



**T.C.  
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YOĞURT ve AYRANDA KARBOKSİMETİL SELÜLOZUN (CMC) KALİTATİF  
ve KANTİTATİF TAYİNİ İÇİN ANALİZ METOTLARI GELİŞTİRİLMESİ ve  
METOT VALİDASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GÜLŞEN ERGÜNEY**

**HAZİRAN 2020  
GÜMÜŞHANE**



**T.C.**  
**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YOĞURT ve AYRANDA KARBOKSİMETİL SELÜLOZUN (CMC) KALİTATİF**  
**ve KANTİTATİF TAYİNİ İÇİN ANALİZ METOTLARI GELİŞTİRİLMESİ ve**  
**METOT VALİDASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülşen ERGÜNEY**

**Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**“Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı”**  
**Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 03.06.2020**  
**Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 09.07.2020**

**HAZİRAN 2020**



## TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda tezin yazımına ait kurallara uygun olarak hazırladığım **“Yoğurt ve Ayranda Karboksimetil Selülozun (CMC) Kalitatif ve Kantitatif Tayini İçin Analiz Metotları Geliştirilmesi ve Metot Validasyonu”** isimli yüksek lisans tezi çalışmasında; söz konusu tüm bilgi ve belgeleri genel akademik kurallara göre elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 22/06/2020

  
Gülşen ERGÜNEY

**ÖZET**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YOĞURT ve AYRANDA KARBOKSİMETİL SELÜLOZUN (CMC) KALİTATİF  
ve KANTİTATİF TAYİNİ İÇİN ANALİZ METOTLARI GELİŞTİRİLMESİ ve  
METOT VALİDASYONU**

Gülşen ERGÜNEY

Gümüşhane Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr.Cemalettin BALTACI

2020, 103 sayfa

Karboksimetil selüloz (CMC), doğal selülozun kimyasal modifikasyonu ile elde edilen bir selüloz türevidir. CMC, genellikle organik bir ortam içinde monokloroasetat ya da bunun sodyum tuzu ile bir alkali selülozun reaksiyonu yoluyla hazırlanır. Karboksimetil selüloz ya da sodyum karboksimetil selüloz gıdalara genel olarak kıvam arttırıcı olarak ilave edilen, beyaz sarımsı renkte, lifli yapıda, bir katkı maddesidir. Gıda sanayiinde geniş kullanım yeri bulmasına karşın, CMC'nin yoğurt, ayran, v.b. bazı süt ürünlerde kullanımı yasaktır. Fakat bazı üreticiler tarafından kıvam artırmak amacıyla özellikle yoğurtta ve ayran da kullanılmaktadır.

Yapılan bu çalışmada CMC içeren yoğurt ve ayran ürünleri üretildi. Bu ürünlerden önce CMC'nin izolasyon çalışmaları yapıldı. CMC ve kazein proteinleri arasında pH 6.70

civarında etkileşimin olması özelliğinden faydalanılarak  $\text{CuSO}_4$  ile çöktürme yapıldı. CMC'nin  $\text{Cu}^{++}$  ile çöktürülmesi burada spesifik olaydır. Fenol ve  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile muamele edilerek spektrofotometrede 490 nm'de maksimum absorbans elde edildi. Ayrıca FI-TR cihazı ile kör ve CMC ilaveli numunelerin spektrumları da karşılaştırıldı. Kalitatif analiz için de LOQ seviyesinde pozitif ve negatif çalışmalar yapıldı. Saf olarak elde edilen CMC tespiti için spektrofotometrik yöntem ile FTIR spektrofotometre kullanılarak bu metotların kalitatif ve kantitatif validasyon ve ölçüm belirsizlikleri çalışmaları yapıldı. Kantitatif çalışmada spektrofotometre cihazı kullanıldı ve LOD, LOQ, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik, geri alma, doğruluk çalışmaları yapıldı. Yoğurt numunesi için LOD değeri % 0.03 , LOQ değeri ise % 0.10 olarak ve ayran numunesi için LOD değeri % 0.03 , LOQ değeri % 0.11 olarak tespit edildi. Yoğurt numunesinde % 0.50 CMC içeren çalışmada geri alma oranı ortalama %  $99.72 \pm 2.07$  ve % 1.00 CMC içeren çalışmada geri alma oranı ortalama %  $100.71 \pm 1.88$  olarak bulundu. Ayran numunesinde % 0.50 CMC içeren çalışmada geri alma oranı ortalama %  $99.05 \pm 2.11$  ve % 1.00 CMC içeren çalışmada geri alma oranı ortalama %  $99.57 \pm 0.94$  olarak bulundu. %95 güven aralığında ( $k=2$ ) genişletilmiş belirsizlik  $\pm U_x$  % 9.00 (0.09) olarak hesaplandı. Kalitatif çalışmalarda hem spektrofotometre hem de FTIR spektrofotometre cihazlarında analiz yapıldı. Hassasiyet, Doğruluk, Yanlış Negatif Oranı, Özgüllük, Yanlış Pozitif Oranı, LOD, Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumu ve Sağlamlık parametreleri çalışıldı. Ayran ve yoğurt numuneleri için; hassasiyet parametresi %100 , doğruluk parametresi % 100 , yanlış negatif oranları % 0 , özgüllük oranı %100 ve yanlış pozitif oranı % 0 olarak bulunmuştur. Tüm bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek bilimsel bir metin haline getirilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** CMC, CMC analiz, FT-IR yöntemi, Kalitatif-Kantitatif Validasyon, Spektrofotometrik yöntem

