

02.09.2004 Tarih 25571 Sayılı R.G.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığından :

**Yem Analiz Metodları
(Tebliğ No: 2004/ 33)**

Madde 1- 1734 Sayılı Yem Kanunu ve buna bağlı Yem Yönetmeliđinin 32 inci maddesi uyarınca yemlerin resmi kontrollerinde, bu tebliğ ekinde verilen referanslara göre hazırlanan; Yemlerde hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi için mikroskopik analiz, Kanatlı hayvan yemlerinde enerji tayini, Yem ve yem katkı maddelerinde A ve E vitaminlerinin HPLC ile analizi, Yakma metodu ile ham protein tayini ve Bitkisel ve hayvansal ham yağ tayinlerinde uygulanacak metodlar aşağıda belirtilmiştir.

Madde 2-Yem Kanunu ve Yem Yönetmeliđinin uygulanmasında görevlendirilen bütün laboratuvarlarda bu metodlar resmi analiz metodları olarak uygulanır.

Madde 3- Bu Tebliğ yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

Madde 4- Bu Tebliğ hükümlerini Tarım ve Köyişleri Bakanı yürütür.

**YEMLERDE HAYVANSAL ORİJİNLI YAPILARIN BELİRLENMESİ İÇİN
MİKROSKOBİK ANALİZ METODU**

1- Amaç ve uygulama alanı

Yemlerde bulunan hayvansal orijinli yapıların (memeli hayvanların, kanatlı hayvanların ve balıkların işlenmesi ile elde edilen ürünler ve bu hayvanların vücut parçaları) mikroskopik analizle belirlenmesi amacıyla hazırlanmıştır.

2- Hassasiyet

Hayvansal orijinli yapının özelliğine bağlı olarak yemlerdeki çok küçük miktarların (< 0,1 %) ölçülmesi mümkündür.

3- Prensip

Resmi kontroller için belirlenmiş yöntemle usulüne uygun bir örnek numune alınır ve analizi yapılmak üzere hazırlanır. Mikroskopik analizle saptanabilecek hayvansal orijinli yapılar (örneğin: kas lifleri ve diğer et partikülleri, kıkırdak, kemik, boynuz, saç, kıl, kan, tüyler, yumurta kabuğu, balık kemikleri, deri pulları) belirlenir. Bu hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi madde 6.1'de anlatılan ekle ayırma ve madde 6.2'de anlatılan örnekten çöktürme ile yapılır.

4- Reaktifler

4.1 Parlatici maddeler

4.1.1 Chloral hydrate (sıvı, 60 % w/v)

4.1.2 Lye (Alkali sıvı) (NaOH 2,5% w / v veya KOH 2,5% w / v), elek fraksiyonları için

4.1.3 Parafin yağı veya gliserol (viskozite:68-81) çöktürmelerin mikroskopla izlenmesi için

4.2 Yıkama maddeleri

4.2.1 Alkol, %96

4.2.2 Aseton

- 4.3 Konsantre (yoğunlaştırma) maddesi
- 4.3.1 Tetrachloroethylene (yoğunluk, 1,62)
- 4.4 Boyama kimyasalları
- 4.4.1 İyot / potasyum iyodad solusyonu (100 ml suya 2 gr. potasyum iyodad katılarak çözündürülür ve düzenli olarak çalkalanırken 1 gr. iyot ilave edilir)
- 4.4.2 Alizarin Kırmızısı (2.5 ml, 1M hidroklorik asit 100 ml suda seyreltilir ve bu çözeltiye 200 mg alizarine kırmızısı ilave edilir.
- 4.4.3 Cystine kimyasalı (2 gr. Kurşun asetat, 10 gr. NaOH / 100 ml H₂O)
- 4.4.4 İyot / potasyum iyodad solusyonu (%70'lik etanolde çözünmüş)
- 4.5 Bleaching kimyasalı
- 4.5.1 Ticari sodyum hipoklorid çözeltisi (%9.6 aktif klor)

5- Ekipman, araç ve gereçler

- 5.1 Hassas terazi (0,001 gr . tartabilecek doğrulukta)
- 5.2 Öğütme aracı (değirmen vb.)
- 5.3 Maksimum 0,50 mm genişliğinde gözenekleri olan elek
- 5.4 Ayırma hunisi veya konik tabanlı beaker
- 5.5 Stereomikroskop (en az 40 kat büyütebilecek kapasitede)
- 5.6 Compound (yüksek çözünürlü) Mikroskop (400 kat büyütebilen) ışığı ve polarize ışığı yansıtabilen
- 5.7 Standard laboratuvar gözlüğü

Kullanım öncesi bütün araç ve gereçler iyice temizlenmiş olmalıdır.

6- İşlem

En az 50 gr örnek alınarak dikkatlice öğütülür. Uygun bir şekilde öğütülmüş numuneden elek fraksiyonlarını incelemek için en az 5 gr. ve yoğunlaştırılmış çökeltiyi incelemek için de en az 5 gr.'lık temsili porsiyon alınır. Mikroskopik analiz için boya maddeleriyle boyanma işlemi de yapılabilir.

6.1 Elek fraksiyonlarında hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi

En az 5 gr.lık örnek elekten geçirilerek iki fraksiyona ayrılır.

İri parçalı fraksiyonlar uygun bir şekilde ince tabakaya yerleştirilerek, stereomikroskop altında hayvansal orijinli yapıları belirlemek için değişik büyüklüklerde tarama yapılır.

Elekten geçen ince fraksiyonlar slaydlara yerleştirilerek yüksek çözünürlüklü mikroskop altında hayvansal orijinli yapıları belirlemek için değişik büyüklüklerde tarama yapılır.

6.2 Yoğunlaştırılmış çökeltide hayvansal orijinli yapıların belirlenmesi

En az 5 gr. örnek tartılarak seperasyon (ayırma) hunisine veya konik tabanlı beaker'a aktarılır ve en az 50 ml tetrakloretilen ile muamele edilir. Karışım iyice çalkalanır ya da karıştırılır.

- Eğer kapalı ayırma hunisi kullanılırsa, çökelti ayrılmadan önce çökeltinin tutması için en az üç dakika bekletilir. Çalkalama işlemi tekrar edilir ve çökeltinin tutması için yine en az üç dakika bekletilir. Daha sonra ayırma hunisi boşaltılarak çökelti ayrılır.

- Eğer açık ayırma hunisi ya da konik beaker kullanılıyor ise çökelti ayrılmadan çökeltinin tutması için en az 5 dakika beklenir.

