözeltisi, 500 µg/ml, 50 mg lasalosid sodyum (3.10) 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jojeye tartılır, asitleştirilmiş metanolde (3.8) çözündürülür, aynı çözücü ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözelti, kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.10.2. Lasalosid sodyum ara standart çözeltisi, 50 µg/ml, 10,0 ml stok standart çözeltisi (3.10.1) 100 ml'lik balon jojeye pipetlenir, asitleştirilmiş metanol (3.8) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözelti, kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.10.3. Kalibrasyon çözeltileri

Bir dizi 50 ml'lik balon jojeye 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ve 10,0 ml ara standart çözeltisi (3.10.2) aktarılır. Asitleştirilmiş metanol (3.8) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltiler sırasıyla 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ve 10,0 µg/ml lasalosid sodyuma karşılık gelir. Bu çözeltiler kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.11. Su, HPLC kullanım saflığında

4. Cihazlar

4.1. Sıcaklık kontrollü ultrasonik banyo (ya da çalkalanan su banyosu).

4.2. Membran filtreler, 0,45 µm.

4.3. 20 µl'lik hacimleri enjekte etmeye uygun enjeksiyon sistemli HPLC cihazı.

4.3.1. Sıvı kromatografik kolon, 125 mm x 4 mm, ters fazlı C18, 5 µm dolgu ya da eşdeğeri.

4.3.2. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları için değişken dalga boyu ayarlı spektrofotometre

5. Metot

5.1. Genel

5.1.1. Kör yem

Geri kazanım testinin (5.1.2) performansında, lasalosid sodyum ya da etkileşime giren maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir. Kör yem numunedekine benzer türde olmalı ve analizde, lasalosid sodyum ya da etkileyen maddeler tespit edilmemelidir.

5.1.2. Geri kazanım testi

Numunedeki varlığına yakın miktarda lasalosid sodyum eklenen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. Lasalosid sodyumu 100 mg/kg düzeyine ulaştırmak için 10,0 ml stok standardı (3.10.1) 250 ml'lik erlene aktarılır ve çözelti yaklaşık 0,5 ml'ye buharlaştırılır. 50 g kör yem eklenir, iyice karıştırılır, 10 dakika dinlendirilir, ekstraksiyon aşamasına (5.2) devam etmeden önce birkaç kez yeniden karıştırılır.

Alternatif olarak, numune ile benzer türde bir kör yem mümkün değilse (bakınız 5.1.1), standart ekleme metodu yoluyla bir geri kazanım testi gerçekleştirilebilir. Bu durumda analiz edilecek numune, zaten numune içinde mevcut olana benzer bir miktar lasalosid sodyum ile zenginleştirilir. Bu numune zenginleştirilmemiş numune ile birlikte analiz edilir ve çıkartma yoluyla geri kazanım hesaplanır.

5.2. Ekstraksiyon

5.2.1. Yem

5 g ile 10 g numune 0,01 g hassasiyetle 250 ml'lik tapalı bir konik cam erlene tartılır. 100,0 ml asitleştirilmiş metanol (3.8) pipetle eklenir. Gevşekçe kapatılır ve içeriğin dağılması için karıştırılır. Erlen yaklaşık 40°C'deki bir ultrasonik banyoya (4.1) 20 dakika konulur, ardından banyodan alınır ve oda sıcaklığına soğutulur. Süspansiyon halindeki madde oturana kadar yaklaşık bir saat dinlendirilir, ardından temsili bir miktar 0,45 µm'lik bir membran filtreden (4.2) uygun bir kaba süzülür. HPLC tayinine (5.3) geçilir.

5.2.2. Premiksler

Yaklaşık 2 g öğütülmemiş premiks 0,001 g hassasiyetle 250 ml'lik balon jojeye tartılır. 100,0 ml asitleştirilmiş metanol (3.8) eklenir ve içeriğin dağılması için karıştırılır. Balon joje ve içindekiler yaklaşık 40°C'deki bir ultrasonik banyoya (4.1) 20 dakika süreyle koyulur, ardından banyodan alınır ve oda sıcaklığına soğutulur. Asitleştirilmiş metanol (3.8) ile işarete kadar tamamlanır ve iyice karıştırılır. Süspansiyon halindeki madde oturana kadar bir saat dinlendirilir, ardından temsili bir miktar 0,45 µm'lik bir membran filtreden (4.2) süzülür. Yaklaşık 4 µg/ml lasalosid sodyum içeren nihai test çözeltisi üretmek için uygun hacimdeki berrak filtrat asitleştirilmiş metanol (3.8) ile seyreltilir. HPLC tayinine (5.3) geçilir.

5.3. HPLC tayini

5.3.1. Parametreler

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur, eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir:

Sıvı kromatografik kolon (4.3.1): 125 mm x 4 mm, ters fazlı C18, 5 µm dolgu ya da eşdeğeri.

Mobil faz (3.9): Fosfat tampon çözeltisi (3.7) ve metanol (3.5) karışımı, 5 + 95 (V+V)

Akış hızı: 1,2 ml/dak.

Tespit dalga boyları:

Eksitasyon: 310 nm

Emisyon: 419 nm

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

4,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisi (3.10.3), tutarlı pik yükseklikleri (alanlar) ve alıkonma süreleri elde edene kadar birkaç kez enjekte ederek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.3.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltisi (3.10.3) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun ortalama pik yükseklikleri (alanları) tayin edilir. Apsisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlara ordinatlarda denk gelen ortalama pik yükseklikleri ya da alanları kullanarak bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.3.3. Numune çözeltisi

Kalibrasyon çözeltileri için alınanla aynı hacim kullanılarak 5.2.1 ya da 5.2.2'deki numune ekstraktları birkaç kez enjekte edilir ve lasalosid sodyum piklerinin ortalama pik yüksekliği (alanlar) belirlenir.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon grafiği referans alınarak, aynı çözeltinin (5.3.3) enjeksiyonu ile üretilen ortalama pik yüksekliğinden (alan) lasalosid sodyum çözeltisinin konsantrasyonu (µg/ml) tayin edilir.

6.1. Yemler

Numunedeki mg/kg cinsinden lasalosid sodyum içeriği "w" aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

c = Numune çözeltisinin lasalosid sodyum konsantrasyonu, µg/ml

V1 = Numune ekstraktının 5.2.1'e göre hacmi, ml (örneğin 100)

m = Test kısmının ağırlığı, g

6.2. Premiksler

Numunedeki mg/kg cinsinden lasalosid sodyum içeriği "w" aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

c = Numune çözeltisinin (5.2.2.) lasalosid sodyum konsantrasyonu, µg/ml

V2 = Numune ekstraktının 5.2.2'ye göre hacmi, ml (örn. 250)

f = 5.2.2'ye göre seyreltme faktörü

m = Test kısmının ağırlığı, g

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanıma

Spektrofotometriye dayanan metotlar, UV tespitinin kullanıldığı metotlara göre etkilenmeye daha az duyarlıdır. Analitin tanınması ortak kromatografi ile doğrulanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi

Bir numune ekstraktına (5.2.1 ya da 5.2.2), uygun miktarda kalibrasyon çözeltisi (3.10.3) eklenir. Eklenen lasalosid sodyum miktarı numune ekstraktında bulunan lasalosid sodyum miktarına benzer olmalıdır. Hem eklenen lasalosid sodyum

miktarı hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca lasalosid sodyum pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği, zenginleştirilmemiş numune ekstraktı ile üretilen orijinal pik genişliğinin $\pm\%10$ aralığında olmalıdır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki farkı aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

- 30 mg/kg ile 100 mg/kg lasalosid sodyum içeriği için daha yüksek değere bağlı %15,
- 100 mg/kg ile 200 mg/kg arasındaki lasalosid sodyum içeriği için 15 mg/kg,
- 200 mg/kg'dan fazla lasalosid sodyum içeriği için daha yüksek değere bağlı %7,5.

7.3. Geri kazanım

Zenginleştirilmiş (kör) numune için geri kazanım en az %80 olmalıdır. Güçlendirilmiş premiks numuneleri için geri kazanım en az %90 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

Bir EC ortak çalışması düzenlenmiş, bu çalışmada 12 laboratuvar tarafından 2 premiks numunesi (numuneler 1 ve 2) ile 5 yem (numuneler 3-7) analiz edilmiştir. Her numunede analizler paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

	Numune 1 Tavuk premixsi	Numune2 Hindi premixsi	Numune 3 Hindi yemi, Pelet formunda	Numune 4 Tavuk yemi krumbıl formunda	Numune 5 Hindi Yemi	Numune 6 Tavuk Yemi A	Numune 7 Tavuk Yemi B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Ortalama [mg/kg]	5050	16200	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
Nominal içerik [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Üretici tarafından beyan edilen içerik

(**) Laboratuvarda hazırlanan yem

L = Laboratuvarların sayısı

n = Tekil sonuçların sayısı

s_r = Tekrarlanabilirlik standart sapması

s_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

CV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı, %

CV_R = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı, %

EK-4

YEMDEKİ İSTENMEYEN MADDELERİNİN KONTROLÜ İÇİN ANALİZ METOTLARI

A. Serbest ve Toplam Gosipol Tayini

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, 20 mg/kg'dan fazla serbest gosipol, toplam gosipol ve kimyasal olarak bu maddelerle ilgili maddeleri içeren pamuk tohumu, pamuk tohumu küspesinde ve bu yem materyallerini içeren karma yemlerde serbest gosipol, toplam gosipol ve kimyasal olarak bu maddelerle ilgili maddelerin tayinini mümkün kılar.

2. Prensiy

Gosipol, 3-aminopropan-1-ol varlığında serbest gosipol tayini için bir propan-2-ol ve hekzan karışımı ile ya da toplam gosipol tayini için dimetilformamid ile ekstrakte edilir. Gosipol, anilin ile, optik yoğunluğu 440 nm'de ölçülen gosipol-dianiline dönüştürülür.

3. Ayırmaçlar

3.1. Propan-2-ol- hekzan karışımı: hacmen 60 birim propan-2-ol ile hacmen 40 birim *n*- hekzan karıştırılır.

3.2. Çözücü A: 1 litrelik balon jöyeye yaklaşık 500 ml propan-2-ol- hekzan karışımı (3.1), 2 ml 3- aminopropan-1-ol, 8 ml glasiyal asetik asit ve 50 ml su koyulur. Propan-2-ol- hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır. Bu ayıraç bir hafta stabildir.

3.3. Çözücü B: 2 ml 3-aminopropan-1-ol ile 10 ml glasiyal asetik asit 100 ml'lik balon jöyeye pipetlenir. Oda sıcaklığına soğutulur ve N, N-dimetilformamid ile gereken hacme tamamlanır. Bu ayıraç bir hafta stabildir.

3.4. Anilin: *Kör testinin optik yoğunluğu 0,022'yi geçerse*, anilin çinko tozu üstünde damıtılır, distilatın ilk ve son %10'luk fraksiyonları atılır. Kahverengi, kapalı bir şişede, soğutulup saklanırsa, bu ayıraç birkaç ay korunabilir.

3.5. Standart gosipol çözeltisi A: 27,9 mg gosipol asetat 250 ml'lik balon jöyeye koyulur. Çözündürülür ve çözücü A (3.2) ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltinin 50 ml'si 250 ml'lik balon jöyeye pipetlenir ve çözücü A ile hacmine kadar tamamlanır. Bu çözeltideki gosipol konsantrasyonu 0,02 mg/ml'dir. Kullanmadan önce oda sıcaklığında bir saat dinlenmeye bırakılır.

3.6. Standart gosipol çözeltisi B : 27,9 mg gosipol asetat 50 ml'lik balon jöyeye koyulur, çözündürülür ve çözücü B (3.3) ile hacmine kadar tamamlanır. Bu çözeltideki gosipol konsantrasyonu 0,5 mg/ml'dir. Standart gosipol çözeltileri A ve B, ışıktan korunduklarında 24 saat stabildir.

4. Cihaz

4.1. Karıştırıcı : yaklaşık 35 rpm

4.2. Spektrofotometre

5. Metot

5.1. Test numunesi

Kullanılan test numunesi miktarı numunenin varsayılan gosipol içeriğine göre değişir. Tercihen az miktarda test numunesi ve bağıl olarak daha fazla temsili miktarda filtrat ile çalışılır, bu sayede hassas fotometrik ölçüm yapılabilmesi için yeterli gosipol elde edilir. Pamuk ve pamuk tohumu küspesinde serbest gosipol tayini için, test numunesi 1 g'ı geçmemelidir, karma yemlerde en fazla 5 g olabilir. 10 ml'lik temsili miktarda filtrat çoğu durumda uygundur, 50 ile 100 µg gosipol içermelidir. Toplam gosipol tayini için test numunesi 0,5 ile 5 g arasında olmalıdır, bu durumda 2 ml temsili miktarda filtrat 40 ile 200 µg gosipol içerecektir. Analiz yaklaşık 20°C'deki oda sıcaklığında gerçekleştirilmelidir.

5.2. Serbest gosipol tayini

Numune yuvarlak boyunlu, dibi ezilmiş camla kaplanmış 250 ml'lik bir cam balona koyulur. Bir pipet kullanılarak 50 ml çözücü A (3.2) eklenir, balon jöye kapatılır ve bir karıştırıcıda bir saat karıştırılır. Kuru bir süzgeç kağıdından süzülür ve süzüntü küçük, yuvarlak boyunlu bir cam balona alınır. Süzme sırasında huni bir saat camı ile örtülür.

50 ile 100 µg gosipol içeren benzer temsili miktarda süzüntü, 25 ml'lik balon jöyelerin (A ve B) her birine pipetlenir. Gerekliyse hacmi çözücü A (3.2) ile 10 ml'ye tamamlanır. Ardından şişedeki (A) içeriği propan-2-ol- hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır. Bu çözelti, numune çözeltisinin ölçümünde referans çözelti olarak kullanılacaktır.