**ABSTRACT**  
**MS THESIS**

**DEVELOPMENT OF ANALYSIS METHODS AND METHOD VALIDATION FOR  
THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF  
CARBOXYMETHYL CELLULOSE (CMC) IN YOGURT AND AYRAN**

Gülşen ERGÜNEY

Gümüşhane University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of food Engineering

Supervisor: Asso. Prof. Dr. Cemalettin BALTACI

2020, 103 pages

Carboxymethyl cellulose (CMC) is a cellulose derivative obtained by chemical modification of natural cellulose. CMC is generally prepared by reaction of an alkali cellulose with monochloroacetate or its sodium salt in an organic medium. Carboxymethylcellulose or sodium carboxymethyl cellulose is a white, yellowish, fibrous structure additive which is generally added to foods as a thickener. Although it is widely used in food industry, using CMC is prohibited in dairy products yoghurt, ayran etc. However, CMC is used in order to increase the consistency in especially yoghurt and ayran by some producers.

In this study, yoghurt and ayran products containing CMC were produced. First, cmc isolation works was made from this products. Precipitation wasper formed with CuSO<sub>4</sub> by



taking advantage of the interaction between CMC and casein proteins at pH 6.70. Precipitation of CMC with  $Cu^{++}$  is a specific event. Phenol and  $H_2SO_4$  were treated with spectrophotometer to obtain maximum absorbance at 490 nm. In addition, the spectra of blind and CMC supplemented samples were compared with FI-TR instrument. For qualitative analysis, positive and negative studies were performed at LOQ level. Qualitative and quantitative validation and measurement uncertainties of these methods were performed using spectrophotometric method and FTIR spectrophotometer for CMC detection. In the quantitative study, spectrophotometer device was used and LOD, LOQ, repeatability, reproducibility, recovery and accuracy studies were performed. The LOD value for the yogurt sample was 0.03%, the LOQ value was 0.10%, and the LOD value for the ayran sample was 0.03%, the LOQ value was 0.11%. In the study containing 0.50% CMC in the yogurt sample, the recovery rate was found to be an average of  $99.72 \pm 2.07$ . In the study containing 1.00 % CMC in the yogurt sample, the recovery rate was found to be an average of  $100.71 \pm 1.88$ . In the study which contains 0.50% CMC in the ayran sample, the rate of recovery was found to be  $99.05\% \pm 2.11$  and in the study containing 1.00% CMC, the average recovery rate was  $99.57 \pm 0.94\%$ . Extended uncertainty in the 95% confidence interval ( $k = 2$ ) was calculated as  $\pm U_x \quad 9.00\% (0.09)$ . In qualitative studies, analysis was performed on both spectrophotometer and FTIR spectrophotometer devices. Sensitivity, Accuracy, False Negative Rate, Specificity, False Positive Rate, LOD, Harmony of Observed and Expected Results, and Strength parameters were studied. For ayran and yogurt samples; sensitivity parameter 100%, accuracy parameter 100%, false negative rates 0%, specificity rate 100%, and false positive rate 0%.

The data obtained as a result of all these studies will be evaluated and turned into a scientific text.

Keywords: CMC detection, CMC analysis, FT-IR Method, Qualitative-Quantitative Validation, Spectrophotometric method

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

İlk olarak tez çalışmam sırasında her zaman kıymetli bilgi, birikim ve tecrübesiyle benden desteğini esirgemeyen ve değerli yorumları ile tezimi şekillendirmemde yardımcı olan Sayın Hocam Doç. Dr. Cemalettin BALTACI'ya tezime katkılarından dolayı teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tüm eğitim ve öğrenim yaşamım süresince büyük bir sabırla bana destek olan, gücünü ve imkânlarını her an sağlayan annem Fatma AVCI'ya ve babam Alayiddin AVCI'ya, yüksek lisans eğitimim boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren eşim Muhammed Cihad ERGÜNEY'e ve kıymetli ailesine, birlikte geçirilecek zamanından çaldığım biricik kızım Erva ERGÜNEY'e, deneysel çalışmalarda yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Ahmet YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Gülşen ERGÜNEY  
Gümüşhane, 2020