Çökelti bir fırın kabında kurutulur ve tartılır. Tartma işlemi eğer yemdeki hayvansal orijinli maddenin tahmini miktarı belirlenecekse yapılır, aksi halde buna gerek yoktur. Eğer çökelti fazla miktarda iri parçalardan oluşursa elekten geçirilerek iki fraksiyona ayrılır. Kurutulan çökelti kemik yapıların belirlenmesi için stereomikroskop ve yüksek çözünürlük mikroskobu altında incelenir.

6.3 Parlattıcı maddeler ile boyayıcı kimyasalların kullanımı

Mikroskobik analizde özel parlatma maddeleri ve boyayıcı kimyasallar kullanılarak hayvansal orijinli yapıların daha iyi belirlenmesi sağlanabilir.

Chloral hydrate : Dikkatlice ısıtıldığında nişasta tanecikleri jelatinize olacağından ve istenmeyen hücre yapıları uzaklaştırılacağından hücre yapıları daha net bir şekilde görülecektir.

Lye : NaOH veya KOH, yem materyallerini temizleyerek kas liflerinin, kıl ve diğer keratin yapıların belirlenmesine yardımcı olur.

Parafin yağı ve gliserol : Kemik yapılar bu parlattıcı madde içinde daha kolaylıkla ayırd edilebilir, çünkü kemiklerdeki ince boşluklar hava ile dolu kalacağından bu boşluklar 5-15 mikrometrelik siyah delikler şeklinde görünürler.

lyot / Potasyum iyodad solusyonu (4.4.1): Nişasta (mavi-mor renk oluşturur) ve proteinin (sarı portakal rengi oluşturur) belirlenmesinde kullanılır. Gerekirse seyreltme yapılabilir.

Alizarin Kırmızısı Solusyonu: Kemikleri, balık kemiği ve pullarını kırmızı/pembe renge boyar.

Cystin kimyasalı: Dikkatlice ısıtıldığında csystin içeren yapılar (saç, tüy, vs.) siyah-kahverengi bir renge dönüşür.

6.4 İçerisinde balık unu bulunabilecek yemlerin incelenmesi

İnce elek fraksiyonu ve ince çökelti fraksiyonundan en az bir slayd hazırlanarak yüksek çözünürlüklü mikroskop altında incelenir.

Eğer yemin etiketinde balık unu içerdiği yazılı ise veya balık unu bulunması ihtimali varsa orijinal örnekten ilave olarak elekten geçirilen iki ince fraksiyon ve toplam çökelti fraksiyonu incelenir.

7- Hesaplama ve değerlendirme

Yemlerde bulunan hayvansal dokuların mikroskopta incelenerek belirlenmesi yukarıda açıklanmıştır. Eğer yemlerdeki hayvansal orijinli yapıların miktarlarının tahmin edilmesi gerekiyorsa aşağıda belirtilen hususlara göre işlem yapılır.

Hesaplama ancak hayvansal orijinli yapılarda kemik parçacıkları bulunması halinde yapılabilir.

Sıcak kanlı kara hayvanlarının (ör: memeli hayvanlar ve kanatlılar) kemik parçacıkları, mikroskobik slaydlarda kemik içi ince boşluklar sayesinde değişik türlerde balık kemiklerinden ayırd edilebilir. Yem örneğinde hayvansal orijinli yapıların oranı iki şekilde tahmin edilebilir.

- Çökeltide (tortuda) bulunan kemik parçacıklarının tahmini oranı (% ağırlık) ile ve,
- Hayvansal orijinli yapılarda kemik parçacıklarının oranı (% ağırlık) ile

Miktar tayini en azından üç slayda bakarak ve her bir slayd için beş ayrı alan taranarak yapılmalıdır. Karma yemlerden elde edilen çökeltide sadece kara hayvanları ve balıkların kemik parçacıkları bulunmaz aynı zamanda yüksek yoğunlukta ör: mineraller, kum, ligninleşmiş bitki parçacıkları ve benzeri diğer bazı parçacıklar da bulunur.

7.1 Kemik parçacıkları oranının tahmini miktarı

$$\% \text{ kara hayvanlarının kemik parçacıkları} = (S \times c) / W$$

$$\% \text{ balık kemikleri ve pulları} = (S \times d) / W$$

(S= çökelti ağırlığı (mg), c= düzeltme faktörü (%) çökeltide bulunan kara hayvan kemiklerinin tahmini oranını, d= düzeltme faktörü (%) çökeltide bulunan balık kemikleri ve pullarının tahmini oranı, W = çöktürmeden önce alınan örnek ağırlığı (mg))

7.2 Hayvansal orijinli yapıların tahmini miktarı

Hayvansal ürünlerde kemik oranı çok değişkendir. (Kemik unlarında kemik oranı %50-60 arasında; et unlarında %20-30 arasında; balık unlarında, kemik ve pul içeriği, balık unu kategorisi ve orijinine göre %10-20 arasında değişkenlik göstermektedir.

Eğer yem örneğinde bulunan hayvansal unun tipi bilinirse, bunun miktarını da tahmin etmek mümkündür.

Yem örneğindeki kara hayvan ürünlerinin tahmini miktarının hesaplanması

$$(\%) = [(S \times c) / (W \times f)] \times 100$$

Yem örneğindeki balık ürünlerinin tahmini miktarının hesaplanması

$$(\%) = [(S \times d) / (W \times f)] \times 100$$

S= çökelti ağırlığı (mg); c= düzeltme faktörü (%), çökeltide bulunan kara hayvan kemiklerinin tahmini oranı; d= düzeltme faktörü (%), çökeltide bulunan balık kemikleri ve pullarının tahmini oranı; f= düzeltme faktörü, örnekteki hayvansal orijinli yapılar içinde yer alan kemiklerin oranı (Et-kemik unu için tahmini oran %40, balık unu için %15'dir, eğer gerçek oranlar bilinirse gerçek kemik oranları dikkate alınır.); W = Çöktürmeden önce alınan örnek ağırlığı (mg)

8- İnceleme sonuçlarının açıklanması

Mikroskopla yapılan yem analizi aşağıdaki şekillerde rapor edilebilir.

8.1 Kara hayvanlarından elde edilen yapıların bulunmasıyla ilgili olarak:

- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde kara hayvanlarına ait bir yapı bulunamamıştır.
- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde kara hayvanlarına ait yapılar bulunmuştur.