10 ml çözücü A (3.2) diğer 25 ml'lik balon jöyelerden (C ve D) her birine pipetlenir. Şişedeki (C) içeriği propan-2-ol- hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır. Bu çözelti, kör test çözeltisinin ölçümünde referans çözelti olarak kullanılacaktır.

2 ml anilin (3.4) şişelerden (D ve B) her birine eklenir. Renk geliştirmek için kaynar su banyosunda 30 dakika ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulur, propan-2-ol- hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır, homojenleştirilir ve bir saat dinlendirilir.

1 cm cam hücreler kullanılarak 440 nm'deki spektrofotometrede, kör testin (D) optik yoğunluğu referans çözelti (C) ile karşılaştırılarak ve numune çözeltisinin (B) optik yoğunluğu referans çözeltisi (A) ile karşılaştırılarak tayin edilir.

Kör testin optik yoğunluğu numune çözeltisinin optik yoğunluğundan çıkartılır (=düzeltilmiş optik yoğunluk). Bu değerden, serbest gosipol içeriği madde 6'da belirtilen şekilde hesaplanır.

5.3. Toplam gosipol tayini

1 - 5 mg gosipol içeren bir test numunesi 50 ml'lik balon jöyeye koyulur ve 10 ml çözücü B (3.3) eklenir. Aynı zamanda, 10 ml çözücü B (3.3) başka bir 50 ml'lik balon jöyeye koyularak bir kör test hazırlanır. İki balon jöye 30 dakika kaynar su banyosunda ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulur ve her bir şişedeki içerik propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır. Homojenleştirilir ve 10 ile 15 dakika çökmesi beklenir, ardından süzülür ve süzüntüler yuvarlak boyunlu erlenlere alınır.

2 ml numune filtratı iki 25 ml'lik balon jojelerden her birine ve 2 ml kör test filtratı diğer iki 25 ml'lik şişelerden her birine pipetlenir. Her seriden bir şişenin içeriğini propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile 25 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltiler referans çözeltiler olarak kullanılacaktır.

2 ml anilin (3.4) diğer iki şişeden her birine eklenir. Renk geliştirmek için kaynar su banyosunda 30 dakika ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulur, propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile 25 ml'ye tamamlanır, homojenleştirilir ve bir saat dinlendirilir.

Optik yoğunluğu, serbest gosipol için 5.2'de belirtildiği gibi ölçülür. Bu değerden, toplam gosipol içeriği madde 6'da belirtilen şekilde hesaplanır.

6. Sonuçların hesaplanması

Sonuçlar spesifik optik yoğunluktan (6.1) ya da bir kalibrasyon eğrisini (6.2) referans alarak hesaplanabilir.

6.1. Spesifik optik yoğunluk ile

Belirtilen koşullar altındaki spesifik optik yoğunluklar aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned} \text{Serbest gosipol:} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} &= 625 \\ \text{Toplam gosipol:} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} &= 600 \end{aligned}$$

Numunenin serbest ya da toplam gosipol içeriği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

% gosipol :

$$\frac{E \times 1250}{E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times p \times a}$$

Burada;

E = Düzeltilmiş optik yoğunluk, madde 5.2'de belirtilen şekilde tayin edilmiş,

p = Test numunesi, g

a = Filtratın temsili miktarı, ml

6.2. Kalibrasyon eğrisi ile

6.2.1. Serbest gosipol

2 seri beş adet 25 ml'lik balon joje hazırlanır. 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ve 10,0 ml'lik standart gosipol çözeltisi A (3.5) temsili miktarları her bir balon joje serisine pipetlenir. Çözücü A (3.2) ile 10 ml'ye tamamlanır. Her seri yalnızca 10 ml çözücü A (3.2) içeren 25 ml'lik balon jojeyle tamamlanır (kör test).

İlk serideki balon jojelerin hacmi (kör testinin şişesi de dahil) propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile 25 ml'ye tamamlanır (referans serisi).

İkinci serideki her bir balon jojeye (kör testinin balon jojesi de dahil) 2 ml anilin (3.4) eklenir. Renk geliştirmek için kaynar su banyosunda 30 dakika ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulur, propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır, homojenleştirilir ve bir saat dinlendirilir (standart serisi).

5.2'de belirtilen şekilde, standart serisindeki çözeltilerin optik yoğunluğu, referans serisindeki çözeltilerle karşılaştırarak tayin edilir. Gosipol (µg) miktarlarına göre optik yoğunlukları yazılarak kalibrasyon eğrisi çizilir.

6.2.2. Toplam gosipol

Altı adet 50 ml'lik balon joje hazırlanır. Birinci cam malzemeye 10 ml çözücü B (3.3) ve diğerlerine sırasıyla 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ve 10,0 ml'lik standart gosipol çözeltisi B (3.6) koyulur. Her balon jojedeki içerik çözücü B (3.3) ile 10 ml'ye tamamlanır. 30 dakika kaynar su banyosunda ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulur, propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır ve homojenleştirilir.

Bu çözeltilerin 2,0 ml'si altı adet 25 ml'lik balon jojelerin iki serisinden her birine koyulur. İlk serideki balon jojelerin içeriği propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile 25 ml'ye tamamlanır (referans serisi).

2 ml anilin (3.4) ikinci serideki her bir balon jojeye eklenir. 30 dakika kaynar su banyosunda ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulur, propan-2-ol-hekzan karışımı (3.1) ile gerekli hacme tamamlanır, homojenleştirilir ve bir saat dinlendirilir (standart serisi).

5.2'de belirtilen şekilde, standart serisindeki çözeltilerin optik yoğunluğu, referans serisindeki çözeltilerle karşılaştırarak tayin edilir. Gosipol (µg) miktarlarına göre optik yoğunlukları yazılarak kalibrasyon eğrisi çizilir.

6.3. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

— 500 ppm'den az gosipol içeriği için daha yüksek değere bağlı %15

- 500 ppm ile 750 ppm arasındaki gosipol içeriği için mutlak değer olarak 75 ppm
- 750 ppm'den fazla gosipol içeriği için daha yüksek değere bağlı %10

B. Dioksin (PCDD/PCDF) ve Dioksin Benzeri PCB Seviyelerinin Tayini

I. Numune Alma Metotları ve Analitik Sonuçların Yorumlanması

1. Amaç ve kapsam

Yemdeki dioksin (poliklorlu dibenzo-p-dioksinler (PCDD) ve poliklorlu dibenzofuranlar (PCDF)) ve dioksin benzeri poliklorlu bifenillerin (PCB'ler)⁽⁵⁾ seviyelerinin resmî kontrolü için amaçlanan numuneler EK-1'deki şartlara göre alınmalıdır. Yem için eşit oranda dağılmış maddelerin ya da ürünlerin kontrolüne ilişkin EK-1 madde 4.A'da belirtilen nicel gereklilikler uygulanmalıdır.

Bu nedenle elde edilen paçal numuneler, alındıkları kısım için temsili numuneler olarak düşünülmelidir. Laboratuvar numunelerinde tayin edilen seviyeler Bakanlıkça belirlenen maksimum seviyelere uygun olmalıdır.

2. Numune alınan kısmın spesifikasyonlara uygunluğu

Tek bir analizin sonucu, ölçüm belirsizliği de göz önünde bulundurulduğunda Bakanlıkça belirlenen ilgili maksimum seviyeleri geçmiyorsa numune alınan kısım uygun kabul edilir.

Paralel analizle ⁽⁶⁾ doğrulanan üst sınır ⁽⁷⁾ analitik sonuç, maksimum seviyeyi ölçüm belirsizliği de göz önünde bulundurulduğunda geçiyorsa, numune alınan kısma ait sonuç Bakanlıkça belirlenen maksimum seviye ile uyumlu değildir.

(⁵) Dioksinler, furanlar ve dioksin benzeri PCB'ler için TEF (= toksik eşdeğerlik faktörleri) tablosu

Türdeş (congener)	TEF değeri	Türdeş (congener)	TEF değeri
Dibenzo-p-dioksinler ('PCDD'ler')		'Dioksin benzeri PCB'ler: Non-orto PCB'ler + Mono-orto PCB'ler	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	Non-orto	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB'ler	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 77	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 81	
OCDD	0,0001	PCB 126	
		PCB 169	0,0001
Dibenzofuran'lar ('PCDF'ler')		Mono- orto PCB'ler	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,01
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,0001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0005
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		0,0005
OCDF	0,0001		0,00001
			0,0001
Kullanılan kısaltmalar: «T» = tetra; «Pe» = penta; «Hx» = hekza; «Hp» = hepta; «O» = okta; «CDD» = klorodibenzo-p-dioksin; «CDF» = klorodibenzofuran; «CB» = klorobifenil.			

(⁶) İç çapraz kontaminasyon ya da numuneleri kazara karıştırma olasılığını dışarıda bırakmak için paralel analiz gereklidir. İlk analiz, ölçüm belirsizliği de hesaba katılarak uyumluluğun doğrulanması için kullanılır.

(⁷) 'Üst sınır' kavramı, nicelleştirilmemiş her bir türdeşin Toksik Eşdeğerliğe (TEQ) katkısı için ölçüm limiti kullanılmasını gerektirir.

Analizin bir dioksin kontaminasyonu olayı çerçevesinde yapılması halinde, analiz için seçilen numuneler, dioksin kontaminasyonu olayıyla bağlantılı olarak izlenebiliyorsa paralel analizle doğrulama göz ardı edilebilir.

Ölçüm belirsizliği aşağıdaki yaklaşımlardan birine göre hesaba katılabilir:

— Yaklaşık %95’lik bir güven aralığı veren 2 kapsam faktörünü kullanarak genişletilmiş belirsizliği hesaplama yoluyla. “Ölçülen değer eksi U” işleminin sonucu maksimum seviyenin üstündeyse numune alınan kısım ile uyumlu değildir. Dioksinlerin ve dioksin benzeri PCB’lerin ayrı tayininde, dioksinlerin ve dioksin benzeri PCB’lerin ayrı analitik sonuçlarının genişletilmiş belirsizliğinin toplamı, dioksinlerin ve dioksin benzeri PCB’lerin toplamı için kullanılmalıdır,

— Karar sınırı (CC α) tesis edilerek ölçülen değer CC α ’ya eşit ya da daha yüksekse numune alınan kısım ile uyumlu değildir.

Mevcut yorum kuralları, resmî kontrol amacıyla numunede elde edilen analitik sonuçlar için geçerlidir.

II. Dioksinler (PCDD/PCDF) ve Dioksin Benzeri PCB’lerin Seviyelerinin Resmî Kontrolünde Kullanılan Analiz Metodları İçin Numune Hazırlanması ve Gereklilikler

1. Amaç ve uygulama alanı

Bu ekte belirtilen hükümler dioksinler ve dioksin benzeri PCB’lerin seviyelerinin resmî kontrolü için analiz edilen yem ve yam katkı maddelerinde uygulanmalıdır.

Yem ve yem katkı maddelerinde dioksinlerin varlığını izleme, maksimum limitin üstünde veya maksimum limitin % 25 altından daha az dioksinler ve dioksin benzeri PCB seviyelerine sahip numuneleri seçmeyi hedefleyen tarama metodunu kapsayan metodlarla gerçekleştirilebilir. Önemli düzeyde şüpheli seviyelere sahip bu numunelerdeki dioksinlerin konsantrasyonu ile dioksinler ve dioksin benzeri PCB’lerin toplamının konsantrasyonu doğrulama metodu ile doğrulanmalıdır.

Tarama metodları, dioksinler ve dioksin benzeri PCB’lerin ilgilenilen seviyede varlıklarının tespit edilmesi için kullanılır. Bu metodlar, çok sayıda numune çalışma kapasitesine sahip olmalıdır ve çok sayıda numuneden muhtemel pozitifleri seçmek için kullanılır. Bu metodlar, hatalı negatiflerden kaçınmak için özel olarak tasarlanmalıdır.

Doğrulama metodları, ilgilenilen seviyede dioksinler ve dioksin benzeri PCB’lerin net bir biçimde tanımlanması ve hesaplanması için tam veya tamamlayıcı bilgi sağlayan metodlardır.

2. Arka plan

Numunedeki her bir maddenin konsantrasyonu, bu ekin ilavesinde listelenen ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından saptanan, o maddeye karşılık gelen Toksik Eşdeğerlik Faktörü (TEF) ile çarpılmalı ve daha sonra Toksik Eşdeğerlikler (TEQs) şeklinde ifade edilen dioksin benzeri bileşiklerin toplam konsantrasyonunu bulmak için toplanmalıdır.

Bu mevzuatta, her bir bileşiğin kabul edilir spesifik ölçüm limiti; EPA metodu 1613 revizyon B’de belirtilen tayin metoduna göre alıkonma zamanı, izotop oranı gibi temel hükümleri yerine getirmesi koşuluyla, iki farklı iyonda düşük duyarlılıktaki sinyal için 3:1 oranında S/N (sinyal/gürültü) estrümental yanıtı veren, numune ekstraktındaki analit konsantrasyonudur.