## İÇİNDEKİLER

|   | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| ÖZET .....  | IV              |
| ABSTRACT .....  | VI              |
| TEŞEKKÜR .....  | VIII            |
| İÇİNDEKİLER.....  | IX              |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                      | XIV             |
| TABLolar DİZİNİ.....                                      | XV              |
| SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                      | XVII            |
| 1. GENEL BİLGİLER.....                                    | 1               |
| 1.1. Giriş .....  | 1               |
| 1.1.1. Gamlar .....                                       | 4               |
| 1.1.1.1. Karragenan .....                                 | 4               |
| 1.1.1.2. Aljinat .....                                    | 5               |
| 1.1.1.3. Agar .....                                       | 5               |
| 1.1.1.4. Gam Arabik .....                                 | 5               |
| 1.1.1.5. Tragakant Gam .....                              | 6               |
| 1.1.1.6. Karaya Gamı.....                                 | 6               |
| 1.1.1.7. Keçi Boynuzu Gamı (LBG).....                     | 6               |
| 1.1.1.8. Guar Gam .....                                   | 7               |
| 1.1.1.9. Ksantan Gam .....                                | 7               |
| 1.1.1.10. Gellan Gam.....                                 | 7               |
| 1.1.1.11. Pektin .....                                    | 8               |
| 1.1.1.12. Karboksimetil Selüloz .....                     | 8               |
| 1.1.1.12.1. Karboksimetil Selüloz Kullanım Alanları ..... | 10              |
| 1.2. Spektrofotometre .....                               | 12              |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 1.2.1.     | Spektrofotometrelerin Çalışma Prensipleri.....  | 14 |
| 1.2.2.     | Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi .....   | 14 |
| 1.3.       | Metot Validasyonu ve Verifikasyonu .....  | 16 |
| 1.3.1.     | Seçicilik .....   | 17 |
| 1.3.2.     | Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ).....  | 17 |
| 1.3.3.     | Ölçüm Aralığı/Doğrusallık .....   | 19 |
| 1.3.4.     | Doğruluk.....   | 20 |
| 1.3.4.1.   | Keskinlik.....  | 20 |
| 1.3.4.1.1. | Tekrarlanabilirlik.....   | 20 |
| 1.3.4.1.2. | Tekrar Üretilirlik .....  | 21 |
| 1.3.4.2.   | Gerçeklik.....  | 22 |
| 1.3.5.     | Sağlamlık.....  | 22 |
| 1.4.       | Ölçüm Belirsizliği.....   | 23 |
| 1.5.       | Kalitatif Analizlerde Metot Validasyonu.....  | 24 |
| 1.6.       | Önceki Çalışmalar .....   | 25 |
| 1.7.       | Çalışmanın Amacı .....  | 26 |
| 1.8.       | Çalışmanın Kapsamı.....   | 27 |
| 2.         | YAPILAN ÇALIŞMALAR.....   | 29 |
| 2.1.       | Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar .....  | 29 |
| 2.1.1.     | Cihazlar.....   | 29 |
| 2.1.2.     | Kimyasallar.....  | 29 |
| 2.2.       | Yoğurt ve Ayrar Ürünlerinin Hazırlanması .....  | 30 |
| 2.3.       | Deney Tasarımlarının Yapılması.....   | 31 |
| 2.3.1.     | CMC' nin Kazein Proteinlerinden ve Diğer Bazı Enzimatik Parçalanma ile Matrikslerden Ayrılması..... | 31 |
| 2.3.2.     | CMC' nin 1000 mg/L CuSO <sub>4</sub> Çözeltisi ile Çöktürülmesi .....                               | 32 |
| 2.3.3.     | Matriks- Eşleşmesi Kalibrasyonun Hazırlanması .....   | 32 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 2.3.4.     | Spektrum Tarama İşlemi .....  | 35 |
| 2.3.5.     | CMC' nin Renge Göre Kalitatif Tespiti İçin Numune Hazırlama ve Analizinin Yapılması.....                | 36 |
| 2.3.6.     | CMC' nin FT-IR Spektroskopisi ile Kalitatif Tespiti İçin Numune Hazırlama ve Analizinin Yapılması ..... | 37 |
| 2.4.       | CMC Analizi ile Alakalı Yapılan Ancak Vazgeçilen Diğer Çalışmalar .....                                 | 38 |
| 2.4.1.     | Na-CMC' nin Kalitatif Analizi.....  | 38 |
| 2.4.2.     | Na-CMC' nin Spektrofotometrik, HPLC, GC Analizi .....   | 38 |
| 2.5.       | Kantitatif Analiz Metodu ile Alakalı Yapılan Validasyon Çalışmaları.....                                | 39 |
| 2.5.1.     | Kantitatif Analiz İçin Verifikasyon Parametreleri.....  | 39 |
| 2.5.1.1.   | Spesifiklik ve Seçicilik .....  | 40 |
| 2.5.1.2.   | Tespit Limiti (LOD), Tayin Limiti (LOQ) ve Metot Tespit Limiti (MDL) .....                              | 40 |
| 2.5.1.3.   | Lineerite ve Ölçüm Aralığı.....   | 41 |
| 2.5.1.4.   | Geri Kazanım.....   | 42 |
| 2.5.1.5.   | Kesinlik.....   | 42 |
| 2.5.1.5.1. | Tekrarlanabilirlik .....  | 43 |
| 2.5.1.5.2. | Ara Kesinlik ( Laboratuvar İçi Tekrar Üretilbilirlik).....  | 43 |
| 2.6.       | Ölçüm Belirsizliği .....  | 43 |
| 2.7.       | Kalitatif Analiz İçin Verifikasyon Parametreleri.....   | 44 |
| 2.7.1.     | Hassasiyet (SE).....  | 45 |
| 2.7.2.     | Doğruluk (RA).....  | 46 |
| 2.7.3.     | Yanlış Negatif Oranı (FN).....  | 46 |
| 2.7.4.     | Özgüllük (SP) .....   | 47 |
| 2.7.5.     | Yanlış Pozitif Oranı (FP).....  | 47 |
| 2.7.6.     | Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumu.....  | 48 |
| 2.7.7.     | Minimum Tespit Sınırı (LOD) .....   | 48 |
| 2.7.8.     | Metot Sağlamlığı .....  | 49 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.       | BULGULAR VE TARTIŞMA.....   | 50 |
| 3.1.     | Kantitatif Çalışmaya Ait Validasyon Bulguları.....  | 50 |
| 3.1.1.   | Tespit Limiti (LOD), Tayin Limiti (LOQ) ve Metot Tespit Limiti (MDL)<br>Çalışma Sonuçları.....                                  | 50 |
| 3.1.2.   | Geri Alma (Gerçeklik) Analiz Sonuçları.....   | 53 |
| 3.1.3.   | Tekrarlanabilirlik Çalışması Analiz Sonuçları .....   | 58 |
| 3.1.4.   | Ara Kesinlik (Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik) Çalışması Analiz<br>Sonuçları.....  | 66 |
| 3.1.5.   | Lineerite ve Ölçüm Aralığı.....   | 73 |
| 3.1.6.   | Hesaplanan Toplam Ölçüm Belirsizliği .....  | 74 |
| 3.1.6.1. | Analiz Sonucunun Ölçüm Belirsizliği Kullanılarak Kabul Uygun Sonuca<br>Göre Karar Kuralı Örneği ile Yapılacak Raporlaması ..... | 79 |
| 3.1.7.   | Piyasadan Alınan Yoğurt ve Ayrar Numunelerine Ait CMC Analizi<br>Sonuçları.....   | 80 |
| 3.2.     | Kalitatif Analiz Sonuçları.....   | 82 |
| 3.2.1.   | FI-TR Cihazı İle Kalitatif Analiz Sonuçları .....   | 82 |
| 3.2.2.   | Spektrofotometre Cihazı İle Kalitatif Analiz Sonuçları .....  | 84 |
| 3.2.3.   | Hassasiyet (Doğru pozitif) Oranı (SNR) .....  | 86 |
| 3.2.4.   | Doğruluk (RA).....  | 89 |
| 3.2.5.   | Yanlış Negatif Oranı (FN).....  | 90 |
| 3.2.6.   | Özgüllük (SP) .....   | 90 |
| 3.2.7.   | Yanlış Pozitif Oranı (FP).....  | 90 |
| 3.2.8.   | Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumu.....  | 91 |
| 3.2.9.   | Minimum Tespit Sınırı (LOD) .....   | 91 |
| 3.2.10.  | Metot Sağlamlığı .....  | 91 |
| 4.       | SONUÇ VE ÖNERİLER.....  | 94 |
| 5.       | KAYNAKLAR.....  | 96 |