8.2 Balık unu bulunmasıyla ilgili olarak:

- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde balıktan elde edilen bir yapı bulunamamıştır.
- Mikroskopla açıkça görülebildiği kadarıyla, yem örneğinde balıktan elde edilen yapılar bulunmuştur.

Eğer incelenen yemde hayvansal orijinli yapılara rastlanırsa hazırlanan raporda tahmini miktarlarda belirtilebilir (% x , < % 0.1, % 0.1-0.5, %0.5-5 veya > %5 gibi).

Daha ayrıntılı rapor için, belirlenebildiği takdirde kara hayvanlarına ait yapıların orijini ve hayvansal yapıların neler olduğu (kas lifleri, kıkırdak, kemikler, boynuz, saç, kıl, tüyler, kan, yumurta kabukları, balık kemikleri ve pulları gibi) rapora eklenir.

KANATLI HAYVAN YEMLERİNDE ENERJİ TAYINI

Kanatlı karma yemlerinin enerji değerleri, yemlerin belirli besin maddeleri oranları dikkate alınarak aşağıda verilen formülasyona göre hesaplanır. Hesaplanan metabolik enerji değeri kcal / kg karmayem olarak elde edilir.

Kcal/kg, ME = [(0,1551 × % ham protein + 0,3431 × % ham yağ + 0,1669 × % Nişasta + 0,1301 × % toplam şeker (sukroz)) / 4.184] × 1000

YEM VE YEM KATKI MADDELERİNDE A VİTAMİNLERİNİN HPLC İLE ANALİZİ

VİTAMİN A BELİRLENMESİ

Bu metot yem ve yem katkı maddelerinde, premikslerde Vit A (retinol) belirlenmesinde uygulanabilir. Bu metotla tespit edilen Vitamin A tüm trans-retinil alkol ve cis izomerlerini kapsamaktadır. Vit A içeriği IU/kg cinsinden ifade edilmektedir ve bir IU 0,300 mikrogram all-trans-vitamin A aktivitesine veya 0,344 mikrogram all-trans vitamin A asetat veya 0,550 mikrogram all-trans-vitamin A palmitat aktivitesine denktir. Belirleme limiti 2000 IU Vit A/kg olarak tespit edilmiştir.

1. İLKE

Numune etanolik potasyum hidroksit çözeltisi ile hidrolize edilir ve Vit A petrol eterine ekstrakte edilir. Solvent evaporasyonla uzaklaştırılır, kalıntı metanol içerisinde çözündürülür ve gerekli görüldüğünde uygun konsantrasyona seyreltilir. UV veya flüoresans detektör kullanılarak ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi ile Vitamin A içeriği tespit edilir. Kromatografik şartlar all-trans vitamin a alkollerini ve cis izomerleri arasında bir ayrılma gerçekleştirecek biçimde ayarlanır.

2. ARAÇ VE GEREÇLER

- 2.1. vakum rotary evaporatör
- 2.2. amber cam malzeme
- 2.3. 500 mL'lik amber renkli, şilifli ve kapaklı balonjojeler
- 2.4. 10, 25, 100, 500 mL. lik balonjojeler
- 2.5. konik, 1000 mL lik ayırma hunileri
- 2.6. armudi balonlar 250 mL
- 2.7. Geri soğutucular
- 2.8. Otomatik pipet
- 2.9. Sözüme düzeneği

- 2.10. 0.2 µL'lik filtreler
- 2.11. 0.45 µL'lik filtreler
- 2.12. Kaba filtre kağıdı
- 2.13. Karıştırıcı, standart Vortex
- 2.14. Hassas terazi
- 2.15. Ultrasonik su banyosu
- 2.16. HPLC, UV-DAD Detektör
- 2.17. Analitik kolon: 250 x 4 mm boyutlarında, 5 veya 10µ partikül iriliğine sahip, silikajel bazlı C18 kimyasal bağlı ters fazlı kolon dolgu maddesi.
- 2.18. spektrofotometre (10 mm quartz bölmeli)
- 2.19. ekstraksiyon düzeneği

3. REAKTİFLER

Analiz sırasında, yalnızca aşağıda belirtilen analitik saflıktaki kimyasallar ve ultra saf su (direnç:18.3 mΩ) kullanılmalıdır.

- 3.1. Metil alkol
- 3.2. Etil alkol %96
- 3.3. Petrol eter (ekstraksiyon için)
- 3.4. Potasyum hidroksit, granül
- 3.5. % 50'lik KOH: 50 g granül KOH 100 mL'lik balonjojeye tartılır ve saf su ile süzülerek hacmi tamamlanıp soğutarak çözülür.
- 3.6. Sodyum askorbat çözeltisi: 10 gr/100 mL (yaklaşık 150 mg askorbik asit sodyum askorbat çözeltisi yerine kullanılabilir)
- 3.7. Sodyum sülfid çözeltisi : 0,5 mol/ L gliserol (yaklaşık 50 mg EDTA sodyum sülfid çözeltisi yerine kullanılabilir)
- 3.8. fenol fitalein indikatör çözeltisi: 2 g fenolfitaleyn etil alkolde çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.
- 3.9. 2-propanol
- 3.10. Mobil Faz: Metanol ve su, 98:2 (v/v) oranında sistemden geçirilir. Kesin oran kullanılan kolonun karakteristiğine göre tespit edilebilir.
- 3.11. Azot gazı
- 3.12. All-trans-vitamin A asetat standardı

All-trans-vitamin A asetat stok çözeltisi: 0,1 mg hassasiyetle 50 mg standart 100 mL'lik balonjojeye alınır. 2-propanol içerisinde çözündürülür ve aynı solventle 100 mL ye tamamlanır. Tahmini konsantrasyon 1400 IU/ mL dir ancak kesin konsantrasyon spektrofotometrik yöntemle teyit edilmelidir.

Stok çözeltiden 2 mL alınarak 50 mL'lik balonjojeye aktarılır. Hacim 2-propanol ile tamamlanır. Tahmini konsantrasyon 56 IU/mL'dir. Bu dilüsyondan 3 mL alınarak 25 mL'lik balonjoje ye aktarılır hacim 2-propanol ile tamamlanır. Bu çözeltinin tahmini konsantrasyonu 6,72 IU/mL dir. 326 nm dalga boyları aralığında 2-propanola karşı bu çözeltinin UV spektrumu alınır.

$$\text{Vitamin A IU/mL} = E_{326} \times 19,0$$

- 3.13. All-trans-vitamin A palmitat standardı.

