

NUMUNE ALMA METOTLARI

1. GENEL HÜKÜMLER

Yemin resmi kontrollü amacıyla alınacak numuneler aşağıda tarif edilen metotlara göre alınmalıdır. Bu şekilde alınan numunelerin, numune alınan kısımları temsil ettiği kabul edilir.

Temsili numune alınmasının amacı bir partiden küçük bir kısım elde etmek, bunu yaparken de bu kısmın özelliğinin partinin söz konusu özelliği bakımından ortalama değere sahip olmasına dikkat etmektir. Partinin içerisinden numune alınması partideki farklı noktalardan tekrarlı biçimde birincil numune alınması yoluyla olur. Söz konusu birincil numune, temsili bölme yoluyla temsili nihai numunelerin hazırlanacağı toplu bir paçal numune oluşturmak üzere karıştırılarak bir araya getirilir.

Görsel muayene yoluyla, yemin numune alınacak kısımları nitelik bakımından aynı partideki yemin geri kalanından farklılık gösteriyorsa, söz konusu kısımlar yemin geri kalanından ayrılmalı ve ayrı bir alt parti olarak değerlendirilmelidir. Yemin farklı alt partilere ayrılmasının mümkün olmadığı durumda, yem tek bir parti olarak değerlendirilmek suretiyle yemden numune alınmalıdır. Bu tür durumlarda, numune alma raporunda bu husus belirtilmelidir.

Bu Yönetmelik hükümleriyle uyumlu olarak alınan bir yem numunesi, aynı sınıf veya tautımdaki bir yem partisnin kısmı ise ve bu numunenin ulusal mevzuat gerekliliklerini karşılamadığı yönünde değerlendirme yapılırsa, söz konusu partideki tüm yemin aynı şekilde etkilendiği varsayılır. Partinin geri kalan kısmının ulusal mevzuat gerekliliklerine uyumlu olduğunun detaylı bir değerlendirmeye ortaya koyulması durumunda yukarıdaki varsayım geçerli olmaz.

Numune, mühür kırılmadan veya uzaklaştırılmadan numuneye erişimi önleyecek şekilde mühürlenmelidir. Numunenin mührü açıkça belirlenebilir ve görülebilir olmalıdır. Numune geri döndürülmüş zarar görmeden açılmayacak şekilde kapatılmış bir kap içerisine yerleştirilebilir.

Numunenin tanımlanması: Numune kalıcı bir şekilde işaretlenmeli ve numune alma tutağı ile açıkça bağlantılı olarak tanımlanmalıdır.

Yem işletmelerinde yapılan resmi kontrollerde kontrol görevlisi tarafından üç takım numune alınır. Birinci takım numunenin muayene ve analizi Bakanlıkça belirlenen laboratuvarında yapılır. İkinci takım olan şahit numune Bakanlık il/ilçe müdürlüğünde muhafaza edilir. Üçüncü takım numune ise işletmeciye bırakılır. Mikrobiyolojik incelemeler ve ürün miktarının şahit numunenin analizinin yapılabilmesi için yetersiz olduğu durumlarda bir takım numune alınır.

2. NUMUNE ALMA ARAÇLARI

2.1. Numune alma aracı numune alınacak ürünleri kontamine etmeyecek maddelerden yapılmış olmalıdır. Numune alma araçları birden fazla kullanılması gerekiyorsa ise çapraz kontaminasyonun önlenmesi amacıyla temizliği kolay olmalıdır.

2.2. Katı yemden numune alınması için önerilen araçlar

2.2.1. Manuel numune alma

2.2.1.1. Dikey kenarlı düz tabanlı kürek

2.2.1.2. Uzun ayrık veya bölümlere sahip numune alma sondası: Numune alma sondasının boyutları numune alınan kısmın özellikleri (konteynır derinliği, çuval boyutları vb.) ve yemin parçacık büyüklüğüne uygun olmalıdır.

Numune alma sondasının birden fazla deliğinin olması durumunda, numune sondası boyunca farklı konumlardan alınmasını sağlamak için, delikler bölümlerle ayrılmalı veya sıralı kademeli delikler mevcut bulunmalıdır.

2.2.2. Mekanik numune alma

Akış halindeki yemden numune alınması amacıyla uygun mekanik araçlar kullanılabilir. Burada uygun araçlarla ifade edilmek istenen, akış halindeki yemin tümünü temsil edecek numune alınması için gerekli araçlardır.

Hareket halindeki yemden (yüksek akış oranına sahip) numune alınması otomatik numune alma araçlarıyla gerçekleştirilebilir.

2.2.3. Bölme aracı

Mümkün ve uygun olduğu hallerde, numuneyi yaklaşık olarak eşit parçalara bölme amacıyla tasarlanan araçlardır. Azaltılan numunelerin hazırlanması amacıyla kullanılabilir.

3. BİRİNCİL NUMUNE SAYISINA İLİŞKİN MİKTAR GEREKLİLİKLERİ

3.1 ve 3.2’de birincil numune sayısına ilişkin miktar gereklilikleri, maksimum 500 tona kadar ve temsili numune alınmasının mümkün olacağı büyüklükteki kısımlar için geçerlidir. Tanımlanan numune alma prosedürü, belirlenen ve numune alınan maksimum kısım büyüklüğünden daha büyük miktarlar için de geçerlidir. Bunun koşulları; aşağıdaki tablolarda belirtilen maksimum birincil numune sayılarının dikkate alınmaması, birincil numune sayısının prosedürün uygun kısmında verilen karekök formülüyle belirlenmesi (bkz. 3.3) ve minimum Paçal numune büyüklüğünün oransal olarak artmasıdır. Bu durum büyük bir partinin daha küçük alt partilere bölünmesini ve her alt partiden 3.1 ve 3.2’de tarif edilen prosedüre uygun olarak numune alınmasını önlemez.

Numune alınan kısmın büyüklüğü, söz konusu kısmın her alt kısmından numune alınabilmesine uygun olmalıdır.

Çok büyük parti veya alt partiler için (500 ton’dan büyük) veya bu bölümün 3.1 ve 3.2’sinde belirtilen numune alma prosedürüyle uyumlu olarak numunenin alınmasının mümkün olmadığı şekilde taşınan veya saklanan partiler için 3.3’te belirtilen numune alma prosedürü uygulanır.

Yem işletmecisinin mevzuat uyarınca zorunlu bir izleme sistemi kapsamında çerçevesinde bu Yönetmelikle uyumlu olarak numune alması gerektiğinde, yem işletmecisinin numune alma prosedürünün denkliği yanında numunenin bütünü temsil edebilme düzeyini yetkili makama ispatlamasından ve yetkili makamın onay vermesinden sonra, işlem özelliklerini dikkate almak amacıyla bu bölümdeki miktar gerekliliklerinden sapabilir.

Kontrol görevisince, partide oluşacak kabul edilemez ticari hasar dolayısıyla miktar gerekliliklerine ilişkin numune alma metodlarının yürütülmesinin mümkün olmadığı istisnai durumlarda (ambalajlama biçimi, taşıma araçları, saklama şekli, vb.), mümkün olduğunca temsili olmak ve tam anlamıyla tarif edilmek ve belgelendirilmek koşuluyla alternatif bir numune alma metodu uygulanabilir.

3.1. Yem içerisinde homojen dağılım gösteren maddelerin veya türünlerin kontrolü için alınacak birincil numuneler hakkında miktar gereklilikleri

3.1.1. Dökme katı yem

Numune alınan kısmın büyüklüğü	Alınacak en az birincil numune sayısı
$\leq 2,5$ ton	7
$> 2,5$ ton	Numune alınan parti miktarının (ton) 20 katının karekökü alınarak elde edilen sayı kadar.(*) En fazla 40 birincil numune alınır.

* Elde edilen sayı kesirliyse en yakın üst tam sayıya yuvarlanır.

3.1.2. Dökme sıvı yem

Numune alınan kısmın büyüklüğü	Alınacak en az birincil numune sayısı
$\leq 2,5$ ton veya ≤ 2500 litre	4 (*)
$> 2,5$ ton veya > 2500 litre	7 (*)

(*) Sıvının homojen hale getirilmesinin mümkün olmadığı durumda birincil numune sayısı artırılmalıdır.

3.1.3. Ambalajlı yem

Yem (sıvı ve katı), tabloda birim olarak bahsedilen torba, çuval, teneke, fiç, vb. içerisinde saklanabilir. Büyük birimlerden (≥ 500 kg veya litre) 3.1.1 ve 3.1.2 deki ambalajsız yem için öngörülen hükümlere uygun olarak numune alınmalıdır.

Numune alınan kısmın büyüklüğü	Birincil numune alınması gereken paketlerin minimum sayısı (*)
1 ile 20 paket arası	1 Paketten(**)
21 ile 150 paket arası	3 Paketten (**)
151 ile 400 paket arası	5 Paketten (**)
> 400 paket	Numune alınan partideki paket sayısının karekökünün dörtte biri kadar. (*) (***) En fazla 40 paketten birincil numune alınır.

(*) Bir paketin (ör. bozulabilir yaş yemler) açılmasının analizi etkilenebileceği durumlarda açılmayan paket birincil numune olarak kabul edilir.

(**) Miktarı 1 kg veya 1 litreyi geçmeyen paketler için bir orijinal paket miktarı birincil numune olarak kabul edilir.

(***) Elde edilen sayı kesirliyse en yakın üst tamsayıya yuvarlanır.

3.1.4. Blok yem ve mineral yalama taşları

25 üniteden oluşan her parti için bir blok veya bir yalama taşı alınır. En çok dört blok veya yalama taşı alınır. Her biri 1 kg'dan az olan blok veya yalama taşları için, bir blok veya bir yalama taşı ağırlığı birincil numune kabul edilir.

3.1.5. Kaba yem

Numune alınan kısmın büyüklüğü	Alınacak en az birincil numune sayısı (*)
≤ 5 ton	5
> 5 ton	Numune alınan parti miktarının (ton) 5 katının karekökü alınarak elde edilen sayı kadar. (**) En fazla 40 birincil numune alınır.

(*) Bazı yemlerden (ör. silajlar), partiye kabul edilemez bir zarar vermeksizin birincil numunelerin alması mümkün olmayabilir. Bu durumlarda alternatif numune alma metotları uygulanabilir ve bu tür partilerden numune almak için bir kılavuz hazırlanabilir.

(***)Elde edilen sayı kesirliyse en yakın üst tamsayıya yuvarlanır.

3.2. Yemde içerisinde homojen dağılım göstermeyen bileşen veya maddelerin kontrolüne ilişkin birincil numuneler hakkında miktar gereklilikleri

Birincil numunelere ilişkin miktar gereklilikleri aşağıdaki durumlarda uygulanır:

- Yem maddelerinde aflatoksinler, çavdarmahmuzu, diğer mikotoksinler ve zararlı botanik bulaşıklıkların kontrolü;
- GDO'lu materyaller de dahil olmak üzere, bir bileşen veya maddenin yem maddesinde homojen dağılım göstermeyen şekilde çapraz kontaminasyonun kontrolü.

Kontrol yetkilisinin karma yemdeki bir bileşen veya maddeyle çapraz kontaminasyon durumunda da homojen dağılım görülmeyeceğine dair güçlü bir şüphesi varsa, aşağıdaki tabloda verilen miktar gereklilikleri uygulanabilir.

Numune alınan kısmın büyüklüğü	Alınacak en az birincil numune sayısı
< 80 ton	3.1'deki miktar gerekliliklerine bakınız. Alınacak birincil numune sayısı 2,5 ile çarpılmalıdır.
≥ 80 ton	100

3.3. Çok büyük partiler için birincil numunelere ilişkin miktar gereklilikleri

Numune alınan büyük parti için (numune alınan parti > 500 ton), alınması gereken birincil numune sayısı;

- Yem içerisinde homojen dağılım gösteren maddelerin veya ürünlerin kontrolü için alınacak birincil numune sayısı= Numune alınan parti miktarının karekökü alınarak elde edilen sayıya 40 eklenir
- Yem içerisinde homojen dağılım göstermeyen bileşen veya maddelerin kontrolü için alınacak birincil numune sayısı= Numune alınan parti miktarının karekökü alınarak elde edilen sayıya 100 eklenir

4. PAÇAL NUMUNELERDE MİKTAR GEREKLİLİKLERİ

Numune alınan kısım başına tek bir paçal numune gereklidir.		
	Yemin türü	En az paçal numune miktarı(*),(**)
4.1.	Dökme yem	4 kg
4.2.	Ambalajlı yem	4 kg (***)
4.3.	Sıvı veya yarı sıvı yem	4 lt
4.4.	Blok yem veya mineral yalama taşları	
4.4.1.	1 kg'den fazla olan her yem	4 kg
4.4.2.	1 kg'den fazla olmayan her yem	Dört blok yem veya yalama taşı ağırlığı
4.5.	Kaba yem	4 kg (****)

(*) Numune alınan yemin yüksek değerli olması halinde, numune alma raporunda tanımlanmak ve belgelenmek koşuluyla paçal numune daha düşük bir miktarda alınabilir.

(**) Genetiği değiştirilmiş materyalin varlığının kontrolü için alınacak olan paçal numune en az 35 000 tohum/dane içermelidir. Buna göre, mısır için paçal numune büyüklüğü en az 10,5 kg, soya için ise 7 kg olmalıdır. Arpa, darı, yulaf, pirinç, çavdar, buğday ve keten tohumu gibi diğer tohum ve daneler için 4 kg'lık paçal numune büyüklüğü 35 000'den daha fazla daneye karşılık gelmektedir.

(***) Ambalajlı yemde tekli birimlerin büyüklüğüne bağlı olarak paçal numune için 4 kg'lık büyüklüğe ulaşmak mümkün olmayabilir.

(****) Düşük özgül ağırlığa sahip kaba yeme (ör. sap, saman) ilişkin olarak paçal numune en az 1 kg büyüklüğe sahip olmalıdır.

5. NİHAİ NUMUNELERE İLİŞKİN MİKTAR GEREKLİLİKLERİ

5.1. Nihai numuneler

En az bir nihai numunenin analizi gereklidir. Analiz için nihai numunedeki miktar aşağıdakilerden daha az olamaz:

Katı yem	500 g (*) (**) (***)
Sıvı veya yarı sıvı yem	500 ml (*)

(*) Genetiği değiştirilmiş materyalin varlığının kontrolü için alınacak numune en az 10 000 tohum/dane içermelidir. Buna göre, mısır için nihai numune büyüklüğü en az 3 000 g, soya için ise 2 000 g olmalıdır. Arpa, darı, yulaf, pirinç, çavdar, buğday ve keten tohumu gibi diğer tohum ve daneler için 500 g'lık nihai numune büyüklüğü 10 000'den fazla daneye karşılık gelmektedir.

(**) Paçal numunenin 4 kg veya litreden önemli derecede küçük olması halinde, numune alma raporunda tanımlanmak ve belgelenmek koşuluyla paçal numuneden daha düşük bir miktarda alınabilir.

(***) 15 Ağustos 2011 tarihli ve 28026 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Pestisit Kalıntıların Resmi Kontrolü İçin Numune Alma Tebliği hükümleriyle uyumlu olarak baklagiller, tahıl daneleri ve ağaç meyislerinden pestisit kalıntıları bakımından numune alınması durumunda, nihai numunenin asgari büyüklüğü 1 kg olacaktır.

6. ÇOK BÜYÜK PARTİLER VEYA PARTİ İÇERİSİNDE NUMUNE ALMANIN MÜMKÜN OLMAYACAĞI ŞEKİLDE DEPOLANAN VEYA TAŞINAN PARTİLER İÇİN NUMUNE ALMA METOTLARI

6.1. Genel ilkeler

Bir partinin taşınma veya saklanma biçimi partinin tümünde birincil numune alınmasına olanak sağlamazsa, bu tür partilerden numune alınması tercihen partinin akış halinde olduğu sırada yapılmalıdır.

Yemlerin depolanmasının amaçlandığı büyük depolarda, işletmecilerin otomatik numune alma ekipmanının depoya kurulması yönünde teşvik edilmelidir. Bu sayede saklanan partilerin tümünden (otomatik) numune alınmasına olanak sağlanabilir.

Bu bölümde bahsedilen numune alma prosedürlerinin uygulanması halinde, işletmeci veya temsilcisi numune alma prosedürü hakkında bilgilendirilmelidir. Bu numune alma prosedürüne işletmeci veya temsilcisi tarafından itiraz edilmesi halinde, masrafları kendileri tarafından karşılanmak üzere söz konusu kişiler yetkili makamın tüm partiden numune almasına olanak sağlarlar.

6.2. Gemiyle taşınan büyük partiler

6.2.1 Gemiyle taşınan büyük partilerden dinamik (hareket halinde) numune alınması

Gemilerdeki büyük partilerden numune alınması tercihen ürünün akış halinde olduğu sırada yapılmalıdır.

Numune alma işlemi fiziksel olarak ayrılabilen ürünlerin olduğu her ambarda yapılır. Bununla birlikte Başlangıçtaki fiziksel ayırma saklama tesislerine aktarımdan sonra geçerli olmaz, çünkü fiziksel olarak ayrılabilen ambalar kısmen birbiri ardında boşaltılır. Bu nedenle numune alma işlemi ilk fiziksel ayırma işleminde veya depolama tesisine taşındıktan sonra ayırma işleminde yapılabilir.

Bir geminin boşaltılması birkaç gün sürebilir. Normalde numune alma işleminin boşaltmanın tümü sırasında belirli aralıklarla yapılması gerekir. Ancak resmi bir kontrol görevlisinin tüm boşaltma işlemi boyunca numune almak için hazır bulunması mümkün veya uygun olmayabilir. Bu nedenle tüm partinin belirli bir kısmından (numune alınan kısım) numune alınmasına izin verilir. Birincil numunelerin sayısı numune alınan kısmın büyüklüğü dikkate alınarak belirlenir.

Aynı sınıf veya tanımdaki bir yem partisinin bir kısmından numune alındığı ve partinin söz konusu bu kısmının mevzuat gerekliliklerini karşılamadığı durumda, geri kalanı ile ilgili yapılan daha kapsamlı değerlendirme sonucunda güvenilir olduğu ispat edilemez ise, o seri, parti veya sevkiyattaki aynı sınıf veya çeşidin tamamının mevzuata uygun olmadığına karar verilir.

Resmi numune otomatik olarak alınsa bile bir denetleyicinin hazır bulunması gereklidir. Bununla birlikte otomatik numune alma işleminin önceden belirlenmiş ve numune alma sırasında değiştirilemeyen parametrelerle yapılması ve birincil numunelerin kapalı bir kapta toplanarak olası bir sahteciliğin önüne geçilmesi söz konusu olduğu takdirde, bir denetleyicinin sadece numune alma süreci başında ve sonunda kaplar değiştirilirken hazır bulunması gereklidir.

6.2.2. Gemiyle taşınan partilerden statik numune alınması

Numune alınmasının statik olarak yapılması durumunda yukarıdan erişimin mümkün olduğu depolar (silolar) için öngörülen prosedürün aynısı uygulanmalıdır (bkz. 6.4.1).

Numune alma işleminin partinin/fiziksel olarak ayrılabilen biriminin erişilebilir kısmından (üst) yapılması gereklidir. Birincil numunelerin sayısı numune alınan kısmın büyüklüğü dikkate alınarak belirlenir. Aynı sınıf veya tanımdaki bir yem partisinin bir kısmından numune alındığı ve partinin söz konusu bu kısmının mevzuat gerekliliklerini karşılamadığı durumda, geri kalanı ile ilgili yapılan daha kapsamlı değerlendirme sonucunda güvenilir olduğu ispat edilemez ise, o seri, parti veya sevkiyattaki aynı sınıf veya çeşidin tamamının mevzuata uygun olmadığına karar verilir.

6.3. Depolarda saklanan büyük partilerden numune alma

Numune, partinin erişilebilir kısmından alınmalıdır. Birincil numunelerin sayısı numune alınan kısmın büyüklüğü dikkate alınarak belirlenir. Aynı sınıf veya tanımdaki bir yem partisinin bir kısmından numune alındığı ve partinin söz konusu bu kısmının mevzuat gerekliliklerini karşılamadığı durumda, geri kalanı ile ilgili yapılan daha kapsamlı değerlendirme sonucunda güvenilir olduğu ispat edilemez ise, o seri, parti veya sevkiyattaki aynı sınıf veya çeşidin tamamının mevzuata uygun olmadığına karar verilir.

6.4. Saklama tesislerinden (silolar) numune alma

6.4.1. Yukarıdan kolayca erişilebilen silolardan numune alma

Numune, partinin erişilebilir kısmından alınmalıdır. Birincil numunelerin sayısı numune alınan kısmın büyüklüğü dikkate alınarak belirlenir. Aynı sınıf veya tanımdaki bir yem partisinin bir kısmından numune alındığı ve partinin söz konusu bu kısmının mevzuat gerekliliklerini karşılamadığı durumda, geri kalanı ile ilgili yapılan daha kapsamlı değerlendirme sonucunda güvenilir olduğu ispat edilemez ise, o seri, parti veya sevkiyattaki aynı sınıf veya çeşidin tamamının mevzuata uygun olmadığına karar verilir.

6.4.2. Yukarıdan erişilemeyen silolardan (kapalı silolar) numune alma

6.4.2.1 Yukarıdan erişilemeyen (kapalı) silolar (> 100 ton)

Silolarda saklanan yemlerden statik şekilde numune alınması mümkün değildir. Bu nedenle silodaki yemden numune alınması gerektiği ve sevkiyatın hareket ettirilmesinin mümkün olmadığı durumda, silo boşaltılacağı zaman yemin akış halinde olduğu sırada numune alınmasının sağlanması için işletmecinin denetleyici bilgilendirmesi gerekir.

6.4.2.2. Yukarıdan erişilemeyen (kapalı) silolar (< 100 ton)

Numune alma prosedürü 50 ile 100 kg arasındaki miktarın bir kaba alınması ve buradan numune alınmasını kapsar. Paçal numune büyüklüğü tüm partiye karşılık gelir ve birincil numunelerin sayısı numune alınması amacıyla bir kaba alınan silonun büyüklüğüyle ilişkilidir. Aynı sınıf veya tanımdaki bir yem partisinin bir kısmından numune alındığı ve partinin söz konusu bu kısmının mevzuat gerekliliklerini karşılamadığı durumda, geri kalanı ile ilgili yapılan daha kapsamlı değerlendirme sonucunda güvenilir olduğu ispat edilemez ise, o seri, parti veya sevkiyattaki aynı sınıf veya çeşidin tamamının mevzuata uygun olmadığına karar verilir.

6.5. Büyük kapalı konteynırlardaki dökme yemlerden numune alma

Bu tür partilerden genellikle boşaltma işleminin ardından numune alınır. Belirli durumlarda ithalat veya kontrol noktasında boşaltma mümkün olmayabilir, bu nedenle numune alma işlemi söz konusu konteynırlar boşaltıldığı zaman yapılmalıdır.

7. NUMUNE ALINMASI, HAZIRLANMASI VE AMBALAJLANMASINA İLİŞKİN TALİMATLAR

7.1. Genel Hükümler

Numuneler gereksiz gecikmeye meydan vermeden alınmalı ve hazırlanmalıdır. Ayrıca ürünün değiştirilmesi veya kontamine olması söz konusu olmayacak şekilde gerekli önlem alınmalıdır. Araçlar ve yüzeyler ile numunelerin alınacağı kaplar temiz ve kuru olmalıdır.

7.2. Birincil numuneler

Birincil numuneler numune alınacak kısmın tamamını temsil edecek şekilde rastgele alınmalı ve yaklaşık olarak aynı büyüklükte olmalıdır.

Birincil numune büyüklüğü en az 100 g veya düşük özgül ağırlığa sahip kaba yem için 25 gram olmalıdır.

6 ncı maddede belirtilen hükümler kapsamında 40 birincil numuneden daha az numune alınması gerektiğinde birincil numunelerin ağırlığı, alınacak paçal numunenin ağırlığını belirleyen 4 üncü madde ile uyumlu olarak belirlenmelidir.

Miktar gerekliliklerine göre sınırlı sayıda birincil numune alınması gerektiği zaman küçük ambalajlı yem partilerinden numune alınması durumunda birincil numunenin miktarı 1 kg veya 1 litreği geçmeyen bir orijinal birim kadar olmalıdır.

Küçük birimlerden (ör. <250 g) oluşan ambalajlı yemden numune alınması durumunda birincil numunenin büyüklüğü ambalajın büyüklüğüne bağlıdır.

7.2.1. Dökme yem

Gerektiğinde numune alınan kısım hareket ettirilmeden (yükleme veya boşaltma) numune alma işlemi yapılabilir.

7.2.2. Ambalajlı yem

3 inci maddede belirtildiği üzere numune alma için gerekli sayıda paketin seçilmesinin ardından her bir paketin bir kısmı bir sonda veya kürek kullanılarak alınabilir. Gerektiğinde numuneler paketlerin ayrı ayrı boşaltılmasından sonra alınabilir.

7.2.3. Homojen veya homojenize edilebilir sıvı veya yarı sıvı yem

3 inci maddede belirtildiği üzere numune alma için yeterli sayıda paketin seçilmesinin ardından, içerikler karıştırılabilir ve her paketten bir miktar alınabilir.

İçerikler boşaltıldıktan sonra birincil numuneler alınabilir.

7.2.4. Homojenize edilemeyen sıvı veya yarı sıvı yem

3 üncü maddede belirtildiği üzere numune alma için gerekli sayıda paketin seçilmesinin ardından numuneler farklı düzeylerden alınabilir.

İçerikler boşaltılırken de numuneler alınabilir fakat bunların ilk kısımları atılır.

Her iki durumda da alınması gereken toplam hacim 10 litreden az olmamalıdır.

7.2.5. Blok yemler ve mineral yalama taşları

3 üncü maddede belirtildiği üzere, numune alma amacıyla gerekli sayıda blok veya yalama taşının seçilmesinin ardından her blok veya yalama taşından bir kısım alınabilir. Homojen olmayan bir blok veya yalama taşının bulunma ihtimaline karşı numune olarak blok veya yalama taşının tümü alınabilir.

1 kg'dan büyük olmayan blok veya yalama taşları için birincil numune bir blok veya yalama taşı içeriklerinden oluşur.

7.3. Paçal numunelerin hazırlanması

Birincil numuneler karıştırılarak tek bir paçal numune hazırlanmalıdır.

7.4. Nihai numunelerin hazırlanması

Paçal numunedeki materyal dikkatle karıştırılmalıdır⁽¹⁾.

- Her numune uygun bir konteynir/kap içerisine koyulmalıdır. Taşıma veya saklama sırasında numune bileşiminde oluşabilecek değişiklik veya kontaminasyon ya da sahteciliğin önlenmesi amacıyla gereken tüm önlemler alınmalıdır.
- Yemde homojen şekilde dağılmış bileşen veya maddelerin kontrolü amacıyla paçal numune tercihen bir mekanik ya da otomatik bölücü yoluyla en az 2,0 kg veya 2,0 litreye temsili şekilde azaltılabilir (azaltılmış numune)⁽²⁾. Baklagiller, tahıl daneleri ve ağaç yemişlerinde pestisit kalıntılarının kontrolü amacıyla azaltılmış numunenin asgari büyüklüğü 3 kg olmalıdır. Yemin yapısının bölücü kullanımına imkan sağlamaması veya bölücünün mevcut olmaması durumunda, numune çeyrekleme metodlarıyla azaltılabilir. Azaltılan numunelerle (Asıl, şahit ve firma numunesi olarak) yaklaşık olarak aynı miktarda ve 5 inci maddedeki miktar gerekliliklerine uygun olarak nihai numuneler alınır. Genetiği değiştirilmiş materyaller de dahil olmak üzere bileşenlerin kontrolü durumunda, Paçal numune:
- Tamamen homojenize edilir ve sonrasında nihai numunelere bölünür ya da
- Mekanik veya otomatik bir bölücü kullanılarak en az 2 kg veya 2 litreye⁽³⁾ azaltılır. Sadece yemin yapısının bölücü kullanımına olanak sağlamadığı durumda, gerek duyulması halinde numune çeyrekleme metoduyla azaltılabilir. Genetiği değiştirilmiş materyalin varlığının kontrolü amacıyla azaltılmış numune en az 10000 tohumun/dane içermelidir (4 üncü maddedeki dipnot (**)) ve 7 nci maddedeki dipnota (*) bakınız).