|    |                |     |
|----|----------------|-----|
| 6. | EKLER .....    | 104 |
|    | ÖZGEÇMİŞ ..... | 110 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Şekil 1.1. | Karboksimetilselüloz yapısı .....   | 8  |
| Şekil 1.2. | Tek ışık yollu spektrofotometrenin şematik gösterimi.....   | 13 |
| Şekil 1.3. | Çift ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı .....  | 13 |
| Şekil 2.1. | Yoğurt ve ayran mayalama işlemi.....  | 30 |
| Şekil 2.2. | CMC' li yoğurt ve içinde CMC olmayan yoğurdun verdiği renk .....  | 33 |
| Şekil 2.3. | Yoğurt numunesi CMC matrisk-eşleşme kalibrasyon eğrisi.....   | 34 |
| Şekil 2.4. | Ayran numunesi CMC matrisk-eşleşme kalibrasyon eğrisi .....   | 35 |
| Şekil 2.5. | CMC' nin Fenol+ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reaksiyonundan vermiş olduğu rengin spektrum taraması.....               | 36 |
| Şekil 2.6. | CMC' nin Fenol+ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reaksiyonundan vermiş olduğu renkler, kör ve % 0.25 CMC ' li yoğurt..... | 37 |
| Şekil 2.7. | Polistiren film, FT-IR spektrometrenin genel performansını kontrol spektrumu .....                                      | 38 |
| Şekil 3.1. | Yoğurt ve ayran numunesi CMC matrisk-eşleşme kalibrasyon eğrisi .....   | 74 |
| Şekil 3.2  | CMC-Bakır kompleksi .....   | 84 |
| Şekil 3.3. | Spektrum tarama sonuçları .....   | 85 |
| Şekil 3.4. | Kör ve % 0.10 CMC numuneler arasındaki renk .....   | 86 |