All-trans-vitamin A palmitat stok çözeltisi : 0,1 mg hassasiyetle 80 mg standart 100 mL lik balonjoje ye alınır. 2-propanol içerisinde çözülür ve aynı solventle hacmine tamamlanır. Tahmini konsantrasyon 1400 IU/ mL dir ancak kesin konsantrasyon spektrofotometrik yöntemle doğrulanmalıdır.

3 mL stok çözeltisi 50 mL lik balonjoje ye alınır hacim 2-propanol ile tamamlanır. Bu çözeltiden de 5 mL alınarak 25 mL lik balonjoje ye aktarılır hacim 2-propanol ile tamamlanır. Bu çözeltinin tahmini konsantrasyonu

6,72 IU/ mL dir ancak spektrofotometrik yöntemle konsantrasyonun doğrulanması gerekmektedir. Doğrulama için çözeltinin 2-propanola karşı 325 nm dalga boyunda UV spektrumu alınır.

$$\text{Vitamin A IU/ mL} = E_{326} \times 19$$

3.14. 2,6-di-tert-bütül-4-metilfenol (BHT) (hidrokinon BHT yerine kullanılabilir.)

4. ÇALIŞMA TEKNİĞİ

Vitamin A ışığa ve oksijene karşı son derece hassastır bu nedenle çalışmalar karanlıkta ve mümkün olduğunca oksijen temasından uzak bir şekilde yapılmalıdır. Karanlık bir ortam sağlamak için cam malzemeler alüminyum folyo ile kaplanmalı veya amber cam malzeme kullanılmalıdır. Oksijenden muhafaza etmek içinde ekstraksiyon süresince sıvı kısmın üzerinde bir azot akımı sağlanmalıdır.

4.1. Örnek Hazırlama

Örnekler 1mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş olmalıdır. Sabunlaştırma işleminden hemen önce öğütme işlemi yapılma ve öğütme sırasında ısınma olması engellenmelidir. (Karın yem ise : 25 g Premiks ise 5g tartılır)

4.2. Sabunlaştırma

Numunenin içerdiği Vit A miktarına göre 0,01 gr hassasiyetle 2-25 gr örnek 500mL lik balona alınır. 130 mL etanol balon çalkalanarak eklenir. Yaklaşık 100 mg BHT, 2 mL sodyum askorbat çözeltisi, 2 mL sodyum sülfid çözeltisi ilave edilerek geri soğutucuya bağlanır. Balon geri soğutma işlemi sırasında manyetik karıştırıcı bir su banyosuna daldırılır. Kaynaya kadar ısıtılır, kaynama başladıktan sonra 5 dakika için geri akışa müsaade edilir. 25 mL potasyum hidroksit solüsyonu geri soğutucu sisteminden balona aktarılır ve 25 dakika daha sistem çalıştırılır. Oksidasyonu engellemek için bu işlem esnasında azot akımından faydalanılır. Geri soğutucu yaklaşık 20 mL su ile durulanır ve balon muhtevası oda sıcaklığına soğutulur.

4.3. Ekstraksiyon- Safılaştırma

Toplam 250 mL su kullanılarak balon içerisindeki sıvı faz 1 lt'lik bir ayırma hunisine veya ekstraksiyon sistemine aktarılır. Sabunlaştırma balonu 25 mL etanol ve 100 mL petrol eteri ile durulanarak içeriği tamamen ayırma hunisine veya ekstraksiyon düzeneğine alınır. Etanol su oranı yaklaşık 2:1 olmalıdır. Sonra karışım 2 dakika süre ile iyice karıştırılır ve 2 dakika faz ayırımı beklenir.

4.3.1. ayırma hunisi ile ekstraksiyon : faz ayırımı gerçekleştirildiğinde petrol eteri fazı başka bir ayırma hunisine aktarılır. (faz ayırımı gerçekleşmemiş ise 10 mL etanol eklenebilir.)100 mL petrol eteri kullanılarak bu ekstraksiyon işlemi 2 kere daha yapılır (50 şer mL petrol eteri kullanılarak). Birleştirilmiş ekstraktlar iki kere her seferinde 100 mL su kullanarak çalkalanır. Su ekleme işlemine eklenen su fenoltalein varlığında renksiz olana kadar devam edilir. Yıkamış ekstrakt 500 mL lik bir balona süzülür. Filtre ve ayırma hunisi 50 mL petrol eteri ile durulanır balon petrol eteri ile hacmine tamamlanarak iyice karıştırılır.

4.3.2. ekstraksiyon düzeneği ile ekstraksiyon: faz ayırımı gerçekleştirildiğinde (gerçekleşmez ise 10 mL etanol ilave edilebilir.) cam silindirin kapağı kapatılır ayarlanabilir U tüpünün kısa ucuna takılır. Bu şekilde ara yüzeyden yukarıda kalmış olur. Yan koldan azot basıncı ile üstteki petrol eteri fazı ayırma hunisine transfer edilir. Cam silindire 100 mL petrol eteri konur kapağı kapatılır ve iyice çalkalanır. Üst kısımda toplanan petrol eteri fazı daha önceki gibi ayırma hunisine aktarılır. Aynı işlem 1 kere daha 100 mL sonra 2 kez 50 mL petrol eteri ile tekrarlanır ayırma hunisinde daha önceden (4-3-1) anlatıldığı gibi yıkanır ve durulanır.

4.4 HPLC için numune solüsyonu hazırlanması : ekstraksiyon sonucu elde edilen petrol eteri solüsyonu 250 mL lik armudi balona aktarılır. Rotary evaporatörde neredeyse tamamen kuruyana kadar 40 C aşılardan evapore edilir. Kalan solvent azot akımı altında uzaklaştırılır ve kalıntı bilinen hacimde metanol içerisinde çözündürülür. (10-100 mL) Vit.A konsantrasyonu 5-30 IU/mL aralığında olmalıdır.

4.5 HPLC de uygulama: Vit A C₁₈ tersfaz kolonunda UV dedektörü için 325nm flüoresans Detektör için 325nm eksitasyon 475 nm emisyonunda ölçülür. Akış hızı 1-2 mL/min olmalıdır.

Mobil faz: Metanol ve suyun 98:2 oranında hacimce karışımı

Akış hızı: 2 mL/dk.