7.5. Numunelerin ambalajlanması

Resmî kontroller için alınan numuneler, mühürlenir ve etiketlenir. Numunenin konulduğu kap veya ambalajın mühürleme işlemi, numunenin güvenliğini temin etmek amacıyla mühür bozulmadan paket açılmayacak şekilde yapılır.

7.6. Numunelerin laboratuvara gönderilmesi

Numune analizi yapacak kişi için gerekli bilgilerle beraber tayin edilen analiz laboratuvarına gecikme olmaksızın gönderilmelidir.

8. NUMUNE ALMA KAYDI

Her bir numunenin kaydı tutulmalı, numune alınan her kısmın ve numune büyüklüğünün açıkça tanımlanması olarak sağlanmalıdır.

Kayıtta aynı zamanda bu Yönetmelikte sunulan numune alma prosedüründen sapma varsa belirtilmelidir.

Kayıt altına alınan numune resmi kontrol laboratuvarına gönderilir.

(1) Topaklanmış parçalar ezilir ve karıştırılır.

(2) Düşük özgül ağırlığa sahip kaba yemler dışında.

(3) Düşük özgül ağırlığa sahip kaba yemler dışında

YEMLERİN ANALİZ METOTLARINA İLİŞKİN GENEL HÜKÜMLER

A. NUMUNELERİN ANALİZ İÇİN HAZIRLANMASI

1. Amaç

Aşağıda belirtilen prosedürler EK-1’de belirtilen hükümlere uygun olarak yapılan numune alma işleminin ardından kontrol laboratuvarlarına gönderilen numunelerin analize hazırlanması amacıyla belirlenmiştir.

Analize alınacak numuneler hazırlanırken tartılan miktarlar analiz metotları kısmında belirtildiği üzere homojen ve nihai numuneleri temsil edecek şekilde hazırlanmalıdır.

2. Alınacak tedbirler

İzlenecek numune hazırlama prosedürü, kullanılacak analiz metotlarına ve kontrol edilecek bileşen ve maddelere bağlıdır. Bu nedenle aşağıdaki numune hazırlama prosedürü, kullanılan analiz metodu ve kontrol edilecek bileşen veya maddeler için uygun olmalıdır.

Gerekli tüm işlemler, numunenin olası kontaminasyonunu ve numune bileşimindeki değişikliği mümkün olduğunca önleyecek şekilde yapılmalıdır. Öğütme, karıştırma ve elekten geçirme işlemleri numunenin hava ve ışığa en az düzeyde maruz kalmasına dikkat edilerek gecikme olmaksızın yapılmalıdır. Numune ısısını artırabilecek değirmen ve öğütücüler kullanılmamalıdır.

Isıya özellikle duyarlı olan yemler için manuel öğütme tavsiye edilmektedir. Bunun dışında kullanılan aparatın bir kontaminasyon kaynağı olmamasını sağlamak için özen gösterilmelidir.

Hazırlama işlemi, numunenin nem düzeyinde önemli değişiklik olmaksızın gerçekleştirilemiyorsa, hazırlık öncesi ve sonrasında EK-3’ün A Bölümünde belirtilen metoda göre nem düzeyi belirlenmelidir.

3. Prosedür

3.1. Genel prosedür

Numune, analiz için hazırlanırken uygun ayırma teknikleri kullanılarak analiz ve referans için yeterli alt numunelere bölünür. Alt numunelere bölünürken konileme ve çeyrekleme metotları kullanılmaz.

3.1.1. Ön işlemsiz öğütülebilen yemler

Elenen numune karıştırılır, temiz, kuru, hava sızdırmayan uygun bir kaba alınır. Analiz yapılmak üzere numune alınacağı zaman, numune tartılmadan hemen önce homojenizasyon sağlamak amacıyla tekrar karıştırılır.

3.1.2. Kurutmanın ardından öğütülebilen yemler

Analiz metodunda farklı bir şekil belirtilmemişse numune, EK-3’ün A Bölümünün 4.3’ünde belirtilen metottaki ön kurutma işlemine uygun olarak, nem içeriği % 8 – 12 aralığına düşüncüye kadar kurutulur. Bundan sonraki işlemler, 3.1.1’de belirtildiği şekilde yapılır.

3.1.3. Sıvı veya yarı sıvı yem

Numune temiz, kuru ve hava sızdırmayan uygun bir kaba alınır. Analiz yapılmak üzere numune alınacağı zaman, numune tartılmadan hemen önce homojenizasyon sağlamak amacıyla karıştırılır.

3.1.4. Diğer yemler

Yemlerin özelliğine göre, yukarıda belirtilen şekillerde hazırlanması mümkün olmayan diğer yemlerin hazırlanmasında farklı metotlar uygulanabilir. Ancak, analiz için alınan miktar, homojen ve numuneyi temsil edecek şekilde olmalıdır.

- Görsel inceleme veya mikroskopi yoluyla muayene ya da numunenin tümünün homojenize edildiği durumlara ilişkin prosedür.
- Görsel incelemeyle muayene durumunda (mikroskop kullanmaksızın), muayene amacıyla laboratuvar numunesinin tümü kullanılır.
- Mikroskopla muayene durumunda, laboratuvar numuneyi azaltabilir.
- Numunenin homojenize olduğu durumda, nihai numune homojenize olan numuneden alınır.

4. Numunelerin saklanması

Numuneler bileşenlerinin değişmeyeceği bir sıcaklıkta saklanmalıdır. Işığa özellikle duyarlı olan vitamin veya diğer maddelerin analizi için alınan numuneler, ışıktan olumsuz etilenmeyecek koşullarda saklanmalıdır.

B. ANALİZLERDE KULLANILAN REAKTİFLER VE APARATLARA İLİŞKİN HÜKÜMLER

1. Analiz metodunda farklı bir şekil belirtilmemişse, kullanılan kimyasalların analitik olarak saf olması gerekir. Eser miktardaki maddelerin analizinde kullanılan kimyasalların saflığı, kör test ile kontrol edilir. Elde edilen sonuçlara göre kimyasalların daha da saflaştırılması gerekebilir.
2. Kullanılan solvent veya dilüentin yapısı belirtilmeksizin analiz metotlarında belirtilen çözelti hazırlanması, seyreltme, durulama veya yıkamayı içeren herhangi bir işlem suyun kullanılmasını gerektirir. Genel bir kural olarak su demineralize veya distile olmalıdır. Analiz metotlarında belirtilen bazı durumlar dışında bu metot özel saflaştırma prosedürlerine tabi olmalıdır.
3. Analiz metotlarında, kontrol laboratuvarlarında normal olarak bulunan ekipmandan, sadece özel olan veya özel bir kullanım gerektiren araç ve aparatlara atıf yapılmıştır. Özellikle küçük miktarlardaki maddelerin belirlenmesi gerektiği zaman bu araç ve aparatlar temiz olmalıdır.

C. ANALİZ METOTLARININ UYGULANMASI VE SONUÇLARIN İFADESİNE İLİŞKİN HUSUSLAR

1. Ekstraksiyon prosedürü

Ekstraksiyon işleminde değişik metotlar uygulanabilir. Genel bir kural olarak, metotta atıfta bulunulan prosedür dışındaki ekstraksiyon prosedürleri uygulanabilir. Bunun uygulanabilmesi için kullanılan ekstraksiyon prosedürünün analiz edilen matriks için metotta belirtilen prosedüre denk bir ekstraksiyon verimine sahip olduğunun ortaya konulması gerekir.

2. Temizleme prosedürü

Temizleme prosedürü farklı metotlarla yapılabilir. Genel bir kural olarak metotta atıfta bulunulan prosedür dışındaki temizleme prosedürleri uygulanabilir. Bunun uygulanabilmesi için, kullanılan prosedürün analiz edilen matriks için metotta belirtilen prosedüre denk bir temizleme verimine sahip olduğu ortaya konulmalıdır.

3. Tespitlerin sayısı

İstenmeyen maddeler yönünden analiz yapılıyorsa kalite prosedürlerine uyulmuş olması koşuluyla, çalışılan ilk örnekte belirlenen analiz sonucunda elde edilen değer, spesifikasyonda belirtilen değer yarisından düşükse ikinci bir çalışmaya gerek yoktur. Diğer durumlarda numunenin iç çapraz kontaminasyonu ya da kazara karışma olasılığını dışarıda bırakmak için çift analiz (ikinci bir tespit) gereklidir. Ölçüm belirsizliği göz önüne alınarak söz konusu iki tespitin ortalaması, uyumun doğrulanması için kullanılır.

Bir maddenin içeriğinin veya beyan edilen değerlerin kontrolünde, kalite prosedürlerine uyulmuş olması koşuluyla, çalışılan ilk örnekte belirlenen analiz sonucu, beyan edilen değeri ve içeriği doğruluyor ve kabul edilebilir tolerans değerleri (aralığı) bulunuyorsa ikinci bir çalışmaya gerek yoktur. Diğer durumlarda numunenin iç çapraz kontaminasyonu ya da kazara karışma olasılığını dışarıda bırakmak için çift analiz (ikinci bir tespit) gereklidir. Ölçüm belirsizliği göz önüne alınarak söz konusu iki tespitin ortalaması, uyumun doğrulanması için kullanılır.

Yemin bileşen değeri, etiketinde belirtilen bileşen değerinden farklı bulunduğu 'Yemlerin Piyasaya Arzı ve Kullanımı Hakkında Yönetmelik' ve 'Hayvan Beslemede Kullanılan Yem Katkı Maddeleri Hakkında Yönetmelik' ile belirlenen tolerans değerleri uygulanır.

4. Kullanılan analiz metodunun raporlaması

Analiz raporunda kullanılan analiz metodu belirtilmelidir.

5. Analiz sonucunun raporlaması

Analiz sonucu, analiz metodunda belirtilen basamak sayısı kadar anlamlı rakamlarla yazılır. Eğer gerekli ise numune analize hazırlanmadan önce belirlenen nem içeriğine göre sonuçta düzeltme yapılır.

6. İstenmeyen maddelerin analizinde ölçüm belirsizliği ve geri kazanım oranı

Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ kapsamındaki istenmeyen maddelerin yemlerde tespiti ve değerlendirilmesi, genişletilmiş ölçüm belirsizliği, geri kazanım ve % 12 nem düzeyi düzeltmesi hesaba katılarak yapılır. İstenmeyen maddelerin analiz sonucu belirlenen maksimum düzeyi aşıyorsa bu yem uygun olmayan yem olarak değerlendirilir. Geri kazanım ve % 12 nem düzeltmesi yapılmış analiz sonucu genişletilmiş ölçüm belirsizliği ile raporlandırılır. Uygunluk değerlendirmesi genişletilmiş ölçüm belirsizliği düşülerek yapılır. Bu prosedür sadece analiz metodunun ölçüm belirsizliği ve geri kazanım düzeltmesi tahminine olanak sağladığı durumlarda geçerlidir. Bu şekildeki değerlendirme mikroskobik analizler için uygun olmadığından yapılmaz. Analiz sonucunun raporlanmasında ölçüm belirsizliği ve geri kazanım oranı aşağıdaki şekilde belirtilir:

a) Geri kazanım için yapılan düzeltmede, geri kazanım seviyesi belirlenir. Geri kazanım için yapılan düzeltme % 90 ile % 110 arasında olduğu durumlarda gerekli değildir.

b) 'x +/- U' eşitliğinde, "x" analiz sonucunu, "U" genişletilmiş ölçüm belirsizliğini ifade eder. Yaklaşık % 95 güven aralığı için, kapsam faktörü 2 kullanılır.

Ancak kalite prosedürlerine uyulmuş olması koşuluyla, belirlenen analiz sonucu elde edilen değer, spesifikasyonda belirtilen değer yarisından düşükse, analiz sonuç raporunda ölçüm belirsizliği ve geri kazanım düzeltmesinin belirtilmesine gerek yoktur.

YEM MADDELERİ VE KARMA YEMLERİN BİLEŞİMİNİN KONTROLÜNE YÖNELİK ANALİZ METOTLARI

A. NEM TAYİNİ

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 içeriği 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. Prensiptir

Numune, yemin yapısına göre değişen, belirlenmiş 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. Nem absorbe etmeyen materyallerden üretilmiş, öğütme esnasında nem kaybına neden olacak kadar ısınmayan temizlenmesi kolay hızlı ve homojen ezme işlemine olanak tanıyan, dışardaki havayla teması olabildiğince önleyen ve 4.1.1. ile 4.1.2.'deki gereklilikleri karşılayan 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 havalandırma sistemi olan ve hızlı sıcaklık düzenlemesi sağlayan elektrik ısıtmalı izotermal etüv. (± 2°C) (*)

3.5. Bir yağ pompası takılmış ve sıcak kurutulmuş havanın girişi 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 kapsamı dışındaki yemler

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

(*) Tahıl ve ürünlerinin kurutulması için etüvün ısı 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. Alabildiği kadar buğday numunesi iki saat boyunca kurutulduğunda, dört saatlik kurutmaya göre sonuçlar arasındaki farkın en fazla % 0,15 olacağı şekilde havalandırma sağlanmalıdır.

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 ekte 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

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 çıkarılır, 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 konur. 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 çıkarılır, desikatör (3.6) içinde 30 – 45 dakika soğumaya bırakılır ve 1 mg hassasiyetle tartılır.

4.2.3. % 4'ten fazla sakkaroz ya da laktöz 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, kapağı açık olarak önceden 80°C - 85°C'ye ısıtılmış vakumlu etüve (3.5) konur. 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 basınçta erişildiğinde vakum pompası çıkarılır. 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 çıkarılır, 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

Parçalamaya 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 (gerekirse, sıkıştırılmış ya da yığılmış yem kabaca bölünebilir). 60°C ile 70°C arasındaki bir etüvde, nem içeriği % 8-% 12'ye azalıncaya 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 yapışma 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 kaptı (ör. 20 x 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 öğütölür 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. Tekrar edilebilirlik

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

6. Gözlem

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

B. HAYVANSAL VE BİTKİSEL YAĞLARDA NEM TAYİNİ

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 genleşme 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 kapta (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.

Not: 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. Tekrar edilebilirlik

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

C. HAM PROTEİN İÇERİĞİNİN TAYİNİ

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. Ayırıcılar

3.1. Potasyum sülfat

3.2. Katalizör: bakır (II) oksit (CuO) ya da bakır (II) sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.3. Granül çinko

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

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

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

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

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

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

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

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

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 (H_3BO_3)

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'sı 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 (HCl) = 0,10 mol/l

Not: Hesaplamalar için düzeltilmiş 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 köptük kaybolana kadar gerekiyorsa ara sıra döndürerek karıştırılır, ardından sıvı sürekli kaynayana kadar daha yoğun şekilde ısıtılır. Kaynayan asit cam balonun çevresinde 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

Damıtık ürünlerdeki amonyağın titrasyonu elle yapılıyorsa aşağıda bahsedilen metot uygulanır. Damıtma ünitesi amonyak içeriğinin titrasyonunu da kapsayacak şekilde tam otomatik ise, cihaz üreticisi firmanın kullanım talimatları uygulanır.

25 ml ila 30 ml borik asit çözeltisi (3.18) içeren bir toplama erleni, iletim borusunun yüksek borik asit çözeltisinin yüzeyi altında olacağı şekilde yoğunlaştırıcının altına yerleştirilir. Damıtma cihazı 50 ml sodyum hidroksit

çözeltilisini (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, yüksek 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 sülfirik 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 dedektör 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 amonyakın 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 metodları izlenerek pH 4 ve pH 7 değerlerinde düzgün olarak kalibre edilmelidir. Titrasyonun pH dönüm noktasına pH 4,6'da erişilir.

5.4. Kör testi

Ayıraçların 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 formülден hesaplanır:

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

Burada;

V_0 = Kör testinde kullanılan NaOH (3.10 ya da 3.11) hacmi (ml)

V_1 = 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. Tekrar edilebilirlik

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 değerin % 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 matris 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, AOÇ'de yayımlanmış metoda göre yapılabilir.

C. ÜRE TAYİNİ

1. Amaç ve kapsam

Bu metot, yemdeki üre seviyesinin tayinini mümkün kılar.

2. Prensiptir

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. Ayraçlar

3.1. 4-dimetilaminobenzaldehid çözeltisi: 1,6 g 4-DMAB'yi 100 ml % 96 etanol içinde çözündürülür ve 10 ml hidroklorik asit (p20 1,19 g/ml) eklenir. Bu ayraç, 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 $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 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, şilifi

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 konur. 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 konur. 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 konur 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.

Üre(%): $c \times f \times 100$

$m \times 1000$

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 bileşikler içeriyorsa, optik yoğunluk 435 nm'de ölçülmelidir.

D. UÇUCU AZOTLU BAZLARIN TAYİNİ

I. MİKRO DİFÜZYON METODUYLA

1. Amaç ve kapsam

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

2. Prensipl

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 jode 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 jeye konur. 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 amonyaka karşılık gelir. Sonuçlar numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

6.1. Tekrar edilebilirlik

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

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

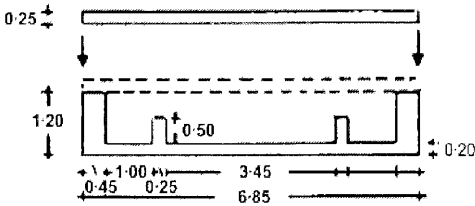
— % 1 ya da daha fazla amonyak içeriği için mutlak değer olarak % 0,1

7. Gözlem

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

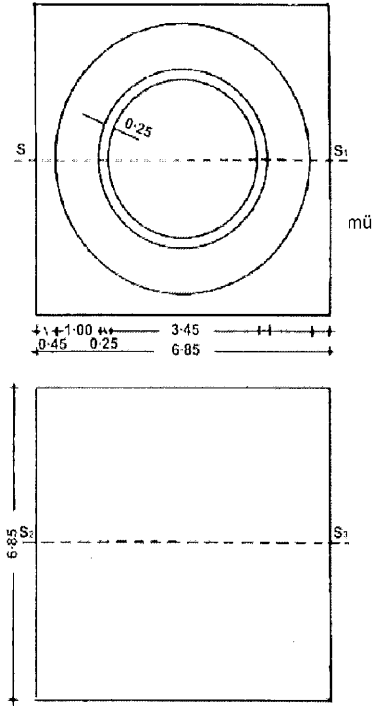
Şekil: Conway Hücresi

Ölçek 1/1



Kapağın S_2S_3 kesiti

Kapağın S_1 kesiti



Şilifli cam kapağın üstten görünümü

II. DAMITMA METODUYLA

1. Amaç ve Kapsam

Bu metod; 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. Ayıracılar

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. Metod

10 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 100 ml su ile 200 ml'lik balon jojeye konur. 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 metod kullanarak kör testi gerçekleştirilir.

6. Sonuçların hesaplanması

1 ml H_2SO_4 0,05 mol/l, 1,7 mg amonyağa karşılık gelir. Sonuçlar yüzde olarak ifade edilir.

6.1. Tekrar edilebilirlik

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

E. AMİNO ASİTLERİN (TRİPTOFAN HARİÇ) TAYİNİ

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, alanın, 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. Triptofan 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 çökeltilir 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 sülfona okside edilmelidir. Tirozin, oksitlenmemiş numunelerin hidrolizatlarında tayin edilmelidir. Amaç ve kapsamda listelenen diğer tüm amino asitler oksitlenmiş ya da oksitlenmemiş numune tayin edilebilir.

Oksidasyon 0°C'de performik asit/fenol karışımı ile gerçekleştirilir. Oksitlenme ayırıcının fazlası sodyum disülfid 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. Ayraçlar

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 disülfid

3.5. Sodyum hidroksit

3.6. 5-Sülfosalisilik 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. Norlöysin 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 P_2O_5 ya da H_2SO_4 üzerinde vakum altında kurutulur.
- 3.16.2. Sisteik asit
- 3.16.3. Metiyonin sülfat.
- 3.17. Sodyum hidroksit çözeltisi, $c = 7,5$ mol/l, (300 g NaOH (3.5) su içinde çözündürülür ve 1 litreye tamamlanır.)
- 3.18. Sodyum hidroksit çözeltisi, $c = 1$ mol/l, (40 g NaOH (3.5) su içinde çözündürülür ve 1 litreye tamamlanır.)
- 3.19. Formik asit— fenol çözeltisi, (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 tiodiglikol içeren) (8,2 ml HCl (3.7) alınır, yaklaşık 900 ml su ile seyreltilir, 20 ml tiodiglikol (3.9) eklenir ve su ile 1 litreye tamamlanır) (3.7 ve 3.9. doğrudan karıştırılmaz).
- 3.22. 5- Sülfosalisilik asit, $\beta = \% 6$, (60 g 5- sülfosalisilik asidi (3.6) su içinde çözündürülür 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 çözeltisi (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.)

Not: 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 tiodiglikol (3.9), 1 g fenol (3.3) ve 16,50 ml HCl'yi (3.7) yaklaşık 800 ml su içinde çözündürülür. 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 ayırıcı, analizör koşullarına göre hazırlanır (4.9)
- 3.27. Amino asitlerin standart çözeltileri. Bu çözeltiler 5°C'de saklanmalıdır.
- 3.27.1. Amino asitlerin stok standart çözeltileri (3.16.1)

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

- 3.27.2. Sisteik asit ve metiyonin sülfatın stok standart çözeltileri, $c = 1,25$ μ mol/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 işaretine 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, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ 0,6560 g norlöysin (3.13) balon jojede 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, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$, sisteik asit ve metiyonin sülfat ve $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ 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 jojeye 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 dedektör.

Kolon, amino asitleri birbirinden ve diğer ninhidrin-pozitif materyallerden ayırabilecek kapasitede sülfonlu polistren reçineleri ile doldurulur. 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 $c = 0,8 \text{ mol/l}$ sodyum konsantrasyonuna sahip olduğu ve oksidasyon basamağından kalan tüm formik asidi içerdiği durumlarda hidroliz metotları kullanılabilir. Hidrolizat yüksek 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 premiklerde 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). Çökeltilinin 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. Çökeltiliyi 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 jojeye 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. Balon/şişe spatula ile birlikte hava geçirmez bir filmle kapatılır, buz-su banyosu içindeki filmle kapatılmış balon/şişe ile birlikte 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 ayracı ayrıştırılır.

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 metoduna 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 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'ın 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'sı 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) işarete kadar tamamlanır.

İç standart henüz kullanılmadıysa, 2 ml iç standart (3.27.3) eklenir ve sitrat tamponuyla (3.24) işarete kadar tamamlanır. İyiçe 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 gram 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

7. Metodun değerlendirilmesi

Metot dört farklı yem (domuz yemi, etlik piliç yemi, protein konsantresi, premix) kullanılarak 1990 yılında uluslar arası düzeyde yapılan döngülü karşılaştırılma içinde test edilmiştir. Aykırı değerlerin elemesinden sonra; sonuçların anlamı ve standart sapma aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Referans materyal	Amino Asit			
	Treonin	Sist(e)in	Metionin	Lisin
Domuz yemi	6,94	3,01	3,27	9,55
	n = 15	n = 17	n = 17	n = 13
Etlik Piliç Yemi	9,31	3,92	5,08	13,93
	n = 16	n = 18	n = 18	n = 16
Protein konsantresi	22,32	5,06	12,01	47,74
	n = 16	n = 17	n = 17	n = 15
Premiks	58,42	—	90,21	98,03
	N = 16		n = 16	n = 16
n= Katılan laboratuvar sayısı				

7.1. Tekrar edilebilirlik

Yukarıda belirtilen döngülü karşılaştırma ile elde edilen laboratuvar içi standart sapma için elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Laboratuvar İçi Standart Sapma (Sr) g/kg olarak

Referans materyal	Amino Asit			
	Treonin	Sist(e)in	Metionin	Lisin
Domuz yemi	0,13	0,10	0,11	0,26
	n = 15	n = 17	n = 17	n = 13
Etlik Piliç Yemi	0,20	0,11	0,16	0,28
	n = 16	n = 18	n = 18	n = 16
Protein konsantresi	0,48	0,13	0,27	0,99
	n = 16	n = 17	n = 17	n = 15
Premiks	1,30	—	2,19	2,06
	N = 16		n = 16	n = 16
n= Katılan laboratuvar sayısı				

Laboratuvar İçi Standart Sapma (Sr) için Varyasyon Katsayısı (%)

Referans materyal	Amino Asit			
	Treonin	Sist(e)in	Metionin	Lisin
Domuz yemi	1,9	3,3	3,4	2,8
	n = 15	n = 17	n = 17	n = 13
Etlik Piliç yemi	2,1	2,8	3,1	2,1
	n = 16	n = 18	n = 18	n = 16
Protein konsantresi	2,7	2,6	2,2	2,4
	n = 16	n = 17	n = 17	n = 15
Premiks	2,2	—	2,4	2,1
	N = 16		n = 16	n = 16
n= Katılan laboratuvar sayısı				

7.2 Tekrar retilebilirlik

Yukarıda belirtilen dgl karşılaştırma ile elde edilen laboratuvarlar arası standart sapma için elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Laboratuvarlar arası Standart Sapma (SR) g/kg

Referans materyal	Amino Asit			
	Treonin	Sist(e)in	Metionin	Lisin
Domuz yemi	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Etlik Piliç yemi	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Protein Konsantresi	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premiks	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16
n= Katılan laboratuvar sayısı				

Laboratuvarlar Arası Standart Sapma (S_R) için Varyasyon Katsayısı (%)

Referans materyal	Amino Asit			
	Treonin	Sist(e)in	Metionin	Lisin
Domuz yemi	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Etlik Piliç Yemi	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Protein konsantresi	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 N = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16
n= Katılan laboratuvar sayısı				

8. Referans materyallerin kullanımı

Metodun doğru uygulanması; erişilebildiği noktalarda onaylı referans materyallerin çoklu ölçümünün yapılmasıyla sınanmalıdır. Kalibrasyonun; onaylı amino asit kalibrasyon çözeltisiyle yapılması önerilir.

9. Gözlemler

9.1. 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.

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

9.3. % 1'den fazla klorit içeren yemlere (konsantre, mineral yemleri, ilave yemler) metodun uygulanmasıyla, metioninin eksik tahmin edilmesi durumunda ve özel uygulama yapılması zorunludur.