## TABLÖLAR DİZİNİ

### Sayfa No

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Tablo 1.1.  | Suda çözünebilen gam tipleri (Ward ve Andon, 1993).....  | 3  |
| Tablo 1.2.  | Kesinlik ifade türleri (TÜRKAK, 2019) .....  | 22 |
| Tablo 2.1.  | Yoğurt numunesi CMC matriks-eşleşme kalibrasyon eğrisi için okunan absorbans değerleri .....         | 34 |
| Tablo 2.2.  | Ayran numunesi CMC matriks-eşleşme kalibrasyon eğrisi için okunan absorbans değerleri .....          | 35 |
| Tablo 2.3.  | Elde edilen sonuçların değerlendirmesinde kullanılan olasılık tablosu .....                          | 44 |
| Tablo 3.1.  | Yoğurt numunesi tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve metot tespit limiti (MDL) sonuçları ..... | 51 |
| Tablo 3.2.  | Ayran numunesi tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve metot tespit limiti (MDL) sonuçları .....  | 52 |
| Tablo 3.3.  | Yoğurt numunesi % 0.5 konsantrasyonda geri alma çalışması.....                                       | 54 |
| Tablo 3.4.  | Yoğurt numunesi % 1.0 konsantrasyonda geri alma çalışması.....                                       | 55 |
| Tablo 3.5.  | Ayran numunesi % 0.50 konsantrasyonda geri alma çalışması .....                                      | 56 |
| Tablo 3.6.  | Ayran numunesi % 1.00 konsantrasyonda geri alma çalışması .....                                      | 57 |
| Tablo 3.7.  | Yoğurt numunesi % 0.25 tekrarlanabilirlik çalışması.....   | 59 |
| Tablo 3.8.  | Yoğurt numunesi % 0.50 tekrarlanabilirlik çalışması.....   | 60 |
| Tablo 3.9.  | Yoğurt numunesi % 1.00 tekrarlanabilirlik çalışması.....   | 61 |
| Tablo 3.10. | Ayran numunesi % 0.25 tekrarlanabilirlik çalışması .....   | 63 |
| Tablo 3.11. | Ayran numunesi %0.50 tekrarlanabilirlik çalışması .....  | 64 |
| Tablo 3.12. | Ayran numunesi %1.00 tekrarlanabilirlik çalışması .....  | 65 |
| Tablo 3.13. | Yoğurt numunesi % 0.25 ara kesinlik çalışması .....  | 67 |
| Tablo 3.14. | Yoğurt numunesi % 0.50 ara kesinlik çalışması .....  | 68 |
| Tablo 3.15. | Yoğurt numunesi % 1.00 ara kesinlik çalışması .....  | 69 |
| Tablo 3.16. | Ayran numunesi % 0.25 ara kesinlik çalışması.....  | 70 |
| Tablo 3.17. | Ayran numunesi % 0.50 ara kesinlik çalışması.....  | 71 |
| Tablo 3.18. | Ayran numunesi % 1.00 ara kesinlik çalışması.....  | 72 |
| Tablo 3.19. | Yoğurt % 0.25 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı.....   | 76 |
| Tablo 3.20. | Yoğurt % 0.50 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı.....   | 76 |
| Tablo 3.21. | Yoğurt % 1.00 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı.....   | 76 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tablo 3.22. | Ayran % 0.25 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı .....              | 77 |
| Tablo 3.23. | Ayran% 0.50 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı .....               | 77 |
| Tablo 3.24. | Ayran % 1.00 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı .....              | 77 |
| Tablo 3.25. | Yoğurt birleştirilmiş toplam belirsizlik hesabı.....                    | 78 |
| Tablo 3.26. | Ayran birleştirilmiş toplam belirsizlik hesabı .....                    | 78 |
| Tablo 3.27. | Metodun birleştirilmiş toplam belirsizlik hesabı.....                   | 79 |
| Tablo 3.28. | Piyasadan alınanan yoğurt ve ayran numunelerine ait CMC sonuçları ..... | 81 |
| Tablo 3.29. | FITR yoğurt numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları .....           | 87 |
| Tablo 3.30. | FITR ayran numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları .....            | 88 |
| Tablo 3.31. | Görsel yoğurt numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları .....         | 88 |
| Tablo 3.32. | Görsel ayran numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları .....          | 89 |
| Tablo 3.33. | Sağlamlık parametresinin değerlendirilmesi .....                        | 92 |