Dalga boyu: Vit A : 325 nm,

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Kolon sıcaklığı: Oda sıcaklığı (20°C)

4.6- KALİBRASYON

4.6.1. standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması: vitamin A asetat stok çözeltisinden 20 mL veya vitamin A palmitat stok çözeltisinden 20 mL 500 mL lik balona alınır ve sabunlaşma bölümünde anlatıldığı gibi hidrolize edilir ancak bu kez BHT eklenmez. Ardından ekstraksiyon bölümünde anlatıldığı gibi petrol eteri ile ekstrakte edilir ve hacim petrol eteri ile tamamlanır. Hemen hemen kuruyana kadar evapore edilir kalan solvent azot akımı altında uçurulur kalıntı 10 mL metanol içerisinde çözündürülür. Bu çözeltinin tahmini konsantrasyonu 560 IU/mL dir. Gerçek konsantrasyon spektrofotometrik yöntemle doğrulanmalıdır. Çalışma çözeltisi kullanımdan önce taze hazırlanmalıdır.

3 mL vitaminA çalışma çözeltisi 50mL lik balonjoje ye alınır ve 2-propanol ile hacmine tamamlanır. bu çözeltiden 5 mL alınır 25 mL ye 2-propanol ile tamamlanır. Bu çözeltinin tahmini konsantrasyonu 6,72 IU Vit A / mL dir. 2-propanole karşı 325 nm de UV spektrumu alınır.

$$\text{IU Vit A / mL} = E_{325} \times 18,3$$

Bu çalışma çözeltisinden 2 mL alınarak 20 mL lik balonjoje ye aktarılır. Metanol ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltinin tahmini konsantrasyonu 56 IU vitamin A /mL dir.

4.6.2. kalibrasyon çözeltilerinin ve kalibrasyon grafiğinin hazırlanması : 1,2,5 ve 10 mL çalışma çözeltisi bir dizi 20 mL lik balonjojeye alınır. Ve balonjojeler metanol ile hacimlerine tamamlanır. Bu çözeltilerin tahmini konsantrasyonları 2,8,5,6,14 ve 28 IU vitamin A/ mL dir. Her biri HPLC ye verilerek pik alanları hesaplanır ve kalibrasyon grafiği çizilmiş olur.

5. HESABI

Kalibrasyon kurvesi kullanılarak analiz edilen numunede bulunan analit konsantrasyonu hesaplanır.

$$W = (500 \times \beta \times V_2 \times 1000) / (V_1 \times m) \quad \text{IU/kg}$$

W : örneğin Vitamin A içeriği IU/kg

β : örnek çözeltisindeki IU/mL vitamin A konsantrasyonu

V_1 : örnek solüsyonu hacmi mL

V_2 : alınan sıvı hacmi mL

m : örnek miktarı g

YEM VE YEM KATKI MADDELERİNDE E VİTAMİNLERİNİN HPLC İLE ANALİZİ

VİTAMİN E BELİRLENMESİ

Bu metot yem ve yem katkı maddelerinde, premikslerde Vit E belirlenmesinde uygulanabilir. Vitamin E içeriği mg DL- α tokoferol asetat/kg olarak ifade edilebilir. 1 mg DL- α - tokoferol asetat 0,91 mg DL- α -tokoferol e eşdeğerdir.

Belirleme limiti 2mg vitamin E/kg olarak tespit edilmiştir.

1. İLKE

Numune etanolik potasyum hidroksit çözeltisi ile hidrolize edilir ve Vit A petrol eterine ekstrakte edilir. Solvent evaporasyonla uzaklaştırılır, kalıntı metanol içerisinde çözündürülür ve gerekli görüldüğünde uygun konsantrasyona seyreltilir. UV veya flüoresans detektör kullanılarak ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi ile Vitamin E içeriği tespit edilir.

2. ARAÇ VE GEREÇLER

2.1. vakum rotary evaporatör

2.2 amber cam malzeme

2.3 500 mL'lik amber renkli, şilifi ve kapaklı balonjojeler

2.4 10, 25, 100, 500 mL lik balonjojeler

- 2.5 konik, 1000 mL lik ayırma huniler
- 2.6 armudi balonlar 250 mL
- 2.7 Geri soğutucular
- 2.8 Otomatik pipet
- 2.9 Süzme düzeneği.
- 2.100.2 µL'lik filtreler
- 2.110.45 µL'lik filtreler
- 2.12Kaba filtre kağıdı
- 2.13Karıştırıcı, standart Vortex
- 2.14Hassas terazi
- 2.15Ultrasonik su banyosu
- 2.16HPLC, UV-DAD Detektör
- 2.17Analitik kolon: 250 x 4 mm boyutlarında, 5veya 10µ partikül iriliğine sahip, silikajel bazlı C18 kimyasal bağlı ters fazlı kolon dolgu maddesi.
- 2.18spektrofotometre (10 mm quart bölmeli)
- 2.19ekstraksiyon düzeneği

3. REAKTİFLER

Analiz sırasında, yalnızca aşağıda belirtilen analitik saflıktaki kimyasallar ve ultra saf su (direnç:18.3 mΩ) kullanılmalıdır.

- 3.1. Metil alkol
- 3.2. Etil alkol %96
- 3.3. Petrol eter (ekstraksiyon için)
- 3.4. Potasyum hidroksit, granül
- 3.5. % 50'lik KOH: 50 g granül KOH 100 mL'lik balonjojeye tartılır ve saf su ile süzülerek hacmi tamamlandı soğutarak çözölmelidir.
- 3.6. Sodyum askorbat çözöltisi: 10 gr/100 mL (yaklaşık 150 mg askorbik asit sodyum askorbat çözöltisi yerine kullanılabilir.)
- 3.7. Sodyum sülfid çözöltisi : 0,5 mol/ L gliserol (yaklaşık 50 mg EDTA sodyum sülfid çözöltisi yerine kullanılabilir.)
- 3.8. fenol fitalein indikatör çözöltisi: 2 g fenolfitaleyn etil alkolde çözöölür ve 100 mL'ye tamamlanır.
- 3.9. 2-propanol
- 3.10. Mobil Faz: Metanol ve su, 98:2 (v/v) oranında sistemden geçirilir. Kesin oran kullanılan kolonun karakteristiğine göre tespit edilebilir.
- 3.11. Azot gazı
- 3.12. DL-α-tokoferol asetat.
- 3.13. DL-α-tokoferol asetat stok çözöltisi: 0,1 mg hassasiyetle 100 mg standart 100 mL lik balonjoje ye alınır. etanol içerisinde çözöndürölür ve aynı solventle 100 mL ye tamamlanır.bu çözöltinin 1mL si 1 mg DL-α-tokoferol asetat içerir.
- 3.14. DL-α-tokoferol
- 3.15. DL-α-tokoferol stok çözöltisi : 0,1 mg hassasiyetle 100 mg standart 100 mL lik balonjoje ye alınır. etanol içerisinde çözöölür ve aynı solventle hacmine tamamlanır. Bu çözöltinin 1mL si 1mg DL-α-tokoferol içerir

3.16. 2,6-di-tert-bütül-4-metilfenol (BHT) (hidrokinon BHT yerine kullanılabilir.)