F. TRIPTOFAN TAYİNİ

1. Amaç ve kapsam

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

2. Prensiptir

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 yüksek Ba(OH)₂ .8H₂O açığa çıkması 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, $c = 0,5 \text{ mol/l}$,

34 ml orto-fosforik asit (3.6) alınır ve su ile 1 litreye tamamlanır. (3.1)

3.15. Konsantre triptofan çözeltisi (3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$,

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, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$,

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 dedektörlü HPLC ekipmanı

4.2. Sıvı kromatografik kolon, 125 mm x 4 mm, C_{18} , 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, $110 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$, $1,4 (\pm 0,1) \text{ bar}$

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 öğütülmeden önce en fazla 50°C sıcaklıkta hava kurutulmalı etüvde ya da 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 konsantr 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. Soyadum hidroksit (3.10) kullanarak pH 3'e ayarlanır. Nihai hacimde % 10 ila % 30 arasında bir metanol konsantrasyonu elde etmek için yeterli 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 erlene (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 miknatıs karışım içinde bırakılır. Kabın 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 karışıma oda sıcaklığında 30 ml su eklenir. Yavaşça çalkalanır ya da karıştırılır. 2,00 ml konsantr 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 yeterli kadar metanol eklenir. Uygun hacimdeki bir balon jojeye aktarılır ve su ile kromatografi için gereken tanımlanmış hacme (örneğin 100 ml) seyreltilir. Metanolün eklenmesi çökeltiliye 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, C ₁₈ , 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. Tekrar edilebilirlik

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

8. Bir ortak araştırmanın sonuçları

Hidroliz metodunu onaylamak için 12 kadar laboratuvar tarafından üç numuneyin analiz edildiği bir Avrupa Komisyonu ortak çalışması (4. Döngülü karşılaştırma) organize edilmiştir. Her bir numune üzerinde eş (5) analiz gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

	Numune 1 Domuz yemi	Numune 2 L-Triptofan ile takviye edilmiş domuz yemi	Numune 3 Domuzlar için konsantre yem
L	12	12	12
n	50	55	50
Ortalama [g/kg]	2,42	3,40	4,22
sr [g/kg]	0,05	0,50	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = sonuç veren laboratuvar sayısı

n = aykırı değerleri elimine eden tutulmuş tekil sonuçların sayısı (cochran, dixon aykırı sonuç testine göre belirlenmiş)

sr = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

r = Tekrar edilebilirlik

R = Tekrar üretilebilirlik

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı, %

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı, %

Serbest triptofanın özütlenmesini onaylamak için 13 kadar laboratuvar tarafından iki numunenin analiz edildiği başka bir Avrupa Komisyonu ortak çalışması (3. Döngülü karşılaştırma) organize edilmiştir. Her bir numune üzerinde eş (5) analiz gerçekleştirildi. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

	Numune 5 Buğday ve soya karışımı	Numune 6 Triptofan (0,457g/kg1) ilave edilmiş buğday ve soya karışımı
L	12	12
n	59	60
Ortalama [g/kg]	0,391	0,931
sr [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34
S _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11

L = sonuç veren laboratuvar sayısı

n = aykırı değerleri elimine eden tutulmuş tekil sonuçların sayısı (Cochran, Dixon aykırı sonuç testine göre belirlenmiş)

s_r = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

r = Tekrar edilebilirlik

R = Tekrar üretilebilirlik

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı, %

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı, %

Hidroliz için bir triptofan onaylanması amacı ile 7 kadar laboratuvar tarafından dört numunenin analiz edildiği başka bir Avrupa Komisyonu ortak çalışması (3. döngülü karşılaştırma) organize edilmiştir. Her bir numune üzerinde eş (5) analiz gerçekleştirildi. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

	Numune 1 Domuz yemi (CRM 117)	Numune 2 Düşük yağ oranlı balık yemi (CRM 118)	Numune 3 Soya fasulyesi (CRM 119)	Numune 4 Yağsız süt tozu (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Ortalama [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = sonuç veren laboratuvar sayısı

n = aykırı değerleri elimine eden tutulmuş tekil sonuçların sayısı (cochran, dixon aykırı sonuç testine göre belirlenmiş)

s_r = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

r = Tekrar edilebilirlik

R = Tekrar üretilebilirlik

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı, %

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı, %

9. Gözlemler

9.1. Aşağıdaki özel kromatografik koşullar triptofan ile α -metiltryptofan arasında daha iyi bir ayırımı sunabilir.

Gradyan kolonu temizlemesiyle elde edilen izokratik elüsyon:

Sıvı kromatografik kolon:	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , 5 µm dolgu ya da eşdeğeri		
Kolon sıcaklığı:	32°C		
Mobil faz:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /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.		

9.2. Kromatografi, HPLC türüne ve kullanılan kolon dolgu materyaline göre değişecektir. Seçilen sistem, triptofan ile iç standart arasındaki kromatografik ayrımı 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/flüoresans 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 yinelenecektir.

9.3. Baryum hidroksit

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

G. HAM KATI VE SIVI YAĞLARIN BELİRLENMESİ

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 yapısına, 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 — Toplam 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 (Sohxlet 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 gözeneklere sahiptir.

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 ekstraksiyon cihazına 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.⁽⁵⁾ Çözücü damıtılır. Balon ve içinde kalanlar bir buçuk saat boyunca etüvde tutularak kurutulur (4.3). Bir desikatörün içinde soğumaya bırakılır

(5) Katı ve sıvı yağların kalite testine girmesi gerektiği durumlarda, sünger taşı parçaları yerine cam boncuklar kullanılır.

ve tartılır. Ölçülen Katı ve sıvı yağların ağırlığı sabitlenene kadar 30 dakika boyunca tekrar 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 yerleştirilir ve 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 katı ya da sıvı yağ kaybı olmamasına yetecek kadar süzme desteği eklenir (3.4). 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 eter ile ekstrakte edilmesi gerektiğini gösterir.

Kalıntıları içeren iki katlı süzgeç kâğıdın bir saat camı üzerine yerleştirilir ve hava üflemleri 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. Tekrar edilebilirlik

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 biri 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. Bu durum yemdeki katı/sıvı yağın yapısına ve yemin bileşimine bağlıdır.

Ğ. HAM SELÜLOZ TAYİNİ

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 ile 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. Ayırıcılar

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

3.2. Köptik 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, $c = 0,5 \text{ mol/l}$

3.7. Potasyum hidroksit çözeltisi, $c = 0,23 \text{ mol/l}$

4. Cihazlar

4.1. Sülfürik asit ve potasyum hidroksitle parçalama işlemi için, süzme krozesi (4.2) desteği olan ve tapalı sıvı çıkış borusu ve mümkünse hava basınçlı vakumla donatılmış ısıtma ünitesi . 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 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 adımından sonra 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 aseton (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 'dan az ya da 2 mg 'a eşit olmalıdır).

Her yakmadan sonra önce fırın içinde daha sonra desikatörde soğutulur tartılır.

Numune içermeyen kör 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

m_0 = Yaktıktan sonraki ağırlık kaybı, g

m_1 = Numune içermeyen kör testin yaktıktan sonraki ağırlık kaybı, g

7. Tekrar edilebilirlik

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 işleminden başlayarak madde 5'de belirtildiği gibi işleme devam edilir.

8.3 Eğer yem % 5'ten fazla karbonat (kalsiyum karbonat olarak) içeriyorsa, tartılmış numuneyle, kroze (4.2) ısıtma ünitesine (4.1) takılır, numune üç defa 30 ml hidroklorik asitle (3.6) yıkanır. Her bir eklemeden sonra numune süzülmeden önce bir dakika boyunca bekletilir, 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 edilemeyebilir.

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 krozelerinin ömrünü uzatmak için 500°C'den daha yüksek olmamalıdır. Isıtma soğutma döngüleri sırasında yüksek termal şokun engellenmesi için dikkat edilmelidir.

H. ŞEKER TAYİNİ

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. Gerekliği noktada laktöz ayrı olarak ölçülür ve sonuçlar hesaplanırken dikkate alınır.

2. Prensip

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

3. Ayırıcılar

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; Na₂CO₃ 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), CuSO₄ 5H₂O, 100 ml su içinde çözündürülür.

3.8.2. Sitrik asit çözeltisi: 50 g sitrik asit C₆H₈O₇ H₂O 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 çözülürerek 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 artırılabilir.) ve 250 ml'lik balon jojeye konur. 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 alınır ve etanolun çoğunu, elimine etmek için yaklaşık hacmin yarısına kadar buharlaştırılır. Buharlaşma kalıntısı 200 ml'lik balon jojeye ılık su kullanarak 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 iodyür çözeltisi (3.12) eklenir ve hemen arkasından 25 ml sülfürik asit (3.11) eklenir. (çok köpüklenme riskine karşı dikkat edilmelidir), Tiyoşülfat 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 iodyür 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 tiyoşülfat 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) ayırıcıları kullanılarak 5.1'e göre berraklaştırılır, ancak bu sefer her bir ayırıcın dört katı kullanılır. % 80'lik etanol (v/v) ile hacmine tamamlanır .

Homojenize edilir ve süzülür. 5.1'e göre etanol ayrılır. Eğer hiç dekstrinize 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) ayırıcıları 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 şekerlerin doğru bir şekilde hesaplanması için aynı numune iki son tespit için kullanılmaz. 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 Na₂ S₂ O₃ 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	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 TAYİNİ

1. Amaç ve kapsam

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

2. Prensip

Şekerler su içinde çözülür. Çözelti; laktozu parçalanmadan koruyan *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile fermentasyona 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 glisiyal 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 ayırıcın ($Cu \cdot 0,05 \text{ mol/litre}$; $Na_2CO_3 \cdot 1 \text{ mol/litre}$) 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 çözdürülür, 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 süzöntüden 40 ila 80 mg laktoz içerebilecek ve süzöntüden 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 kör test gerçekleştirilir. Laktoz içeriğini Luff-Schoorl'a göre şu şekilde belirlenir: tam olarak 25 ml Luff-Schoorl ayracı (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. 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. Bir geri soğutucu Erlen 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 ayracı (3.9) eklenir ve titrasyon tamamlanır.

Kör deneme: Aynı titrasyon tam olarak ölçülen 25 ml Luff-Schoorl ayracı (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 ayrıracı için değerler tablosu

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litre, 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. NİŞASTA TAYİNİ

POLARİMETRİK METOT

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; beyan edilen enerji değerlerine (EK-7 içindeki hükümler) uygunluğunu kontrol etmek için, yemlerde nişasta ve yüksek molekül ağırlıklı nişasta parçalanma ürünlerinin seviyelerini belirlemede kullanılır.

2. Prensip

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. Ayırıcılar

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

1 mg 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 çözeltileri 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:

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

Nişasta içeriği

P = Derece cinsinden toplam optik sapma

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

$$[\alpha]_D^{20^\circ} =$$

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

Nişasta içeriği

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

S = Sakarimetre derecelerinde toplam optik sapma

S' = % 40 etanol (v/v) içinde çözülebilir maddelerin sakarimetre derecelerinde toplam optik sapması

N = 200 mm tp 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.

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

6.3. Tekrar edilebilirlik

Aynı numune üzerinden elde edilen iki paralel ölçümün sonuçları arasındaki fark nişasta içeriği % 40'tan az olanlar için mutlak değer olarak 0,4' 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 pulpu, melası, şırası, şekeri gibi şeker pancarı rnleri — Pancar şırası, (pancar) şekeri gibi (şeker) pancar rnleri

— Turunçgil posası,

— Keten tohumu; keten tohumu ekspeller kşpesi; keten tohumu ekstraksiyon kşpesi,

— Kolza tohumu; kolza tohumu ekspeller kşpesi; kolza tohumu ekstraksiyon kşpesi; kolza tohumu kabukları,

— Ayeği tohumu; ayeği tohumu ekspeller kşpesi; kısmen kabuğu soyulmuş ayeği tohumu ekstraksiyon kşpesi,

— Kopra (Hindistan Cevizi içi) ekspeller kşpesi; kopra (Hindistan Cevizi içi) ekstraksiyon kşpesi,

— Patates posası,

— Kurutulmuş maya,

— İnulün açısından zengin ürünler (yerelması talaşı ve unu gibi),

— Don yağı tortusu.

J. HAM KÜL TAYİNİ

1. Amaç ve Kapsam

Bu metot; yemdeki ham kül içeriğinin tayinini mümkün kılar.

2. Prensip

Numune 550°C’de yakılarak kül haline getirilir; kalıntı tartılır.

3. Ayırıcılar

Amonyum nitrat, % 20 (w/v) çözelti

4. Cihaz

4.1. Isıtıcı plaka

4.2. Elektrikli, termostatlı kül fırını

4.3. Yakma 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 kül krozesine tartılır. Kroze sıcak plakaya konur ve madde karbonize olana kadar dereceli olarak ısıtılır 5.1 ya da 5.2’ye göre yakılır.

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. Kül haline gelmesi zor maddeler en az üç saat boyunca bir ilk yakma 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.) Etüvde kuruttuktan sonra yakma işlemine devam edilir. Küllenme tamamlanana kadar işlem gereken sayıda yinelenir.

7.2. 7.1. maddesinde anlatılan işleme dirençli maddeler olması halinde aşağıdaki işlemler yapılır: Üç saat yakıldıktan sonra, kül sıcak suya konur ve külsüz süzgeç kağıdından süzülür. Filtre ve orijinal krozedeki içerik küllenir. Süzüntü soğutulmuş darası alınmış bir kroze konur, kuruyana kadar buharlaştırılır, küllendirilir ve tartılır.

7.3 Katı ve sıvı yağlarda çalışılıyorsa 25 g numune uygun boyutlu bir krozeye tartılır. Külsüz süzgeç kağıdı şeridi ile kömürleştirilir. Yanma sonrasında, olabildiğince az su ile nemlendirilir. Kurutulur ve madde 5'te anlatılan şekilde küllenir.

K. HİDROKLORİK ASİTTE ÇÖZÜNMEYEN KÜL TAYİNİ

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. Prensipte

2.1. Metot A: Numune kül haline getirilir, kül hidroklorik asit içinde kaynatılır ve çözünmeyen kalıntı filtrelenecek, 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. Ayırıcılar

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 krozeler

5. Metot

5.1. Metot A:

Numune ham kül tayini için anlatılan metot kullanarak kül haline getirilir. 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 kağıdıyla 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. KARBONATLARIN TAYİNİ

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. Prensip

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

3. Ayırıcılar

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, içinde 10 ml hidroklorik asit (3.1) içeren kırılmaz bir tüp bulunan özel balona (4) konur ve balon joje cihaza bağlanır. Üç yönlü musluk (5), tüpü (1) dışarıya bağlayacak şekilde çevirilir. Renklendirilmiş sülfürik asit doldurulmuş (3.3) ve derecelendirilmiş tüpe (1) bağlanmış hareketli tüp (2) kullanılarak sıvı seviyesi, sıfır işaretine kadar getirilir. Musluk (5), (1) ve (3) tüpleri bağlayacak şekilde çevirilir ve seviyenin sıfırda olduğu kontrol edilir.

Balon joje (4) eğilerek hidroklorik asit (3.1) yavaşça numuneye akıtılır. Tüp (2) alçaltıtlark 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

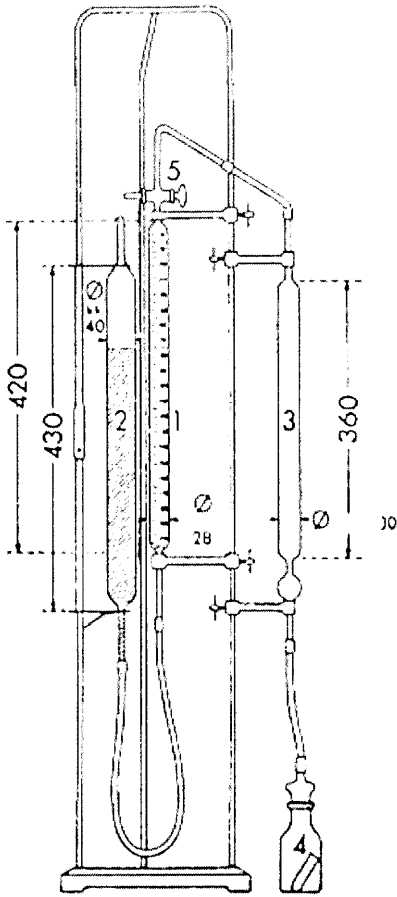
m = Numunenin gram cinsinden ağırlığı

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.



(ölçüler mm cinsinden verilmiştir)

M. TOPLAM FOSFOR TAYİNİ

FOTOMETRİK 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 yemse) ya da asitle parçalamaya (mineral bileşikler ve sıvı yemde) yoluyla mineralleştirilir ve bir asit çözeltisinin içinde konur. Çözelti, molibdovanadat reaktifi ile işleme tabi tutulur. Bu şekilde oluşan sarı çözeltinin optik yoğunluğu 430 nm’de spektrofotometre ile ölçülür.

3. Ayırıcılar

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 jode 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 ıslatmak 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 jöjeye boşaltılır, beher birkaç kez sıcak su ile durulanır. Soğumaya bırakılır, su ile gereken hacme tamamlanır, homojenleştirilir ve filtrelenir.

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 µg/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 µg/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 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda eğri doğrusal olacaktır.

6. Sonuçların hesaplanması

Kalibrasyon eğrisi kullanılarak test numunesindeki fosfor miktarı tayin edilir. Sonuçları numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

6.1.Tekrar edilebilirlik

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 ÇÖZÜNEBİLEN KLORÜR İÇERİĞİNİN TAYİNİ

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. Gerekliyse santrifüjlenir, 100 ml süpernatant sıvı alınır ve 200 ml'lik bir balon jojeye aktarılır. Aseton (3.6) ile karıştırılır ve bu çözücü 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 süzüntü (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 çekelti

oluşturmak için sertçe çalkalanır. Gümüş nitratin fazlası amonyum tiyosiyanat çözeltisi (3.1) ile kırmızımsı kahverengi ton oluşup bir dakika boyunca kaybolmadan devam edene 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:

V_1 = Eklenen 0,1 mol/l gümüş nitrat çözeltisinin miktarı, ml

V_2 = Titrasyon için kullanılan 0,1 mol/l amonyum tiyosiyanat çözeltisinin miktarı, ml

m = Numunenin ağırlığı.

Kr testi için 0,1 mol/l gümüş nitrat çözeltisi tketiliyorsa, 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.

YEMLERDE KULLANIMINA İZİN VERİLEN YEM KATKI MADDELERİNİN DÜZEYLERİNİN KONTROLÜNE YÖNELİK ANALİZ METOTLARI

A. VİTAMİN A TAYİNİ

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. Prensip

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 ayırım olmayacak şekilde seçilir.

3. Ayırıcılar

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. Fenolfalein 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 $2,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$)

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. $1,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$

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 ayırımı 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 dedektörü, değişken dalga boyu ayarlı

4.6. 10 mm kuvars hücreli spektrofotometre

4.7. Manyetik karıştırıcılı 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 tüptün, silindirdeki üst sıvı katmanının ayırıcı bir huniye aktarılabilceği şekilde U şekilli bir alt ucu ve karşı ucta 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 yüksek 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 içeriğine bağlı olarak 2 g - 25 g numune 1 mg hassasiyetle 500 ml'lik bir düztabanlı ya da konik cam balona (4.2.1) konur. 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 bir 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) süzerek 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

Fazlar ayrıldığında (bakınız 7.3) petrol eteri fazı 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 yenilenir.

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. Yıkanmış ekstrakt, süspansiyon halindeki suyu çıkartmak amacıyla faz ayırımı (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

Fazlar ayrıldığında (bakınız 7.3) cam silindirin tıpası (4.8.1) şilifli cam ek (4.8.2) ile değiştirilir ve ayarlanabilir tüpün U şeklini 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. Fazların 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) yenilenir ve petrol eteri fazları 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 dedektörü (325 nm) ya da bir floresans dedektörü 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, C ₁₈ , 5 ya da 10 µm dolgu ya da eşdeğeri
Mobil faz (3.9)	Metanol (3.3) ve su karışımı, örn. 980 + 20 (v+v).
Akış hızı	1-2 ml/dak.
Dedektör (4.5.2)	UV dedektörü (325 nm) ya da floresans dedektörü (eksitasyon: 325 nm/emisyon: 475 nm).

5.6. Kalibrasyon

5.6.1. Çalışma standard 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 düztabanlı 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 çözüldürülür. 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 işaretine 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 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

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

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 işaretine 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 jojeje 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:

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

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 seyreltilmemiş vitamin A çalışma standard 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

V_1 = Numune çözeltisinin (5.4) hacmi, ml

V_2 = 5.4'te alınan temsili miktarının hacmi, ml

m = Test numunesinin 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. Bir normal 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 askorvik 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): Numunedeki 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 numunesinde bir geri kazanım testi uygulanmalıdır. Geri kazanım oranı % 80'den düşüğe analitik sonucun geri kazanım için düzeltilmesi gerekir.

8. Tekrar edilebilirlik

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

s_r = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

r = Tekrar edilebilirlik

R = Tekrar üretilebilirlik

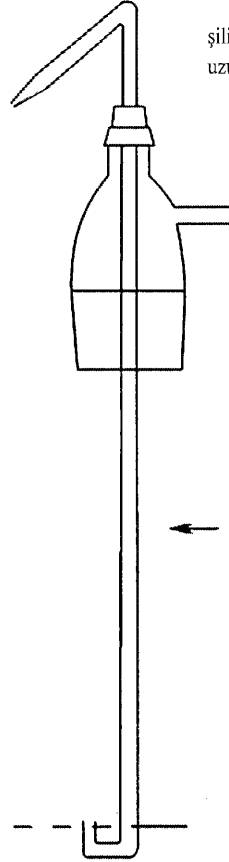
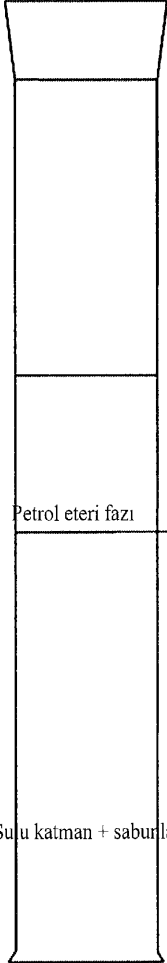
CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı.

Ektraksiyon Cihazları

şilifli cam ek (4.8.2) (yaklaşık
uzunluk 45 cm)

Cam silindir (4.8.1) (yaklaşık yükseklik 48 cm)



B. VİTAMİN E TAYİNİ

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 dedektörüyle geçerlidir. Bir UV dedektöründe 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 dedektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

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, $\beta = 120$ g/l (x = 9 için) (bakınız 7.8)

3.7. Fenolftalein 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).

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 jojeler.

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

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

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 × 4 mm, C₁₈, 5 ya da 10 µm dolgu ya da eşdeğeri.

4.5.2. UV ya da flüoresans dedektörü, 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 aktarılabilceği şekilde U şekilli bir alt ucu ve karşı ucta 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 yüksek 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 E kaybı olabilir.

5.2. Sabunlaştırma

Vitamin E içeriğine 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) tartılır. 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 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 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) süzülerek 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

Fazlar ayrıldığında (bakınız 7.3) petrol eteri Fazı 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 ekstraktlara, 100 ml'lik su ekleyip hafifçe karıştırarak (emülsiyon oluşumunu önlemek için) ve ardından fenolfalein 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 jojeye (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

Fazlar ayrıldığında (bakınız 7.3) cam silindirin tıpası (4.8.1) silifli 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 işlemini 100 ml petrol eteri ile (3.2), ardından iki kez 50 ml'lik petrol eteri ile (3.2) yinelenir ve hafif petrol eteri fazı 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 joje 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 dedektörü (eksitasyon: 295 nm, emisyon: 330 nm) ya da UV dedektörü (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 v+v).
Akış hızı:	1-2 ml/dak.
Dedektör (4.5.2)	Floresans dedektörü (eksitasyon: 295 nm/emisyon: 330 nm) ya da UV dedektörü (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 standard 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 standard 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:

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

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 standard 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 jöjeye 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 grafiğı 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:

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

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 yüksekliğı (alan), aynı çözeltinin konsantrasyonu µg/ml (α-tokoferol asetat olarak hesaplanan)cinsinden tayin edilir.

Numunenin mg/kg cinsinden vitamin E içeriğı "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), µg/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'dan 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. Bir normal 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 sülfid 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. Tekrar edilebilirlik

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
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1.075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr [%]	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
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = Laboratuvarların sayısı

N = Tekil değerlerin sayısı

s_r = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

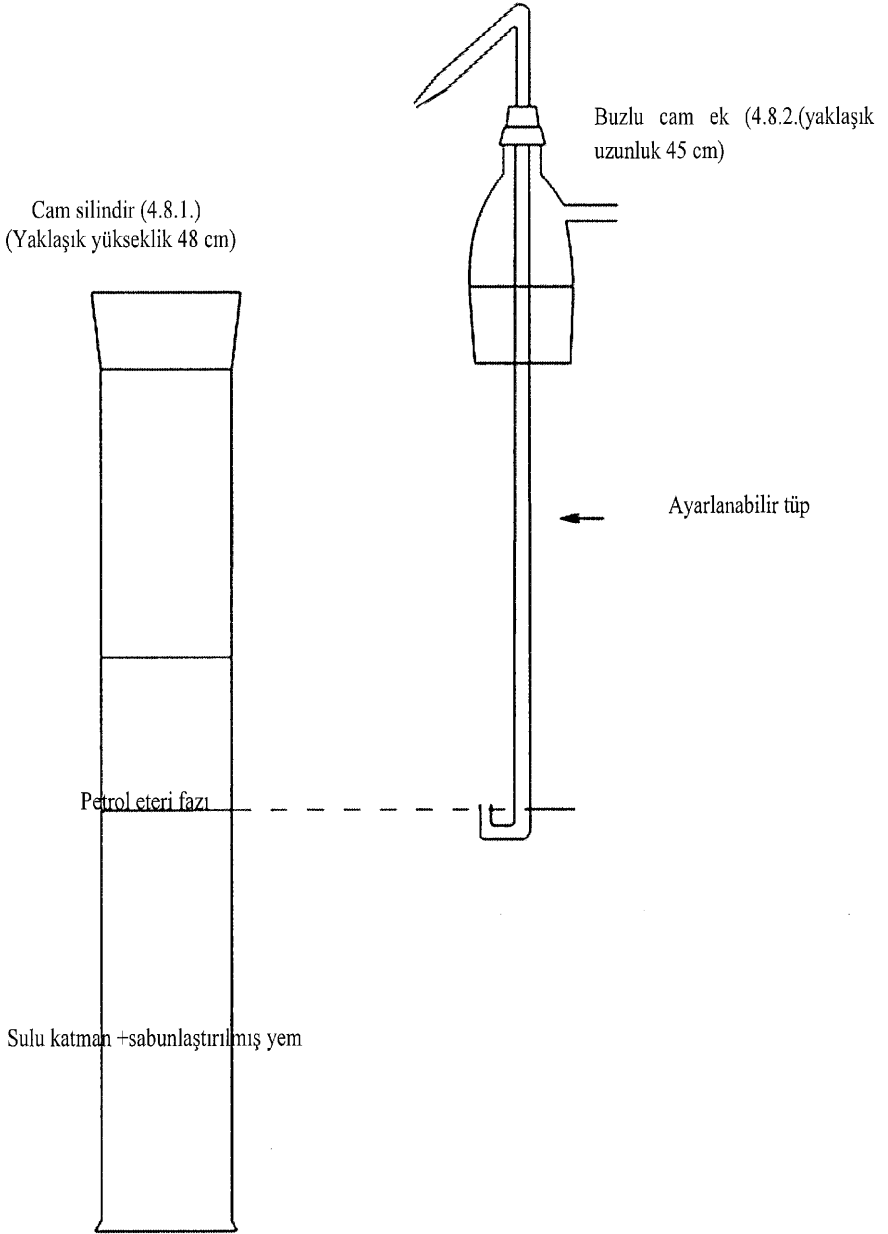
r = Tekrar edilebilirlik

R = Tekrar üretilebilirlik

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı

Şekil 1: Ekstraksiyon cihazı (4.8)



C. DEMİR, BAKIR, MANGAN VE ÇİNKO İZ ELEMENTLERİNİN TAYİNİ

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. Prensip

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

3. Malzemeler ve Çözeltiler

Tanıttıcı yorumlar

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

Analizde kullanılan kimyasallar en azından analitik saflıkta olmalıdır. Tayin edilecek elementlerin var olmadığı, bir kör deneyle kontrol edilmelidir. Gerekliyorsa, ayırıcılar daha da saflaştırılmalıdır.