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |   |
|-------------------|---|
| % CV              | : Yüzde değişim (Varyasyon) katsayısı,  |
| % RSD             | : Yüzde bağıl standart sapma  |
| ACC               | : Tekrarlanabilirlik uyumu  |
| ACS               | : Amerikan Kimya Derneği  |
| ANOVA             | : Varyans Analizi (Analysis of Variance)  |
| AOAC              | : Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (Association of :<br>OfficialAnalyticalChemists)   |
| ASTM              | : Amerikan Test ve Malzemeler Topluluğu (American Society forTesting and<br>Materials)  |
| b                 | : Sapma (bias)  |
| CAC               | : Uluslar arası gıda kodeksi  |
| CC <sub>α</sub>   | : Karar sınırı (Karar sınırı)   |
| CC <sub>β</sub>   | : Algılama kapasitesi (Detection capacity)  |
| CMC               | : Karboksi Metil Selüloz  |
| CV                | : Değişim (Varyasyon) katsayısı   |
| EPA               | : Çevre Koruma Dairesi (Environmental Protection Agency)  |
| FAO               | : Gıda Tarım Örgütü (Food Agriculture Organization)   |
| FDA               | : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. FoodandDrug Administration)   |
| FTIR              | : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Fourier Transform Infrared)   |
| FN                | : Yanlış negatif sonuç sayısı (False negative)  |
| FNR               | : Yanlış Negatif Oranı (False Negative Rate)  |
| FP                | : Yanlış pozitif sonuç sayısı (False positive)  |
| FPR               | : Yanlış Pozitif Oranı (False Positive Rate)  |
| ICH               | : Beşeri İlaçların Uluslararası Uyum Konferansı (The International Council for<br>Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human<br>Use) |
| IEC               | : Uluslararası Elektronik Komisyonu (International Electronic Commission)   |
| ISO               | : Uluslararası Standartlar Kurumu (International Standardization<br>Organization)   |
| IUPAC             | :Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure<br>andAppliedChemistry)  |
| LLOQ              | : Düşük tayin sınırı (Low limit of detection)   |
| LOD               | : Algılama sınırı (Limit of quantitation)   |
| LOD <sub>50</sub> | : Paralel ölçüm sonuçlarının %50 sinin pozitif/negatif olduğu değer   |
| LOQ               | : Tayin sınırı (Limit of dedection)   |
| NATA              | : Ulusal Test Otoriteleri Birliği, Avusturalya (The National Association of<br>Testing Authorities, Australia)  |
| NIST              | : Amerikan Teknoloji ve Standartlar Ulusal Enstitüsü (National Institute of<br>StandardsandTechnology)  |
| NMKL              | : Gıda Analizleri alanında İskandinav Ülkeleri Birliği (Nordic Committee on<br>Food Analysis)   |
| RLR               | : Güvenilirlik oranı (Reliability rate)   |
| RM                | : Referans Malzeme (Reference Material)   |
| SLR               | : Seçicilik Oranı (Selectivity Rate)  |

|         |   |
|---------|---|
| RSD     | : Bağıl standart sapma (Relative standard deviation)                  |
| SD      | : Süstitüsyon Derecesi (Substitution Degree)                          |
| SNR     | : Hassasiyet Oranı (Sensitivity Rate)                                 |
| SRM     | : Sertifikalı Referans Malzeme (Certified reference material)         |
| TN      | : Doğru negatif sonuç sayısı (True negative)                          |
| TP      | : Doğru pozitif sonuç sayısı (True positive)                          |
| TSE     | : Türk Standartları Enstitüsü   |
| TÜBİTAK | : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu                     |
| TURKLAB | : Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği                        |
| UME     | : Ulusal Metroloji Enstitüsü  |
| UR      | : Güvenilmeyen Bölge (Untrusted Zone)                                 |
| VIM     | : Uluslararası Metroloji Sözlüğü (International Metrology Dictionary) |
| WHO     | : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)                     |

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Yoğurt dünyanın farklı ülkelerinde değişik şekillerde tanımlanır. TS 1330'a göre yoğurdun tanımı "Ekstra veya birinci sınıf inek sütü (TS 1018), koyun sütü (TS 11044), keçi sütü (TS 11046), manda sütü (TS 11045) ve pastörize süt (TS 1019)'den birinin veya birkaçının karışımının gerektiğinde süt tozu ilavesiyle (TS 1329) homojenize edilip veya edilmeden *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* etkisiyle laktik asit fermentasyonuna yoğurt yapım kurallarına (TS 10935) uygun olarak muameleye tutulması sonucu elde edilen üründür" (TS 1330, 1999).

En az 90 °C'de ısıtılıp, mayalama derecesine soğutulmuş sütün, yoğurt mayası katılarak laktik asit mayalanmasına tabi tutulmasıyla elde edilen özel kıvamda bir süt ürünü olan yoğurt, Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre, Yoğurt; fermentasyonda spesifik olarak *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*' un simbiyotik kültürlerinin kullanıldığı fermente süt ürünüdür. (TGK, 2009).

FAO/WHO'nun tanımına göre "İsteğe bağlı katkıları (süt tozu, yağlı süt tozu, peynir altı suyu tozu, vb.) kullanarak veya kullanmadan, süt ve süt ürünlerinden (pastörize süt veya konsantre süt) *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'un faaliyeti sonucu meydana gelen laktik asit fermentasyonu ile elde edilen koagüle olmuş süt ürünüdür" (Rasic ve Kurman, 1978).