3. Numune hazırlamada uyulacak kalite güvencesi gereklilikleri

EK-2’de belirtildiği üzere analiz için numuneler hazırlamayla ilgili genel hükümler geçerlidir. Ek olarak aşağıdaki gerekliliklere uyulmalıdır:

- a) Numune alma ve analiz metodunun her bir basamağında çapraz bulaşmayı önleyecek tedbirler alınmalıdır.
- b) Numuneler, cam, alüminyum, polipropilen veya polietilen kaplarda muhafaza edilmeli ve taşınmalıdır. Kağıt tozlarının kalıntıları numune kabından uzaklaştırılmalıdır. Cam malzemelerin, dioksinleri içermediğine dair önceden kontrol edilmiş veya belgelenmiş çözücüler ile çalkalanmalıdır.
- c) Numuneler, bütünlüğü korunarak özellikleri değişmeyecek şekilde muhafaza edilmeli ve taşınmalıdır. Yem ve yem katkı maddelerinde özellikle numunenin rutubet içeriğinin değişmemesi için önlemler alınmalıdır.
- ç) Mümkün olduğu kadar, her bir laboratuvar numunesi tam homojenizasyonu sağlayacak bir metod kullanılarak, numune 1 mm elekten geçecek şekilde iyice öğütülmeli ve iyice karıştırılmalıdır.
- d) Numune hariç tutularak tüm analitik metodun uygulaması ile kör analiz gerçekleştirilmelidir.
- e) Ekstraksiyon için kullanılan numune ağırlığı, metodun hassasiyet gerekliliklerini karşılamak için yeterli olmalıdır.
- f) Analiz edilecek ürünler için kullanılan spesifik numune hazırlama metodları, uluslararası kabul edilen talimatlara göre geçerli kılınmalıdır.

4. Laboratuvarlar için gereklilikler

‘Alt sınır’ kavramı, nicelleştirilmemiş her bir türdeşin TEQ’ya katkısı için sıfır kullanılmasını gerektirir.

‘Ara sınır’ kavramı, nicelleştirilmemiş her bir türdeşin TEQ’ya katkısı hesaplarken, ölçüm limitinin yarısının kullanılmasını gerektirir.

a) Laboratuvarlar, metodun verimini, tekrarlanan analizlerde kabul edilebilir bir varyasyon katsayısı sağlanacak şekilde, ilgilenilen seviyenin 0.5, 1 ve 2 katı gibi seviye aralıklarında göstermelidir. Kabul edilebilirlik kriterlerinin detayları Madde 5’de verilmiştir.

b) Doğrulama metodunun ölçüm limiti ilgilenilen seviyenin yaklaşık beşte biri aralığında olmalıdır.

c) İç kalite kontrol ölçümleri amacıyla, düzenli kör kontrolleri ve spiking denemeler veya tercihen sertifikalı referans materyal kullanılarak kontrol numunelerinin analizi gerçekleştirilmelidir.

ç) Laboratuvar yeterliliği, ilgili matrislerde dioksinlerin ve dioksin benzeri PCB’lerin tespitine yönelik yapılan laboratuvarlar arası çalışmalara sürekli ve başarılı katılımı ile kanıtlanmalıdır.

— Laboratuvar yeterliliğini değerlendiren laboratuvarlar arası çalışmalara başarılı katılımlar, spesifik analizlerdeki yeterliğin kanıtı için en iyi yoldur. Bununla birlikte toprak ya da sıvı atık gibi numunelere yönelik laboratuvarlar arası çalışmalara katılımlar, daha düşük kontaminasyon seviyeleri sunan gıda ve yem numuneleri alanında da yeterliliği kanıtlamaz. Bu nedenle dioksinler ve dioksin benzeri PCB’lerin ilgili yem/gıda matrislerindeki tayinine yönelik laboratuvarlar arası çalışmalara sürekli katılım şarttır.

— Laboratuvarlar, analitik kalite güvencesi uyguladıklarından emin olmak için ISO Guide 58’e uygun çalışan tanınmış bir kurum tarafından akredite edilmelidir. Laboratuvarların ISO/IEC/17025 standardını izlediği akredite edilmelidir.

5. Dioksinler ve dioksin benzeri PCB’lere yönelik analitik metotların gereklilikleri

Analitik metotların kabulü için temel gereklilikler:

a) Yüksek hassasiyet ve düşük tespit limitleri. PCDD’ler ve PCDF’ler için, bu bileşiklerin bazılarının aşırı toksisiteyi nedeniyle tespit edilebilir miktarlar pikogram TEQ (10^{-12} g) düzeyinde olmalıdır. PCB’lerin, PCDD’ler ve PCDF’lerden daha yüksek düzeylerde bulunduğu bilinmektedir. Çoğu PCB bileşeni için nanogram (10^{-9} g) aralığındaki hassasiyet yeterlidir. Ancak, daha toksik dioksin benzeri PCB bileşenlerinin, özellikle non-ortho PCB bileşenlerin, ölçümü için PCDD’ler ve PCDF’lere uygulanan hassasiyetin aynısı uygulanmalıdır.

b) Yüksek seçicilik (spesifiklik). PCDD’ler, PCDF’ler ve dioksin benzeri PCB’leri, konsantrasyonu aranılan analitlerden birkaç kat fazla olan, aranılan analitlerle birlikte ekstrakte olan ve muhtemel girişim yapan bileşiklerden ayırt etmek gereklidir. Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) metotlarında, TEF değeri belirtilmiş toksik bileşiklerin (17 adet 2,3,7,8-PCDD ve -PCDF’ler ve dioksin benzeri PCB’ler) ve diğer aynı türden bileşiklerin ayırımı gereklidir. Biyotestler, PCDD’ler, PCDF’ler ve dioksin benzeri PCB’lerin toplamı şeklinde TEQ değerlerini seçici olarak belirleyebilmelidir.

c) Yüksek doğruluk (gerçeklik ve kesinlik). Tespit, numunedeki gerçek konsantrasyonun geçerli bir tahmini olmalıdır. Yüksek doğruluk (ölçüm doğruluğu: analite ilişkin gerçek veya atfedilen değer ile ölçülen sonuç arasındaki uyumun yakınlığı), TEQ’nun tahmininde zayıf güvenilirlik üzerine dayalı analiz sonucunda numunenin reddinden kaçınmak için gereklidir. Doğruluk; gerçeklik ve kesinlik olarak ifade edilir. Gerçeklik; sertifikalı materyal içindeki analit için ölçülen ortalama değer ve onun sertifikalanmış değeri arasındaki farktır ve bu değer yüzdesi olarak ifade edilir. Kesinlik; tekrar üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan relatif standart sapmadır (RSD_R).

Tarama metotları, biyotestleri ve GC/MS metotlarını içerir; doğrulama metotları, yüksek çözünürlüklü gaz kromatografisi/yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRGC/HRMS) metotlarıdır. Toplam TEQ değeri verilirken aşağıdaki kriterler uygulanmalıdır.

Toplam TEQ değerinde aşağıdaki kriterlere uyulmalıdır:

	Tarama metotları	Doğrulama metotları
Yanlış negatif oranı	< 1 %	
Gerçeklik		- %20 ila +%20
Kesinlik RSD_R	< 30 %	< 15 %

6. Tarama ve doğrulama amaçlarına yönelik GC/MS metotları için uyulacak spesifik gereklilikler.

a) 2,3,7,8 pozisyonlarında klor içeren ^{13}C -işaretlenmiş PCDD/F internal standartları ve ^{13}C -işaretlenmiş dioksin benzeri PCB internal standartları analitik metodun en başında, örneğin analitik metot validasyonu için ekstraksiyon öncesi eklenmelidir. 4’den 8’e kadar klor ihtiva eden her bir PCDD/F grubu ve her bir dioksin benzeri PCB grubu için en az bir işaretli bileşik eklenmelidir (alternatif olarak, kütle spektrofotometresinde PCDD/F ve dioksin benzeri PCB’lerin taranmasında kullanılan seçici iyon kaydedici fonksiyonların her biri için en az bir işaretli bileşik). Doğrulama metotları söz konusu olduğunda kesinlikle 17 tane 2,3,7,8 pozisyonlarında klor içeren ^{13}C -işaretlenmiş PCDD/F iç standartlarının tümünün ve 12 tane ^{13}C -işaretlenmiş dioksin benzeri PCB iç standartlarının tümünün kullanılması gereklidir. ^{13}C -işaretlenmiş analogu eklenmemiş her bir bileşik için de uygun kalibrasyon çözeltileri kullanılarak relatif tepki faktörü (RRF) belirlenmelidir.

b) %10’dan daha az yağ içeren yem ve yem katkı maddeleri için internal standartların ekstraksiyon öncesi eklenmesi zorunludur. %10’dan daha fazla yağ içeren yem ve yem katkı maddeleri için iç standartlar yağ ekstraksiyonundan

önce veya sonra eklenebilir. Ekstraksiyon etkinliğinin uygun validasyonu, internal standartların eklendiği aşamaya ve sonuçların ürün veya yağ üzerinden verilmesine bağlı olarak yapılmalıdır.

c) GC/MS analizi öncesinde, 1 veya 2 geri kazanım standardı/standartları eklenmelidir.

ç) Geri kazanım kontrolü gereklidir. Doğrulama metotları için, her bir iç standardın geri kazanımı % 60-120 aralığında olmalıdır. Herhangi bir bileşiğin, özellikle bazı 7 ve 8 klorlu dibenzodioxinler ve dibenzofuranların, toplam TEQ değerine katkısı, toplam TEQ değerinin (PCDD/F ve dioksin benzeri PCB'lerin toplamı) %10'unu geçmemesi durumunda, daha düşük veya daha yüksek geri kazanımlar kabul edilebilir. Tarama metotları için geri kazanım %30-140 aralığında olmalıdır.

d) Dioksin benzeri olmayan PCB'ler ve klorlanmış difenil eterler gibi girişim yapan klorlanmış bileşiklerden dioksinlerin ayrımı uygun kromatografik tekniklerle tercihen florisil, alümina ve/veya karbon kolonu ile gerçekleştirilmelidir.

e) İzomerlerin gaz kromatografisi ile ayrımı yeterli olmalıdır (1,2,3,4,7,8-HxCDF ve 1,2,3,6,7,8-HxCDF arasındaki pikten pike ayırım %25'den küçük olmalıdır).

f) Tespit, EPA 1613 revizyon B: 4 den 8 e kadar klor ihtiva eden dioksinler ve furanların HRGC/HRMS izotop dilüsyon tekniği ile veya eşdeğer performans kriterlerine sahip başka bir teknik ile yapılmalıdır.

g) Dioksin kontaminasyonu maksimum seviye aralığında ya da üstünde olan yemler için üst sınır seviyesi ile alt sınır seviyesi arasındaki fark en fazla %20 olmalıdır. Kontaminasyon seviyeleri maksimum seviyenin altında olan yemler için fark %25 ila %40 olabilir.

7. Analizin tarama metotları

7.1. Giriş

Tarama metodu kullanılarak farklı analitik yaklaşımlar gerçekleştirilebilir; bu yaklaşımlar yalnızca tarama yaklaşımı ve nicel yaklaşımlardır.

1) Tarama yaklaşımı

Numunelerin tepkisi, ilgilenilen seviyedeki referans numune ile karşılaştırılır. Referansdan daha az tepki veren numuneler negatif olarak beyan edilir, daha yüksek tepki veren numuneler şüpheli pozitiflerdir. Gereklilikler şöyledir;

1. Her bir test serisinde, aynı zaman ve koşullar altında ekstrakte edilen ve test edilen kör ve referans numune(ler) bulunmalıdır. Referans numune, kör ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde yüksek tepki göstermelidir.

2. İlgilenilen seviyenin kontrolünde, ilgi aralığındaki testin performansının uygunluğunu göstermek için, ilgilenilen seviyenin 0.5 ve 2 katı konsantrasyona sahip ekstra referans numuneler dâhil edilmelidir.

3. Diğer matriksler test edileceği zaman, referans numunenin/numunelerinin uygunluğu, tercihen referans numune seviyesinde TEQ değerine sahip olduğu HRGC/HRMS ile belirlenmiş numuneler veya bu seviyede referans madde ilave edilmiş kör dâhil edilerek ispatlanmalıdır.

4. Biyotestlerde internal standartlar kullanılmadığından, bir test serisi içinde standart sapma ile ilgili bilgi elde etmek için tekrarlanabilirlik testleri gerçekleştirilmelidir. Varyasyon katsayısı %30'un altında olmalıdır.

5. Biyotestler için, hedef bileşikler, olası girişimler ve maksimum tolere edilebilir kör düzeyleri tanımlanmalıdır.

2) Nicel yaklaşım

Nicel yaklaşım, kör ve geri kazanım kontrollerine ek olarak standart dilüsyon serilerine, ikili veya üçlü saflaştırma ve ölçüme ihtiyaç duyar. Sonuç, sinyali veren bileşiklerin TEQ prensibine karşılık gelen bileşikler olduğu varsayılarak TEQ olarak ifade edilebilir. Bu, ekstraktaki ve dolayısıyla numunedeki TEQ seviyesinin hesaplanmasında kalibrasyon eğrisini oluşturmak için TCDD veya dioksin/furan/dioksin benzeri PCB standart karışımı kullanılarak gerçekleştirilebilir. Sonuç, daha sonra kör numune için hesaplanan TEQ seviyesine (kullanılan çözücüler ve kimyasallardan gelen kirliliği hesaba katmak için) ve geri kazanıma (ilgilenilen seviye civarındaki kalite kontrol örneğinin TEQ seviyesinden hesaplanan) göre düzeltilir. Geri kazanım kaybının, biyotestlerdeki TEF değerleri ve WHO tarafından belirlenen ve Tablo 5' de yer alan resmî TEF değerleri arasındaki farklara ve/veya matriks etkilerinden kaynaklanabileceğine dikkat etmek gereklidir.

7.2. Tarama için kullanılan analiz metotlarının gereklilikleri

1) Tarama için GC/MS analiz metotları ve biyotestler kullanılabilir. GC/MS metotları için Madde 6 da verilen hükümler kullanılmalıdır. Hücre temelli biyotestler için özel hükümler (7.3) bendinde, kit-temelli biyotestler için özel hükümler (7.4) bendinde açıklanmıştır.

2) Analizin doğrulama metodu ile belirlenen TEQ değeri ile karşılaştırılarak, maksimum limit veya müdahale seviyesi üstünde ve altındaki çok sayıda numune serisinin hatalı-pozitif ve hatalı-negatif sonuçlarının sayısı hakkında bilgi gereklidir. Gerçek hatalı-negatif oranı %1'in altında olmalıdır. Hatalı-pozitif numunelerin oranı, tarama metodunun kullanımının avantajlı olması için yeteri kadar düşük olmalıdır.