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

Aşağıda açıklanan kimyasallar ve elementlere ait standart çözeltiler

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 ⁽⁶⁾

5.1. Organik madde içeren numuneler

5.1.1. Yakma ve analiz için çözeltinin hazırlanması ⁽⁷⁾

5.1.1.1. 5 ila 10 g numune 0,2 mg hassasiyetle tartılarak kuvars ya da platin krozeye (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

⁽⁶⁾ Aynı sonuçları veremeleri kaydıyla diğer parçalama metotları (mikrodalga basınçlı parçalama) de kullanılabilir.

⁽⁷⁾ Yeşil kaba yem (taze ya da kuru), eser elementleri tutabilecek çok miktarda bitkisel silis içermeye eğilimindedir ve ortamdaki 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 hidroklorik asit (3.4) eklenir ve yaklaşık 150°C'de kuruyana kadar buharlaştırılır. Kalıntıda herhangi bir silis içeriği kalırsa, birkaç ml hidroklorik 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 jöjeye filtrelenir ve su ile işaretine kadar tamamlanır (HCl konsantrasyonu yaklaşık 0,5 mol/l). Tayin işlemine madde 5.1.2'den devam edilir.

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 (CO_2 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 konur 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.

(ç) Piyometre 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.

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

$\mu\text{g Fe/ml}$	0	0,5	1	2	3	4	5
Çalışma standardı çözeltisi (3.7.1) (1 ml = 100 $\mu\text{g Fe}$), 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

$\mu\text{g Cu/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Çalışma standardı çözeltisi (3.8.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Cu}$), ml	0	1	2	4	6	8	10
HCl (3.2), ml	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

$\mu\text{g Mn/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Çalışma standardı çözeltisi (3.9.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Mn}$), 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

$\mu\text{g Zn/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
Çalışma standardı çözeltisi (3.10.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Zn}$), 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 işaretine 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 çözeltisi '0', kör olarak kullanılmamalıdır.

5.1.2.4. Atomik absorpsiyon ölçümü

Kalibrasyon çözeltilerinin 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. Tekrar Edilebilirlik

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 TAYİNİ

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 dedektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

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 jojeye 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 jojeye 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 (p20 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 asit (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 kaptaki 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 dedektörlü (UV Dedektör) ya da Diode Array dedektörlü

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 soydum 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 katmanı 250 ml'lik ayırma hunisine aktılır. 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 yüntünden 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 beklenilir. Kesinlikle kolonun kurumasına 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 jeye 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 pik 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 numunesinin gram cinsinden ağırlığı.

7. Sonuçların Validasyonu

7.1. Tanımlama

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 dedektörü 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 $\pm$ % 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 $\pm$ 2 nm'dir;

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

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrar edilebilirlik

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

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı (%)

Rec. = Geri kazanım (%)

D. ROBENİDİN TAYİNİ

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. Prensiptir

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 dedektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

3.1. Metanol.

3.2. Asitleştirilmiş metanol.

4,0 ml hidroklorik asidi ($p_{20} = 1,18$ g/ml) 500 ml'lik balon jøjeye 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 süzgeç.

Tip 3A, 8 ila 12 gözlü boncuk (1,6-2,5 mm'lik boncuk, 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 kapta saklanır.

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

3,40 g potasyum dihidrojen fosfatı 1000 ml'lik balon jøjede suda (HPLC kullanım saflığında) çözündürülür, işarete kadar tamamlanır 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 jøjede su (HPLC kullanım saflığında) içinde çözündürülür, işarete kadar tamamlanır 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 jode çözündürülür, aynı çözeltiyle işarete kadar tamamlanır 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 tamamlanır 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 tamamlanır 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 dedektörlü (ultravioleto dedektör) ya da 250 – 400 nm aralığında çalışan Diode Array dedektörlü.

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 fibreglas süzgeç kağıdından (4.5) süzülür ve süzüntünün tümü 150 ml'lik konik cam balona alınır. 7,5 g moleküler süzgeç (3.4) eklenir, kapatılır ve beş dakika çalkalanılır. Hemen fibreglas 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 teması en az düzeyde olmasına dikkat edilmelidir. Yüklene 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 beklenir. 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,

Dedektör dalga boyu: 317 nm,

Enjeksiyon hacmi: 20 ila 50 µl.

3,6 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisini (3.9.3), tutarlı pik yükseklikleri ve alınma 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. Her bir konsantrasyonun pik yükseklikleri (alanları) ölçülür. Kalibrasyon çözeltilerinin apsisteki µg/ml cinsinden konsantrasyonlarına ordinatlarda denk gelen ortalama pik yükseklikleri ya da alanları kullanılarak 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:

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

Burada;

c = Numune çözeltisinin µg/ml cinsinden robenidin konsantrasyonu,

m = Test numunesinin gram cinsinden ağırlığı.

7. Sonuçların Validasyonu

7.1. Tanımlama

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 çözülme 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 absorbands aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, apeks spektrumunun absorbandsının % 15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrar edilebilirlik

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 Ögütülmüş 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 = Tekrar edilebilirliğin standart sapması,

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı, %

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması,

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı. %

E. DİKLAZURİL TAYİNİ

(+)-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. Prensip

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. Ayraçlar

3.1. Su, HPLC kullanım saflığında

3.2. Amonyum asetat.

3.3. Tetrabutilamonyum 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, ρ₂₀ = 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 i 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 i standart maddesi 0,1 mg hassasiyetle 100 ml'lik balon jojeye tartılır, DMF (3.6) içinde, ultrasonik banyoda (4.6) özündürülür, 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 özeltisi, 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 özelti 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 özücüsü: asitleştirilmiş metanol.

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

3.13.2. Elüent B: asetonitril (3.4).

3.13.3. Elüent C: metanol (3.5).

4. Cihaz

4.1. Mekanik alkalayıcı

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. K r yem

Diklazuril ya da etkileşime giren maddelerin olmadığını kontrol etmek için bir k r yem analiz edilmelidir. K r 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 k r yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 1 mg/kg düzeyine ulaştırmak için 0,1 ml stok standart c zeltisi (3.8.1) 50 g'lık k r yeme eklenilir, iyice karıştırılır ve 10 dakika dinlendirilir. (5.2) maddesine geçmeden önce birkaç kez yeniden karıştırılır.

Alternatif olarak, numune ile benzer türde bir k r 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 zenginle tirilir. Bu numune zenginle tirilmemi  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 c zeltisi (3.2), 200 ml ekstraksiyon c z c s  (3.12) eklenilir ve balon joje kapatılır. Karışım çalkalayıcıda (4.1) gece boyunca çalkalanır.   kmesi için 10 dakika dinlendirilir. 20 ml temsili miktarda süpernatant uygun bir cam kaba aktarılır ve 20 ml su ile seyreltilir. Bu c zelti bir ekstraksiyon kartu una (3.11) aktarılır ve vakum (4.5) uygulayarak geçirilir. Kartu  25 ml ekstraksiyon c z c  karışımı (3.12) ve suyla [65 + 35 (V + V)] yıkanır. Toplanan fraksiyonlar atılır ve bileşikler 25 ml ekstraksiyon c z c  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 c z nd r l r, 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 c zeltisi (3.9.2), 200 ml ekstraksiyon c z c s  (3.12) eklenir ve erlenin a  ı kapatılır. Karışım çalkalayıcıda (4.1) gece boyunca çalkalanır.   kmesi 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 10,0 ml DMF (3.6) içinde yeniden c z nd r l r, 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; e de er sonuçlar vermeleri kaydıyla diğer koşullar da kullanılabilir.

Sıvı kromatografik kolon (4.2.1):	100 mm x 4,6 mm, Hipersil ODS, 3 �m dolgu ya da e�de�eri	
Mobil faz:	El�ient A (3.13.1):	Sulu amonyum asetat ve tetrabutil-amonyum hidrojen s�lfat c�zeltisi.
	El�ient 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
Dedektör 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)

$c_{d,c}$ = Kalibrasyon çözeltisindeki diklazuril konsantrasyonu (3.10), µg/ml

m = Test numunesinin 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)

$c_{d,c}$ = Kalibrasyon çözeltisindeki diklazuril konsantrasyonu (3.10), µg/ml

m = Test numunesinin 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. Tanımlama

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 çözöleme gücüyle tayin edilen bir marj aralığında aynı olmalıdır. Diode Array metodu için bu tipik olarak $\pm$ 2 nm'dir.

(b) 230 - 320 nm arasında, kromatogramın pik apeksinde kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun % 10 ila % 100 bağıl absorbens aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbensinin % 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 absorbens 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. Tekrar edilebilirlik

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

- 0,5 mg/kg ile 2,5 mg/kg diklazuril içeriği için daha yüksek değere bağlı % 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 bağlı % 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 premiksdan 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 kanatlı karma 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 = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı

9. Gözlemler

Diklazuril yanıtının ölçülen konsantrasyon dizisinde doğrusal olduğu önceden gösterilmiş olmalıdır.

F. LASALOSİD SODYUM TAYİNİ

Streptomyces lasaliensis ile üretilen bir poliyter 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 dedektör kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayrıçalar

3.1. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)

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 KH_2PO_4 (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, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (*Streptomyces lasaliensis* ile üretilen bir poliyter 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 konur, 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 C ₁₈ , 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. Tanımlama

Spektroflorometriye 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 yansı boyutundaki pik genişliği, zenginleştirilmemiş numune ekstraktı ile üretilen orijinal pik genişliğinin ± % 10 aralığında olmalıdır.

7.2. Tekrar edilebilirlik

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 premiksi	Numune 2 Hindi premiksi	Numune 3 Hindi yemi, Pelet formunda	Numune 4 Tavuk yemi ince-toz 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 = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı, %

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı, %

YEMLERDE İSTENMEYEN MADDELERİNİN KONTROLÜNE YÖNELİK ANALİZ METOTLARI

A. SERBEST VE TOPLAM GOSİPOL TAYİNİ

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. Prensiptir

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. Ayırıcılar

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 jojeye 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 konur. Propan-2-ol- hekzan karışımı (3.1) ile hacmine tamamlanır. Bu ayırıcı bir hafta stabildir.

3.3. Çözücü B: 2 ml 3-aminopropan-1-ol ile 10 ml glasiyal asetik asit 100 ml'lik balon jojeye pipetlenir. Oda sıcaklığına soğutulur ve N, N-dimetilformamid ile gereken hacme tamamlanır. Bu ayırıcı bir hafta stabildir.

3.4. Anilin: Kır 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 ayırıcı birkaç ay saklanacak.

3.5. Standart gosipol çözeltisi A: 27,9 mg gosipol asetat 250 ml'lik balon jojeye konur. Çözündürülür ve çözücü A (3.2) ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltinin 50 ml'si 250 ml'lik balon jojeye 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 jojeye konur, 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 bağlı 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 konur. Bir pipet kullanılarak 50 ml çözücü A (3.2) eklenir, balon joje 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 jojelerin (A ve B) her birine pipetlenir. Gerekirse hacmi çözücü A (3.2) ile 10 ml'ye tamamlanır. Ardından şişedeki (A) içeriği propan-2-ol-hekzan karşımı (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 jojelerden (C ve D) her birine pipetlenir. Şişedeki (C) içeriği propan-2-ol-hekzan karşımı (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 karşımı (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 jojeye konur ve 10 ml çözücü B (3.3) eklenir. Aynı zamanda, 10 ml çözücü B (3.3) başka bir 50 ml'lik balon jojeye koyularak bir kör test hazırlanır. İki balon joje 30 dakika kaynar su banyosunda ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulur ve her bir şişedeki içerik propan-2-ol-hekzan karşımı (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 karşımı (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 karşımı (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 olarak hesaplanabilir.

6.1. Spesifik optik yoğunluk ile

Belirtilen koşullar altındaki spesifik optik yoğunluklar aşağıdaki gibidir:

Serbest gosipol: $E_{1cm}^{1\%}=625$

Toplam gosipol: $E_{1c}^{1\%}=600$

Numunenin serbest ya da toplam gosipol içeriği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$\% \text{ gosipol : } \frac{E \times 1250}{E_{1cm}^{1\%} \times p \times a}$$

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 jocularin 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 joculari 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) konur. Her balon joculardeki 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 jocularin iki serisinden her birine konur. İlk serideki balon jocularin 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. Tekrar edilebilirlik

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. DİOKSİN (PCDD/PCDF) VE DİOKSİN BENZERİ PCB SEVİYELERİNİN TAYINI

BÖLÜM 1

Numune alma metotları ve analiz sonuçlarının yorumlanması

1. Amaç ve Kapsam

Poliklorlu dibenzo-p-dioksinler (PCDD'ler), poliklorlu dibenzofuranlar (PCDF'ler), dioksin benzeri poliklorlu bifeniller (PCB'ler) ⁽⁸⁾ ve dioksin benzeri olmayan PCB'lerin yemdeki düzeylerine ilişkin resmi kontroller amacıyla alınacak numuneler Yönetmeliğin EK-1'indeki hükümleriyle uyumlu olarak alınmalıdır. Yemde homojen olarak dağılmış madde veya ürünlerin kontrolüyle ilişkili nicel gereklilikler EK -1'in 3.1 inci maddesinde belirtildiği gibi uygulanacaktır. Bu şekilde alınan paçal numunelerin alındıkları parti veya alt partiyi temsil ettikleri kabul edilmektedir. Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ'deki maksimum düzeylerle laboratuvar numunelerinde belirlenen düzeyler temelinde uyum sağlanacaktır.

⁽⁸⁾Dioksinler, furanlar ve dioksin benzeri PCB'ler için TEF (toksik ekivalans faktörleri) tablosu

Dünya Sağlık Örgütü tarafından Haziran 2005'te, Cenevre'de düzenlenen 'Kimyasal Güvenilirlik Uluslararası Programı (IPCS)'nda (Martin Van den Berg ve ark., 'Dioksin ve Dioksin Benzeri Bileşiklerin İnsanlar ve Memeliler İçin Toksik Eşdeğerlik Faktörlerinin 2005 Dünya Sağlık Örgütü Yeniden Değerlendirmesi') kabul edilen, dioksin ve dioksin benzeri bileşiklerin insanlar için tehlike değerlerini gösteren Toksik Eşdeğerlik Faktörleri (WHO-TEF, 2005) [Toxicological Sciences 93(2), 223-241 (2006)]

Türdeş bileşen	TEF değeri	Türdeş bileşen	TEF değeri
Dibenzo-p-dioksinler ('PCDD'ler)		Dioksin benzeri PCB'ler: Non-orto PCB'ler ve Mono-orto PCB'ler	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-orto PCB'ler	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
Dibenzofuranlar ('PCDF'ler)		Mono-orto PCB'ler	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		
Kısaltmalar: T; Tetra/Dört, Pe; Penta/Beş, Hx;Hekza/Altı, Hp;Hepta/Yedi, O;Octa/Sekiz, CDD; Klorodibenzodioksin, CDF; Klorodibenzofuran, CB; Klorobifenil			

Bölüm B'deki amaçlara yönelik olarak "Analiz Metotlarının Uygulanması ve Sonuçların Yorumlanmasına İlişkin 96/23/EC sayılı Konsey Direktifi'ni uygulayan 12 Ağustos 2002 tarihli ve 2002/657/EC (*) sayılı Komisyon Kararı" Ek I'inde belirtilen tanımlar geçerli olacaktır.

"Tarama metodları" maksimum düzeyleri veya müdahale eşiklerini geçen PCDD/F ve dioksin benzeri PCB düzeylerine sahip numunelerin seçimi için kullanılan metodlardır. Bunlar maliyet açısından etkin ve yüksek bir numune analiz hacmine olanak sağlar ve yüksek maruziyet ve tüketiciler açısından sağlık riski teşkil eden yeni olayların tespit olasılığını artırır. Tarama metodları biyoanalitik veya GC-MS metodlarına dayanacaktır. Maksimum düzeyle uyumun kontrolü için eşik değerini aşan numunelere ait sonuçlar, orijinal numunede doğrulayıcı bir metotla yapılacak tam kapsamlı yeni bir analizle doğrulanacaktır.

"Doğrulamaya metodları" PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin maksimum düzeyde veya ihtiyaç duyulduğu takdirde müdahale eşiğinde kesin biçimde belirlenmesi ve miktarının ölçülmesine olanak sağlayan tam veya tamamlayıcı bilgileri sağlayan metodlardır. Söz konusu metodlar gaz kromatografi/yüksek çözünürlüklü kütle spektrometreden (GC-HRMS) veya gaz kromatografi/tandem kütle spektrometreden (GC-MS/MS) faydalanır.

2. Parti veya alt partinin maksimum düzeyle uyumu

2.1. Dioksin benzeri olmayan PCB'ler için

Analiz sonucunun Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'nde dioksin benzeri olmayan PCB'lerin maksimum düzeyi aşmaması durumunda, söz konusu parti ölçüm belirsizliği göz önüne alınarak maksimum düzeyle uyumlu kabul edilir.

Üst sınır⁽¹⁰⁾ analiz sonucunun tekrarlı analizle⁽¹¹⁾ doğrulandığında Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'ndeki maksimum düzeyi aşması durumunda, söz konusu parti ölçüm belirsizliği göz önüne alınarak maksimum düzeyle uyumsuz kabul edilir. İki tespitin ortalaması, ölçüm belirsizliği göz önüne alınarak uyumun doğrulanması amacıyla kullanılır.

Ölçüm belirsizliği aşağıdaki yaklaşımların birisine göre dikkate alınacaktır:

- Yaklaşık % 95 güven aralığı veren kapsam faktörünün 2 (k=2) olarak alınmasıyla genişletilmiş belirsizlik hesaplanır. "Ölçülen değer eksi U" maksimum düzeyin üzerindeyse bir parti veya alt parti uyumsuz olarak kabul edilir.
- 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.

2.2. PCDD/F ve dioksin benzeri PCB'ler için

Parti aşağıdaki koşullarda maksimum düzeylerle uyumlu kabul edilir:

- Yanlış uyumluluk oranı % 5'in altında olan bir tarama metoduyla gerçekleştirilen tek bir analizin sonucuna göre söz konusu düzeyin Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'ndeki maksimum PCDD/PCDF düzeyi ve PCDD/PCDF'ler ile dioksin benzeri PCB'lerin toplamını geçmemesi.

(*) Analitik metodların yürütülmesi ve sonuçların yorumlanmasına ilişkin 96/23/EC sayılı Konsey Direktifi'ni uygulayan 14 Ağustos 2002 tarihli ve 2002/657/EC sayılı Komisyon Kararı

(¹⁰) "üst sınır" kavramı miktarı belirlenmemiş her türdeşin katkısı için miktar tayin limitinin kullanılmasını gerektirir. "alt sınır" miktarı belirlenmemiş her türdeşin katkısı için sıfır kullanılmasını gerektirir. "orta sınır" miktarı belirlenmemiş her türdeşin katkısını hesaplamak için miktar tayin limitinin yarısını kullanmayı gerektirir.

(¹¹) Genel olarak, EK-2, Bölüm C'nin 3'üncü maddesinde tekrarlı analizlere ilişkin gereklilikler geçerli olur. Bununla birlikte, ilgili analizler için ¹³C etiketli iç standardın kullanımıyla birlikte yürütülen doğrulama metodları için, tekrarlı analiz sadece söz konusu doğrulama metodlarını uygulayan ilk tespitin sonucunun uyumsuz olması halinde gereklidir. Tekrarlı analiz iç çapraz bulaşma veya numunelerin kazara karışması olasılığını ortadan kaldırmak için gereklidir. Analizin bulaşma hadisesi çerçevesinde yürütülmesi durumunda, analiz için seçilen numunelerin izlenebilirlik yoluyla bulaşma hadisesiyle bağlantılandırılması ve düzeyin maksimum seviyenin önemli ölçüde üstünde olması halinde tekrarlı analiz yoluyla doğrulama yapılabilir.

- Doğrulayıcı metotla gerçekleştirilen tek bir analizin sonucuna göre söz konusu düzeyin ölçüm belirsizliği göz önüne alınarak Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'ndeki maksimum PCDD/PCDF düzeyi ve PCDD/PCDF'ler ile dioksin benzeri PCB'lerin toplamını geçmemesi.

Tarama tayinleri için maksimum PCDD/PCDF düzeyi veya PCDD/PCDF'ler ile dioksin benzeri PCB'lerin toplamı için numune uyumuna ilişkin kararlara yönelik olarak bir eşik değeri belirlenir.

Doğrulayıcı metotla elde edilen ve tekrarlı analizle doğrulanmış üst sınır ⁽¹²⁾ analiz sonucunun Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'ndeki maksimum düzeyi aşması durumunda, söz konusu parti ölçüm belirsizliği⁽¹³⁾ göz önüne alınarak maksimum düzeyle uyumsuz kabul edilir. İki tespitin ortalaması, ölçüm belirsizliği göz önüne alınarak uyumun doğrulanması amacıyla kullanılır.

Ölçüm belirsizliği aşağıdaki yaklaşımların birisine göre dikkate alınacaktır:

- Yaklaşık % 95 güven aralığı veren kapsam faktörünün 2 (k=2) olarak alınmasıyla genişletilmiş belirsizlik hesaplanır. "Ölçülen değer eksi U" maksimum düzeyin üzerindeyse bir parti veya alt parti uyumsuz olarak kabul edilir. PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin ayrı tayini durumunda, PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin ayrı analiz sonuçlarının tahmini genişletilmiş belirsizlik toplamı PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin toplamı için kullanılacaktır.
- Karar sınırı (CCA) tesis edilerek ölçülen değer CCA'ya eşit ya da daha yüksekse numune alınan kısım ile uyumlu değildir.

Mevcut yorum kuralları, resmî kontrol amacıyla numune elde edilen analitik sonuçlar için geçerlidir.

3. Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'nin Ek 2'sindeki müdahale eşiklerini aşan sonuçlar

Müdahale eşikleri, bulaşma kaynağı belirlenmesi ve bunları azaltacak ya da ortadan kaldıracak önlemler alınmasının gerekli olduğu durumlarda numune seçimine yönelik bir araç görevi görür. Tarama metotlarıyla söz konusu numunelerin seçimi için uygun eşik değerleri belirlenir. Bir kaynak belirlenmesi ve bulaşmanın azaltılması veya ortadan kaldırılması için önemli çabalara ihtiyaç duyulması durumunda, bir doğrulama metodu kullanarak ve ölçüm belirsizliğini dikkate alarak tekrarlı analiz yoluyla müdahale eşiklerinin aşıldığının doğrulanması uygun olabilir ⁽¹⁴⁾.

BÖLÜM 2

Yemde dioksin (PCDD/PCDF) ve dioksin benzeri PCB düzeylerinin resmi kontrolünde kullanılan analiz metotları için numune hazırlama ve gereklilikler

1. Uygulama Alanı

Bu Bölümde belirlenen gereklilikler, poliklorlu dibenzo-p-dioksinler ve poliklorlu dibenzofuranlar (PCDD/F'ler) ve dioksin benzeri poliklorlu bifenillerin (dioksin benzeri PCB'ler) resmi kontrolü ve diğer yasal amaçlarla yemin analiz edildiği durumlarda geçerli olur.

PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin yemdeki varlığının izlenmesi iki tür analiz metoduyla birlikte gerçekleştirilebilir:

⁽¹²⁾ Üst sınır" kavramı miktarı belirlenmemiş her türdeşin Toksik Ekvivalent (TEQ) katkısının miktar sınırını kullanmayı gerektirir. "Alt sınır" kavramı miktarı belirlenmemiş her türdeşin TEQ'ye katkısı için sıfır değerinin kullanılmasını gerektirir. "Orta sınır" kavramı miktarı belirlenmemiş her türdeşin TEQ'ye katkısını hesaplamada miktar tayin limitinin yarısının kullanılmasını gerektirir.

⁽¹³⁾ Genel olarak, EK-2, Bölüm C'nin 3'üncü maddesinde tekrarlı analizlere ilişkin gereklilikler geçerli olur. Bununla birlikte, ilgili analizler için ¹³C etiketli iç standartın kullanımıyla birlikte yürütülen doğrulama metotları için, tekrarlı analiz sadece söz konusu doğrulama metotlarını uygulayan ilk tespitin sonucunun uyumsuz olması halinde gereklidir. Tekrarlı analiz iç çapraz bulaşma veya numunelerin kazara karışması olasılığını ortadan kaldırmak için gereklidir. Analizin bulaşma hadisesi çerçevesinde yürütülmesi durumunda, analiz için seçilen numunelerin izlenebilirlik yoluyla bulaşma hadisesiyle bağlantılandırılması ve düzeyin maksimum seviyenin önemli ölçüde üstünde olması halinde tekrarlı analiz yoluyla doğrulama çıkarılabilir.

⁽¹⁴⁾ Maksimum düzeyler için 5 nolu dipnotta olduğu gibi müdahale eşiklerinin kontrolü için tekrarlı analize ilişkin aynı açıklama ve gereklilikler.

a) Tarama metodları

Tarama metodlarının amacı maksimum düzeyleri veya müdahale eşiklerini geçen PCDD/F ve dioksin benzeri PCB düzeylerine sahip numuneleri seçmektir. Tarama metodları maliyet açısından etkin ve yüksek bir numune analiz hacmine olanak sağlar ve yüksek maruziyet ve tüketiciler açısından sağlık riski teşkil eden yeni olayların tespit olasılığını artırır. Bunların uygulanması yanlış uyumlu sonuçların önlenmesini hedeflemelidir. Tarama metodları biyoanalitik veya GC-MS metodlarını kapsayabilir.

Tarama metodları analiz sonucunu eşik noktasıyla karşılaştırır ve maksimum düzey veya müdahale eşığının muhtemel aşımına yönelik evet/hayır şeklinde karar verilmesini sağlar. Maksimum düzeyle uyumsuz olmasından şüphelenilen numunelerde PCDD/F'lerin konsantrasyonu ve PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin toplamı bir doğrulama metoduyla tespit edilmeli/doğrulanmalıdır.

İlave olarak, tarama metodları numune mevcut olan PCDD/F ve dioksin benzeri PCB'lerin düzeylerinin belirlenmesini sağlayabilir. Biyoanalitik tarama metodlarının uygulanması durumunda, sonuç Biyoanalitik Ekvivalanlar (BEQ) olarak ifade edilirken, fizikokimyasal GC-MS metodlarının uygulanması durumunda sonuç Toksik Ekvivalanlar (TEQ) olarak ifade edilmektedir. Tarama metodlarının sayısal olarak belirtilen sonuçları, uyumu, uyumsuzluk şüphesini veya müdahale eşiklerinin aşılmasını göstermek için uygundur ve doğrulayıcı metodlarla takip durumunda düzeylerin aralığını belirtir. Düşük zemin seviyelerinin belirlenmesi, maruziyet seviyelerinin zamana bağlı olarak değişiminin izlenmesi veya müdahale seviyesi ve maksimum limitlerin yeniden değerlendirilmesi gibi durumlar için tarama metodları uygun değildir.

b) Doğrulama metodları

Numunedeki mevcut PCDD/F ve dioksin benzeri PCB'lerin kesin bir şekilde hesaplanması ve tanımlanmasını ve türdeş bileşen bazında da tam bilgiye ulaşılmasını sağlar.