En yaygın tüketilen fermente süt ürünü yoğurttur. Tüketiminin bu kadar yaygın olmasının nedeni, yoğurdun soğukta muhafaza edildiğinde 4–6 hafta gibi uzun süre bozulmadan muhafaza edilmesi ve düşük pH değerinden dolayı içerisindeki patojen mikroorganizmaların canlılıklarını muhafaza edememelerinin yanında, yoğurdun beslenmedeki önemidir. Ülkemizde son yıllarda üretilen yoğurt miktarı tahminen 1.5 milyon ton civarındadır. Yoğurt tüketiminde gelişmiş ülkelerde yıldan yıla ciddi bir artış görülmektedir (Tekinşen, 2000).

Yoğurdun ilk olarak ne zaman ve nerede yapıldığına dair kesin bir bilgi olmamakla birlikte tarihi çok eski zamanlara dayanmaktadır. Bazı kaynaklarda yoğurdun ilk olarak melekler tarafından getirildiği yazsa da çoğunluk olarak Türkler tarafından bulunduğu kabul edilmektedir (Rasic ve Kurman, 1978).

Son yüzyıl içerisinde diğer ülkelerde daha fazla tanınan yoğurdun tüketimi hızla artmaya başlamıştır. Özellikle bilimsel olarak bazı hastalıkları iyileştirdiği ve insan ömrünü uzattığı açıklanınca yoğurda olan ilgi artmış ve yoğurt tüketimi dünyada yaygınlaşmaya başlamıştır. Günümüzde yoğurt, çeşitli tat ve özellikte yapılan, dünyanın her yerinde tanınan, her ülkede tüketimi hızla artan kıymetli bir yiyecek haline gelmiştir (Yaygın, 1999).

Yoğurt ülkemizde uzun yıllardan beri sevilerek tüketilmektedir. Buna rağmen kişi başına yoğurt tüketim oranı diğer ülkelerle kıyaslandığında çok düşüktür. Türkiye’ de kişi başına yoğurt tüketimi 20 kg/yıl iken bu değer Finlandiya’ da 40 kg/yıl, Bulgaristan’da 35 kg/yıl, Yunanistan’da 89 kg/yıl ve ABD’de 113 kg/yıl’ dır (Demirci ve Şimşek, 1997).

Önemli süt bileşenlerinin tümünü içermesinden ziyade, yoğurdun besin değeri, bu bileşenlerde yoğurdun içeriğindeki canlı mikroorganizmaların etkisiyle meydana gelen dönüşümlerden kaynaklanmaktadır. Yoğurtta bulunan *L. Bbulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin gerçekleştirdiği laktik asit fermantasyonu sırasında proteinler, karbonhidratlar ve lipitler dönüşümlere uğrarlar ve organizmalar tarafından kullanılabilir hale gelirler, yani ön sindirime tabi tutulurlar. Bu dönüşümler sindirilebilirliklerinin artmasını ve emilimlerinin daha hızlı olmasını sağlar (Blanc, 1986). Normal bir sütün bir saatte % 32’ si sindirilirken, yoğurtun 1 saatteki sindirilme oranı %91’ dir (Yöney, 1967).

Yoğurttaki laktik asit yoğurdun besleyicilik değeri yanında, yoğurda fizyolojik yönden de avantajlar katmaktadır. Laktik asit, kalsiyum, fosfor ve demirin kullanımını kolaylaştırmaktadır (Rasic ve Kurman, 1978).

Ayran; yoğurda su katılarak veya kuru maddesi ayarlanan süte *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*’ un kültürlerinin katılmasıyla hazırlanan fermente süt ürünüdür (TGK, 2009).

Bazı ülkelerde ayranın içilebilir yoğurt, sıvı yoğurt, yoğurt içeceği gibi değişik şekilde adlandırıldığı ve literatürde de ayran yerine bu isimlerin kullanıldığı görülebilmektedir (Akın, 2006).

Sindiriminin kolaylığı ve ferahlatıcı özelliğinden dolayı gerek şehirlerde, gerekse kırsal kesimlerde oldukça fazla tüketilen ayranın üretimi özellikle yaz aylarında artmaktadır (Gülmez ve Güven, 2003; Köksoy ve Kılıç, 2003).

Yaz aylarında tüketimi artmakta olan ayran, yoğurt gibi beslenme değeri açısından yüksek fermente bir süt ürünüdür (Özer, 2006).

Gam terimi ilk olarak, yapışkan, zamlımsı, bitkilerden sıızan doğal maddeler için kullanılmıştır. Gamın teknik tanımı ise, kıvam artırıcı ve/veya jelleştirici etki vermek için

suda dağılabilen veya çözünebilen polimerik karbonhidratlar olarak kabul edilmektedir. Bu tarz maddeler kolloidal yapıda olduklarından ve hidrofilik kolloid özellik gösterdiklerinden “hidrokolloidler” olarak da adlandırılırlar (Glicksman, 1969). Gıda endüstrisinde gamlar yaygın olarak, jelleştirmede, kıvam artırmada, stabilize etmede ve süspansiyon oluşturuca ajanlar olarak kullanılmaktadırlar (Glicksman, 1980; Anderson ve Andon 1988; Ward vd., 1993). Bu kadar yaygın kullanılma nedenleri arasında, hidrokolloidlerin kaliteyi iyileştirmeleri ve geliştirilen yeni teknolojilerin kullanılmasına ve bu teknolojilerdeki üretim-işlem ekipmanlarının uygulanmasına olanak sağlamaları gösterilmektedir (Davidson, 1980).