3) Pozitif sonuçlar her zaman analizin doğrulama metodu ile (HRGC/HRMS) doğrulanmalıdır. Ayrıca, geniş TEQ aralığındaki numuneler HRGC/HRMS ile doğrulanmalıdır (negatif numunelerin yaklaşık %2 - 10'u). Biyotestler ve HRGC/HRMS sonuçları arasındaki uygunluk kontrolü yapılmalıdır.

7.3. Hücre tabanlı biyo analizler için spesifik gereklilikler

1) Biyotestler gerçekleştirildiğinde, her bir test uygulaması, TCDD'nin veya dioksin/furan/dioksin benzeri PCB karışımlarının referans konsantrasyonlarının serisine gereksinim duyar ($R^2 > 0.95$ değerine sahip doz-tepki eğrisinin tümü). Ancak, tarama amaçları için düşük seviyedeki numunelerin analizinde genişletilmiş düşük seviye eğrisi kullanılabilir.

2) Kalite kontrol dökümanındaki TCDD referans konsantrasyonu (ölçüm limitinin yaklaşık 3 katı), belli bir zaman aralığında biyotestlerin sonucu için kullanılmalıdır. Hücrelerin tepkisi birçok faktöre bağlı olabildiği için, buna alternatif olarak, referans numunenin relatif tepkisi TCDD kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırılabilir.

3) Her bir çeşit referans materyali için kalite kontrol kartları oluşturulmalı ve sonucun belirlenen klavuza uygunluğu kontrol edilmelidir.

4) Özellikle kantitatif hesaplamalar için, kullanılan numune dilüsyonunun konsantrasyonu tepki eğrisinin doğrusal kısmının içinde olması gerekir. Tepki eğrisinin doğrusal kısmının üstündeki numuneler seyreltilmeli ve tekrar test edilmelidir. Bu durumda, bir defada en az 3 veya daha fazla dilüsyon test edilmelidir.

5) Yüzde standart sapma her bir numune dilüsyonu için üçlü tayinde %15'i geçmemeli ve üç bağımsız deney arasında %30'un üstünde olmamalıdır.

6) Tespit limiti, çözücü körünün veya gürültü seviyesinin standart sapmasının 3 katı olarak belirlenebilir. Diğer bir yaklaşım, o günün kalibrasyon eğrisinden hesaplanan en alt seviyenin (indüksiyon faktörü çözücü körünün 5 katı) üstündeki tepkiyi uygulamaktır. Ölçüm limiti, gürültünün veya çözücü körünün standart sapmasının 5-6 katı olarak belirlenebilir. Diğer bir yaklaşım, o günün kalibrasyon eğrisinden hesaplanan en alt seviyenin (indüksiyon faktörü çözücü körünün 10 katı) üstündeki tepkiyi uygulamaktır.

7.4. Kit tabanlı biyo analizler için spesifik gereklilikler

- 1) Kit temelli biyotestler, gıda numunelerine uygulamak için yeterli duyarlılığa ve güvenilirliğe sahip olmalıdır.
- 2) Numune hazırlama ve analizler için kit kullanım talimatları takip edilmelidir.
- 3) Test kitleri son kullanma tarihinden sonra kullanılmamalıdır.
- 4) Diğer kitler ile kullanmak için tasarlanmış materyaller veya bileşenler kullanılmamalıdır.
- 5) Test kitleri belirtilen depolama sıcaklığı aralığında saklanmalı ve belirtilen uygulama sıcaklığında kullanılmalıdır.
- 6) İmmunolojik temelli testler için tespit limiti, körün 10 tekrarlı analizine dayanan standart sapmanın 3 katının doğrusal regresyon eşitliğinin eğim değerine bölünmesiyle belirlenir.
- 7) Standart kabul edilebilir aralıkta tepki verdiği için emin olmak için, laboratuvarındaki testlerde referans standartlar kullanılmalıdır.

8. Sonuçların rapor edilmesi

Kullanılan analitik metot elverdiği ölçüde, analitik sonuçlar her bir PCDD/F ve dioksin benzeri PCB bileşiklerinin seviyelerini içermelidir ve sonuçların raporlanmasında maksimum bilgiyi içermesi ve böylece özel hükümlere göre sonuçların yorumunu etkinleştirmek için altsınır, üstsınır veya orta sınır olarak rapor edilmelidir.

Rapor, eğer talep edilir ise numunenin rutubet miktarını ve bu miktarı belirlemede kullanılan metodu da içermelidir.

Her bir iç standardın geri kazanımları; geri kazanımlar Madde 6'da bahsedilen aralık dışında olduğunda, maksimum seviye aşıldığında ve diğer durumlarda talep edilmesi halinde belirtilmelidir.

Numunenin uygunluğu hakkında karar verileceği zaman ölçüm belirsizliği göz önünde bulunduruluyorsa, bu parametre de belirtilmelidir. Dolayısıyla, analitik sonuçlar $x \pm U$ şeklinde raporlanmalıdır. Burada (x) analitik sonuç ve (U) ise koveraj faktörü olarak yaklaşık % 95'lik güven aralığını veren "2" katsayısının kullanıldığı genişletilmiş ölçüm belirsizliğini ifade eder. Dioksinlerin ve dioksin benzeri PCB'lerin ayrı ayrı tespit edilmesi durumunda; toplam ölçüm belirsizliği için bu bileşiklerin ayrı ayrı analitik sonuçlarından hesaplanan toplama ait genişletilmiş ölçüm belirsizliği kullanılmalıdır.

Sonuçlar, Bakanlıkça Belirlenen maksimum limitlerin birimi ile aynı birimlerde ve aynı ondalık basamağında ifade edilmelidir.

EK-5

YEMLERİN RESMÎ KONTROLÜ İÇİN HAYVANSAL KÖKENLİ BİLEŞENLERİN TAYİNİNDE ANALİZ METOTLARI

Yem içindeki hayvansal kökenli bileşenlerin mikroskopik tespiti, tanımlaması ya da tahmini için koşullar

1. Amaç ve uygulama alanı

Yem içindeki hayvansal kökenli bileşenlerin (memeli, kanatlı hayvanları ve balık vücut kısımları ve vücut parçalarının işlenmesinden gelen ürünler olarak tanımlanır) tespiti, Bakanlık düzenlemelerine uygun olarak hayvan beslenmesi alanında koordineli bir inceleme programı çerçevesinde mikroskopik inceleme yoluyla gerçekleştiriliyorsa bu koşullar kullanılmalıdır. Bu ekteki metotların tüm resmî testlerde uygulanması şartıyla, belirli hayvansal bileşen türlerinin tespitini geliştirmek ya da hayvansal bileşen kökenini daha kesin belirlemek için varyant ya da alternatif metotlar kullanılarak ikinci bir test de gerçekleştirilebilir. Ayrıca, plazma ya da don yağı içindeki kemikler gibi belirli spesifik hayvansal bileşenleri incelendiğinde (bakınız 9), bu analizlerin koordineli inceleme programında öngörülen analizlere ek olarak yapılması şartıyla bir varyant protokolü kullanılabilir.

2. Hassasiyet

Hayvansal kökenli bileşenler, yapılarına göre yem içinde çok az miktarlarda (< %0,1) tespit edilebilir.

3. Prensiptir

Tanımlama için, EK-1’de belirtilen şartlar doğrultusunda alınan ve uygun şekilde hazırlanan temsili bir numune kullanılır. Aşağıdaki protokol nem içeriği düşük yemleri işlemek için uygundur. Nem içeriği %14’ten fazla olan yemler işlenmeden önce kurutulmalıdır (yoğunlaştırma). Özel yemler ve yem materyalleri (yağ, sıvı yağ gibi) için hassas işlem gereklidir (bakınız 9). Hayvansal kökenli bileşenleri tipik, mikroskopla tanımlanabilir karakteristiklere (örn. Kas lifleri ve diğer et parçacıkları, kıkırdak, kemikler, boynuz, kıl, sert kıllar, kan, tüyler, yumurta kabukları, balık kılçığı, pullar) dayanılarak tanımlanır. Tanımlama, numunenin hem elek fraksiyonunda (6.1) hem de konsantre çökeltisinde (6.2) yapılmalıdır.

4. Ayırıcılar

4.1. Bastırıcı ajan

4.1.1. Kloral hidrat (sulu, %60 w/v)

4.1.2. Elek fraksiyonları için çözelti (NaOH %2,5 w/v ya da KOH %2,5 w/v)

4.1.3. Parafin yağı ya da gliserol (viskozite: 68-81), çökeldeki mikroskopik gözlemler için

4.2. Durulama ajanları

4.2.1. Alkol, %96

4.2.2. Aseton

4.3. Konsantre edici ajan

4.3.1. Tetrakloroetilen (yoğunluk 1,62)

4.4. Boyama ayırıcıları

4.4.1. İyot/potasyum iyodür çözeltisi (2 g potasyum iyodür 100 ml suda çözündürülür ve sıkça çalkalarken 1 g iyot eklenir.)

4.4.2. Alizarin Kırmızısı (2,5 ml 1M hidroklorik asit 100 ml’ye su ile tamamlanır ve bu çözeltiye 200 mg alizarin kırmızısı eklenir.)

4.4.3. Sistin ayırıcı (2 g kurşun asetat, 10 g NaOH/100 ml H₂O)

4.4.4. İyot/potasyum iyodür çözeltisi (%70 etanolde çözündürülmüş)

4.5. Ağartıcı ayırıcı

4.5.1. Ticari sodyum hipoklorit çözeltisi (%9,6 aktif klorlu)

5. Ekipman ve aksesuarlar

5.1. Analitik terazi (0,01 g hassasiyet, konsantre sediment hariç: 0,001 g)

5.2. Öğütme materyali (öğütme değirmeni ya da havan, özellikle analizde %15’ten fazla yağ içeren yemler için)

5.3. Maksimum 0,50 mm kare gözlere sahip ağ gözlü elek

5.4. Ayırma hunisi ya da konik tabanlı dinlendirme beheri

5.5. Stereo mikroskop (minimum 40’ büyütmeli)

5.6. Compound mikroskop (minimum 400’ büyütmeli), aktarılan ışıkla ya da polarize ışıklı

5.7. Standart laboratuvar cam malzemesi

Tüm ekipman iyice temizlenmelidir. Ayırma hunileri ve cam malzemeler bir bulaşık makinesine yıkanmalıdır. Elekler fırça ya da sert kollar kullanılarak temizlenmelidir.

6. Metot

Pelet yemler, her iki fraksiyon da ayrı numune olarak analiz edilecekse öğütüldükten sonra elekten geçirilebilir.

En az 50 g numune işleme tabi tutulmalıdır (gerekirse uygun bir yapı elde etmek amacıyla uygun öğütme ekipmanı (5.2) kullanarak dikkatle öğütülür). Öğütülmüş materyalden iki temsili numune alınmalıdır, biri elek fraksiyonu (en az 5 g) (6.1) ve diğeri konsantre sediment (en az 5 g) (6.2) içindir. Tanımlama için boyama ayıraçlarıyla (6.3) renklendirme ek olarak uygulanabilir.

Hayvansal proteinlerin yapısını ve parçacıkların kökenini göstermek için ARIES gibi bir karar destek sistemi kullanılabilir ve referans numuneler belgelendirilebilir.

6.1. Hayvansal kökenli bileşenlerin elek fraksiyonunda tanınması

En az 5 g numune iki fraksiyon olarak elekten (5.3) elenir. Büyük parçalı elek fraksiyonu (fraksiyonları) (ya da fraksiyonun temsili bir kısmı) uygun bir desteğe ince bir tabaka olarak uygulanır ve stereo mikroskop (5.5) altında, çeşitli büyütmelerde hayvansal kökenli bileşenler için sistematik olarak taranır.

İnce partiküllü elek fraksiyonu (fraksiyonları) ile yapılan slaytlar bileşik mikroskop (5.6) altında, çeşitli büyütmelerde hayvansal kökenli bileşenler için sistematik olarak taranır.

6.2. Hayvansal kökenli bileşenlerin konsantre sedimentlerde tanımlanması

En az 5 g (0,01 g hassaslığında) numune bir ayırma hunisine ya da konik tabanlı bir dinlendirme beherine aktarılmalı ve en az 50 ml tetrakloroetilen (4.3.1) ile işlenmelidir. Karışım art arda çalkalanmalı ya da karıştırılmalıdır.

— Kapalı bir ayırma hunisi kullanılıyorsa sediment ayrılmadan önce dinlendirmek için yeterince beklenmelidir (en az 3 dakika). Çalkalama tekrar edilmeli ve sediment yeniden en az 3 dakika dinlendirilmelidir. Sediment yeniden ayrılmalıdır.

— Açık bir beher kullanılıyorsa sediment ayrılmadan önce en az 5 dakika dinlendirilmelidir.

Tüm sediment kurutulmalı ve ardından tartılmalıdır (0,001 g hassasiyetinde). Tartım yalnızca bir tahmin yapılacaksa gereklidir. Sediment birçok büyük partikülden oluşuyorsa bir elekten (5.3) iki fraksiyon halinde elenebilir. Kurutulan sediment kemik içeriği için stereo mikroskop (5.5) ve compound mikroskop (5.6) altında incelenmelidir.

6.3. Bastırıcı ajanların ve boyama ayıraçlarının kullanılması

Hayvansal kökenli bileşenlerin mikroskopik tanımı, özel bastırıcı ajanlar ve boyama ayıraçları kullanılarak desteklenebilir.

Kloral hidrat (4.1.1): Dikkatle ısıtıldığında, nişasta tanelerinin jelatinleşmesi ve istenmeyen hücre içeriğinin çıkması nedeniyle hücre yapıları daha net görülebilir.

Çözelti (4.1.2): Sodyum hidroksit ya da potasyum hidroksit, yem materyalini netleştirir, kas liflerinin, saçların ve diğer keratin yapılarının tespitini kolaylaştırır.