Bu nedenle bu metodlar tarama metodları ile elde edilen sonuçların doğrulanması da olmak üzere maksimum limit ve müdahale seviyelerinin kontrolünü sağlar. Buna ilave olarak bu metodlar; yem izlemede düşük zemin seviyelerinin tespiti, zamana bağlı olarak değişimlerin izlenmesi, popülasyonun maruziyet değerlendirmesi ve müdahale seviyesi ve maksimum limitlerin olası yeniden değerlendirilmesi için veri tabanının oluşturulması gibi farklı amaçlar için de kullanılabilir. Doğrulama metodları aynı zamanda muhtemel bulaşı kaynağını ortaya çıkarmak üzere türdeş bileşen dağılımlarının belirlenmesi hususunda da önemlidirler. Bu metodlar GC-HRMS kullanırlar. Maksimum limitlere uygunluk veya uygunsuzluğun kontrolünde aynı zamanda GC-MS/MS de kullanılabilir.

2. Arka plan

Toksik Ekvivalan (TEQ) konsantrasyonlarının hesaplanması için, belirli bir numune maddelerin tek başına konsantrasyonları kendilerine ait Toksik Ekvivalans Faktörleriyle (TEF) çarpılacak (bkz. Bölüm 1'deki dipnot (8) ve sonrasında TEQ cinsinden ifade edilen dioksin benzeri bileşiklerin toplam konsantrasyonlarını ortaya koymak için toplanacaktır.

Söz konusu Bölüm B'ye yönelik olarak, tek bir türdeşin kabul edilen spesifik miktar tayini limiti, bir analitin en düşük miktarının makul istatistiksel belirlilikle ölçülebileceği ve uluslararası düzeyde tanınan standartlarda belirtilen teşhis kriterlerini (örneğin EN 16215:2012 (Hayvan yemi — Dioksin ve dioksin benzeri PCB'lerin GC-HRMS ile belirlenmesi, indikatör PCB'lerin GCHRMS ile belirlenmesi) ve/veya revize edilen EPA 1613 ve 1668 metodları.) yerine getireceği anlamına gelir.

Tekli bir türdeşin miktar tayin limiti aşağıdaki şekilde belirlenebilir:

- Daha düşük yoğunluktaki ham veri sinyali için 3:1'lik S/N (sinyal/gürültü) oranıyla izlenmesi gereken iki farklı yonda instrumental yanıt (response) üreten bir numune ekstraktında analitin konsantrasyonu veya
- Teknik gerekçeler dolayısıyla, sinyal/gürültü hesaplamasında güvenilir sonuçlar elde edilemezse, her numune serisinde kalibrasyon eğrisindeki tüm noktalar için hesaplanan ortalama bağlı yanıt faktöründen kabul edilebilir (≤ 30) ve tutarlı (analitik numune serisinin en azından başında ve sonunda ölçülen) sapma. LOQ iç standartların geri kazanımı ve numune alımı dikkate alınarak en düşük konsantrasyondan hesaplanır

Biyoanalitik tarama metodları türdeş düzeyinde sonuç vermez. Fakat sadece TEQ düzeyinin Biyoanalitik Ekvivalanlar (BEQ) cinsinden ifade edilen bir göstergesidir ⁽¹⁵⁾ ve testte yanıt meydana getiren bir numune ekstraktındaki tüm bileşiklerin TEQ prensibinin tüm gerekliliklerine uymayabileceğini gösterir.

Tarama ve doğrulama metodları, müdahale eşiği veya maksimum düzeyde seviyeleri güvenilir şekilde tespit etmek için yeterli düzeyde duyarlı olmaları halinde sadece belirli bir matrisin kontrolü için uygulanabilirler.

3. Kalite güvence gereklilikleri

- a) Numune alma ve analiz prosedürünün her bir basamağında çapraz bulaşmayı önleyecek tedbirler alınmalıdır.
- b) Numuneler, numunelerdeki PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin seviyeleri üzerine etki etmeyecek şekilde saklamaya uygun cam, alüminyum, polipropilen veya polietilen kaplarda muhafaza edilmeli ve taşınmalıdır. Eser miktarda olsa dahi kağıt tozlarının kalıntılarını numune kabından uzaklaştırılmalıdır.
- c) Numuneler, bütünlüğü korunarak özellikleri değişmeyecek koşullarda muhafaza edilmeli ve taşınmalıdır.
- ç) Her bir laboratuvar numunesi mümkün olduğu kadar, tam homojenizasyonu sağlamak üzere, iyice öğütülmeli (örneğin 1 mm'lik elekten geçecek şekilde) ve iyice karıştırılmalıdır. Numuneler, rutubet içeriği çok yüksek ise, öğütülmeden önce kurutulmalıdır.
- d) Kimyasallar, cam malzemeler ve ekipmanların, TEQ veya BEQ'e dayalı sonuçları etkilememesi için kontrol edilmiş olması çok önemlidir.
- e) Numune hariç tutularak, tüm analitik prosedürün uygulanması ile kör analiz gerçekleştirilmelidir.
- f) Biyoanalitik metodlar için, analizde kullanılan tüm cam malzeme ve çözücülerin çalışma aralığı içerisinde hedef bileşiklerin tespitinde girişim yapan bileşikler içermediğinin kontrol edilmiş olması oldukça önemlidir. Cam malzemeler, PCDD/F'ler, dioksin benzeri PCB'ler ve girişim yapan bileşiklerin kalıntılarını uzaklaştırmak için uygun sıcaklıklarda ısıtılmalı ve/veya çözücüler ile çalkalanmalıdır.
- g) Ekstraksiyon için kullanılan numune miktarı, müdahale seviyesi veya maksimum limit konsantrasyonunu içeren yeterince düşük çalışma aralığındaki gereklilikleri karşılamalıdır.
- ğ) Analiz edilecek ürünler için kullanılan özel numune hazırlama prosedürleri, uluslararası kabul edilen talimatlara uygun olmalıdır.

4. Laboratuvarların gereklilikleri

4.1 Laboratuvarlar, Gıda ve Yemin Resmi Kontrollerine Dair Yönetmelikte laboratuvarlar için belirtilen hükümlere uymak zorundadır.

4.2. İlgili yem matrisleri ve konsantrasyon aralıklarında PCDD/PCDF ve dioksin benzeri PCB'lerin tespiti için laboratuvarlar arası çalışmalara devamlı olarak başarılı şekilde katılım yoluyla laboratuvar yeterliliği kanıtlanacaktır.

4.3. Numunelerin rutin kontrolü için tarama metodları uygulayan laboratuvarlar, doğrulama metodunu uygulayan laboratuvarlarla kalite kontrol ve şüpheli numunelerin analiz sonucunun doğrulanması bakımından yakın bir işbirliği oluşturacaklardır.

5. Dioksinler (PCDD/PCDF'ler) ve dioksin benzeri PCB'lerin analiz prosedürünün karşılaması gereken temel gereklilikler

⁽¹⁵⁾ Biyoanalitik metodlar TEF programına dahil edilen türdeşlere özgü değildir. Yapısal olarak ilişkili diğer AhR-aktif bileşikler genel yanıtı katkı yapan numune ekstraktında mevcut olabilir. Bu nedenle biyoanalitik sonuçlar numunedeki TEQ düzeyinin bir tahmini değil fakat bir göstergesi olabilir.

5.1. Düşük çalışma aralığı ve miktar tayin limitleri

PCDD/F'ler için, bu bileşiklerin bazılarının yüksek toksisiteleri nedeniyle tespit edilebilir miktarlar femtogram (10^{-15} g) düzeyinde olmalıdır. Çoğu PCB türdeş bileşeni için nanogram (10^{-9} g) düzeyinde ölçüm limiti yeterlidir. Ancak, daha toksik dioksin benzeri PCB türdeş bileşenlerinin (özellikle non-orto türdeş bileşenlerin) ölçümü için, çalışma aralığı pikogram (10^{-12} g) seviyelerine inmelidir.

5.2. Yüksek seçicilik (spesifiklik)

5.2.1. PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'leri, ilgili analitlerden birkaç kat fazla konsantrasyonlarda mevcut olan, ilgili analitlerle birlikte ekstrakte edilen ve girişim yapması muhtemel bileşiklerden ayırt etmek gereklidir. Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC-MS) metodlarında, toksik bileşikler (17 adet PCDD/F'ler ve 12 adet dioksin benzeri PCB'ler) ve diğer türdeş bileşenlerin ayrımı gereklidir.

5.2.2. Biyoanalitik metodlar, PCDD/F'ler ve/veya dioksin benzeri PCB'lerin toplamı olarak, hedef bileşikleri tespit edebilir olmalıdır. Clean-up işlemi "hatalı-uygunsuz" sonuçlara sebep olan bileşikler ya da hatalı-uygun sonuçlara sebep olan yanıtı düşürecek bileşikler uzaklaştıracak şekilde olmalıdır.

5.3. Yüksek doğruluk (gerçeklik ve kesinlik, biyoanaliz görüntür geri kazanımı)

5.3.1. GC-MS metodları ile tespit; numunedeki gerçek konsantrasyon için geçerli bir değerlendirme sağlamalıdır. Yüksek doğruluk (Ölçüm doğruluğu: Analite ilişkin gerçek veya atfedilen değer ile ölçülen sonucun birbirine yakınlığı), hesaplanan TEQ seviyesinin zayıf güvenilirliği sebebiyle analiz sonucunun 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 farkın sertifikalanmış değere göre yüzdesi olarak ifade edilir. Kesinlik ise tekrar üretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan bağlı standart sapmadır (RSDR).

5.3.2. Biyoanalitik metodlar için biyoanaliz görüntür geri kazanımı belirlenir. Biyoanaliz görüntür geri kazanımı, kör tayin için düzeltilmiş TCDD veya PCB 126 kalibrasyon eğrisinden hesaplanan ve sonrasında doğrulama metoduyla belirlenmiş TEQ düzeyine bölünen BEQ düzeyidir. Ekstraksiyon ve temizleme aşamalarında PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri bileşiklerin kaybı, yanıtı arttıran veya azaltan (agonistik ve antagonistik etkiler) ve birlikte ekstrakte edilen bileşikler, veya Toksik Ekvivalans Faktörü (TEF) ve Bağlı Güç (REP) değerleri arasındaki farklar gibi faktörlerin düzeltilmesini hedefler. Biyoanaliz görüntür geri kazanımı ilgi düzeyi çevresinde temsili türdeş bileşenlerine sahip uygun referans numunelerinden hesaplanmaktadır.

5.4. Maksimum düzey aralığı ve genel kalite kontrol önlemlerinin validasyonu

5.4.1. Laboratuvarlar, geçerli kılma işleminde ve/veya rutin analizlerde maksimum limitin 0,5, 1 ve 2 katı gibi maksimum limit aralığında tekrarlanan analizlerde kabul edilebilir bir varyasyon katsayısı sağlanacak şekilde, metodun performansını göstermelidir.

5.4.2. Kontrol numunelerinin düzenli kör kontrolleri ve eklenmiş denemeler veya analiz (tercihen mevcut olması halinde sertifikalı referans materyali) iç kalite kontrol tedbirleri olarak yürütülür. Analizin gerekliliklere uygun olarak yürütülmesinin teyidi için kontrol numunelerinin kör kontrolleri, eklenmiş denemeleri veya analizleri kaydedilmeli ve kontrol edilmelidir.

5.5. Ölçüm Limiti (LOQ)

5.5.1. Biyoanalitik tarama metodları için, ölçüm limitinin belirlenmesi zorunlu bir gereklilik değildir ancak bu metodun eşik değeri ve kör değerini birbirinden ayırt edebildiğini kanıtlaması gerekmektedir. Bir BEQ düzeyi verildiği zaman, bu seviyenin altında yanıt veren numuneleri ele almak için bir raporlama limiti belirlenmelidir. Raporlama limitinin, çalışma aralığı altında kalmak kaydıyla, "prosedür kör numunelerinden" en az 3 kat fazla olabileceği gösterilmelidir. Bu sebeple, bu limit, bir deneme köründen ya da S/N oranından değil; istenen minimum seviye civarındaki hedef bileşenleri içeren numunelerden hesaplanmalıdır.

5.5.2. Bir doğrulama metodu için; ölçüm limiti, maksimum limitin ortalama 1/5'i olmalıdır.

5.6. Analiz kriterleri

Doğrulama veya tarama metodlarından güvenilir sonuçlar elde etmek amacıyla; maksimum limit veya müdahale seviyesi aralığında, gerek toplam TEQ değeri olarak hesaplanan (PCDD/F ve dioksin benzeri PCB'lerin toplamı) ve gerekse PCDD/F ve dioksin benzeri PCB'ler olarak ayrı ayrı hesaplanan TEQ değeri ve BEQ değeri için Tablo-5'teki kriterler karşılanmalıdır.

Tablo yukarıda belirtildiği üzere no:5 e tekabül ediyorsa numaralandırılmalıdır.

	Biyoanalitik veya fizikokimyasal metodlarla tarama	Doğrulama metodları
Yanlış uyumlu oran(*)	< % 5	
Geçerlilik		- % 20 ila + % 20
Tekrar edilebilirlik (RSD _i)	< % 20	
Laboratuvarda tekrar üretilebilirlik (RSD _R)	< % 25	< % 15
(*)Maksimum düzeylere istinaden		

5.7. Tarama metodları için özel gereklilikler

5.7.1. Tarama için GC-MS analiz metodları ve biyoanalitik metodlar kullanılabilir. GC-MS metodları için 6 ncı maddede verilen hükümler kullanılmalıdır. Hücre temelli biyoanalitik metodlar için özel hükümler 7 nci maddede açıklanmıştır.

5.7.2. Numunelerin rutin kontrolü için tarama metodları uygulayan laboratuvarlar doğrulama metodu uygulayan laboratuvarlarla yakın işbirliği kurmalıdır.

5.7.3. Rutin analizler sırasında, tarama metodunun performans doğrulaması, analitik kalite kontrol ve devam eden metod geçerli kılma işlemleriyle yapılmalıdır. Uygun sonuçların kontrolü için, sürekli bir program olmalıdır.

5.7.4. Hücre yanıtının olası baskılanmasının ve sitotoksitenin kontrolü:

Hücre yanıtının olası baskılanmasının ve sitotoksitenin kontrolü: Rutin taramalarda, numune ekstraktında girişim yapan bileşikler tarafından yanıtın olası baskılanmasını kontrol etmek için numune ekstraktlarının % 20'si; maksimum limit veya müdahale seviyesine karşılık gelen miktarda 2,3,7,8-TCDD eklenerek ve eklenmeksizin ölçülmelidir. Standart eklenmiş numunenin ölçülen konsantrasyonu; standart eklenmemiş ekstrakt konsantrasyonu ve eklenen standardın konsantrasyonunun toplamı ile karşılaştırılır. Bu ölçülen konsantrasyon, hesaplanan (toplam) konsantrasyondan % 25'ten daha fazla oranda düşükse; bu potansiyel sinyal baskılanmasının göstergesidir ve ilgili numune, GC-HRMS doğrulama analizi için gönderilmelidir. Sonuçlar, kalite kontrol grafiklerinde izlenmelidir.

5.7.5. Uygun numunelerin kalite kontrolü:

Uygun numunelerin kalite kontrolü: Numune matrisi ve laboratuvar tecrübesine bağlı olarak, uygun numunelerin yaklaşık % 2-10'u GC-HRMS tarafından doğrulanmalıdır

5.7.6. Kalite kontrol verilerinden yanlış uyumlu oranların belirlenmesi:

Maksimum düzey veya müdahale eşliğinin altında veya üstündeki numunelerin tarama sonuçlarında elde edilen yanlış uygun sonuçların oranları belirlenmelidir. Yanlış uygun sonuçların oranı % 5'in altında olmalıdır. Uyumlu numunelerin kalite kontrolünde matris/matris grubu başına en az 20 adet doğrulanmış sonucun mevcut olması

halinde, yanlış uyumlu orana dayanan sonuçlar bu veritabanından çekilmelidir. Ring denemeleri veya bulaşmalar sırasında analiz edilen ve örneğin maksimum düzeyin (ML) 2 katına kadar konsantrasyon aralığını kapsayan numunelere ait sonuçlar yanlış uyumlu sonuç oranının değerlendirilmesi için en az 20 sonuca ilave edilebilir. Numuneler çeşitli kaynakları temsil eden en sık türdeş bileşenlerini kapsamalıdır.

Tarama analizleri tercihen müdahale eşiğini geçen numunelerin tespiti için hedeflenmelidir, ancak yanlış uyumlu sonuç oranlarının belirlenmesindeki kriter maksimum düzey olup doğrulama metodunun ölçüm belirsizliğini dikkate almalıdır.

5.7.7. Tarama metodundan elde edilen potansiyel uygunsuz sonuçlar, orijinal numunenin doğrulama metodu ile komple yeniden analizi ile doğrulanmalıdır. Bu numuneler, hatalı-uygunsuz sonuçların oranının değerlendirilmesi için de kullanılabilir. Tarama metodları için, hatalı uygunsuz sonuçların oranı, daha önce tarama esnasında uygunsuz olduğundan şüpheli olarak deklare edilen numunenin doğrulama analizi ile uygunluğu doğrulanmış sonuçlarına olan oranıdır. Bununla beraber, tarama metodlarının avantajlı olup olmadıklarının değerlendirilmesi, hatalı uygunsuz numunelerin, toplamda kontrol edilen numune sayısı ile kıyaslanmasına dayanır. Tarama metodunun avantajlı olarak değerlendirilebilmesi için bu oran yeterince düşük olmalıdır.

5.7.8. En azından geçerli kılma koşulları altında; biyoanalitik metodlar, BEQ olarak hesaplanan ve ifade edilen TEQ limitinin geçerli bir göstergesini sağlamalıdır. Ayrıca tekrar edilebilirlik koşulları altında yürütülen biyoanalitik metodlar için, laboratuvar içi RSD_r, tekrar üretilebilirlik RSD_R'den genellikle daha küçük olmalıdır.

6. GC-MS metodlarının tarama veya doğrulama amaçlarıyla taşınması gereken özel şartlar

6.1. WHO-TEQ seviyeleri üst-sınır ve alt-sınır arasındaki kabul edilebilir farklılıklar

Maksimum limit aşımının doğrulanması veya müdahale seviyelerine ihtiyaç olduğu durumda üst-sınır ve alt-sınır değerleri arasındaki fark % 20'yi geçmemelidir.

6.2. Geri kazanımların kontrolü

6.2.1. 2,3,7,8 pozisyonlarında klor içeren ¹³C -işaretlenmiş PCDD/F iç standartları ve ¹³C -işaretlenmiş dioksin benzeri PCB iç standartları analitik metodun en başında (örnek olarak metodun geçerli kılınması için ekstraksiyon öncesi) eklenmelidir. 4'den 8'e kadar klor ihtiva eden her bir PCDD/F'ler homolog grubu ve her bir dioksin benzeri PCB homolog grubu için en az bir işaretli bileşik eklenmelidir (alternatif olarak, kütle spektrometresinde PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin taranmasında kullanılan seçici iyon kaydedici fonksiyonların her biri için en az bir işaretli bileşik). Doğrulama metodları söz konusu olduğunda, 17 adet 2,3,7,8 pozisyonlarında klor içeren ¹³C -işaretlenmiş PCDD/F iç standartlarının tümü ve 12 tane ¹³C -işaretlenmiş dioksin benzeri PCB iç standartlarının tümü kullanılmalıdır.

6.2.2. ¹³C-işaretlenmiş analogu eklenmemiş her bir türdeş için de uygun kalibrasyon çözeltileri kullanılarak bağlı tepki faktörü (RRF) belirlenmelidir.

6.2.3. Bitkisel veya hayvansal menşeli olup % 10'dan daha düşük oranda yağ içeren yemler için, iç standartların ilavesi ekstraksiyon öncesinde zorunlu olmalıdır. Hayvansal menşeli olup % 10'dan fazla yağ içeren yemler için, iç standartlar yağ ekstraksiyonundan önce veya sonra ilave edilmelidir. İç standartların uygulandığı aşama ve sonuçların ürün veya yağ bazlı bildirimine bağlı olarak ekstraksiyon etkinliğinin validasyonu uygun şekilde yapılmalıdır.

6.2.4. GC-MS analizi öncesinde, 1 veya 2 geri kazanım standardı/standartları (kimyasal yapısı ekstrakte edilen bileşenlere benzeyen) eklenmelidir.

6.2.5. Geri kazanım kontrolü gereklidir. Doğrulama metodları için, her bir iç standardın geri kazanımı % 60-120 aralığında olmalıdır. Herhangi bir bileşiğin, özellikle bazı 7 ve 8 klorlu dibenzo-p-dioksinler 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. GC-MS tarama metodları için, geri kazanım % 30-140 aralığında olmalıdır.

6.3. Girişim (interferans) yapan maddelerin uzaklaştırılması

- Dioksin benzeri olmayan PCB'ler ve klorlanmış difenil eterler gibi girişim yapan klorlanmış bileşiklerden PCDD/F'lerin ayırımı uygun kromatografik tekniklerle, tercihen florisil, alümina ve/veya karbon kolonu ile gerçekleştirilmelidir.
- İzomerlerin gaz kromatografisi ile ayırımı yeterli olmalıdır (1,2,3,4,7,8-HxCDF ve 1,2,3,6,7,8-HxCDF arasındaki pikten pike ayırımı % 25'ten küçük olmalıdır).

6.4. Standart eğriyle kalibrasyon

Kalibrasyon eğrisinin aralığı, maksimum limit veya müdahale seviyesini kapsamalıdır.

6.5. Doğrulama metodları için spesifik kriterler

- GC-HRMS için:

HRMS'de, çözünürlük % 10'luk vadideki parçalanmamış (bütün) kütle aralığı için tipik olarak 10000 den büyük veya eşit olmalıdır

Uluslararası kabul görmüş standartlarda tanımlanan ileri tanımlama ve doğrulama kriterlerinin yerine getirilmesi, örneğin EN 16215:2012 standardı (Hayvansal yemlerde dioksinler ve dioksin benzeri PCB ler ve indikatör PCB lerin GC-HRMS ile tespit edilmesi) ve/veya EPA metodları 1613 ve revize edilmiş 1668 de tanımlandığı şekilde yapılır.

- GC-MS/MS için

Analiz kapsamındaki bütün işaretlenmiş ve işaretlenmemiş analitler en az 2 spesifik öncü(precursor) iyon ve öncü iyonların her birisi de kendine karşılık gelen bir adet spesifik geçiş ürün iyonu (transition product ions) ile izlenmelidir.

Tipik MS/MS şartlarına uygulanan, özellikle analitin her geçişi için çarpışma (collision) enerjisi ve çarpışma gaz basıncı, hesaplanmış veya ölçülmüş değerlere kıyasla (kalibrasyon standartlarından elde edilen ortalama değer) seçilmiş geçiş ürün iyonları için relatif iyon yoğunluklarının maksimum müsaade edilen toleransı ± 15 % dir.

İlgilenilen analitleri etkileyebilecek muhtemel girişimleri minimize etmek üzere her kuadropol için çözünürlük birim kütle çözünürlüğe eşit veya daha iyi olacak şekilde ayarlanmalıdır (birim kütle çözünürlük: iki pikin bir kütle birimi ayrı olacak şekilde ayırabilmek için yeterli çözünürlük).

Uluslararası kabul görmüş standartlarda tanımlanan ileri düzeydeki kriterlerin yerine getirilmesi, örneğin standart EN 16215:2012 (hayvansal yemlerde dioksinler ve dioksin benzeri PCB ler ve indikatör PCB lerin GC-HRMS ile tespit edilmesi) ve EPA metodları 1613 ve revize edilmiş 1668 de tanımlandığı üzere (GC-HRMS in kullanılmasının zorunlu tutulması haricinde) yapılır.

7. Biyoanalitik metodlar için özel gereklilikler

Biyoanalitik metodlar, hücre temelli, reseptör ya da immuno analizler gibi biyolojik prensiplere dayalı metodlardır. Bu kısım, genel olarak biyoanalitik metodlar için gereklilikleri vermektedir.

Bir tarama metodu prensip olarak numuneyi uygun ya da "uygunsuz olmasından şüpheli" olarak sınıflandırır. Bunun için, hesaplanan BEQ düzeyi eşik değeri ile karşılaştırılır (Bkz: Madde 7.3). Eşik değerinin altındaki numuneler uygun olarak beyan edilir, eşik değerine eşit veya bu değer üzerindeki numuneler şüpheli olarak beyan edilir ve bir doğrulama metodu ile analiz edilmesi gerekir. Pratikte, maksimum limitin 2/3'üne karşılık gelen bir BEQ değeri, hatalı-uygunsuz sonuçlar için kabul edilebilir bir oran olup hatalı-uygun sonuçlar için % 5'in altında bir oran sağlayan en uygun eşik değerini verebilir. PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'ler toplamı ve PCDD/F'ler için ayrı maksimum limitler olduğu durumda, fraksiyonlarına ayrılmamış numunelerin uygunluk kontrolü, PCDD/F'ler için uygun biyoanaliz eşik değerlerinin tespit edilmesini gerektirir. Müdahale seviyesini aşan numunelerin kontrolü için, müdahale seviyesinin uygun bir yüzdesi, eşik değeri olarak kullanılır.

Ayrıca, belirli biyolojik metodlar olması halinde; raporlama limitini aşan ve çalışma aralığındaki numuneler için BEQ olarak ifade edilen bir gösterge seviyesi verilebilir. (bkz. 7.1.1 ve 7.1.6).

7.1. Test yönteminin değerlendirilmesi

7.1.1. Genel gereklilikler

- Bir TCDD kalibrasyon eğrisinden konsantrasyonlar hesaplanacağı zaman, eğrinin en alt ve en üst uçlarındaki değerler, yüksek bir varyasyon katsayısı (CV) gösterecektir. Çalışma aralığı, bu CV'nin % 15'ten düşük olduğu alandır. Çalışma aralığının en alt ucu (raporlama limiti), prosedür körlerinin en az üç kat üzerinde belirlenmiş olmalıdır. Çalışma aralığının en üst ucu, genellikle EC₇₀ değeri (maksimum etkin konsantrasyonun % 70'i) ile gösterilir, ancak CV bu aralıkta % 15'ten daha yüksek ise, çalışma aralığının en üst ucu daha düşük olur. Çalışma aralığı, geçerli kılma esnasında belirlenmelidir. Eşik değerleri [Madde 7.3], çalışma aralığı içinde olmalıdır.
- Standart çözeltiler ve numune ekstraktları, en az iki tekrar olarak analiz edilmelidir. Tekrarlar kullanılacağı zaman, bölünmüş tabaka üzerinde 4-6 gözde test edilen bir standart çözelti ya da kontrol ekstraktı, % 15'ten daha düşük CV'ye sahip bir yanıt ya da konsantrasyon (sadece çalışma aralığında) üretmelidir.