4. ÇALIŞMA TEKNİĞİ

Vitamin E ışığa ve oksijene karşı son derece hassastır bu nedenle çalışmalar karanlıkta ve mümkün olduğunca oksijen temasından uzak bir şekilde yapılmalıdır. Karanlık bir ortam sağlamak için cam malzemeler alüminyum folyo ile kaplanmalı veya amber cam malzeme kullanılmalıdır. Oksijenden muhafaza etmek içinde ekstraksiyon süresince sıvı kısmın üzerinde bir azot akımı sağlanmalıdır.

4.1. Örnek Hazırlama

Örnekler 1mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüş olmalıdır. Sabunlaştırma işleminden hemen önce öğütme işlemi yapılma ve öğütme sırasında ısınma olması engellenmelidir. (Karın yem ise : 25 g Premiks ise 5g tartılır)

4.2. Sabunlaştırma

Numunenin içerdiği Vitamin E miktarına göre 0,01 gr hassasiyetle 2-25 gr örnek 500mL lik balona alınır. 130 mL etanol balon çalkalanarak eklenir. Yaklaşık 100 mg BHT, 2 mL sodyum askorbat çözeltisi, 2 mL sodyum sülfid çözeltisi ilave edilerek geri soğutucuya bağlanır. Balon geri soğutma işlemi sırasında manyetik karıştırıcı bir su banyosuna daldırılır. Kaynayanaya kadar ısıtılır, kaynama başladıktan sonra 5 dakika için geri akışa müsaade edilir. 25 mL potasyum hidroksit solusyonu geri soğutucu sisteminden balona aktarılır ve 25 dakika daha sistem çalıştırılır. Oksidasyonu engellemek için bu işlem esnasında azot akımından faydalanılır. Geri soğutucu yaklaşık 20 mL su ile durulanır ve balon muhtevası oda sıcaklığına soğutulur.

4.3. Ekstraksiyon- Safılaştırma

Toplam 250 mL su kullanılarak balon içerisindeki sıvı faz 1 lt'lik bir ayırma hunisine veya ekstraksiyon sistemine aktarılır. Sabunlaştırma balonu 25 mL etanol ve 100 mL petrol eteri ile durulanarak içeriği tamamen ayırma hunisine veya ekstraksiyon düzeneğine alınır. Etanol su oranı yaklaşık 2:1 olmalıdır. Sonra karışım 2 dakika süre ile iyice karıştırılır ve 2 dakika faz ayırımı beklenir.

4.3.1. ayırma hunisi ile ekstraksiyon : faz ayırımı gerçekleştiğinde petrol eteri fazı başka bir ayırma hunisine aktarılır. (faz ayırımı gerçekleşmemiş ise 10 mL etanol eklenebilir.)100 mL petrol eteri kullanılarak bu ekstraksiyon işlemi 2 kere daha yapılır (50 şer mL petrol eteri kullanılarak). Birleştirilmiş ekstraktlar iki kere her seferinde 100 mL su kullanarak çalkalanır. Su ekleme işlemine eklenen su fenolftalein varlığında renksiz olana kadar devam edilir. Yıkamış ekstrakt 500 mL lik bir balona süzülür. Filtre ve ayırma hunisi 50 mL petrol eteri ile durulanır balon petrol eteri ile hacmine tamamlanarak iyice karıştırılır.

4.3.2. ekstraksiyon düzeneği ile ekstraksiyon: faz ayırımı gerçekleştiğinde (gerçekleşmez ise 10 mL etanol ilave edilebilir.) cam silindirin kapağı kapatılır ayarlanabilir U tüpünün kısa ucuna takılır. Bu şekilde ara yüzeyden yukarıda kalmış olur. Yan koldan azot basıncı ile üstteki petrol eteri fazı ayırma hunisine transfer edilir. Cam silindire 100 mL petrol eteri konur kapağı kapatılır ve iyice çalkalanır. Üst kısımda toplanan petrol eteri fazı daha önceki gibi ayırma hunisine aktarılır. Aynı işlem 1 kere daha 100 mL sonra 2 kez 50 mL petrol eteri ile tekrarlanır ayırma hunisinde daha önceden (A-4-3-1) anlatıldığı gibi yıkanır ve durulanır.

4.4. HPLC için numune solusyonu hazırlanması : ekstraksiyon sonucu elde edilen petrol eteri solusyonu 250 mL lik armudi balona aktarılır. Rotary evaporatörde neredeyse tamamen kuruyana kadar 40 C aşılardan evapore edilir. Kalan solvent azot akımı altında uzaklaştırılır ve kalıntı bilinen hacimde metanol içerisinde çözündürülür. (10-100 mL) Vit.A konsantrasyonu 5-30 IU/mL aralığında olmalıdır.

4.5. HPLC de uygulama. Vit E C₁₈ tersfaz kolonunda UV dedektörü için 292nm flüoresans dedektör için 295nm eksitasyon 330 nm emisyonunda ölçülür. Akış hızı 1-2 mL/min olmalıdır.

Mobil faz: Metanol ve suyun 98:2 oranında hacimce karışımı

Akış hızı: 2 mL/dk.

Dalga boyu: Vit E :292 nm,

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Kolon sıcaklığı: Oda sıcaklığı (20°C)

4.6. KALİBRASYON

4.6.1. standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması: DL- α -tokoferol asetat stok çözeltisinden 25 mL 500 mL lik balona alınır ve sabunlaşma bölümünde anlatıldığı gibi hidrolize edilir. Ardından ekstraksiyon bölümünde anlatıldığı gibi petrol eteri ile ekstrakte edilir ve hacim petrol eteri ile tamamlanır. Hemen hemen kuruyana kadar evapore edilir kalan solvent azot akımı altında uçurulur kalıntı 10 mL metanol içerisinde çözündürülür. Bu çözeltinin tahmini konsantrasyonu 45. ,5 mikrogram DL- α -tokoferol /mL yani 50 mikrogram DL- α -tokoferol asetat/mL dir.