Parafin yağı ve gliserol (4.1.3): Kemik bileşenleri bu bastırıcı ajanda iyi tanımlanabilir, çünkü çoğu boşluk havayla dolu kalır ve 5-15 µm'lik siyah delikler olarak görülürler.

İyot/potasyum İyodür çözeltisi (4.4.1): Hem nişasta (mavi-mor renk) hem de protein (sarı-amber renkli renk) tayininde kullanılır. Çözeltiler gerekirse seyreltilebilir.

Alizarin kırmızısı çözelti (4.4.2): Kemik, balık kılçığı ve pullarda kırmızı/pembe renklendirme. Sediment kurutmadan önce (bakınız 6.2), tüm sediment bir cam test tüpüne aktarılmalı ve yaklaşık 5 ml alkol (4.2.1) ile iki kez durulanmalıdır (her defasında bir vorteks kullanılmalıdır, çözücü yaklaşık bir saat dinlendirilmeli ve dökülmelidir).

Bu boyama ayıraçını kullanmadan önce, sediment en az 1 ml sodyum hipoklorit çözeltisi (4.5.1) eklenerek ağartılmalıdır. Reaksiyonun 10 dakika sürmesine izin verilmelidir. Tüp suyla doldurulmalı sediment 2-3 dakika dinlendirilmeli ve su ile süspansiyon halindeki partiküller dökülmelidir. Sediment yaklaşık 10 ml suyla iki kez durulanmalıdır (bir vorteks kullanılmalı, dinlendirilmeli ve su her defasında dökülmelidir). 2 ila 10 ya da daha fazla alizarin kırmızı çözeltisi damlası (kalıntı miktarına göre) eklenmelidir.

Karışım çalkalanmalı ve birkaç saniye reaksiyon oluşması beklenmelidir. Renklendirilmiş sediment yaklaşık 5 ml alkol (4.2.1) ile iki kez durulandıktan sonra bir kez aseton (4.2.2) (her defasında bir vorteks kullanılmalı, çözücü yaklaşık bir dakika dinlendirilmeli ve dökülmelidir) ile durulanmalıdır. Ardından sediment kurutma için hazırdır.

Sistin ayırıcı: (4.4.3): Dikkatle ısıtıldığında sistin içeren bileşenler (saç, tüy vb.) koyu kahverengi olur.

6.4. Balık unu içermesi muhtemel yemde inceleme

İnce elek fraksiyonundan ve ince çökel fraksiyonundan en az bir slayt bileşik mikroskop altında incelenmelidir (bakınız 6.1 ve 6.2).

Etikette balık unu içerdiğine dair ibare varsa ya da ilk incelemede balık unu varlığı için şüphe varsa ya da tespit edilmişse, orijinal numuneden ve toplam sedimentten en az iki ilave ince elek fraksiyonu slaydı incelenmelidir.

7. Hesaplama ve değerlendirme

Karasal sıcakkanlı türlerin (memeliler ve kuşlar gibi) kemik parçaları, tipik boşluklar yoluyla mikroskop slaydında farklı türdeki balık kemiğinden ayırt edilebilir. Numune materyalindeki hayvansal kökenli bileşenlerin oranı aşağıdakiler göz önünde bulundurularak tahmin edilmelidir:

- konsantre sedimentteki kemik parçalarının tahmini oranı (% ağırlık) ve
- hayvansal kökenli bileşenlerdeki kemik oranı (% ağırlık)

Tahmin en az üç (mümkünde) slayda ve slayt başına en az beş alana dayandırılmalıdır. Karma yemde konsantre sediment bir kural olarak, yalnızca karasal hayvan kemiği ve balık kemiği parçaları değil, ayrıca yüksek spesifik ağırlıktaki diğer parçaları da (mineraller, kum, odunlaşmış bitki parçaları vb) içerir.

7.1. Kemik parçalarının tahmini yüzde değeri

$$\% \text{ karasal kemik parçaları} = (S \times c)/W$$

$$\% \text{ balık kemiği ve pul parçaları} = (S \times d)/W$$

(S = sediment ağırlığı (mg), c = sedimentteki tahmini karasal hayvan kemiği bölümü için (%) düzeltme faktörü, d = sedimentteki tahmini karasal balık kemiği ve pul parçaları bölümü için (%) düzeltme faktörü, W = çökel için numune materyalinin ağırlığı (mg)).

7.2. Hayvansal kökenli bileşenlerin tahmini değeri

Hayvansal ürünlerdeki kemik kısmı büyük oranda değişiklik gösterebilir. (Kemik unu söz konusu olduğunda kemiğin yüzdesi %50 ila %60 ve et ununda %20 ila %30'dur; balık unu söz konusu olduğunda, kemik ve pul içeriği, balık ununun kategorisine ve kökenine göre, normalde %10-20 aralığında değişir).

Numunedeki hayvansal un türü biliniyorsa, içeriği tahmin etmek mümkündür:

$$\text{Karasal hayvan ürünü bileşiklerinin tahmini içeriği (\%)} = (S \times c)/(W \times f) \times 100$$

$$\text{Balık ürünü bileşiklerinin tahmini içeriği (\%)} = (S \times d)/(W \times f) \times 100$$

(S = sediment ağırlığı (mg), c = sedimentteki tahmini karasal hayvan kemiği bölümü için (%) düzeltme faktörü, d = sedimentteki tahmini karasal balık kemiği ve pul parçaları bölümü için (%) düzeltme faktörü, f = incelenen numune hayvansal kökenli bileşenlerdeki kemik kısmı için düzeltme faktörü, W = sediment için numune materyalinin ağırlığı (mg)).

8. İnceleme sonuçlarının ifade edilmesi

Rapor en azından karasal hayvanlardan ve balık unundan türetilen bileşenlerin varlığı hakkında bilgi içermelidir. Farklı durumlar aşağıdaki şekilde rapor edilmelidir:

8.1. Karasal hayvanlardan türetilen bileşenlerin varlığına ilişkin:

— bir mikroskop kullanılarak görülebildiği kadarıyla, incelenen numune içinde karasal hayvanlardan türetilen bir bileşen bulunmadı,

ya da

— bir mikroskop kullanılarak görülebildiği kadarıyla, incelenen numune içinde karasal hayvanlardan türetilen bir bileşen bulundu.

8.2. Balık unu varlığına ilişkin:

— bir mikroskop kullanılarak görülebildiği kadarıyla, incelenen numune içinde balıktan türetilen bir bileşen bulunmadı,

ya da

— bir mikroskop kullanılarak görülebildiği kadarıyla, incelenen numune içinde balıktan türetilen bir bileşen bulundu.

Balıktan ya da karasal hayvanlardan türetilen bileşenlerin bulunması durumunda, inceleme sonucunun raporu, gerekiyorsa, tespit edilen bileşenlerin miktarı için bir tahmin belirtebilir (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % ya da > 5 %), karasal hayvan türü ve mümkünse hayvansal bileşen (kas lifi, kıkırdak, kemikler, boynuz, kıl, sert kıl, tüyler, kan, yumurta kabukları, balık kılıcı, pullar) tanımlanabilir.

Hayvansal içerik miktarının tahmin edildiği durumlarda kullanılan f düzeltme faktörü belirtilmelidir.

Karasal hayvan kökenli kemik bileşenlerinin tanımlandığı durumlarda, rapor ek maddeler içermelidir:

‘Yukarıdaki bileşenlerin memelilerden türetilmiş olması olasılığı göz ardı edilemez.’

Karasal hayvan kökenli kemik parçalarının kanatlı hayvanları ya da memelilerden gelen kemik parçaları olarak belirtildiği durumlarda bu ek madde gerekli değildir.

9. Sıvı yağ ya da katı yağ analizi için isteğe bağlı protokol

Aşağıdaki protokol sıvı yağ ya da katı yağ analizi için kullanılabilir:

- Yağ katıysa, sıvı haline gelene kadar mikrodalga etüvde ısıtılır.
- Bir pipet kullanarak 40 ml yağ bir santrifüj tüpündeki numunenin altına aktarılır.
- 10 dakika 4 000 r.p.m.'de santrifüje tabi tutulur.
- Yağ, santrifüjden sonra katıysa, bir kez daha sıvılaşıncaya kadar etüvde ısıtılır. Santrifüj, 4000 rpm'de 5 dakika boyunca yinelenir.
- Küçük bir kaşık ya da spatula kullanılarak boşaltılan safsızlıkların yarısı, olası hayvansal bileşen içeriğinin (et lifleri, tüyler, kemik parçaları, vb) tanımlanması için küçük bir petri tabağına ya da mikroskopik bir slayda alınır. Mikroskopi için bastırıcı ajan olarak parafin yağı ya da gliserol önerilir.
- Kalan safsızlıklar 6.2'de anlatıldığı üzere çöktürme için kullanılır.

EK-6

KANATLI YEMİNDEKİ ENERJİ DEĞERİNİN HESAPLANMASI

1. Hesaplama metodu ve enerji değerinin ifadesi

Kanatlı karma yemindeki enerji değeri, yemin belirli analitik bileşenlerinin yüzdesi temelinde aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmalıdır. Bu değer, karma yemin azota göre düzeltilmiş metabolize olabilir enerji (ME) değerini MJ/kg cinsinden ifade eder:

$MJ/kg\ ME = 0,1551 \times \% \text{ ham protein} + 0,3431 \times \% \text{ ham yağ} + 0,1669 \times \% \text{ nişasta} + 0,1301 \times \% \text{ toplam şeker (sakkaroz olarak)}$.

2. Beyan edilen değerler için geçerli toleranslar

Resmî muayenede, muayene sonuçları ile beyan edilen enerji değeri arasında bir farklılık (artan ya da azalan yem enerji değeri) ortaya çıkarsa, en az 0,4 MJ/kg ME'lik bir toleransa izin verilmelidir.

3. Sonucun ifade edilmesi

Yukarıdaki formül uygulandıktan sonra, elde edilen sonuçlar bir ondalık hane ile verilmelidir.

4. Numune alma ve analiz metotları

Karma yemden numune alma ve hesaplama metodunda belirtilen analitik bileşenlerin içeriğinin tayini, resmî yem kontrolü için sırasıyla numune alma metotlarına ve analiz metotlarına göre gerçekleştirilmelidir.

Aşağıdakiler geçerlidir:

- ham yağ içeriğinin tayini için: EK-3, Bölüm H'de açıklanan, ham sıvı yağ ve katı yağ tayini metodu, metot B.
- nişasta içeriğinin tayini için: EK-3, Bölüm L'de belirtilen polarimetrik metot.

EK-7

YEMDE ARTIK İZİN VERİLMEYEN KATKI MADDELERİNİN YASADIŞI VARLIĞINI KONTROL ETMEK İÇİN ANALİZ METOTLARI

Önemli Notlar:

Artık izin verilmeyen katkı maddelerinin yemdeki varlığını tespit etmek için bu ekte bahsedilen analiz metotlarından daha hassas analiz metotları kullanılabilir. Bu ekte bahsedilen analiz metotları doğrulama amacı için kullanılmalıdır.

A. Metil Benzokuat Tayini

7-benziloski-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolin

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemdeki metil benzokuat seviyesinin tayinini mümkün kılar. Miktar tayinlerinin sınırı 1 mg/kg'dır.

2. Prensip

Metil benzokuat, numuneden metanollü metansülfonik asit çözeltisi ile ekstrakte edilir. Ekstrakt, diklorometan, iyon değişim kromatografisi ve sonra yeniden diklorometan ile saflaştırılır. Metil benzokuat içeriği, bir UV dedektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Diklorometan

3.2. Metanol, HPLC kullanım saflığında

3.3. HPLC mobil faz

Metanol (3.2) ve su (HPLC kullanım saflığında) karışım 75 + 25 (v+v), 0,22 µm filtreden (4,5) süzülür ve çözelti gazdan arındırılır (örneğin 10 dakika ultrason ses dalgaları uygulayarak).

3.4. Metanosülfonik asit çözeltisi, c = %2, 20,0 ml metansülfonik asit, metanol (3.2) ile 1000 ml'ye tamamlanır.

3.5. Hidroklorik asit çözeltisi, c = %10, 100 ml hidroklorik asit (ρ₂₀ 1,18 g/ml), su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

3.6. Katyon değişimi reçinesi Amberlit CG-120 (Na), 100 ila 200 göz

Reçine kullanımdan önce ön işleme tabi tutulur. 100 g reçine 500 ml hidroklorik asit çözeltisi (3.5) ile karıştırılır ve sıcak plakada sürekli karıştırarak kaynayanaya kadar ısıtılır. Soğuması beklenir ve asit boşaltılır. Vakum altında bir süzgeç kağıdından süzülür. Reçine iki kez 500 ml'lik su porsiyonları ile ve ardından 250 ml metanol (3.2) ile yıkanır.

Reçine yeniden 250 ml'lik metanol ile durulanır ve filtre kekinden hava geçirerek kurutulur. Kuruyan reçine kapalı bir şişede saklanır.

3.7. Standard madde: Saf metil benzokuat (7-benziloski-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolin)

3.7.1. Metil benzokuat stok standart çözeltisi, 500 µg/ml, 50 mg standart madde (3.7) 0,1 mg hassasiyetle tartılır, 100 ml'lik balon jojede, metansülfonik asit çözeltisi içinde (3.4) çözündürülür, işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır.

3.7.2. Metil benzokuat ara standart çözeltisi, 50 µg/ml,

5,0 ml metil benzokuat stok standart çözeltisi (3.7.1) 50 ml'lik balon jojeye aktarılır, metanol (3.2) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır.