7.1.2. Kalibrasyon

7.1.2.1. Standart eğriyle kalibrasyon

- Ekstrakttaki ve akabinde numunedeki BEQ düzeyini hesaplamak için; analiz yanıtı TCDD kalibrasyon eğrisiyle (ya da PCB 126 ya da bir PCDD/F/dioksin benzeri PCB standart karışımı) karşılaştırılarak numunedeki seviyeler belirlenebilir.
- Kalibrasyon eğrileri, çalışma aralığının en alt ucunda yeterli konsantrasyonlar içermek kaydıyla, 8-12 konsantrasyon (en az iki tekrar) içermelidir. Çalışma aralığında, kalibrasyon eğrisine uygunluk kalitesine özellikle dikkat gösterilmelidir. R² değeri, doğrusal olmayan regresyon içinde uygunluk derecesinin tahmininde ya çok az fikir verir ya da hiç vermez. Daha iyi bir uygunluğa, eğrinin çalışma aralığında gözlenen ve hesaplanan düzeyler arasındaki farkı minimize ederek ulaşılabilir (örneğin farkların karelerinin toplamını minimize ederek).
- Numune ekstraktında belirlenen seviye, bir matris/çözelti kör numunesi için (kullanılan çözeltiler ve kimyasallardan gelen safsızlıkları hesaba katmak için) hesaplanan BEQ düzeyine ve geri kazanıma (maksimum limit veya müdahale seviyesi civarında benzer türde bileşen dağılımına sahip uygun referans numunelerin BEQ düzeyinden hesaplanan) göre düzeltilir. Bir geri kazanım düzeltmesi yapmak için, geri kazanım her zaman istenen aralık içinde olmalıdır [Bkz: Madde 7.1.4]. Geri kazanım düzeltmesi için kullanılan referans numuneler, Madde 7.2'de verilen gerekliliklere uymak zorundadır.

7.1.2.2. Referans numunelerle kalibrasyon

Alternatif olarak, kör ve geri kazanım düzeltmesi gerekliliğini elimine ederek; ilgilenilen seviye civarında en az 4 referans numuneden [Bkz: Madde 7.2.4: bir matris kör + maksimum limit veya müdahale seviyesinin 0.5, 1 ve 2 katı seviyesinde 3 referans numune] hazırlanan bir kalibrasyon eğrisi kullanılabilir. Bu durumda, maksimum limitin 2/3'üne karşılık gelen [Bkz: Madde 7.3] analiz yanıtı, direkt olarak bu numunelerden hesaplanabilir ve eşik değeri olarak kullanılabilir. Müdahale seviyesini aşan numunelerin kontrolü için, bu müdahale seviyelerinin uygun bir yüzdesi eşik değeri olarak kullanılır.

7.1.3. PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin ayrı belirlenmesi

Ekstraktlar, PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin TEQ değerlerinin (BEQ olarak) ayrı ayrı gösterilmesine olanak tanıyan, PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'leri içeren fraksiyonlara ayrılabilir. Dioksin benzeri PCB'leri içeren fraksiyona ilişkin sonuçları değerlendirmek için tercihen PCB 126 standart kalibrasyon eğrisi kullanılmalıdır.

7.1.4. Biyoanaliz görünür geri kazanımları

Biyoanaliz görünür geri kazanımı, maksimum limit veya müdahale seviyesi civarında benzer türdeş bileşen dağılımına sahip uygun referans numunelerden hesaplanmalı ve TEQ düzeyi ile karşılaştırılan BEQ düzeyinin yüzdesi olarak açıklanmalıdır. Deney tipine ve kullanılan TEF'lere (¹⁶)bağlı olarak; dioksin benzeri PCB'ler için TEF ve REP faktörleri arasındaki farklılıklar, PCDD/F'lere kıyasla dioksin benzeri PCB'ler için daha düşük geri kazanımlara sebep olabilir. Bu yüzden, PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin ayrı ayrı belirlenmesi yapılacaktır; biyoanaliz görünür geri kazanımı, dioksin benzeri PCB'ler için % 20-60, PCDD/F'ler için % 50-130 (Oranlar, TCDD kalibrasyon eğrisi içindir) olmalıdır. Farklı matrisler ve numunelerde, PCDD/F'lerin ve dioksin benzeri PCB'lerin toplamına dioksin benzeri PCB'lerin katkısı değişebileceğinden, toplam parametre için biyoanaliz görünür geri kazanımı, bu oranları yansıtacak şekilde % 30-130 arasında olmalıdır. PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin için TEF değerlerinin uygulanmasında bu aralıkların gözden geçirilmesi gereklidir.

7.1.5. Clean-up aşamasında geri kazanımların kontrolü

Geçerli kılma işleminde, clean-up aşamasında bileşenlerin kaybı kontrol edilmelidir. Farklı türdeş bileşenler içeren karışım eklenmiş bir kör numunede clean-up yapılmalı (en az n=3); geri kazanım ve değişkenlik bir doğrulama metodu ile kontrol edilmelidir. Geri kazanım, çeşitli karışımlarda, özellikle TEQ düzeyine % 10'dan daha fazla katkı sağlayan türdeş bileşenler için, % 60-120 arasında olmalıdır.

7.1.6. Raporlama limiti

BEQ değerleri raporlanırken, eğrinin alt aralığındaki düşük kesinlik sebebiyle, standartların kalibrasyon eğrisinden değil; tipik türdeş bileşen dağılımı içeren ilgili matris numunelerinden bir raporlama limiti belirlenmelidir. Ekstraksiyon ve clean-up işleminin etkileri hesaba katılmalıdır. Raporlama limiti, prosedür körlerinin en az üç kat üzerinde belirlenmiş olmalıdır.

7.2. Referans numunelerinin kullanımı

7.2.1. Referans numuneler, numune matrisi, türdeş bileşen dağılımı ve maksimum limit veya müdahale seviyesi civarında PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'ler için konsantrasyon aralıklarını temsil etmelidir.

7.2.2. Her analiz serisinde, bir prosedür körü, ya da tercihen bir matris körü ve maksimum limit veya müdahale seviyesinde bir referans numune dahil edilmelidir. Bu numuneler, aynı koşullar altında aynı zamanda ekstrakte edilmeli ve analiz edilmelidir. Referans numune, kör numune ile karşılaştırıldığında belirgin yüksek bir yanıt göstermeli ve böylece analizin uygunluğunu temin etmelidir. Bu numuneler, kör ve geri kazanım düzeltmeleri için kullanılabilir.

7.2.3. Bir geri kazanım düzeltmesi yapmak için seçilen referans numuneler, analiz numunesini temsil etmelidir, yani türdeş bileşen dağılımı, seviyenin eksik bulunmasına sebep olmamalıdır.

7.2.4. Maksimum limit veya müdahale seviyesinin kontrolünde; ilgi aralığında analizin performansının uygunluğunu göstermek için, maksimum limit veya müdahale seviyesinin 0.5 ve 2 katı konsantrasyonuna sahip olan ekstra referans numuneler dâhil edilebilir. Bu numuneler, analiz numunelerinde BEQ düzeylerinin hesaplanması için kullanılabilir [Madde 7.1.2.2].

7.3. Eşik değerlerinin belirlenmesi

BEQ olarak ifade edilen biyoanalitik sonuçlar ve TEQ olarak ifade edilen doğrulama metodları sonuçları arasında ilişki kurulmalıdır (örneğin her seviyede 6 tekrar yapılarak maksimum limitin 0, 0.5, 1 ve 2 katlarında (n=24) standart eklenmiş referans numuneleri içeren matris etkili kalibrasyon denemeleri). Düzeltme faktörleri (kör ve

(¹⁶) Mevcut gereklilikler M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006) künye bilgisine sahip kaynakta yayımlanan TEF'lere dayanmaktadır

geri kazanım) bu ilişkinin tahmin edilebilir ancak her analiz serisine prosedür/matriks körleri ve geri kazanım numuneleri dahil edilerek kontrol edilmelidir. (7.2.2).

Eşik değerleri, müdahale seviyesinin kontrolü ya da numunenin maksimum limitlerle (eğer istenirse, ya PCDD/F'ler ve dioksin benzeri PCB'ler için ayrı ayrı ya da dioksin benzeri PCB'ler ve PCDD/F'ler toplamı için karşılık gelen maksimum limit veya müdahale seviyesiyle) uyumuna karar vermek için belirlenmelidir. % 5'in altında bir hatalı-uygun oranı gösteren ve % 25'in altında RSD_R 'de, % 95 güven aralığına dayalı bir doğrulama metodu karar limitine karşılık gelen biyoanalitik sonuçların (kör ve geri kazanım için düzeltilmiş) dağılımının en alt uç noktası eşik değerler olarak ifade edilir. Doğrulama metodu karar limiti, ölçüm belirsizliğinin hesaba katıldığı maksimum limittir.

BEQ cinsinden kesim değeri 7.3.1, 7.3.2 ve 7.3.3'teki yaklaşımlarla uyumlu olarak hesaplanmalıdır (bkz. Şekil 1).

7.3.1. Doğrulama metodu karar limitinde % 95 tahmin aralığının en düşük bandının kullanımı:

$$\text{Eşik değeri: } BEQ_{DL} - s_{y,x} * t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

Burada:

BEQ_{DL} : Ölçüm belirsizliğinin hesaba katıldığı maksimum limit olan doğrulama metodu karar limitine karşılık gelen BEQ,

$s_{y,x}$: Fark standart sapması

$\alpha, f = m-2$: "t" testi faktörü ($\alpha = \% 5$, $f =$ serbestlik derecesi, tek yönlü),

m : Kalibrasyon noktalarının toplam sayısı (j indeksi),

n : Her seviyedeki tekrarların sayısı,

x_i : Doğrulama metodu ile belirlenen kalibrasyon noktası i 'ye karşılık gelen numune konsantrasyonu (TEQ olarak ifade edilen),

x : Tüm kalibrasyon numunelerinin konsantrasyonlarının ortalaması (TEQ olarak ifade edilen),

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$$

: Kareler toplamı parametresi,

i =Kalibrasyon noktası i için indekstir.

7.3.2. Ortalama BEQ değerine karşılık gelen veri dağılımının en alt uç noktası olarak; doğrulama metodu karar limiti düzeyinde bulaşan numunelerin çoklu analizlerinin ($n \geq 6$) biyoanalitik sonuçlarından (kör ve geri kazanım için düzeltilmiş) hesaplama:

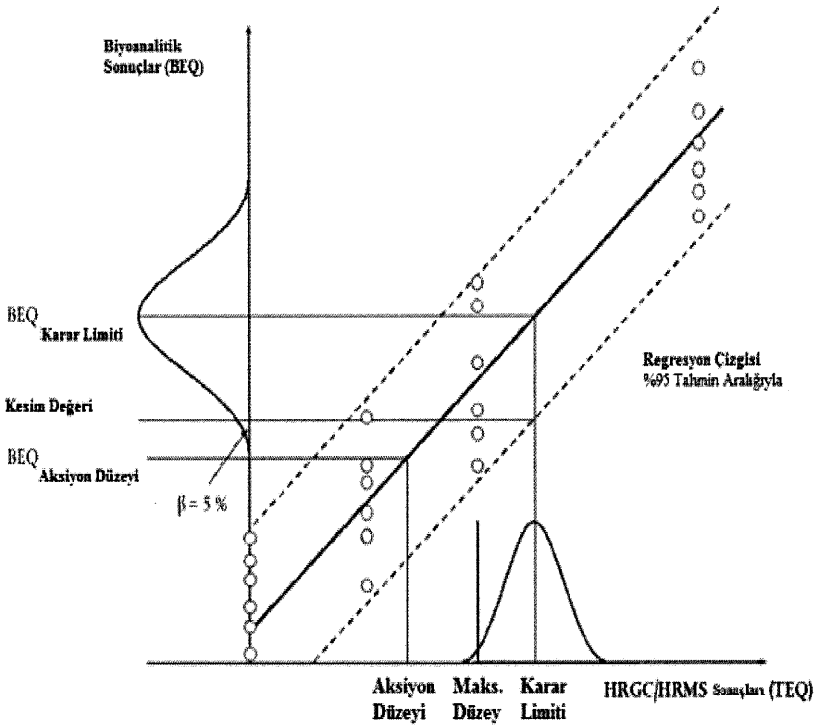
$$\text{Eşik değeri} = BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

Burada:

SD_R : Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik koşulları altında ölçülen BEQ_{DL} 'de biyoanaliz sonuçlarının standart sapmasıdır.

7.3.3. Ortalama BEQ değerinin, maksimum limit veya müdahale seviyesinin 2/3'ü düzeyinde bulaşı seviyesine sahip numunelerin çoklu analizlerinin ($n \geq 6$) biyoanalitik sonuçlarından (kör ve geri kazanım için düzeltilmiş) hesaplanması. Bu hesaplama, bu seviyenin Madde 7.3.1 ve Madde 7.3.2'de hesaplanan eşik değeri civarında olacağı gözlemine dayanmaktadır.

Şekil 1



Şekil 1 % 5'in altında bir yanlış-uyumlu oranı gösteren ve % 25'in altında RSD_R 'de, % 95 güven aralığına sahip eşik değerleri:

1. Doğrulama metodu karar limitinde % 95 tahmin aralığının en düşük bandından,
2. Ortalama BEQ değerine karşılık gelen veri dağılımının (şekilde çan eğrisi ile temsil edilen) en alt uç noktası olarak, doğrulama metodu karar limiti düzeyinde bulaşıya sahip numunelerin çoklu analizlerinden ($n \geq 6$) hesaplanır.

7.3.4. Eşik değerlerine kısıtlamalar

Farklı matriks/türdeş bileşen dağılımına sahip az sayıda numune kullanılarak yapılan geçerli kılmadaki RSD_R 'den hesaplanan BEQ'e dayalı eşik değerleri, rutinde muhtemel türdeş bileşen dağılımının bilinmeyen spektrumunun analizinden elde edilenden daha iyi bir kesinliğe sahip olduğundan dolayı TEQ'e dayalı maksimum limit veya müdahale seviyesinden daha yüksek olabilir. Bu durumlarda, eşik değerleri $RSD_R = \% 25$ 'ten hesaplanmalı ya da maksimum limit veya müdahale seviyesinin 2/3'ü tercih edilmelidir.

7.4. Performans özellikleri

7.4.1. Biyoanalitik metodlarda iç standart kullanılmadığından; analiz serileri arasında ve analiz serileri içinde standart sapma hakkında bilgi edinmek amacıyla, tekrar edilebilirlik analizleri yapılmalıdır. Tekrar edilebilirlik % 20'nin ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik % 25'in altında olmalıdır. Bu, kör ve geri kazanım düzeltilmesinden sonra hesaplanan BEQ olarak ifade edilen seviyelere dayandırılmalıdır.

7.4.2. Geçerli kılma işleminin bir parçası olarak, analize karşılık gelen eşik değerinin üstündeki numunelerin tanımlanmasına olanak sağlamak üzere; eşik değerindeki bir seviye ile bir kör numuneyi ayırt edebileceği gösterilmelidir. [Madde 7.1.2].

7.4.3. Hedef bileşikler, olası girişim yapan bileşikler ve maksimum tolere edilebilir kör seviyeler tanımlanmalıdır.

7.4.4. Numune ekstraktının üçlü tekrerrüt analizinde elde edilen yanıtların (sadece çalışma aralığında) veya yanıtlardan hesaplanan konsantrasyonların standart sapma yüzdesi % 15'in üzerinde olmamalıdır.

7.4.5. BEQ (kör ve maksimum limit veya müdahale seviyesi) olarak ifade edilen referans numune(lerin)nin düzeltilmemiş sonuçları, belirli bir zaman aralığında biyoanalitik metodun performansının değerlendirilmesi için kullanılmalıdır.

7.4.6. Her tip referans numune ve prosedür körleri için kalite kontrol (QC) grafikleri, analitik performansın gerekliliklerini karşıladığından emin olmak için (özellikle prosedür körleri için çalışma aralığının en düşük seviyesi ile istenilen minimum fark açısından ve referans numuneler için laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik açısından) kayıt ve kontrol edilmelidir. Hesaplama çıkarıldığında, hatalı-uygun sonuçları önlemek için prosedür körleri çok iyi kontrol edilmelidir.

7.4.7. Uygun numunelerin % 2-10'undan elde edilen sonuçlar (her matriks için en az 20 numune) ve şüpheli numunelerin doğrulama metodlarından elde edilen sonuçlar toplanmalı; tarama metodlarının performansını ve BEQ ile TEQ arasındaki ilişkiyi hesaplamak için kullanılmalıdır. Bu veri tabanı, geçerli kılınmış matrikslerde rutin numunelere uygulanabilir eşik değerlerinin yeniden hesaplanması için kullanılabilir.

7.4.8. Başarılı metod performansı, ring deneylerine katılımla gösterilmiş de olabilir. Eğer bir laboratuvar ring deneylerinde başarı performansını gösterebilirse; maksimum limitin iki katına kadar ulaştığı bir konsantrasyonu kapsayan numunelerden elde edilen analiz sonuçları, yanlış-uyumlu oranının değerlendirilmesine de dahil edilebilir. Numuneler, değişik kaynakları temsil eden en sık türdeş bileşen dağılımını kapsamalıdır.

7.4.9. Olaylar sırasında eşik değerleri söz konusu olayın spesifik matriks ve türdeş bileşenlerini yansıtacak şekilde yeniden değerlendirilebilir

8. Sonuçların raporlanması

8.1. Doğrulama metodları

8.1.1. Kullanılan analitik prosedür elverdiği ölçüde, sonuçların raporlanmasında maksimum bilgiyi içermesi ve dolayısıyla özel hükümlere göre sonuçların yorumlanabilmesine imkan sağlamak için analitik sonuçlar her bir PCDD/F, dioksin benzeri PCB türdeş bileşenlerinin seviyelerini içermeli; alt-sınır, üst-sınır ve orta-sınır olarak rapor edilmelidir.

8.1.2. Raporda PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri PCB'lerin ekstraksiyonu için kullanılan metod yer almalıdır.

8.1.3. Her bir iç standardın geri kazanımı; geri kazanımlar Madde 6.2.5'de bahsedilen aralık dışında olduğunda, maksimum limit aşıldığında (bu durumda, iki analizin biri için geri kazanımlar) ve başka durumlarda talep edilmesi halinde belirtilmelidir.

8.1.4. Numunenin uygunluğu hakkında karar verileceği zaman ölçüm belirsizliği dikkate alınacağı için, bu parametre de belirtilmelidir. Dolayısıyla, analitik sonuçlar $x \pm U$ şeklinde raporlanmalıdır. Burada (x) analitik sonuç ve (U) ise kapsama faktörü olarak yaklaşık % 95'lik güven aralığını veren "2" katsayısının kullanıldığı genişletilmiş ölçüm belirsizliğini ifade eder. PCDD/F'lerin ve dioksin benzeri PCB'lerin ayrı ayrı tespit edilmesi durumunda; PCDD/F'lerin ve dioksin benzeri PCB'lerin ayrı ayrı analitik sonuçlarından hesaplanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği toplamı PCDD/F'lerin ve dioksin benzeri PCB'lerin toplamı için kullanılmalıdır.

8.1.5. Ölçüm belirsizliği CC α karar limiti uygulanarak [Kısım B'nin Bölüm I'nin 2.2'sinde tanımlandığı üzere] hesaplanırsa, bu parametre raporlanmalıdır.

8.1.6. Sonuçlar, Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'nde belirtilen maksimum limitlerin birimi ile aynı birimlerde ve aynı ondalık basamağında ifade edilmelidir

8.2. Biyoanalitik tarama metodları

8.2.1. Tarama sonuçları uygun ya da uygunsuz olmasından şüphe edilen (şüpheli) olarak açıklanmalıdır.

8.2.2. İlave olarak PCDD/PCDF'ler ve/veya dioksin benzeri PCB'ler için BEQ cinsinden ifade edilen (ve TEQ cinsinden ifade edilmeyen) bir sonuç verilebilir

8.2.3. Raporlama limitinin altında bir yanıt veren numuneler, raporlama limitinden daha düşük olarak açıklanmalıdır .

8.2.4. Her bir numune matriksi için; rapor, değerlendirmenin esas tutulduğu maksimum limit veya müdahale seviyesini belirtmelidir

8.2.5. Rapor uygulanan analiz tipi, temel analiz prensibi ve kalibrasyon çeşidinden bahsetmelidir .

8.2.6. Raporda PCDD/PCDF'ler ve dioksin benzeri PCB'ler için kullanılan ekstraksiyon metodu belirtilmelidir .

8.2.7. Uygunsuz olduğundan şüphelenilen numuneler için, yapılması gereken işlem her ne ise raporda yer almalıdır. Yüksek seviyelere sahip numunelerdeki PCDD/F ler ve PCDD/F ler ile dioksin benzeri PCB lerin konsantrasyonları doğrulama metodu ile tespit edilmeli ve doğrulanmalıdır.

BÖLÜM III

Dioksin Benzeri Olmayan PCB'lerin (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180) Seviyesinin Kontrolünde Kullanılan Analiz Metodları İçin Gereklilikler ve Numune Hazırlama Usul ve Esasları

1. Uygulama alanı

Bu Bölümde belirtilen gereklilikler, yemin dioksin benzeri olmayan PCB'lerin resmi kontrolü ve diğer yasal amaçlarla analiz edildiği durumlarda geçerli olacaktır.

2. Uygulanabilir tespit metodları

Gaz kromatografi/Elektron Yakalayıcı Dedektör (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS veya denk metodlar.

3. Aranan analitlerin teşhis ve doğrulaması

3.1. İç standartlar veya referans standartlara göre olarak bağlı alıkonulma zamanı (+/- % 0,25 kabul edilebilir sapmayla).

3.2. Numunelerin seviyeleri yasal limitler aralığında olduğunda veya uygunsuz olup olmadığı doğrulanacaksa, toplam altı adet indikatör PCB'lerin tamamı (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 ve PCB 180) girişim yapan bileşiklerden özellikle de birbirlerinden ayrılmadan gelen PCB'lerden gaz kromatografik ayrımı (Birbirlerinden ayrılmadan gelen türdeş bileşenler, genellikle, PCB 28/31, PCB 52/69 ve PCB 138/163/164 olarak bulunur. GC-MS için yüksek klorlu türdeş bileşenlerin fragmentlerinden gelebilecek muhtemel girişimler de göz önünde bulundurulmalıdır.).

3.3. GC-MS teknikleri için

En az aşağıdakilerin izlenmesi:

- HRMS için iki spesifik iyon;
- LRMS için $m/z > 200$ 'iki spesifik iyon veya $m/z > 100$ üç spesifik iyon
- MS-MS için 1 öncü ve 2 ürün iyonu.

Seçilmiş kütle parçalarının mevcudiyet oranları için izin verilen maksimum toleranslar:

Seçilmiş kütle fragmentlerinin mevcudiyet oranının teorik mevcudiyetten bağıl sapması veya hedef iyon (izlenen iyonlardan en çok bulunan) ve niteleyici iyon(lar) için kalibrasyon standardı:

Hedef iyonla karşılaştırılan niteleyici iyonun/yonların bağıl yoğunluğu	GC-EI-MS (bağıl sapma)	GC-CI-MS, GC-MS ^a (bağıl sapma)
> % 50	± % 10	± % 20
> % 20 ila % 50	± % 15	± % 25
> % 10 ila % 20	± % 20	± % 30
≤ % 10	± % 50(*)	± % 50(*)
(*)Bağıl yoğunluğu % 10'dan yüksek olan kütle fragmentlerinin yeterli sayısı. Bu nedenle hedef iyon ile karşılaştırılan % 10'dan daha düşük bağıl yoğunluğa sahip niteleyici iyonların kullanılması önerilmemektedir.		

3.4. GC-ECD tekniklerine ilişkin gereklilikler

Tolerans düzeyini aşan sonuçlar farklı polariteye sahip iki sabit fazlı GC kolonu kullanılarak doğrulanmalıdır.

4. Metot performansının gösterilmesi

Metodun yürütülmesi maksimum limit aralığında (maksimum düzeyin 0,5 ila 2 katı) tekrarlanan analiz için kabul edilebilir bir varyasyon katsayısıyla geçerli kılınmalıdır (orta seviyede kesinlik için gereklilikler için 9'a bakınız).

5. Ölçüm Limiti

Kör değerler maksimum limite karşılık gelen bulaşan seviyesinin % 30'undan daha yüksek olmamalıdır (¹⁷).

6. Kalite kontrol

Düzenli kör kontroller, standart eklenmiş numunelerin analizi, kalite kontrol numuneleri, ilgili matrislere ilişkin laboratuvarlar arası çalışmalara katılım.

7. Geri kazanımların kontrolü

7.1. Aranılan analitlerle karşılaştırılabilen fizikokimyasal özelliklerle birlikte uygun iç standartlar kullanılmalıdır.

7.2. İç standartların eklenmesi:

Ürünlere ekleme (ekstraksiyon ve clean-up işleminden önce).

7.3. Altı adet izotop etiketli indikatör PCB türdeş bileşenleri kullanan metotlara ilişkin gereklilikler:

a) İç standartların geri kazanımlarına göre sonuçlar düzeltilmelidir.

b) izotop etiketli iç standartların geri kazanımları % 50 ila % 120 arasında olmalıdır.

c) Altı adet indikatör PCB'lerin toplamına % 10'dan az katkı sağlayan her bir türdeş bileşen için daha düşük veya daha yüksek geri kazanımlar kabul edilebilir.

(¹⁷). Numundeki bir bulaşanın seviyesine kimyasal kör seviyesinin katılmasının olabildiğince düşük olması önerilir. Özellikle de kör seviyelerinin çıkarıldığı durumlarda, kör seviyelerindeki varyasyonun kontrolü, laboratuvarın sorumluluğundadır.

7.4. Altı adet izotop-işaretlenmiş iç standartların hepsini kullanmayan veya başka iç standartlar kullanan metotlar için gereklilikler:

- a) İç standart(lar)ın geri kazanımı her numune için kontrol edilmelidir,
- b) İç standart(lar)ın geri kazanımı % 60 ila % 120 arasında olmalıdır,
- c) İç standartların geri kazanımları için sonuçlar düzeltilmelidir.

7.5. İşaretlenmemiş türdeş bileşenlerin geri kazanımları, maksimum limit aralığındaki konsantrasyonlara sahip kalite kontrol numuneleri ya da standart eklenmiş numunelerle kontrol edilmelidir. Bu türdeş bileşenler için kabul edilebilir geri kazanımlar % 70-120 arasındadır.

8. Laboratuvarlara ilişkin gereklilikler

Laboratuvarlar, Gıda ve Yemin Resmi Kontrollerine Dair Yönetmeliğinde laboratuvarlar için belirtilen hükümlere uymak zorundadır.

9. Performans karakteristikleri: İlgilenilen seviyedeki altı adet indikatör PCB'ler toplamı için kriter

10. Sonuçların raporlanması

10.1. Kullanılan analitik prosedür elverdiği ölçüde, sonuçların raporlanmasında maksimum bilgiyi içermesi ve dolayısıyla özel hükümlere göre sonuçların yorumlanabilmesine imkan sağlamak için analitik sonuçlar her bir PCB türdeş bileşenlerinin seviyelerini içermeli; alt-sınır, üst-sınır ve orta-sınır olarak rapor edilmelidir.

10.2. Rapor, PCB'lerin ve yağların ekstraksiyonu için kullanılan metodu da içermelidir.

10.3. Geri kazanımların 7'de bahsedilen aralık dışında olması durumunda, maksimum limitin aşılması durumunda ve isteğe bağlı diğer bütün durumlarda her bir iç standardın geri kazanımı belirtilmelidir.

10.4. Numunenin uygunluğuna karar verirken ölçüm belirsizliği dikkate alındığı için, bu parametre de belirtilmelidir. Bu nedenle, analitik sonuçlar $x \pm U$ olarak raporlanır. Burada x analitik sonucu, U ise kapsama faktörü olarak yaklaşık % 95'lik bir güven aralığını veren "2" katsayısının kullanıldığı, genişletilmiş ölçüm belirsizliğini ifade eder.

10.5. Eğer ölçüm belirsizliği karar limiti (CC α) uygulayarak [Kısım B'nin Bölüm I'nin 2.1'inde tanımlandığı üzere] hesaba katılıyorsa, bu parametre rapor edilmelidir.