4.6.2. kalibrasyon çözeltilerinin ve kalibrasyon grafiğinin hazırlanması : 1,2,4 ve 10 mL çalışma çözeltisi bir dizi 20 mL lik balonjojeye alınır. Ve balonjojeler metanol ile hacimlerine tamamlanır. Bu çözeltilerin tahmini konsantrasyonları 2,5;5,0;10;ve 25 mikrogram /mL DL- α -tokoferol asetat tır.

5. HESABI

Kalibrasyon kurvesi kullanılarak analiz edilen numunede bulunan analit konsantrasyonu hesaplanır.

$$W=(500 \times \beta \times V_2) / (V_1 \times m) \quad \text{mg/kg}$$

W : örneğin Vitamin E içeriği mg/kg

β : örnek çözeltisindeki mikrogram /mL vitamin E konsantrasyonu

V_1 : örnek solüsyonu hacmi mL

V_2 : alınan sıvı hacmi mL

m : örnek miktarı g

BİTKİSEL VE HAYVANSAL HAM YAĞ TAYİNİ

Bu metot yemlerde bitkisel ve hayvansal ham yağ miktarını tayin etmeyi mümkün kılar. Bu tayin oleaginous tohumları ve yağlı tohumların analizini kapsamaz.

Yemin yapısına ve bileşimine göre analiz yapmak için aşağıda iki prosedür açıklanmıştır.

Metot A: Direkt ekstrakte edilebilen yağlar

Bu metot bitkisel orijinli yem ve materyallerine uygulanabilir. B Metodunun konuları kapsamındakileri hariç tutar.

Metot B: Bu metot hayvansal orijinli bütün yem materyallerine ve bütün karma yemlere uygulanabilir. Bunlar ön hidrolizsiz tam olarak ekstrakte edilemeyen materyallerdir.

1. İLKE:

- 1.1. **Metot A:** Örnek petrol eteri ile ekstrakte edilir, Solvent distile edilip uzaklaştırılır. Kalıntı kurutulur ve tartılır.
- 1.2. **Metot B:** Örnek sıcak hidroklorik asit ile hidrolize edilir. Çözelti soğutulur ve süzülür. Kalıntı yıkanır, kurutulur ve metot A kullanılarak petrol eteri ile ekstrakte edilir.

2. ARAÇ VE GEREÇLER:

- 2.1. Soxhlet tipi ekstraktör veya eşdeğeri bir cihaz. (Geri akış hızı 10devir/saat olmalı).
- 2.2. Kurutma etüvü (100 °C \pm 3 °C) veya Vakumlu etöv (75 °C \pm 3 °C)
- 2.3. Ekstraksiyon kartuşu (Ekstraksiyon cihazına uygun gözenekte olmalı.)

3. REAKTİFLER:

- 3.1. Petrol eteri 40-60 °C (Brom değeri 1 mg'dan az evaporasyon kalıntısı 2 mg/100 mL'den az olmalıdır.)
- 3.2. Sodyum sülfat (susuz).
- 3.3. 3 N Hidroklorik asit çözeltisi.
- 3.4. Süzmeye yardımcı madde (Kieselgur, hyflo-supercel).

4. ÇALIŞMA TEKNİĞİ:

4.1 Metot A:

5g numune 1mg hassasiyetle tartılır. Karışım yağ içermeyen ekstraksiyon kartuşuna (2.3) konulur ve yağsız pamuk tomarıyla kapatılır.

Kartuş ekstraktöre (2.1) yerleştirilir ve petrol eteri ile (3.1) 6 saat ekstrakte edilir. Eger soxhelet tipi bir ekstraktör kullanılıyorsa sıcaklığı saatte en az 10 sifon yapacak şekilde ayarlanmalıdır. Eter ekstraktı kuru, darası alınmış sünger taşı parçacıkları içeren balonda toplanır. Eter uzaklaştırılır ve kalıntı 1.5 saat 100 °C'de etüvde (2.2) kurutulur. Desikatörde soğutulur ve tartılır. Yağ kalıntılarının ağırlığının sabit olduğundan emin olmak için 30 dak. daha kurutulur. (Ağırlık kaybı 1mg'dan az olmalıdır).

4.2 Metot B:

2.5 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 400 mL'lik behere veya 300 mL'lil erlene koyulur. 100 mL 3N (3.3) ve sünger taşı parçaları koyulur. Beher saat camı ile kapatılır veya erlen geri soğutucuya bağlanır. Karışım alevde veya elektrikli ısıtıcıda hafifçe kaynayacak şekilde 1 saat tutulur. Numunenin kabin çeperlerine yapışmasına izin verilmez. Soğutulur, filtrasyon esnasında yağ kaybını engelleyecek filtrasyon yardımcı maddesi (3.4) eklenir. İki kat yağsız ve nemli süzgeç kağıdından süzülerek kalıntı asit reaksiyonu bitene dek soğuk suda yıkanır. Süzütünün yağ içermediği kontrol edilir. Süzüntüde yağ varlığı numunenin hidrolizden önce 4.1 de verilen metodla ekstrakte edilmesi gerektiğini gösterir.

2 katlı kalıntı içeren filtre kağıtları bir saat camına koyulur ve 100 ± 3 °C de etüvde kurutulup ekstraksiyon kartuşuna koyulup petrol eteri ile ekstraksiyona 4.1 deki gibi devam edilir.

5. HESABI

Sonuçlar numunenin yüzdesi olarak ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik:

- Aynı numunede aynı analistin iki paralel çalışmasının yağ oranı sonuçlarındaki fark ,
- % 5'den az yağ kapsayan örneklerde mutlak değer olarak % 0.2'den
 - % 5- %10 arası yağ içerenlerde en yüksek sonuca göre rölatif % 4.0'dan
 - % 10 ve üzeri yağ içerenlerde mutlak değer olarak % 0.4'den fazla olmamalıdır.

6. ÖZEL DURUMLAR

6.1 Yüksek yağ içeren ve deney için parçalaması veya homojen numune alınması zor ürünler için aşağıdaki işlem aşamaları uygulanır.