3.7.3. Kalibrasyon çözeltileri

Bir dizi 25 ml'lik balon jojeye 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0 ml metil benzokuat ara standart çözelti (3.7.2) aktarılır. Mobil faz (3.3) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltiler sırasıyla 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ve 10,0 µg/ml metil benzokuat konsantrasyonlarına sahiptir. Bu çözeltiler kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

4. Cihaz

4.1. Laboratuvar çalkalayıcısı

4.2. Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporator)

4.3. Bir musluk ve yaklaşık 200 ml kapasiteli bir hazne takılmış cam kolon (250 mm x 15 mm)

4.4. HPLC cihazı, değişken dalga boyu mor ötesi detektörlü ya da Diode Array dedektörlü

4.4.1. Sıvı kromatografik kolon: 300 mm x 4 mm, C₁₈, 10 µm dolgu ya da eşdeğeri.

4.5. Membran filtreler, 0,22 µm

4.6. Membran filtreler, 0,45 µm

5. Metot

5.1. Genel

5.1.1. Metil benzokuat ya da etkileyen maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir.

5.1.2. Numunedeki varlığına yakın miktarda metil benzokuat eklenerek kirletilen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 15 mg/kg düzeyine ulaştırmak için 600 µl stok standart çözeltisi (3.7.1) 20 g kör yeme eklenir, karıştırılır ve ekstraksiyondan (5.2) önce 10 dakika beklenir.

Bu metodun amacı doğrultusunda, kör yem numunesindekine benzer olması ve analizde metil benzokuat tespit edilmemesi gerekmektedir.

5.2. Ekstraksiyon

Yaklaşık 20 g hazırlanmış numune 0,01 g hassasiyetle tartılır ve 250 ml'lik erlene aktarılır. 100,0 ml metansülfonik asit çözeltisi (3.4) eklenir ve 30 dakika boyunca mekanik olarak (4.1) çalkalanır. Çözelti bir süzgeç kağıdından süzülür ve filtrat sıvı-sıvı ayırma aşaması (5.3) için saklanır.

5.3. Sıvı-sıvı ayırma

Elde edilen (5.2) filtratın 25,0 ml'si, 100 ml hidroklorik asit çözeltisi (3.5) içeren 500 ml'lik bir ayırma hunisine aktarılır. Huniye 100 ml diklorometan (3.1) eklenir ve bir dakika çalkalanır. Katmanların ayrılması beklenir ve alttaki (diklorometan) katman 500 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona aktılır. Sulu fazın ekstraksiyon işlemi 40 ml'lik diklorometan porsiyonları ile iki kez daha yapılır ve bunlar yuvarlak tabanlı balon jode ilk ekstrakt ile birleştirilir. Diklorometan ekstraktı, azalan basınç altında 40°C'de döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) (4.2) kuruyana kadar buharlaştırılır. Kalıntı 20 ila 25 ml metanolde (3.2) çözündürülür, balon joje kapatılır ve tüm ekstrakt iyon değişimi kromatografisi (5.4) için saklanır.

5.4. İyon değişimi kromatografisi

5.4.1. İyon değişimi kolonunun hazırlanması

Bir cam kolonunun (4.3) alt ucuna cam yününden küçük bir tapa sokulur. 50 ml hidroklorik asit (3.5) ile 5,0 g işlenmiş katyon değişimi reçinesi bulamacından (3.6) hazırlanır, cam kolona dökülür ve çökmesi beklenir.

Reçine yüzeyinin hemen üstündeki aşırı asit akıtılır ve dışarı akış turnusol kağıdında nötr görüne kadar kolon su ile yıkanır. 50 ml metanol (3.2) kolona aktarılır ve reçine yüzeyine tahliye olması beklenir.

5.4.2. Kolon kromatografisi

Bir pipetle, (5.3)'te elde edilen ekstrakt dikkatle kolona aktarılır. Yuvarlak tabanlı balon joje iki porsiyon 5 ile 10 ml metanol (3.2) ile yıkanır ve bu yıkama suları kolona aktarılır. Ekstrakt reçine yüzeyine akıtılır ve kolon 50 ml metanol ile yıkanır, akış hızının en fazla 5 ml/dakika olduğundan emin olunur. Atık su atılır. 150 ml metansülfonik asit çözeltisi (3.4) kullanarak metil benzokuat kolondan elüe edilir ve kolonun elüatı 250 ml'lik bir konik cam erlene alınır.

5.5. Sıvı-sıvı ayırma

(5.4.2)'de elde edilen elüat 1 litrelik ayırma hunisine alınır. Konik balon joje 5 ile 10 ml metanol (3.2) ile yıkanır bu yıkama suları ayırma hunisinin içeriği ile birleştirilir. 300 ml hidroklorik asit çözeltisi (3.5) ve 130 ml diklorometan (3.1) eklenir. 1 dakika çalkalanır ve fazın ayrılması beklenir. Altta (diklorometan) katmanı 500 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona akıtılır. Sulu fazın ekstraksiyon işlemi 70 ml'lik diklorometan porsiyonları ile iki kez daha yapılır ve bunlar yuvarlak tabanlı balon jode ilk ekstrakt ile birleştirilir.

Diklorometan ekstraktı, azalan basınç altında 40°C'de döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) (4.2) kuruyana kadar buharlaştırılır. Şişedeki kalıntı yaklaşık 5 ml metanol (3.2) içinde çözündürülür ve bu çözelti nicel olarak 10 ml'lik balon jodeye aktarılır. Yuvarlak tabanlı balon joje iki porsiyon 1 ile 2 ml metanol ile durulanır ve bunları balon jodeye aktarılır. Metanol ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Temsili bir miktar bir membran filtreden (4.6) süzülür. Bu çözelti HPLC tayini (5.6) için saklanır.

5.6. HPLC tayini

5.6.1. Parametreler

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir:

- sıvı kromatografik kolon (4.4.1)
- HPLC mobil faz: Metanol-su karışımı (3.3)
- akış hızı: 1 - 1,5 ml/dakika
- tespit dalga boyu: 265 nm
- enjeksiyon hacmi: 20 ila 50 µl

4 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisi (3.7.3), tutarlı pik yükseklikleri (alanlar) ve alıkonma süreleri elde edene kadar birkaç kez enjekte ederek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.6.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltilisi (3.7.3) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun pik yükseklikleri (alanları) ölçülür.

Kalibrasyon çözeltilerinin apisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlarına ordinatlarda denk gelen ortalama pik yükseklikleri ya da alanları kullanarak bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.6.3. Numune çözeltilisi

Kalibrasyon çözeltileri için alınanla aynı hacmi kullanarak numune ekstraktı (5.5) birkaç kez enjekte edilir ve metil benzokuat piklerinin ortalama pik yüksekliği (alan) belirlenir.

6. Sonuçların hesaplanması

Numune çözeltilisinin konsantrasyonu, kalibrasyon grafiği (5.6.2) referans alınarak numune çözeltilisinin metil benzokuat piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan) ve µg/ml cinsinden belirlenir.

Numunenin mg/kg cinsinden metil benzokuat içeriği “w” aşığıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

c = Numune çözeltilisinin metil benzokuat konsantrasyonu, µg/ml

m = Test porsiyonunun ağırlığı, g

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanıma

Analitin tanınması ortak kromatografi ile ya da numune ekstraktının ve 10 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltilisinin (3.7.3) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array detektörü kullanılarak onaylanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi (co-chromatography)

Bir numune ekstraktına, uygun miktarda ara standart çözeltilisi (3.7.2) eklenir. Eklenen metil benzokuat miktarı numune ekstraktındaki tahmini metil benzokuat miktarına benzer olmalıdır. Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca metil benzokuat pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Maksimum yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği orijinal genişliğin yaklaşık %10’u aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşığıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) Numunenin ve standart spektrumlarının, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen maksimum absorpsiyon dalga boyu, tespit sisteminin çözüleme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array ile tespit için bu tipik olarak yaklaşık 2 nm’dir;

(b) 220 - 350 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun %10 ila %100 bağı absorbans aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğuunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının %15’ini geçmediğinde karşılanır;

(c) 220 - 350 nm arasında, aynı ekstrakt tarafından üretilen pikin yukarı eğim, apeks ve aşığı eğim spektrumları, spektrumun %10 ila %100 bağı absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum pik olduğuunda ve gözlenen hiçbir noktada spektrumlar arasındaki sapma, apeks spektrumunun absorbansının %15’ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki farkı aşığıdaki değerleri geçmemelidir: 4 ile 20 mg/kg arasındaki metil benzokuat içeriği için daha yüksek sonuca bağı %10.

7.3. Geri kazanım

Güçlendirilmiş bir kör numune için geri kazanım en az %90 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

10 laboratuarda beş numune analiz edilmiştir. Her numunede analizler paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

	Kör	Toz yem 1	Pelet yem 1	Toz yem 2	Pelet yem 2
Ortalama [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
Geri kazanım [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = Tespit edilmedi

s_r = Tekrarlanabilirlik standart sapması

CV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı, %

s_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

CV_R = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı, %.

B. Olaquindox Tayini

2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksit

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemdeki olaquindox seviyesinin tayinini mümkün kılar. Miktar tayinlerinin sınırı 5 mg/kg'dır.

2. Prensip

Numune su-metanol karışımı ile ekstrakte edilir. Olaquindox içeriği, bir UV detektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Metanol

3.2. Metanol, HPLC kullanım saflığında

3.3. Su, HPLC kullanım saflığında

3.4. HPLC için mobil faz

Su (3.3)-metanol (3.2) karışımı, 900 +100 (V + V).

3.5. Standard madde: Saf olaquindox 2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksit, E851.

3.5.1. Olaquindox stok standart çözeltisi, 250 µg/ml

50 mg olaquindox'u (3.5) 0,1 mg hassasiyetle 200 ml'lik balon jojeye tartılır ve yaklaşık 190 ml su eklenir. Ardından balon joje 20 dakika ultrasonik banyoya (4.1) koyulur. Ultrasonik işleminden sonra çözelti oda sıcaklığına getirilir, su ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ve soğuk bir yerde saklanır. Bu çözelti her ay taze olarak hazırlanmalıdır.

3.5.2. Olaquindox ara standart çözeltisi, 25 µg/ml

10,0 ml stok standart çözeltisi (3.5.1) 100 ml'lik balon jojeye aktarılır, mobil fazla (3,4) işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ve soğuk bir yerde saklanır. Bu çözelti her gün taze olarak hazırlanmalıdır.

3.5.3. Kalibrasyon çözeltileri

Bir dizi 50 ml'lik balon jojeye 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 ve 20,0 ml ara standart çözeltisi (3.5.2) aktarılır. Mobil faz (3,4) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Cam malzeme alüminyum folyo ile sarılır.

Bu çözeltiler sırasıyla 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 ve 10,0 µg/ml olaquindox'a karşılık gelir. Bu çözeltiler her gün taze olarak hazırlanmalıdır.

4. Cihaz

4.1. Ultrasonik banyo

4.2. Mekanik çalkalayıcı

4.3. HPLC cihazı, değişken dalga boyu mor ötesi detektörlü ya da Diode Array dedektörlü

4.3.1. Sıvı kromatografik kolon, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm dolgu ya da eşdeğeri

4.4. Membran filtreler, 0,45 µm

5. Metot

Not: Olaquinox ışığa duyarlıdır. Tüm metotlar hafif ışık altında ya da amber renkli cam malzeme kullanarak gerçekleştirilir.

5.1. Genel

5.1.1. Olaquinox ya da etkileyen maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir.

5.1.2. Numunedeki varlığına yakın miktarda olaquinox eklenerek kirletilen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 50 mg/kg düzeyinde kirletmek için 10,0 ml stok standardı çözeltisi (3.5.1) 250 ml'lik erlene aktarılır ve çözelti yaklaşık 0,5 ml'ye buharlaştırılır. 50 g kör yem eklenir, iyice karıştırılır 10 dakika dinlendirilir, ekstraksiyon adımıyla (5.2) devam etmeden önce birkaç kez yeniden karıştırılır.

Not: Bu metodun amacı doğrultusunda, kör yem numunedekine benzer olmalı ve olaquinox tespit edilmemelidir.

5.2. Ekstraksiyon

Yaklaşık 50 g numune 0,01 g hassasiyetle tartılır. 1000 ml'lik bir konik cam erlene aktarılır ve 100 ml metanol (3.1) eklenir ve balon joje 5 dakika boyunca ultrasonik banyoya (4.1) koyulur. 410 ml su eklenir ve ultrasonik banyoda 15 dakika daha bırakılır. Balon joje ultrasonik banyodan alınır, 30 dakika çalkalayıcıda (4.2) çalkalanır ve katlanmış bir filtreden süzülür. 10,0 ml filtrat 20 ml'lik balon jojeye aktarılır, su ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Temsili bir miktar bir membran filtreden (4,4) süzülür. (bakınız 9) HPLC tayini (5.3) adımına geçilir.

5.3. HPLC tayini

5.3.1. Parametreler:

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir.

Analitik kolon (4.3.1):

Mobil faz (3.4):	Su (3.3)-metanol (3.2) karışımı, 900 100 (V + V).
Akış hızı:	1,5-2 ml/dak.
Tespit dalga boyu:	380 nm
Enjeksiyon hacmi:	20 µl –100 µl

2,5 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisini (3.5.3), tutarlı pik yükseklikleri ve alıkonma süreleri elde edilene kadar birkaç kez enjekte ederek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.3.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltisi (3.5.3) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun ortalama pik yükseklikleri (alanları) tayin edilir. Kalibrasyon çözeltilerinin apsisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlarına ordinatlarda denk gelen ortalama pik yükseklikleri (alanlar) kullanılarak bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.3.3. Numune çözeltisi

Kalibrasyon çözeltileri için alınanla aynı hacmi kullanarak numune ekstraktı (5.2) birkaç kez enjekte edilir ve olaquinox piklerinin ortalama pik yüksekliği (alan) belirlenir.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon grafiği (5.3.2) referans alınarak, aynı çözeltinin olaquinox piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan), numune çözeltisinin konsantrasyonu µg/ml cinsinden tayin edilir.