10.6. Sonuçlar, Yemlerde İstenmeyen Maddeler Tebliği'nde belirtilen maksimum limitlerin birimi ile aynı birimlerde ve aynı ondalık basamağında ifade edilmelidir.

Gerçeklik	- % 30 ila + % 30
Orta seviyede kesinlik (% RSD)	$\leq$ % 20
Üst ve alt sınır hesaplaması arasındaki fark	$\leq$ %20

YEMLERDE HAYVANSAL BİLEŞENLERİN TESPİTİNE YÖNELİK ANALİZ METOTLARI

1. HEDEF VE KAPSAM

Hayvan orijinli birleşenlerin tespit edilmesi, ışık mikroskopi veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile bu Ek'te yer alan hükümlere uygun olarak yapılacaktır.

Bu iki metot, yem maddeleri ve karma yemlerde, hayvansal orijinli birleşenlerin varlığını tespit etmeyi amaçlar. Ancak bu metotlarla, yem maddeleri ve karma yemlerde bu tür birleşenlerin miktarı hesaplanamaz. Her iki metodun da tespit limiti % 0,1(w/w)'in altındadır.

PCR metodu, yem maddeleri ve karma yemlerde bulunan hayvan orijinli birleşenlerin taksonomik grubunu tanımlamayı sağlar.

Bu metotlar, 24/12/2011 tarih ve 28152 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan İnsan Tüketimi Amacıyla Kullanılmayan Hayvansal Yan Ürünler Yönetmeliğinin 8 inci maddesi ve 24/11/2011 tarih ve 28152 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Yemlerin Piyasaya Arzı ve Kullanımı Hakkında Yönetmeliğin EK-2'sinde yer alan yasaklamaların kontrolünde uygulanacaktır.

Analiz edilen yem çeşidine bağlı olarak bir tek operasyonel protokol içerisinde, yem maddelerindeki hayvansal proteinlere yönelik AB referans laboratuvarınca (EURL-AP) oluşturulan ve sitesinde yayımlanan standart çalışma prosedürleri (SOP)'ne uygun olarak, kendi başına veya kombine olarak bu metotlar kullanılabilir.⁽¹⁸⁾

2. METOTLAR

2.1. Işık Mikroskopi

2.1.1 Prensip

Analiz için gönderilen, yem maddeleri ve karma yemlerde mevcut olan hayvansal orijinli birleşenleri, kas lifleri ve diğer et parçaları, kırkırdak, kemik, boynuz, tüy, kıl, kan, kanat, yumurta kabuğu, balık kılıcı ve iskeleti gibi tipik ve mikroskobik olarak ayırt edilebilen özelliklere göre tanımlanır.

2.1.2. Reaktifler ve Ekipman

2.1.2.1. Reaktifler

2.1.2.1.1. Konsantre Edici Ajanlar

2.1.2.1.1.1. Tetrakloroetilen (özellik 1,62)

2.1.2.1.2. Boya Reaktifleri

2.1.2.1.2.1. Alizarin Kırmızı (Red) Çözelti (2,5 ml 1M hidrolik asit, 100 ml su ile seyreltilir ve bu çözeltiye 200 mg Alizarin (Red) Kırmızı eklenir.)

2.1.2.1.3. Kapatma ortamı

2.1.2.1.3.1. Lye (NaOH 2,5 % w/v or KOH 2,5 % w/v)

2.1.2.1.3.2. Gliserol (seyreltilmemiş, viskozite 1 490 cP)

⁽¹⁸⁾ <http://eurl.craw.eu/>

2.1.2.1.3.3. Norland ® Optik Yapıştırıcı 65 (viskozite: 1 200 cP) veya kalıcı preparat hazırlamak için muadili bir reçine

2.1.2.1.4. Boyama özelliği olan Kapatma ortamı

2.1.2.1.4.1. Lugol solüsyon (2 g potasyum iodide 100 ml su ile çözülür ve sürekli çalkalayarak 1 g iodine eklenir.)

2.1.2.1.4.2. Sistin reaktif (10 g NaOH, 100 ml su ile çözülür, çözeltiye 2 g kurşun asetat eklenir)

2.1.2.1.4.3. Fehling reaktifi (A ve B' stok çözeltilerinden 1/1 oranında kullanım öncesi hazırlanır. Çözelti A: 100 ml suda 6,9 g demir (II) sülfat pentahidrat çözülür. Çözelti B: 34,6 g potasyum sodium tartarat tetrahidrat ve 12 g NaOH 100 ml suda çözülür.).

2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidin/Hidrojen peroksit. (1 g 3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB) 100 ml buzlu glacial asetik asit ve 150 ml suda çözülür. Kullanım öncesi, 4 kısım TMB çözeltisi, 1 kısım % 3 hidrojen peroksit çözeltisi ile karıştırılır.)

2.1.2.1.5. Yıkama reaktifi

2.1.2.1.5.1. Etanol > 96 % (teknik derecede)

2.1.2.1.5.2. Aseton (teknik derecede)

2.1.2.1.6. Ağartıcı reaktif

2.1.2.1.6.1. Ticari sodyum hipoklorit solüsyon (% 9 - 14 aktif klorin)

2.1.2.2. Ekipman

2.1.2.2.1. 0,001 g Hassasiyette analitik terazi

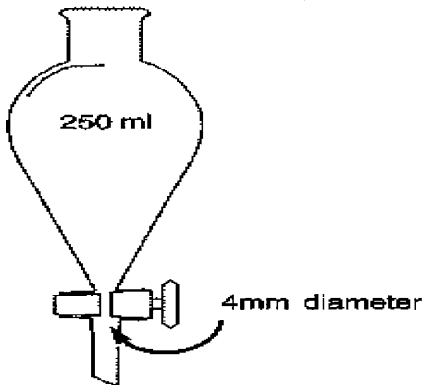
2.1.2.2.2. Öğütücü ekipman: havan-değirmen

2.1.2.2.3. 0,25 mm ve 1 mm'lik kare gözenekli elek

2.1.2.2.4. Yuvarlak cam valfli, 250 ml Teflon içerikli, konik cam ayırma hunisi. Valfin açılma çapı ≥ 4 mm.

Tespit düzeylerinin konik cam ayırma hunisi kullanılarak elde edilen düzeylere denk olduğunun laboratuvarca ortaya konulması şartıyla konik tabanlı çöktürme beheri de kullanılabilir.

Ayırma hunisi



2.1.2.2.5. En az 6,5X - 40X nihai büyütme oranına sahip stereomikroskop

2.1.2.2.6. En az 100X - 400X nihai büyütme oranına sahip bright field mikroskobu. Polarize ışık ve farklı girişim kontrastlığı ayrıca eklenebilir.

2.1.2.2.7. Standart laboratuvar cam malzemeleri

2.1.2.2.8. Preparat hazırlığı için ekipman: klasik mikroskop lamı, çukur lamlar, lamel (20 × 20 mm), pensler, ince spatul

2.1.3. Numune alımı ve hazırlanması

2.1.3.1. Numune alımı

EK-1'de belirtilen metoda göre alınan numune kullanılmalıdır.

2.1.3.2. Alınması gereken önlemler

Laboratuvarda çapraz kontaminasyondan kaçınmak amacıyla, yeniden kullanılabilir tüm ekipman, kullanım öncesi dikkatlice temizlenmelidir. Ayırma hunisi parçaları ve cam malzemeler elle yıkanmalı ve sonrasında bulaşık makinesinde yıkanmalıdır. Elekler, sert sentetik kıllı fırçalar yardımıyla temizlenmelidir. Eleklerin nihai olarak temizlenmesi, asetonla yapılmalıdır ve balık ununa benzer yağlı materyallerin elekten geçirilmesi sonrası, sıkıştırılmış hava ile temizlenmesi tavsiye edilir.

2.1.3.3. Yağlar dışında numune hazırlığı

2.1.3.3.1. Numune Kurutma: nem içeriği > % 14'ten fazla olan numuneler işleme başlamadan önce kurutulmalıdır.

2.1.3.3.2. Numunenin elekten geçirilmesi: Pelet ve taneli yemlerin 1 mm. lik elekten ön eleme yapılması ve elek altı ile elek üstü kısımların ayrı ayrı çalışılması tavsiye edilir.

2.1.3.3.3. Alt-numune ve öğütme: Analiz için en az 50 g alt-numune alınmalı ve sonrasında öğütülmelidir.

2.1.3.3.4. Ekstraksiyon ve sediment hazırlığı: Öğütülmüş alt-numunesinin 10±0,01 gr'lık kısmı ayırma hunisine alınır ve 50 ml tetrakloroetilen eklenir. Huniye alınan miktar, balık unu veya % 10'dan fazla sediment oluşturan mineral katkıları veya premiksler diğer saf hayvan ürünleri olması durumunda 3 g ile sınırlı olmalıdır. Karışım, kuvvetli bir şekilde en az 30 sn. kadar çalkalanmalıdır. Çalkalama esnasında huninin iç yüzeyine yapışan paracıklar, sonradan eklenecek en az 50 ml. daha tetrakloroetilen ile sıvı içine indirilir. Karışım, sediment ayrılması için tupa açılmadan en az 5 dakika beklemeye bırakılmalıdır.

Sediment kurutulmalı ve sonrasında tartılmalıdır (0,001 g hassasiyetle) Sedimentin % 5'inden fazlası > 0,50 mm parçacıklardan oluşuyor ise, 0,25 mm elenmeli ve iki sonuç fraksiyonu incelenmelidir.

2.1.3.3.5. Ekstraksiyon ve flotat hazırlığı: Sediment, yukarıda belirtilen metotlara tabi olduktan sonra, ayırma hunisinde iki faz kalmalıdır: tetrakloroetilden oluşan sıvı olan faz ve flotat materyalden oluşan katı olan faz. Bu katı faz flotattır ve tıpanın açılmasıyla huniden gelen tetrakloroetilen tamamıyla temizlenmesiyle yerine getirilmelidir. Ayırma hunisini ters-yüz ederek, flotat parça geniş bir Petri kabına alınır ve buhar yolu ile hava kurutması yapılır. Eğer flotat parçanın % 5'i > 0,50 mm'den daha fazla ise, 0,25 mm'de elenmeli ve sonuç veren iki fraksiyon incelenmelidir.

2.1.3.3.6. Ham materialin hazırlanması: Öğütülmüş alt-numunesinin en az 5 g'ının parçası hazırlanmalıdır. Eğer numenin % 5'i > 0,50 mm parçalardan oluşuyor ise, 0,25 mm'de elenmelidir ve oluşan iki fraksiyon tetkik edilmelidir.

2.1.3.4. Yağlardan oluşan numunelerin hazırlanması

Yağlardan oluşan numunelerin hazırlanması için aşağıdaki protokol takip edilmelidir:

- Eğer yağ katı ise, sıvılaştırmaya kadar ısıtılmalıdır.
- Bir pipet kullanarak, 40 ml.'lik yağ, numunenin dibinden bir santrifüj tüpüne aktarılmalıdır.

- 4 000 r.p.m.'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmelidir.
- Eğer yağ santrifüj sonrası katı ise, sıvılaştırıncaya kadar ısıtılmalıdır.
- 4 000 r.p.m.'de 5 dakika boyunca santrifüjü tekrarlayınız.
- Küçük bir kaşık veya spatula kullanarak, çökeltinin yarısı lamalara tetkik için alınmalıdır; Kapatıcı ortam olarak gliserol kullanılması tavsiye edilmektedir.
- Kalan çökeltilde, 2.1.3.3. bendinde belirtildiği şekilde sedimentin hazırlanması için kullanılmalıdır.

2.1.3.5. Boyama reaktifleri

Analist, hayvansal orijinli doğru tanımlamaları kolaylaştırmak amacıyla, numunelerin hazırlanması esnasında boyama reaktiflerini EURL-AP tarafından onaylanan ve sitesinde yayınlanan rehberde uygun olarak kullanabilir.

Alizarin Red çözeltisi, sediment renklendirmesi için kullanılması durumunda aşağıdaki protokol uygulanacaktır:

- Kurutulmuş sediment cam bir test tüpüne aktarılmalı ve yıkama işlemi yaklaşık 5 ml etanol ile 2 kez tekrarlanmalıdır. (Her seferinde 30 saniyelik vorteks kullanılmalı; solventin 1,5 dakika durulması beklenmeli ve boşaltılmalıdır.)
- Sediment, en az 1 ml. sodium hipoklorit solüsyon ekleyerek ağartılmalıdır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklenmelidir. Test tüpü, su ile doldurulmalı, sediment 2-3 dakika su ile bekletilmeli, su ve yüzen parçacıklar nazikçe dökülerek boşaltılmalıdır.
- Sediment, 10 ml. su ile en az iki kere daha yıkanmalıdır. (En az 30 sn vortekslenmeli, çökmesi beklenmeli, yıkama suyu boşaltılmalıdır.
- 2 ile 10 damla arasında Alizarin Red çözeltisi eklenmeli ve karışım vortekslenmelidir. Reaksiyonun oluşması için 30 saniye beklenmeli ve boyanmış sediment, yaklaşık 5 ml. etanol ile iki kere yıkanmalı, daha sonra bir defa aseton ile yıkanmalıdır. En az 30 sn vortekslenmeli, 1 dakika beklenmeli, solvent boşaltılmalıdır.
- Boyanmış sediment kurutulmalıdır.

2.1.4. Mikroskopik

2.1.4.1. Preparat Hazırlığı

Mikroskobik Preparatlar, sedimentten hazırlanmalı ve analistin tercihi göre flotat veya ham materyal halinde olmalıdır. Numune hazırlanmasında eleme yapıldığında elek altı ve elek üstü fraksiyonlardan ayrı ayrı hazırlanmalıdır. Preparatlar üzerine yayılan fraksiyonların test parçaları, tüm fraksiyonu temsil etmelidir. 2.1.4.2. bendinde yer alan tüm inceleme prosedürünün yerine getirildiğinden emin olmaya yetecek kadar preparat hazırlanmalıdır.

Preparatlar, EURL-AP tarafından oluşturulan ve sitesinde yayınlanan SOP'e uygun kapatıcı ortam kullanılarak lamelle kapatılmalıdır.

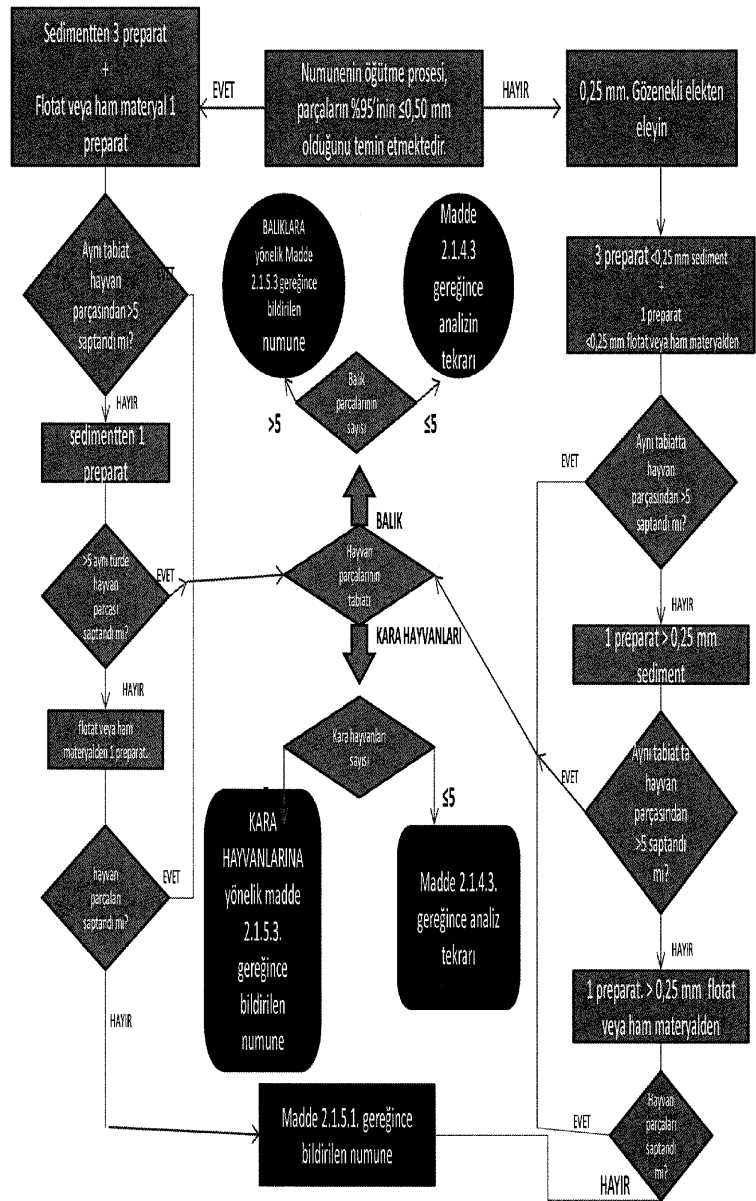
2.1.4.2. Karma yem ve yem maddelerinde hayvansal orijinli bileşenlerin tetkiki için gözlem protokolleri hazırlanan Preparatlar, karma yem ve yem maddelerinde (balık unu hariç) Şekil-1'de ve balık unu için ise Şekil-2'de verilen gözlem protokollerine uygun olarak incelenmelidir.

Mikroskobik incelenmeler compound mikroskop kullanılarak analistin ihtiyacına göre sediment, flotat veya ham materyalden yapılabilir. Büyük fraksiyonlar için Stereomikroskop, compound mikroskoba ilaveten kullanılabilir. Her preparat, farklı büyütmeye oranlarında taranmalıdır.

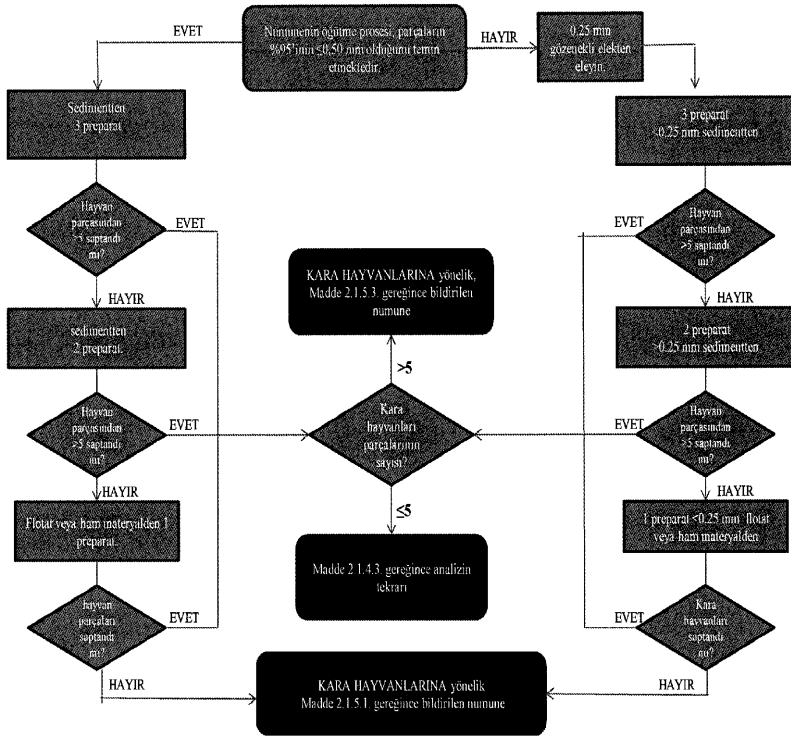
Tüm fraksiyon materyalleri, şart koşulan preparat sayısına ulaşmaya yeterli değilse gözlem protokollerinin her bir basamağında minimum sayıda preparat zorunlu olarak incelenmelidir. Tanımlama için en fazla 6 preparat incelenmelidir.

Analist, parçacıkların tabiatı ve orijininin tanımlanmasını kolaylaştırmak amacıyla, karar destek sistemi, doku kütüphanesi ve referans örnek gibi destek araçlarını kullanabilir.

Şekil- 1 Balık unu hariç, karma yem ve yem materyallerinde hayvansal orjinli bileşenlerin saptanmasına yönelik gözlem protokolü



Şekil- 2 Balık unundaki hayvansal bileşenlerin saptanmasına yönelik gözlem protokolü



2.1.4.3. Tespit Sayısı

Şekil-1 ve Şekil-2'de belirtilen gözlem protokollerine göre yapılan ilk tespiti müteakip belirli bir yapıda hayvan parçası tespit edilmez ise (örn. Kara hayvanları veya balık), ek çalışmaya gerek yoktur ve analiz sonuçları, 2.1.5.1. bendinde yer alan terminoloji kullanılarak raporlandırılmalıdır.

Şekil-1 ve Şekil-2'de belirtilen gözlem protokollerine uygun yapılan ilk tespiti müteakip belirli bir yapıda hayvan parçası (örn. kara hayvanları veya balık), 1'den 5'e kadar derecelerde tespit edilirse; ikinci tespit yeni bir 50 g alt numunesinden başlayarak yapılmalıdır. Eğer bu ikinci tespit sonrası belirli bir yapıda hayvan parçaları, 0'dan 5'e kadar derecelerde tespit edilirse; analiz sonuçları 2.1.5.2 bendinde yer alan terminoloji kullanılarak raporlandırılır; bunun dışında üçüncü tespit yeni bir 50 g'lık alt-numuneden yapılmalıdır. Ancak yine de, ilk ve ikinci tespit sonrası iki tespit üzerinden belirli bir yapıda parçaların toplamı 15'ten fazla ise, ilave bir tespit gerekmez ve analiz sonucu 2.1.5.3.bendinde belirtilen terminoloji kullanılarak direkt raporlandırılmalıdır. Üçüncü tespit sonrası belirli bir yapıda hayvan parçalarının toplamı 15'ten fazla ise; analiz sonuçları 2.1.5.3. bendinde yer alan terminoloji kullanılarak raporlandırılmalıdır. Aksi takdirde, analiz sonuçları 2.1.5.2.bendinde belirtilen terminoloji kullanılarak raporlandırılmalıdır.

Şekil 1 - Şekil 2 deki gözlem protokolüne göre ilk determinasyonda 5 ten fazla hayvan parçası (kara hayvanı veya balık) tespit edilmişse analiz sonuları 2.1.5.3 teki terminoloji kullanılarak raporlandırılır.

2.1.5. Sonuçların Açıklanması

Sonuçlar raporlandırılırken, laboratuvar, hangi çeşit materyal üzerinde (sediment, flotat veya ham materyal) analizlerin gerçekleştirilmiş olduğunu ve kaç adet determinasyonun yapılmış olduğunu belirtmelidir.

Laboratuvar raporu, en azından kara hayvanları veya balıktan elde edilen tamamlayıcıların mevcutluğu ile ilgili bilgi vermelidir.

Farklı durumlar, aşağıdaki yollarda raporlandırılmalıdır:

2.1.5.1. Belirli bir yapıda hayvan parçaları tespit edilememiş ise:

- Analiz edilen numunede, ışık mikroskobu kullanarak gözle görülebildiği kadarıyla kara hayvanlarına ait bileşen tespit edilememiştir.
- Analiz edilen numunede, ışık mikroskobu kullanarak gözle görülebildiği kadarıyla balıklara ait bileşen tespit edilememiştir.

2.1.5.2 Belirli bir yapıda hayvansal orjinli bileşen sayısı 1 ile 5 arasında tespit edilmiş ise:

- Verilen numunede ışık mikroskobu kullanarak gözle görülebildiği kadarıyla kara hayvanlarından, her determinasyon için ortalama 5 parçadan daha fazla parça tespit edilememiştir. Parçalar şu şekilde tanımlanır (kemik, kırıldak, kas, saç, boynuz...vb.) Bu düşük seviyenin varlığı, mikroskobik metotta tespit limitinin altında olması, yanlış pozitif sonuç riskinin olabileceği göz ardı edilmemelidir.

veya, yukarıdaki gibi,

- Verilen numunede ışık mikroskobu kullanarak gözle görülebildiği kadarıyla balıklardan, her determinasyon için ortalama 5 parçadan daha fazla parça tespit edilememiştir. Parçalar şu şekilde tanımlanır. (Balık kılığı, balık iskeleti, kırıldak, kas, otolit, solungaç) Bu düşük seviyenin varlığı, mikroskobik metotta tespit limitinin altında olması, yanlış pozitif sonuç riskinin olabileceği göz ardı edilmemelidir.
- Yalnızca elenerek yapılan fraksiyonda hayvan parçalarının tespiti çevresel kontaminasyonlarla işaret olabileceğinden, ön-eleme durumunda, laboratuvar raporu, hangi fraksiyonda (elenen fraksiyon, taneli fraksiyon) hayvan parçalarının tespit edilmiş olduğunu belirtmelidir.

2.1.5.3. Belirli bir yapıda ortalama 5 hayvan parçasından daha fazlası tespit edilmiştir:

- Işık mikroskop kullanarak gözle görüldüğü üzere; kara hayvanlarından, verilen numunede her determinasyon için ortalama 5 parçadan daha fazla parça elde edilir. Bu parçalar şu şekilde tanımlanmıştır: [kemik, kırıldak, kas, saç, boynuz...]

Verilen numunede ışık mikroskobu kullanarak gözle görülebildiği kadarıyla kara hayvanlarından, her determinasyon için ortalama 5 parçadan daha fazla parça tespit edilmiştir. Parçalar şu şekilde tanımlanır (kemik, kırıldak, kas, saç, boynuz...vb.)

veya, yukarıdaki gibi

- Verilen numunede ışık mikroskobu kullanarak gözle görülebildiği kadarıyla balıklardan, her determinasyon için ortalama 5 parçadan daha fazla parça tespit edilmiştir. Parçalar şu şekilde tanımlanır (balık kılığı, balık iskeleti, kırıldak, kas, otolit, solungaç.)

Yalnızca elenerek yapılan fraksiyonda hayvan parçalarının tespiti çevresel kontaminasyonların işaret olabileceğinden, ön-eleme durumunda, laboratuvar raporu, şimdiye kadar hangi fraksiyonda (elenen fraksiyon, taneli veya çekirdek içi fraksiyon) hayvan parçalarının tespit edilmiş olduğunu belirtmelidir.

2.2. PCR

2.2.1. Prensip

Yem maddeleri ve karma yemlerdeki hayvan orijinli Deoksiribonukleik asit (DNA) fragmanlarındaki hedeflenen türe özgü spesifik DNA sekanslarının, PCR tekniği ile çoğaltılarak tespit edilmesidir.

PCR metodunda ilk olarak DNA ekstraksiyon basamağına gerek vardır. Elde edilen DNA ekstraktına analizde hedeflenen hayvan türlerini tetkik etmek amacıyla çoğaltma basamağı uygulanmalıdır

2.2.2. Reaktifler ve Ekipmanlar

2.2.2.1. Reaktifler

2.2.2.1.1. DNA ekstraksiyon basamağı için reaktifler

Yalnızca EURL-AP tarafından onaylanan ve internet sitesinde yayınlanmış olan reaktifler kullanılmalıdır.