20 g numune 1 mg hassasiyetle tartılır ve 10 g veya fazla susuz sodyum sülfatla (3.2) karıştırılır. 4.1 de belirtildiği gibi petrol eteri ile (3.1) ekstrakte edilir. Alınan ekstrakt 500 mL ye petrol eteri (3.1) ile tamamlanır ve homojenize edilir. Bu solüsyondan 50 mL alınarak küçük, kuru darası alınmış ve sünger taşı parçacıkları içeren balona konulur. Solvent uzaklaştırılır, kurutulur ve 4.1'in son paragrafındaki gibi devam edilir. Kartuşta kalan ekstraksiyon kalıntısından solvent uzaklaştırılır ve kalıntı 1 mm elek büyüklüğünde öğütülür. Tekrar ekstraksiyon kartuşuna konulur (Sodyum Sülfat eklenmeden), petrol eteri ile ekstrakte edilir ve 4.1'in ikinci ve üçüncü paragraflarındaki gibi devam edilir.

Sonuç numunenin yüzdesi olarak, ilk ekstraksiyonda kullanılan solüsyon miktarında dikkate alarak aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\% \text{ Yağ} = (10a + b) \times 5$$

a: eter ekstraktı, g birinci ekstraksiyon sonrası

b: eter ekstraktı, g ikinci ekstraksiyon sonrası

6.2 Düşük bitkisel ve hayvansal yağ içeren örneklerde miktar 5 g alınabilir.

6.3 Yüksek oranda su içeren evcil hayvan yemlerinin Metod B'ye göre hidroliz ve ekstraksiyonu öncesi susuz sodyum sülfat ile karıştırılmasına ihtiyaç olabilir.

6.4 Metod B deki filtrasyon sonrası kalıntıyı soğuk su yerine sıcak su ile yıkamak daha etkili olabilir.

6.5 Bazı yemlerin 1.5 saatten daha uzun kurutulması gerekebilir. Aşırı kurutma düşük sonuçlara neden olacağından kaçınılmalıdır. Mikrodalga fırın da kullanılabilir.

6.6 Eğer yağ oranı % 15 den fazla ise A metodu ile ön ekstraksiyon, B metodu ile ön hidroliz ve tekrar ekstraksiyon tavsiye edilir. Bu yemdeki yağın yapısına ve yemin yapısına göre değişebilir.

YAKMA METODU İLE HAM PROTEİN TAYİNİ

%0,2-20 Azot içeren karmayem ve karmayem hammaddelerinde uygulanabilen bir metoddur?

1. İLKE:

Yüksek sıcaklıkta (850-950°C) saf oksijenle (%99.9) örneğin yakılması sonucu açığa çıkan azotun ısısal öz iletkenlik (Termak kondüktivite) yardımı ile ölçülmesi ve uygun protein faktörü ile çarpılarak % protein olarak ifade edilmesi ilkesine dayanır.

2. ARAÇ ve GEREÇLER:

2.1. Hassas laboratuvar terazisi

2.2. Fırın: Saf oksijende (% 99.9) örneğin parçalanması için minimum 950 °C çalışma sıcaklığını sağlamalıdır. Bazı sistemler daha yüksek sıcaklıklar gerektirebilir.

2.3. İzolasyon Sistemi: Diğer yanma ürünlerinden ayrılmış olan azot gazı termal kondüktivite dedektörü ile ölçümün yapılması için izole edilmiş olmalıdır. NO_x ürelerini N₂ çeviren veya azotu NO₂ olarak ölçen cihaza ihtiyaç olabilir ve dizayna eklenebilir.

2.4. Tanımlama Sistemi : Dedektörün tepkisini % m/m olarak azota çevirmelidir. Standart madde kalibrasyonu kör (blank) tanımlanması, barometrik basınç karşılığı gibi özellikler içerebilir. Gereken herhangi bir kalibrasyon EDTA gibi saf primer standart organik maddedeki teorik azot yüzdesine dayandırılmalıdır.

3. ALET VE EKİPMANIN PERFORMANSI:

Cihazın kullanımı için üretici tavsiyelerine ve kullanım talimatına tam uyarak örnek analize alınır. Bununla ilgili o cihaza ait prosedür ve talimatlar oluşturulur, uygulanır.

Yukarıda açıklandığı şekilde donatılmış sistem aşağıdaki minimum performans özelliklerini sağlamalıdır.

3.1. Sistem % 0.2-20 azot içeren karmayem ve hammaddelerindeki azotu ölçebilecek kapasitede olmalıdır.

3.2. Sistemin kesinliği, Lisin_HCl ve Nikotinik asit içindeki azot miktarı yapılan 10 ölçüm ile kanıtlanmalıdır. Ölçüm ortalamaları teorik değerlerin ± 0.15 civarında olmalı ve standart sapma ≤ 0.15 olmalıdır. Lisin-HCl yerine standart triptofanda kullanılabilir.

3.3. Mısır taneleri ve soya fasulyesi karışımında (2+1) uygun şekilde öğütülmüş 10 ölçüm sonucunda bağlı standart sapması (RSD) ≤ 2.0 olmalıdır.

$$RSD = \% SD (\text{Standart Sapma}) / \% \text{ ortalama azot} \times 100$$

Bu kesinliği sağlayan parçacık büyüklüğü (yaklaşık 0.5 mm) tüm karışımı yemler ve diğer heterojen maddeler için kullanılmalıdır.

3.4. Azot içermeyen toz selüloz gibi bir numune (sıfır değer) 10 kez okunarak kör analiz yapılmalıdır.

Atmosferik düzeltme hata getirebilir. Eğer sistem uygun şekilde ayarlanmış ise ve örnek sıkışmış atmosferik azotu en aza indirecek şekilde hazırlanmış ise gerekli değildir.

4. HESAPLAMA:

$$\% \text{ Ham Protein (m/m)} = \% \text{ N} \times f_{\text{protein}}$$

f_{protein} = Örnek cinsine göre kullanılan protein çevirme faktörü

-EK-

REFERANSLAR

1-Commission Directive 2003/126/EC of 23 December 2003 on the analytical method for the determination of constituents of animal origin for the official control of feedingstuffs

2-Commission Directive 86/174/EEC of 9 April 1986 fixing the method of calculation for the energy value of compound poultryfeed

3-Commission Directive 2000/45/EC of 6 July 2000 Establishing Community methods of analysis for the determination of vitamin A, vitamin E and tryptophan in feedingstuffs.

4- Commission Directive 98/64/EC of 3 September 1998 establishing Community methods of analysis for the determination of amino-acids, crude oils and fats, and olaquinox in feedingstuffs and amending Directive 71/393/EEC (Text with EEA relevance)

5-Official Methods of Analysis of American Association of Analytical Chemists (AOAC), 2000. Method No:990.03