Numunenin mg/kg cinsinden olaquinox içeriği “w” aşağıdaki formülle elde edilir:

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

c = Numune ekstraktının olaquinox konsantrasyonu, µg/ml

m = Test porsiyonunun ağırlığı (5.2), g

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanıma

Analitin tanınması ortak kromatografi ile ya da numune ekstraktının (5.2) ve 5,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisinin (3.5.3) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array dedektörü kullanılarak onaylanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi

Bir numune ekstraktına (5.2), uygun miktarda kalibrasyon çözeltisi (3.5.3) eklenir. Eklenen olaquinox miktarı numune ekstraktında bulunan olaquinox miktarına benzer olmalıdır.

Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca olaquinox pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği, kirlenmemiş numune ekstraktının orijinal olaquinox piki genişliğinin $\pm 10\%$ aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) Numunenin ve standart spektrumlarının, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen maksimum absorpsiyon dalga boyu, tespit sisteminin çözülme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array saptama için bu tipik olarak ± 2 nm'dir.

(b) 220 ile 400 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun 10% ila 100% bağıl absorpsiyon aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorpsiyonunun 15% 'ini geçmediğinde karşılanır.

(c) 220 ile 400 nm arasında, aynı ekstrakt tarafından üretilen pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun 10% ila 100% bağıl absorpsiyon aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, pik apeksi spektrumunun absorpsiyonunun 15% 'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark, 10 ila 200 mg/kg arasındaki olaquinox içeriği için daha yüksek sonuca bağıl 15% 'i geçmemelidir.

7.3. Geri kazanım

Güçlendirilmiş bir kör numune için geri kazanım en az 90% olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

Bir EC ortak çalışması düzenlenmiş, bu çalışmada 13 laboratuvar tarafından bir kör yem de dahil dört domuz yavrusu yemi numunesi analiz edilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilmiştir:

	Numune 1	Numune 2	Numune 3	Numune 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
ortalama [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
Nominal içerik [mg/kg]	—	15	50	100
geri kazanım %	—	97,3	96,0	95,4

L = Laboratuvarların sayısı

n= Tekil değerlerin sayısı

S_r = Tekrarlanabilirlik standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

CV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı

CV_R = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı.

9. Gözlem

Metot, 100 mg/kg'dan fazla olaquindox içeren yemler için valide edilmemiş olsa da, daha az numune ağırlığı alarak ve/veya ekstraktı (5.2) kalibrasyon grafiğinin (5.3.2) aralığı aralığında ki bir konsantrasyona erişecek şekilde seyrelterek tatmin edici sonuçlar almak mümkündür.

C. Amprolium Tayini

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinyum klorür hidroklorür

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot, yemdeki ve premikslerdeki amprolium seviyesinin tayinini mümkün kılar. Tespit limiti 1 mg/kg, ölçüm limiti 5 mg/kg'dır.

2. Prensip

Numune su-metanol karışımı ile ekstrakte edilir. Mobil faz ile seyreltilip membran ile süzildükten sonra, amprolium içeriği, bir UV detektörü kullanan katyon değişimi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayıraçlar

3.1. Metanol.

3.2. Asetonitril, HPLC kullanım saflığında.

3.3. Su, HPLC kullanım saflığında.

3.4. Sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi, c = 0,1 mol/l.

13,80 g sodyum dihidrojen fosfat monohidrat 1000 ml'lik balon jojede su (3.3) içinde çözündürülür, suyla (3.3) işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır.

3.5. Sodyum perklorat çözeltisi, c = 1,6 mol/l.

224,74 g sodyum perklorat monohidrat 1000 ml'lik balon jojede su (3.3) içinde çözündürülür, suyla (3.3) işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır.

3.6. HPLC için mobil faz (bakınız 9.1)

Asetonitril (3.2), sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (3.4) ve sodyum perklorat çözeltisi (3.5) karışımı, 450+450+100 (v+v+v). Kullanmadan önce 0,22 µm'lik bir membran filtreden (4.3) süzülür ve çözelti gazdan arındırılır (örn. Ultrasonik banyoda (4.4) en az 15 dakika).

3.7. Standard madde: saf amprolium, 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinyum klorür hidroklorür, E 750 (bakınız 9.2).

3.7.1. Amprolium stok standart çözeltisi, 500 µg/ml

50 mg amprolium (3.7) en yakın 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jojeye tartılır, 80 ml metanol (3.1) içinde çözündürülür ve balon joje 10 dakika ultrasonik banyoya (4.4) koyulur. Ultrasonik işleminden sonra çözelti oda sıcaklığına getirilir, su ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.7.2. Amprolium ara standart çözeltisi, 50 µg/ml

5,0 ml stok standart çözeltisi (3.7.1) 50 ml'lik balon jojeye pipetlenir, ekstraksiyon çözücüsüyle (3.8) işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.7.3. Kalibrasyon çözeltileri

Bir dizi 50 ml'lik balon jojeye 0,5, 1,0 ve 2,0 ml ara standart çözeltisi (3.7.2) aktarılır.

Mobil faz (3.6) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltiler sırasıyla 0,5, 1,0 ve 2,0 µg/ml amprolium'a karşılık gelir. Bu çözeltiler kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.8. Ekstraksiyon çözücüsü.

Metanol (3.1) -su karışımı 2+1 (v+v).

4. Cihaz

4.1. 100 µl'lik hacimleri enjekte etmeye uygun enjeksiyon sistemli HPLC cihazı.

4.1.1. Sıvı kromatografik kolon, 125 mm × 4 mm, katyon değişimi Nucleosil 10 SA, 5 ya da 10 µm dolgu ya da eşdeğeri.

4.1.2. Değişken dalga boyu ayarlı UV detektörü ya da Diode Array dedektörü.

4.2. Membran filtre, PTFE materyali, 0,45 µm.

4.3. Membran filtre, 0,22 µm.

4.4. Ultrasonik banyo.

4.5. Mekanik çalkalayıcı ya da manyetik karıştırıcı.

5. Metot

5.1. Genel

5.1.1. Kör yem

Geri kazanım testinin (5.1.2) performansında, amprolium ya da etkileyen maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir. Kör yem numunedekine benzer türde olmalı ve analizde, amprolium ya da etkileyen maddeler tespit edilmemelidir.

5.1.2. Geri kazanım testi

Numunedeki varlığına yakın miktarda amprolium eklenerek kirletilen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 100 mg/kg düzeyinde kirletmek için 10,0 ml stok standardı çözeltisi (3.7.1) 250 ml'lik erlene aktarılır ve çözelti yaklaşık 0,5 ml'ye buharlaştırılır.

50 g kör yem eklenir, iyice karıştırılır 10 dakika dinlendirilir, ekstraksiyon adımıyla (5.2) devam etmeden önce birkaç kez yeniden karıştırılır.

Alternatif olarak, numune ile benzer türde bir kör yem mümkün değilse (bakınız 5.1.1), standart ekleme metodu yoluyla bir geri kazanım testi gerçekleştirilebilir. Bu durumda analiz edilecek numune, zaten numune içinde mevcut olana benzer bir miktar amprolium ile güçlendirilir. Bu numune kirletilmemiş numune ile birlikte analiz edilir ve çıkartma yoluyla geri kazanım hesaplanabilir.

5.2. Ekstraksiyon

5.2.1. Premiksler (içerik < %1 amprolium) ve yem

Amprolium içeriğine göre 5-40 g numune 0,01 g hassasiyetle 500 ml'lik bir konik cam malzemeye tartılır ve 200 ml ekstraksiyon çözücüsü (3.8) eklenir. Balon joje ultrasonik banyoya (4.4) koyulur ve 15 dakika bırakılır. Balon joje ultrasonik banyodan alınır ve 1 saat çalkalayıcıda çalkalanır ya da manyetik karıştırıcıda (4.5) karıştırılır. Ekstrakttan temsili bir miktarı mobil faz (3.6) ile 0,5-2 µg/ml amprolium içeriğine seyreltilir ve karıştırılır (bakınız 9.3). Bu seyreltilmiş çözeltiden 5-10 ml bir membran filtrede (4.2) süzülür. HPLC tayinine (5.3) geçilir.

5.2.2. Premiksler (içerik ≥ %1 amprolium)

Amprolium içeriğine göre 1-4 g premiki 0,001 g hassasiyetle 500 ml'lik bir konik cam malzemeye tartılır ve 200 ml ekstraksiyon çözücüsü (3.8) eklenir. Balon joje ultrasonik banyoya (4.4) koyulur ve 15 dakika bırakılır. Balon joje ultrasonik banyodan alınır ve 1 saat çalkalayıcıda çalkalanır ya da manyetik karıştırıcıda (4.5) karıştırılır. Ekstrakttan temsili bir miktarı mobil faz (3.6) ile 0,5-2 µg/ml amprolium içeriğine seyreltilir ve karıştırılır. Bu seyreltilmiş çözeltiden 5-10 ml'si bir membran filtrede (4.2) süzülür. HPLC tayinine (5.3) geçilir.

5.3. HPLC tayini

5.3.1. Parametreler:

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir.

Sıvı kromatografik kolon (4.1.1): 125 mm × 4 mm, katyon değişimi Nucleosil 10 SA, 5 ya da 10 µm dolgu ya da eşdeğeri.

Mobil faz (3.6): Asetonitril (3.2), sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (3.4) ve sodyum perklorat çözeltisi (3.5) karışımı, 450+450+100 (v+v+v).

Akış hızı: 0,7-1 ml/dak

Tespit dalga boyu: 264 nm

Enjeksiyon hacmi: 100 µl

1,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisi (3.7.3), tutarlı pik yükseklikleri ve alıkonma süreleri elde edene kadar birkaç kez enjekte edilerek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.3.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltisi (3.7.3) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun ortalama pik yükseklikleri (alanları) tayin edilir. Kalibrasyon çözeltilerinin apisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlarına ordinatlarda denk gelen ortalama pik yüksekliklerini (alanlar) kullanarak bir kalibrasyon grafiği çizilir.

5.3.3. Numune çözeltisi

Kalibrasyon çözeltileri için alınanla aynı hacmi kullanarak numune ekstraktı (5.2) birkaç kez enjekte edilir ve amprolium piklerinin ortalama pik yüksekliği (alan) belirlenir.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon grafiğini (5.3.2) referans alınarak, aynı çözeltinin amprolium piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan), numune çözeltisinin konsantrasyonu µg/ml cinsinden tayin edilir.

Numunenin mg/kg cinsinden amprolium içeriği “w” aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

V = Ekstraksiyon çözücüsünün (3.8) 5.2’ye göre hacmi, ml (örneğin 200 ml)

c = Numune ekstraktının amprolium konsantrasyonu, µg/ml

f = 5.2’ye göre seyreltme faktörü

m = Test porsiyonunun ağırlığı, g

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanıma

Analitin tanınması ortak kromatografi ile ya da numune ekstraktının (5.2) ve 2,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisinin (3.7.3) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array dedektörü kullanılarak onaylanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi (co-chromatography)

Bir numune ekstraktına (5.2), uygun miktarda kalibrasyon çözeltisi (3.7.3) eklenir. Eklenen amprolium miktarı numune ekstraktında bulunan amprolium miktarına benzer olmalıdır.

Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca amprolium pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği, kirlenmemiş numune ekstraktının orijinal amprolium piki genişliğinin ±%10 aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) Numunenin ve standart spektrumlarının, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen maksimum absorpsiyon dalga boyu, tespit sisteminin çözülme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array saptama için bu tipik olarak ± 2 nm’dir.

(b) 210 ile 320 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının %15’ini geçmediğinde karşılanır.

(c) 210 ile 320 nm arasında, aynı ekstrakt tarafından üretilen pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, pik apeksi spektrumunun absorbansının %15’ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki farkı aşağıdaki değerleri geçmemelidir:

- 25 mg/kg ila 500 mg/kg amprolium içeriği için daha yüksek değere bağıl %15,
- 500 mg/kg ile 1.000 mg/kg arasındaki amprolium içeriği için 75 mg/kg,
- 1000 mg/kg’den fazla amprolium içeriği için daha yüksek değere bağıl %7,5.

7.3. Geri kazanım

Güçlendirilmiş bir (kör) numune için geri kazanım en az %90 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

Bir ortak çalışma düzenlenmiş, bu çalışmada üç kanatlı yemi (numune 1-3), bir mineral yem (numune 4) ve bir premiks (numune 5) analiz edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

	Numune 1 (kör yem)	Numune 2	Numune 3	Numune 4	Numune 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
ortalama [mg/kg]	—	45,5	188	5129	25140
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
nominal içerik [mg/kg]	—	50	200	5000	25000

L = Laboratuvarların sayısı

n= Tekil değerlerin sayısı

sr = Tekrarlanabilirlik standart sapması

CV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısı

SR = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

CVR = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı.

9. Gözlemler

9.1. Numune tiamin içeriyorsa, tiamin piki kromatogramda amprolium pikinden biraz önce görünür. Bu metodu izlerken amprolium ve tiamin ayrılmalıdır. Amprolium ve tiamin bu metotta kullanılan kolun (4.1.1) tarafından ayrılmazsa, mobil fazın %50 asetonyitril kısmı (3.6) metanol ile değiştirilir.

9.2. İngiliz Farmakopesine göre bir amprolium çözeltisinin (c = 0,02 mol/l) hidroklorik asit (c = 0,1 mol/l) içindeki spektrumu 246 nm ve 262 nm’de maksimum pikler gösterir. Absorbans 246 nm’de 0,84 ve 262 nm’de 0,80 olmalıdır.

9.3. Ekstrakt her zaman mobil fazla seyreltilmelidir, çünkü amprolium pikinin tutma süresi iyonik güçteki değişime bağlı olarak önemli oranda kayabilir.