2.2.2.1.2. DNA çoğaltma basamakları için reaktifler

2.2.2.1.2.1. Primer ve Problar

Yalnızca EURL-AP tarafından valide edilen oligonükleotid dizilime sahip Primer ve Problar kullanılmalıdır. ⁽¹⁹⁾

2.2.2.1.2.2. Master Miks

Yalnızca hayvansal DNA varlığından dolayı yanlış sonuçlara neden olabilecek reaktifleri içermeyen master miksler kullanılmalıdır.⁽²⁰⁾

2.2.2.1.2.3. Dekontaminasyon reaktifleri

2.2.2.1.2.3.1. Hidroklorik asit çözeltisi (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Ağartıcı (% 0,15 aktif klor içeren sodyum hipoklorit çözeltisi)

2.2.2.1.2.3.3. Analitik teraziler gibi pahalı cihazların dekontaminasyonu için aşındırıcı olmayan reaktifler (örn. MP Biomedicals marka DNA Erase™)

2.2.2.2. Ekipman

2.2.2.2.1. 0,001 g doğrulukta analitik terazi

2.2.2.2.2. Ögütücü

2.2.2.2.3. Real-time PCR

2.2.2.2.4. Mikrosantrifüj

2.2.2.2.5. 1 - 1 000 µl hacimli mikropipet seti

2.2.2.2.6. Standart moleküler biyoloji sarf malzemeleri; mikrofüj tüpleri, filtreli mikro pipet uçları, real time PCR plakaları

2.2.2.2.7. Numune ve reaktifleri depolama amaçlı dondurucular

2.2.3. Numune alma ve Numunenin Hazırlanması

2.2.3.1. Numune alma

⁽¹⁹⁾ Analizde hedeflenen, her hayvan türü için primerlerin ve problemlerin listesi EURL-AP websitesinde bulunmaktadır..

⁽²⁰⁾ Fonksiyonel olan master miks örnekleri EURL-AP websitesinden bulunmaktadır..

Yemlerin Resmî Kontrolü İçin Numune Alma Ve Analiz Metotlarına Dair Yönetmeliğin EK-1’de belirtilen metoda göre alınan numune kullanılmalıdır.

2.2.3.2. Numunenin hazırlanması

DNA ekstraksiyonuna kadar laboratuvar numunelerinin hazırlanması, EK-2’de yer alan şartlara uygun olmalıdır. Analiz için en az 50 g alt numune alınarak öğütülür.

Numune hazırlığı, ISO 24276 da belirtildiği gibi PCR hazırlık odası ve DNA ekstraksiyon odalarından farklı bir odada yapılmalıdır.

Her numune en az 100 mg lık iki paralel olarak hazırlanmalıdır.

2.2.4. DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu, EURL-AP tarafından oluşturulan ve internet sitelerinde yayınlanan SOP’ler (Standart çalışma prosedürleri-SÇP) kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

ISO 24276 da belirtildiği gibi, her ekstraksiyon serisi için iki ekstraksiyon kontrolü hazırlanmalıdır.

- Ekstraksiyon negatif kontrol,
- Ekstraksiyon pozitif kontrol

2.2.5. Genetik amplifikasyon

Genetik çoğaltma, tanımlanması gereken her tür için valide edilmiş metotlar kullanarak gerçekleştirilmelidir. Bu metotlar, EURL-AP tarafından oluşturulan ve internet sitesinde yayınlanan SOP’lerde belirtilmiştir. Her DNA ekstraktı, inhibisyonun kontrolü amacıyla en az iki farklı dilüsyonda analiz edilmelidir.

Hedeflenen her tür için, ISO 24276 da belirtildiği gibi, iki çoğaltma kontrolü hazırlanmalıdır.

- Her bir plaka veya PCR analiz serisi için bir pozitif hedef DNA kontrolü kullanılmalıdır.
- Her bir plaka veya PCR analiz serisi için çoğaltma reaktifi kontrolü (hedef DNA yı içermeyen kontrol olarakta adlandırılır), her plate için kullanılmalıdır.

2.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi ve ifadesi

Laboratuvar sonuçları raporlandırırken, en azından, kullanılan numelerin ağırlığını, kullanılan ekstraksiyon tekniğini, tespit edilen bulguların sayısını ve metodun tespit limitini göstermelidir.

Çoğaltma reaktif kontrolü negatif iken pozitif DNA ekstraksiyon kontrolü ve pozitif DNA hedef kontrolleri analiz edilen hedef için pozitif sonuçlar vermez ise sonuçlar değerlendirilmemeli ve raporlandırılmamalıdır.

Numuneye ait iki paralelin sonuçlarının uyumsuz olması durumunda, en azından PCR aşaması tekrarlanmalıdır. Laboratuvar, DNA ekstraktlarının uyumsuzluğun sebebi olabileceğinden şüpheleniyorsa, sonuçlar yorumlanmadan önce yeni bir DNA ekstraksiyonunu ve bunu takiben PCR aşaması yapılmalıdır.

Sonuçların nihai yorumlanmasında EURL-AP tarafından oluşturulan ve internet sitesinde yayınlanan SOP ‘ye dayanarak paralel numunelerinin sonuçlarının integronuna ve yorumlanmasına dayanmaktadır.

2.2.6.1. Negatif sonuç

Negatif bir sonuç aşağıdaki gibi raporlandırılmalıdır:

Analiz edilen numunede X’e ait DNA tespit edilmedi. (X: hedeflenen hayvan türü veya grubu)

2.2.6.2. Pozitif sonuç

Pozitif bir sonuç aşağıdaki gibi raporlandırılmalıdır:

Analiz edilen numunede X’e ait DNA tespit edildi. (X: hedeflenen hayvan türü veya grubu)

KANATLI KARMA YEMLERİNDE ENERJİ DEĞERİNİN HESAPLANMASINA YÖNELİK ANALİZ METODU

1. HESAPLAMA METODU VE ENERJİ DEĞERİNİN İFADESİ

Kanatlı karma yemdeki 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 EDİLEN DEĞERLER İÇİN GEÇERLİ 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 İFADE EDİLMESİ

Yukarıdaki formül uygulandıktan sonra, elde edilen sonuçlar bir ondalık hane ile verilmelidir.

4. NUMUNE ALMA VE ANALİZ METOTLARI

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.

YEMLERDE KULLANIMI YASAKLANAN YEM KATKI MADDELERİNİN KONTROLÜNE YÖNELİK ANALİZ METOTLARI

Bu ekte belirtilen analiz metotlarından daha hassas analiz metotları, yemde izin verilmeyen katkı maddelerini saptamada kullanılabilir.

A. METİL BENZOQUAT TAYİNİ

7-benziloski-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolin

1. Amaç ve kapsam

Bu metot; yemdeki metil benzoquat seviyesinin tayinini mümkün kılar. Tespit limiti (LOQ) 1 mg/kg'dır.

2. Prensiptir

Metil benzoquat, numuneden metanollü metansülfonik asit çözeltisi ile ekstrakte edilir. Ekstrakt, diklorometan, iyon değişim kromatografisi ve sonra yeniden diklorometan ile saflaştırılır. Metil benzoquat içeriği, UV dedektörlü ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) tespit edilir.

3. Ayırıcılar

3.1. Diklorometan

3.2. Metanol, HPLC saflıkta

3.3. HPLC mobil faz

Metanol (3.2) ve su (HPLC saflıkta) karışım 75 + 25 (v+v), 0,22 µm filtreden (4,5) geçirilir ve çözelti gazdan arındırılır (örneğin 10 dakika ultrasonik su banyosunda tutularak).

3.4. Metansülfonik 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 (p20 1,18 g/ml), su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

3.6. Amberlit katyon değişim reçinesi CG-120 (Na), 100 ila 200 göz açıklığında

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 filtre kağıdından geçirilir. Reçine iki kez 500 ml'lik su ile ve ardından 250 ml'lik metanolla (3.2) ile yıkanır. Reçine yeniden 250 ml'lik metanol ile durulanır ve Yıkama ortamındaki katı madde (reçine) hava geçirerek kurutulur. Kuruyan reçine kapalı bir şişede saklanır.

3.7. Standard madde: Saf metil benzoquat (7-benziloski-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolin)

3.7.1. Metil benzoquat stok standart çözeltisi, 500 µg/ml,

50 mg standart madde (3.7) 0,1 mg hassasiyetle tartılır, metansülfonik asit çözeltisi ile (3.4) çözündürülür, hacmi balon jojede 100 ml'ye tamamlanır ve karıştırılır.

3.7.2. Metil benzoquat ara standart çözeltisi, 50 µg/ml,

5,0 ml metil benzoquat stok standart çözeltisi (3.7.1) 50 ml'lik balon jojeye metanolla (3.2) hacmi tamamlanır ve karıştırılır.

3.7.3. Kalibrasyon çözeltileri

25 ml'lik balon jojelere 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0 ml metil benzoquat ara standart çözelti hazırlamak için (3.7.2) aktarılır. Mobil faz (3.3) ile hacmi tamamlanır ve karıştırılır. Bu çözeltiler sırasıyla 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 ve 10,0 µg/ml metil benzoquat konsantrasyonlarına sahiptir. Bu çözeltiler kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

4. Cihaz

4.1. Laboratuvar tipi çalkalayıcı

4.2. Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporator)

4.3. Yaklaşık 200 ml kapasite hazneli ve bir musluk takılmış cam kolon (250 mm x 15 mm)

4.4. Değişken dalga boylu UV yada DAD dedektörlü HPLC cihazı

4.4.1. HPLC kolonu: 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.

Bir kör yem numunesi, metil benzoquat ya da girişim yapan maddelerin olup olmadığını kontrol etmek için analiz edilmelidir.

5.1.2. Numunedeki varlığına yakın miktarda metil benzoquat eklenen kör yem numunesi analiz edilerek geri alma yapılmalıdır. 15 mg/kg geri alma için 20 g kör yeme 600 µl stok standart çözeltisi (3.7.1) eklenir, karıştırılır ve ekstraksiyondan (5.2) önce 10 dakika beklenir.

Bu metodun amacı doğrultusunda, kör yem numunesi analiz edilecek örnek tipine benzer olmalı ve metil benzoquat içermemelidir.

5.2. Ekstraksiyon

Hazırlanmış numunden 0,01 g hassasiyetle yaklaşık 20 g 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. Ayırma hunisine 100 ml diklorometan (3.1) eklenir ve bir dakika çalkalanır. Faz ayrımı beklenir ve alttaki (diklorometan) katman 500 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona aktılır. Sulu fazın ekstraksiyon işlemi 40 ml'lik diklorometan ile iki kez daha yapılır ve bunlar yuvarlak tabanlı balon jode ilk ekstrakt ile birleştirilir. Diklorometan ekstraktı, düşük 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 değişim kromatografisi (5.4) için saklanır.

5.4. İyon değişimi kromatografisi

5.4.1. İyon değişimi kolonunun hazırlanması

Bir cam kolonunun (4.3) alt kısmına cam yününden küçük bir tıkaç yapılır. 50 ml hidroklorik asit (3.5) ile işlenmiş 5,0 g katyon değişim reçinesi karışımı(3.6) hazırlanır, cam kolona dökülür ve çökmesi beklenir.

Reçine yüzeyinin hemen üstündeki fazla 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 5 ile 10 ml'lik metanolle (3.2) 2 defa yıkanır ve bu yıkama solventleri kolona aktarılır. Ekstrakt reçine yüzeyine akıtılır ve kolon 50 ml metanol ile yıkanır, akış hızının en fazla 5 ml/dakika olduğundan emin olunur. Atık kısım atılır. 150 ml metansülfonik asit çözeltisi (3.4) kullanarak metil benzoat kolondan elüe edilir ve kolondaki elüat 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. Alt (diklorometan) faz 500 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona akıtılır. Sıvı fazın ekstraksiyon işlemi 70 ml'lik diklorometan ile iki kez daha yapılır ve bunlar yuvarlak tabanlı balon jodede ilk ekstrakt ile birleştirilir.

Diklorometan ekstraktı, düşük 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 10 ml'lik dereceli balon jojeye aktarılır. Yuvarlak tabanlı balon joje iki defa 1 ile 2 ml'lik metanol ile durulanır ve bunlar balon jojeye aktarılır. Metanol ile hacmi tamamlanır ve karıştırılır. Numune membran filtreden (4.6) süzülür ve 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 edilerek kromatografik sistemin stabilitesi kontrol edilir.

5.6.2. Kalibrasyon grafiği

Her bir kalibrasyon çözeltisi (3.7.3) birkaç kez enjekte edilir ve her bir konsantrasyonun pik yükseklikleri (alanları) ölçülür.

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

5.6.3. Numune çözeltisi

Kalibrasyon çözeltileri için alınanla aynı enjeksiyon hacmi kullanarak numune ekstraktı (5.5) birkaç kez enjekte edilir ve metil benzoquat piklerinin ortalama pik yüksekliği (alan) belirlenir.

6. Sonuçların hesaplanması

Numune çözeltisinin konsantrasyonu, kalibrasyon grafiği (5.6.2) referans alınarak numune çözeltisinin metil benzoquat piklerinin ortalama yüksekliğinden (alan) µg/ml olarak belirlenir.

Numunenin mg/kg cinsinden metil benzoquat içeriği “w” aşağıdaki formülle elde edilir:

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

Burada;

c = Numune çözeltisinin metil benzoquat konsantrasyonu, µg/ml

m = g olarak numunenin ağırlığı

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanımlama

Analitin tanımlanması ortak kromatografi yöntemi ile ya da numune ekstraktının ve 10 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisinin (3.7.3) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array dedektörü (DAD) kullanılarak yapılabilir.

7.1.1. Ortak kromatografi (co-chromatography)

Bir numune ekstraktına, uygun miktarda ara standart çözeltisi (3.7.2) eklenir. Eklenen metil benzoquat miktarı numune ekstraktındaki tahmini metil benzoquat miktarına benzer olmalıdır.

Hem eklenen miktar hem de ekstraktın seyreltilmesi hesaba katılarak yalnızca metil benzoquat pikinin yüksekliği artırılmalıdır. 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) Numunedeki maksimum absorsiyon ve standart spektranın tepe noktasındaki dalga boyu diode array sisteminin limitleri içinde olmalıdır. Diode Array ile tespit için bu tipik olarak yaklaşık 2 nm'dir;

(b) 220 - 350 nm arasında, kromatogramdaki pik tepe noktasında kaydedilen numune ve standart spektrumları, spektrumun % 10 ila % 100 bağıl absorbans aralığından farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum pik olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının % 15'ini geçmediğinde karşılanır;

(c) 220 - 350 nm arasında, aynı ekstrakta ait pikin yukarı eğim, tepe noktası ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun % 10 ila % 100 bağıl absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum pik olduğunda ve gözlenen hiçbir noktada spektrumlar arasındaki sapma, tepe noktası spektrumunun absorbansının % 15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrar edilebilirlik

Aynı numunedekiiki paralel sonuçları arasındaki fark aşağıdaki değerleri geçmemelidir: 4 ile 20 mg/kg arasındaki metil benzoquat içeriği için daha yüksek sonuca bağlı % 10.

7.3. Geri kazanım

Standart eklenmiş bir kör numune için geri kazanım en az % 90 olmalıdır.

8. Ortak bir çalışmanın sonuçları

10 laboratuvarıda 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 = Tekrar edilebilirliğin Standart Sapması

CV_r = Tekrar edilebilirliğin Değişim Katsayısı, %

s_R = Tekrar Üretilirliğin Standart Sapması

CV_R = Tekrar Üretilirliğin Değişim Katsayısı, %.

B. OLAQUİNDONX TAYİNİ

2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksit

1. Amaç ve kapsam

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

2. Prensip

Numune su-metanol karışımı ile ekstrakte edilir. Olaquindox içeriği, bir UV dedektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

3.1. Metanol

3.2. Metanol, HPLC saflıkta

3.3. Su, HPLC saflıkta

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) konulur. Ultrasonik işlemten sonra çözelti oda sıcaklığına getirilir, su ile hacmi tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ve buzdolabında 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) hacmi tamamlanır ve karıştırılır. Balon joje alüminyum folyo ile sarılır ve buzdolabında saklanır. Bu çözelti her gün taze olarak hazırlanmalıdır.

3.5.3. Kalibrasyon çözeltileri

50 ml'lik balon jojelere 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 hacmi 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 içerir. Bu çözeltiler her gün taze olarak hazırlanmalıdır.

4. Cihaz

4.1. Ultrasonik banyo

4.2. Mekanik çalkalayıcı

4.3. HPLC cihazı, değişken dalga boyu UV dedektörlü ya da Diode Array (DAD) 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: Olaquindox ışığa duyarlıdır. Tüm metotlar hafif ışık altında ya da amber renkli cam malzeme kullanarak gerçekleştirilmelidir.

5.1. Genel

5.1.1. Olaquinox ya da girişim yapan maddelerin olup olmadığını kontrol etmek için bir kör yem analiz edilmelidir.

5.1.2. Numunedeki varlığına yakın miktarda olaquinox eklenen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım çalışması yapılmalıdır. 50 mg/kg düzeyinde geri alma için 10,0 ml stok standardı çözeltisi (3.5.1) 250 ml'lik erlene alınır ve çözelti yaklaşık 0,5 ml'ye buharlaştırılır. 50 g kör yem eklenir, iyice karıştırılır 10 dakika dinlendirilir, ekstraksiyona (5.2) başlamadan önce birkaç kez yeniden karıştırılır.

Not: Bu metodun amacı doğrultusunda , kör yem numunesi analiz edilecek örneğe benzer olmalı ve olaquinoxıçermemelidir.

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 banyoda (4.1) tutulur.. 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. Numune 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):

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 apisteki 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 enjeksiyon 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, numune çözeltisinin olaquinox pikinin 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 numunesinin ağırlığı (5.2), g

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanımlama

Analitin tanımlanması ortak kromatografi yöntemi ile ya da numune ekstraktının (5.2) ve 5,0 µg/ml içeren kalibrasyon çözeltisinin (3.5.3) spektrumlarının karşılaştırılacağı bir Diode Array dedektörü (DAD) 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 artırılmalıdır. Yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği, kirletilmemiş numune ekstraktının orijinal olaquinox piki genişliğinin ± % 10 aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir;

(a). Numunedeki maksimum absorsiyon ve standart spectranın tepe noktasındaki dalga boyu diode array sisteminin limitleri içinde olmalıdır.

Diode Array saptama için bu tipik olarak ± 2 nm’dir.

(b) 220 ile 400 nm arasında, kromatogramın pik tepe noktasında kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun % 10 ila % 100 bağı absorbans aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum pik olduğuunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbansının % 15’ini geçmediğinde karşılanır.

(c) 220 ile 400 nm arasında, aynı ekstrakta ait pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun % 10 ila % 100 bağı absorbans aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğuunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, pik tepe noktası spektrumunun absorbansının % 15’ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrar edilebilirlik

Aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark, 10 ila 200 mg/kg arasındaki olaquinox içeriği için aynı ürün üzerinde yapılan 2 paralel arasındaki fark yüksek sonucakıyasla % 15’i geçmemelidir.

7.3. Geri kazanım

Standart eklenmiş 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 = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı.

9. Gözlem

Metot, 100 mg/kg'dan fazla olaquindox içeren yemler için valide edilmemiş olsa da, daha az numune ağırlığı olarak ve/veya ekstraktı (5.2) kalibrasyon grafiğinin (5.3.2) aralığı aralığında ki bir konsantrasyona erişecek şekilde seyrelterek tatmin edici sonuçlar almak mümkündür.

C. AMPROLİUM TAYİNİ

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. Prensiptir

Numune su-metanol karışımı ile ekstrakte edilir. Mobil faz ile seyreltilip membran ile süzildükten sonra, amprolium içeriği, bir UV dedektörü kullanan katyon değişimi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

3.1. Metanol.

3.2. Asetonitril, HPLC saflıkta.

3.3. Su, HPLC saflıkta.

3.4. Sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi, $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

13,80 g sodyum dihidrojen fosfat monohidrat 1000 ml'lik balon jodede su (3.3) içinde çözündürülür, suyla (3.3) hacmi tamamlanır ve karıştırılır.

3.5. Sodyum perklorat çözeltisi, $c = 1,6 \text{ mol/l}$.

224,74 g sodyum perklorat monohidrat 1000 ml'lik balon jodede su (3.3) içinde çözündürülür, suyla (3.3) hacmi 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, $450+450+100 \text{ (v+v+v)}$. Kullanmadan önce $0,22 \mu\text{m}$ '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, $500 \mu\text{g/ml}$

50 mg amprolium (3.7) en az $0,1 \text{ mg}$ hassasiyetle 100 ml'lik balon jojeye tartılır, 80 ml metanol (3.1) içinde çözündürülür ve balon joje 10 dakika ultrasonik banyoya (4.4) konur. Ultrasonik işlemten 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, $50 \mu\text{g/ml}$

$5,0 \text{ ml}$ stok standart çözeltisi (3.7.1) 50 ml 'lik balon jojeye alınır, 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 $2,0 \text{ ml}$ 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 $2,0 \mu\text{g/ml}$ amprolium içerir. Bu çözeltiler kullanmadan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.8. Ekstraksiyon çözücüsü.

Metanol (3.1) -su karışımı $2+1 \text{ (v+v)}$.

4. Cihaz

4.1. $100 \mu\text{l}$ '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 dolu ya da eşdeğeri.

4.1.2. Değişken dalga boyu ayarlı UV dedektörü ya da Diode Array dedektörü.(DAD)

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 girişim yapan maddeleri içermeyen 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 eklenen kör yem analiz edilerek bir geri kazanım testi yapılmalıdır. 100 mg/kg düzeyinde geri kazanım 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, ekstraksiyona (5.2) geçilmeden 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 eklenir. Bu numune standart eklenmiş numune ile birlikte analiz edilir ve standart ekleme yöntemi ile 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) konur ve 15 dakika bırakılır. Balon joje ultrasonik banyodan alınır ve 1 saat çalkalayıcıda çalkalanır ya da manyetik karıştırıcıda (4.5) karıştırılır. Ekstraktan 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 premiks'i 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) konur ve 15 dakika bırakılır. Balon joje ultrasonik banyodan alınır ve 1 saat çalkalayıcıda çalkalanır ya da manyetik karıştırıcıda (4.5) karıştırılır. Ekstraktan 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 apsisteki 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’ e göre hacmi, ml (örneğin 200 ml)

c = Numune ekstraktının amprolium konsantrasyonu, µg/ml

f = 5.2’ ye göre seyreltme faktörü

m = Analize alınan numune ağırlığı, g

7. Sonuçların validasyonu

7.1. Tanımlama

Analitin tanımlanması 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 tanımlanır.

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 artırılmalıdır. Yüksekliğinin yarısı boyutundaki pik genişliği, kirletilmemiş numune ekstraktının orijinal amprolium piki genişliğinin $\pm$ % 10 aralığında olmalıdır.

7.1.2. Diode Array Tanımlama

Sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir:

(a) Numunedeki maksimum absorsiyon ve standart spectranın tepe noktasındaki dalga boyu diode array sisteminin limitleri içinde olmalıdır.

Diode Array saptama için bu tipik olarak $\pm$ 2 nm'dir.

(b) 210 ile 320 nm arasında, kromatogramın pik tepe noktasında kaydedilen numune ve standart spektrumlar, spektrumun % 10 ila % 100 bağıl absorbens aralığındaki bölümleri için farklı olmamalıdır. Bu kriter aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen noktaların hiçbirinde iki spektrum arasındaki sapma, standart analizin absorbensinin % 15'ini geçmediğinde karşılanır.

c) 210 ile 320 nm arasında, aynı ekstraktına ait pikin yukarı eğim, apeks ve aşağı eğim spektrumları, spektrumun % 10 ila % 100 bağıl absorbens aralığındaki bölümleri için birbirinden farklı olmamalıdır. Bu kriter, aynı maksimum piki olduğunda ve gözlenen tüm noktalarda spektrumlar arasındaki sapma, pik tepe noktası spektrumunun absorbensinin % 15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrar edilebilirlik

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

- 25 mg/kg ila 500 mg/kg amprolium içeriği için daha yüksek değere bağlı % 15,
- 500 mg/kg ile 1.000 mg/kg arasındaki amprolium içeriği için 75 mg/kg,
- 1000 mg/kg'dan fazla amprolium içeriği için fark yüksek değere kıyasla % 7,5 İ geçmemelidir.

7.3. Geri kazanım

Standart eklenmiş 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

s_r = Tekrar edilebilirliğin standart sapması

CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı

s_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması

CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı.

9. Gözlemler

9.1. Numune tiamin içeriyorsa, tiamin piki kromatogramda amprolium pikinden biraz önce görünür. Bu metodu uygularken amprolium ve tiamin ayrılmalıdır. Numunedeki Amprolium ve tiamin bu metotta kullanılan kolon (4.1.1) tarafından ayrılmazsa, mobil fazın % 50 asetonitril 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 alıkonma süresi iyonik güçteki değişime bağlı olarak önemli oranda kayabilir.

C. CARBADOX TAYİNİ

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. Prensiptir

Numune su ile dengelenir ve metanol-asetonitril ile ekstrakte edilir. Filtrelenmiş yem ekstraktından temsil bir miktar, alüminyum oksit kolonunda temizlemeye tabi tutulur. Premiksler ve preparatlar için filtrelenmiş ekstraktan bir miktar, su, metanol ve asetonitril ile uygun konsantrasyona seyreltilir. Carbadox içeriği, bir UV dedektörü kullanılarak ters fazlı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilir.

3. Ayırıcılar

3.1. Metanol

3.2. Asetonitril, HPLC kullanım saflığında

3.3. Asetik asit, w = % 100

3.4. Alüminyum oksit: nötr, etkinlik derecesi I

3.5. Metanol-asetonitril 1+1 (v+v), 500 ml metanol (3.1) 500 ml asetonitril (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 saflıkta

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 işarete kadar tamamlanır ve karıştırılır.

3.10. HPLC için mobil faz, 825 ml asetat tampon çözeltisi (3.9) 175 ml asetonitril (3.2) ile karıştırılır. 0,22 µm filtreden (4,5) süzülür ve çözelti gazdan arındırılır (örneğin 10 dakika ultrason su banyosu ile).

3.11. Standard madde, Saf carbadox: Methyl 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 su banyosu ile (4.7) çözündürülür, Ultrasonik işlemten sonra çözelti oda sıcaklığına getirilir, metanol asetonitril (3.5) ile hacmi 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 hacmi tamamlanır ve karıştırılır. Balon jöjeler alüminyum folyo ile sarılır. Bu çözeltiler sırasıyla 2,0, 5,0, 10,0 ve 20,0 µg/ml carbadox içerir. 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 camlı ve sıvı geçirime 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 dedektörü ya da 225 – 400 nm aralığında çalışan Diode Array dedektörü

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 girişim yapan 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 kirlenilen kör yem (5.1.1) analiz edilerek bir geri kazanım testi yürütülmelidir. 50 mg/kg düzeyinde kirlenmek 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 standart ekleme metodu 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 bekletilir. 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 jojeye 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 bekletilir. 105,0 ml metanol-asetonitril (3.5) eklenir, kapatılır ve homojenleştirilir.

Numune 15 dakika ultrasonik su banyosunda (4.7) 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 ekstrakt atılır. Sonraki 5 ml'lik ekstrakte edilen kısım 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 apsisdeki 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. Premiksler 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 premiksler 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 Tanımlama

Analitin tanınması co-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 artırılmalıdır. 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) Numunedeki maksimum absorsiyon ve standart spectranın tepe noktasındaki dalga boyu diode array sisteminin limitleri içinde olmalıdır.

(b) 225 ile 400 nm arasında, kromatogramın pik tepe noktası 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, tepe noktası 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, tepe noktası spektrumunun absorbansının % 15'ini geçmediğinde karşılanır.

Bu kriterlerden biri karşılanmazsa analitin varlığı doğrulanmamıştır.

7.2. Tekrar edilebilirlik

10 mg/kg ya da yüksek içerik için, aynı numunenin iki paralel tayininin sonuçları arasındaki fark daha yüksek sonucun % 15'ini 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 = Tekrar edilebilirliğin standart sapması CV_r = Tekrar edilebilirliğin değişim katsayısı S_R = Tekrar üretilebilirliğin standart sapması CV_R = Tekrar üretilebilirliğin değişim katsayısı