Ç. Carbadox Tayini

Methyl 3-(2-kinoksalinilmetilen) carbazate N¹,N⁴-dioksit

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, yemlerdeki, premikslerdeki ve preparatlardaki carbadox seviyesinin tayinini mümkün kılar. Tespit limiti 1 mg/kg, ölçüm limiti 5 mg/kg’dır.

2. Prensip

Numune su ile dengelenir ve metanol-asetonyitril ile ekstrakte edilir. Yem için filtrelenmiş ekstraktan temsili bir miktar, alüminyum oksit kolonunda temizlemeye tabi tutulur. Premiksler ve preparatlar için filtrelenmiş ekstraktan temsili bir miktar, su, metanol ve asetonyitril ile uygun konsantrasyona seyreltilir. Carbadox içeriği, bir UV detektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayrıştırıcılar

3.1. Metanol

3.2. Asetonyitril, HPLC kullanım saflığında

3.3. Asetik asit, w = %100

3.4. Alüminyum oksit: nötr, etkinlik derecesi I

3.5. Metanol-asetonyitril 1+1 (v+v), 500 ml metanol (3.1) 500 ml asetonyitril (3.2) ile karıştırılır.

3.6. Asetik asit, σ = %10, 10 ml asetik asit (3.3) suyla 100 ml’ye seyreltilir.

3.7. Sodyum asetat.

3.8. Su, HPLC kullanım saflığında

3.9. Asetat tampon çözeltisi, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0, 0,82 g sodyum asetat (3.7) 700 ml su (3.8) içinde çözündürülür ve asetik asitle (3.6) pH’ı 6,0’a ayarlanır. 1000 ml’lik balon jojeye aktarılır, su (3.8) ile işaret kadara tamamlanır ve karıştırılır.

3.10. HPLC için mobil faz, 825 ml asetat tampon çözeltisi (3.9) 175 ml asetonyitril (3.2) ile karıştırılır. 0,22 µm filtreden (4,5) süzülür ve çözelti gazdan arındırılır (örneğin 10 dakika ultrason ses dalgaları uygulayarak).

3.11. Standard madde, Saf carbadox: Methil 3-(2-kinoksalinilmetilen) carbazate N¹,N⁴-dioksit, E 850.

3.11.1. Carbadox stok standart çözeltisi, 100 µg/ml (bakınız 5. Metot Not), 25 mg carbadox standart maddesi (3.11) 0,1 mg hassasiyetle 250 ml'lik balon jojeye tartılır.

Metanol-asetonitril (3.5) içinde ultrason ses dalgalarıyla (4.7) çözündürülür. Ultrasonik işleminden sonra çözelti oda sıcaklığına getirilir, metanol asetonitril (3.5) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ya da amber renkli cam malzeme kullanılır ve bir buzdolabında saklanır. En fazla 4°C sıcaklıkta çözelti 1 ay süreyle stabildir.

3.11.2. Kalibrasyon çözeltileri

Bir dizi 100 ml'lik balon jojeye 2,0, 5,0, 10,0 ve 20,0 ml stok standart çözeltisi (3.11.1) aktarılır. 30 ml su eklenir, metanol-asetonitril (3.5) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Balon jojeler alüminyum folyo ile sarılır. Bu çözeltiler sırasıyla 2,0, 5,0, 10,0 ve 20,0 µg/ml carbadox'a karşılık gelir. Kalibrasyon çözeltileri kullanılmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

Not: 10 mg/kg'dan az içeren yemlerde carbadox tayini için, konsantrasyonu 2,0 µg/ml altındaki kalibrasyon çözeltileri hazırlanmalıdır.

3.12. Su-[metanol-asetonitril] (3.5) karışımı, 300 + 700 (v + v), 300 ml suyla 700 ml metanol-asetonitril karışımı (3.5) karıştırılır.

4. Cihaz

4.1. Laboratuvar çalkalayıcısı ya da manyetik karıştırıcı

4.2. Fiberglas filtre kağıdı (Whatman GF/A ya da eşdeğeri)

4.3. Sinterlenmiş cam kırpıntılı ve sıvı çekme valfli cam kolon (300 ila 400 mm uzunluk yaklaşık 10 mm iç çap)

Not: Ayrıca musluk takılı bir cam kolon ya da konik uçlu bir cam kolon da kullanılabilir; bu durumda cam yününden küçük bir tapa alt uca sokulur ve bir cam çubuk kullanılarak sıkıştırılır.

4.4. 20 µl'lik hacimleri enjekte etmeye uygun enjeksiyon sistemli HPLC ekipmanı

4.4.1. Sıvı kromatografik kolon: 300 mm x 4 mm, C₁₈, 10 µm dolgu ya da eşdeğeri

4.4.2. Değişken dalga boyu ayarlı UV detektörü ya da 225 – 400 nm aralığında çalışan Diode Array detektörü

4.5. Membran filtre, 0,22 µm

4.6. Membran filtre, 0,45 µm

4.7. Ultrasonik banyo

5. Metot

Not: Carbadox ışığa duyarlıdır. Tüm metotlar hafif ışık altında ya da amber renkli cam malzeme ya da alüminyum folyo sarılmış cam malzeme kullanarak gerçekleştirilir.

5.1. Genel

5.1.1. Kör yem

Geri kazanım testinin (5.1.2) performansında, carbadox ya da etkileyen maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir. Kör yem numunedekine benzer türde olmalı ve analizde, carbadox ya da etkileyen maddeler tespit edilmemelidir.

5.1.2. Geri kazanım testi

Numunedeki varlığına yakın miktarda carbadox eklenerek kirletilen kör yem (5.1.1) analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 50 mg/kg düzeyinde kirletmek için 5,0 ml stok standart çözeltisi (3.11.1) 200 ml'lik erlene aktarılır. Çözelti, bir azot akışında yaklaşık 0,5 ml'ye buharlaştırılır. 10 g kör yem eklenir, karıştırılır ve ekstraksiyon adımıyla (5.2) devam etmeden önce 10 dakika beklenir.

Alternatif olarak, numune ile benzer türde bir kör yem mümkün değilse (bakınız 5.1.1), standart ekleme metodu yoluyla bir geri kazanım testi gerçekleştirilebilir. Bu durumda numune, zaten numune içinde mevcut olana benzer bir miktar carbadox ile zenginleştirilir. Bu numune zenginleştirilmemiş numune ile birlikte analiz edilir ve çıkartma yoluyla geri kazanım hesaplanabilir.

5.2. Ekstraksiyon

5.2.1. Yem

10 g numune 0,01 g hassasiyetle tartılır ve 200 ml'lik erlene aktarılır. 15,0 ml su eklenir, karıştırılır ve 5 dakika dengelenir. 35,0 ml metanol-asetonitril (3.5) eklenir, kapatılır ve 30 dakika çalkalayıcıda çalkalanır ya da manyetik karıştırıcıda (4.1) karıştırılır. Çözelti fiberglas süzgeç kağıdından (4.2) süzülür. Bu çözelti saflaştırma adımı (5.3) için tutulur.

5.2.2. Premiksler (%0,1 ile %2,0)

1 g öğütülmemiş numune 0,001 g hassasiyetle tartılır ve 200 ml'lik erlene aktarılır. 15,0 ml su eklenir, karıştırılır ve 5 dakika dengelenir. 35,0 ml metanol-asetonitril (3.5) eklenir, kapatılır ve 30 dakika çalkalayıcıda çalkalanır ya da manyetik karıştırıcıda (4.1) karıştırılır. Çözelti fiberglas süzgeç kağıdından (4.2) süzülür.

Temsili miktarda filtrat 50 ml'lik balon jöjeye pipetlenir. 15,0 ml su eklenir, metanol-asetonitril (3.5) ile işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır. Nihai çözeltideki carbadox konsantrasyonu yaklaşık 10 µg/ml olmalıdır. Temsili bir miktar, 0,45 µm'lik bir filtreden (4,6) süzülür. HPLC tayinine (5,4) geçilir.

5.2.3. Preparatlar (> %2)

0,2 g öğütülmemiş numune 0,001 g hassasiyetle tartılır ve 250 ml'lik erlene aktarılır. 45,0 ml su eklenir, karıştırılır ve 5 dakika dengelenir. 105,0 ml metanol-asetonitril (3.5) eklenir, kapatılır ve homojenleştirilir.

Numune 15 dakika sonikasyona (4.7) tabi tutulur, ardından 15 dakika çalkalanır ya da karıştırılır (4.1). Çözelti fiberglas süzgeç kağıdından (4.2) süzülür.

Temsili miktarda filtrat su-metanol-asetonitril (3.12) karışımı ile 10-15 µg/ml'lik nihai bir carbadox konsantrasyonuna (%10'luk bir preparat için seyreltme faktörü 10'dur) seyreltilir. Temsili bir miktar, 0,45 µm'lik bir filtreden (4,6) süzülür. HPLC tayinine (5,4) geçilir.

5.3. Saflaştırma

5.3.1. Alüminyum oksit kolonunun hazırlanması

4 g alüminyum oksit (3.4) tartılır ve cam kolona (4.3) aktarılır.

5.3.2. Numune saflaştırma

15 ml filtrelenmiş ekstrakt (5.2.1) alüminyum oksit kolonuna uygulanır ve ilk 2 ml'lik elüat atılır. Sonraki 5 ml'lik elüat alınır ve temsili bir miktarı 0,45 µm'lik bir filtreden (4.6) süzülür. HPLC tayinine (5,4) geçilir.

5.4. HPLC tayini

5.4.1. Parametreler

Aşağıdaki koşullar rehberlik amacıyla sunulmuştur; eşdeğer sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir:

Sıvı kromatografik kolon (4.4.1):	300 mm x 4 mm, C ₁₈ , 10 µm dolgu ya da eşdeğeri
Mobil faz (3,10):	Asetat tampon çözeltisi (3.9) ve asetonitril (3.2) karışımı, 825 + 175 (v+v).
Akış hızı:	1,5-2 ml/dak.
Tespit dalga boyu:	365 nm
Enjeksiyon hacmi:	20 µl

5,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisi (3.11.2), tutarlı pik yükseklikleri (alanlar) ve alıkonma süreleri elde edilene kadar birkaç kez enjekte edilerek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.4.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltisi (3.11.2) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun pik yükseklikleri (alanları) ölçülür. Kalibrasyon çözeltilerinin apisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlarına ordinatlarda denk gelen ortalama pik yükseklikleri ya da alanları kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi çizilir.

5.4.3. Numune çözeltisi

Numune ekstraktı (yem için (5.3.2), Premiksler için (5.2.2) ve preparatlar için (5.2.3)) birkaç kez enjekte edilir ve carbadox piklerinin ortalama pik yüksekliği (alan) belirlenir.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon grafiği (5.4.2) referans alınarak, aynı çözeltinin carbadox piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan), numune çözeltisinin carbadox konsantrasyonu µg/ml cinsinden tayin edilir.

6.1. Yemler

Numunedeki mg/kg cinsinden carbadox içeriği “w” aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

c = Numune ekstraktının (5.3.2) carbadox konsantrasyonu, µg/ml

V1 = Ekstraksiyon hacmi, ml (örneğin 50)

m = Test kısmının ağırlığı, g

6.2. Ön karşımlar ve preparatlar

Numunedeki mg/kg cinsinden carbadox içeriği “w” aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

c = Numune ekstraktının (5.2.2 ya da 5.2.3) carbadox konsantrasyonu, µg/ml

V2 = Ekstraksiyon hacmi, ml (örneğin ön karşımlar için 50, preparatlar için 150)

f = 5.2.2'ye (Premiksler) ya da 5.2.3'e (preparatlar) göre seyreltme faktörü

m = Test kısmının ağırlığı, g

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanıma

Analitin tanınması ortak kromatografi ile ya da numune ekstraktının ve 10,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisinin (3.11.2) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array dedektörü kullanılarak onaylanabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi (co-chromatography)

Bir numune ekstraktına, uygun miktarda kalibrasyon çözeltisi (3.11.2) eklenir. Eklenen carbadox miktarı numune ekstraktında bulunan tahmini carbadox miktarına benzer olmalıdır. Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca carbadox pikinin yüksekliği geliştirilmelidir. Maksimum yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği orijinal genişliğin yaklaşık %10'u aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) numunenin ve standart spektrumlarının, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen maksimum absorpsiyon dalga boyu, tespit sisteminin çözülme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array tespit için bu tipik olarak + 2 nm'dir.

(b) 225 ile 400 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır.

(c) 225 ile 400 nm arasında, aynı ekstrakt tarafından üretilen pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun %10 ila %100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, apeks spektrumunun absorbansının %15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrarlanabilirlik

10 mg/kg ya da üstü içerik için, aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark daha yüksek sonuca bağıl %15'i geçmemelidir.

7.3. Geri kazanım

Zenginleştirilmiş bir (kör) numune için geri kazanım en az %90 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

Bir ortak çalışma düzenlenmiş, bu çalışmada 8 laboratuvar tarafından 6 yem, 4 premiks ve 3 preparat numunesi analiz edilmiştir. Her numunede analizler paralel olarak gerçekleştirilmiştir. (Bu ortak çalışma hakkında daha ayrıntılı bilgi için bkz. *Journal of the AOAC, Volume 71, 1988, p. 484-490*). Sonuçlar (atılanlar dışında) aşağıda verilmiştir:

Tablo 1

Yem için ortak çalışmanın sonuçları

	Numune 1	Numune 2	Numune 3	Numune 4	Numune 5	Numune 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Ortalama (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
Nominal içerik (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tablo 2

Premiksler ve preparatlar için ortak çalışmanın sonuçları

	Premiksler				Preparatlar		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Ortalama (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S _r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV _r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S _R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV _R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nominal içerik (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = Laboratuvarların sayısı

n= Tekil değerlerin sayısı

S_r = Tekrarlanabilirlik standart sapmasıCV_r = Tekrarlanabilirlik varyasyonu katsayısıS_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

CVR = Tekrar üretilebilirlik varyasyonu katsayısı