Uluslararası gıda kodeksinin (CAC) yapmış olduğu gıda katkı maddeleri sınıflandırılmasında, gam adı altında bir sınıf oluşturulmamıştır. Fakat söz konusu maddeler “jelleştirme ajanları” ve “kalınlaştırıcılar” olmak üzere yukarıda belirtilen fonksiyonları doğrultusunda iki ana sınıf altında toplanmaktadırlar (Nussinovitch, 1997).

Genellikle suda çözünebilir gamlar olarak bilinen hidrokolloidler değişik biyolojik kaynaklardan elde edilen ve birtakım arıtma işlemlerine tabi tutulan ve esas olarak çözünebilir liflerden meydana gelen polimerik karbonhidratlardır (Ward ve Andon, 1993). Çizelge 1’ de ayrıntılı olarak suda çözünebilir gam tipleri verilmiştir.

Tablo 1.1. Suda çözünebilir gam tipleri (Ward ve Andon, 1993)

| <b>Tip</b>                | <b>Kaynak</b>                              |
|---------------------------|--|
| Reçine gamları            |  |
| Gam arabik                | <i>Acacia</i> spp.                         |
| Karaya                    | <i>Sterculia</i> spp.                      |
| Tragakant                 | <i>Astragalus</i> spp.                     |
| Deniz yosunu ekstraktları |  |
| Karragenan                | <i>Chondrus</i> , <i>Eucheuma</i> spp.     |
| Agar                      | <i>Gracilaria</i> , <i>Gelidium</i> spp.   |
| Aljinat                   | <i>Laminaria</i> , <i>Macrocystis</i> spp. |

Tablo 1.1. (devamı)

|                    |                                |
|--------------------|--------------------------------|
| Tohum ekstraktları |                                |
| Guar               | <i>Cyamopsistetragonolobus</i> |
| Keçiboynuzu gamı   | <i>Ceratoniasiliqua</i>        |
| Mikrobiyel gamlar  |                                |
| Ksantan gam        | <i>Xanthomonascompestris</i>   |
| Gellan gam         | <i>Pseudomonasclodea</i>       |
| Bitki ekstraktları |                                |
| Pektinler          | Elma, turunçgil kabukları      |
| Konjac unu         | <i>Amorphophallus spp.</i>     |
| Modifiye gamlar    |                                |
| Selüloz gam        | Sodyum karboksimetil selüloz   |
| Selüloj jel        | Mikrokristalin selüloz         |
| Metil Selüloz      | Metil selüloz                  |
| HPMC               | Hidroksipropilmetil selüloz    |

### 1.1.1. Gamlar

#### 1.1.1.1. Karragenan

Karragenan ilk olarak kırmızı deniz yosunu olan ve İrlanda yosunu diye de bilinen *Chondruscrispus*’ dan ekstrakte edilmiştir (Towle, 1973). En önemli özelliklerinden birisi, Karragenanların su veya süt bazlı gıdalarda düşük konsantrasyonlarda farklı çeşitlerde jel oluşturabilmeleridir (Mabeau ve Fleurence,1993). Bu yüzden gıda endüstrisinde jelleştirici ve bağlayıcı, koyulaştırıcı, stabilizör ajanlar olarak görev yapmaktadırlar. Mandıra tipi ürünlerde karragenanın karakteristik etkisine, süt jellerinde, tart gibi pastaların dolgu malzemelerinde, donmuş tatlılarda, pastörize ve sterilize edilmiş sütlerde rastlanılmaktadır (Stanley, 1987). Şekerleme tarzındaki ürünlerde ise, selüloz gamı ve karragenanın birlikte veya ikisinden birinin tek başına kullanımıyla ciddi oranda yağı azaltılarak ürünler daha düşük kalorili üretilebilmektedir (Izzo vd., 1995).



#### **1.1.1.2. Aljinat**

Hidrofilik ve asidik yapıda bir polisakkarit olan aljinik asit kahverengi deniz yosunu sınıfının çeşitli alt gruplarından ekstrakte edilmekte olup, kahverengi deniz yosunlarının hücre duvarlarında kalsiyum, magnezyum, potasyum ve sodyumun çözünmeyen tuzları formunda bulunmaktadır (Nishide vd., 1992). Aljinatların gıdalar üzerine etkilerine ilişkin bir çok çalışma mevcuttur. (Cottrell ve Kovacs, 1980; Nussinovitch, 1993). Bu çalışmalar arasında meyve yapısını iyileştirmeleri, patateslerin depolama sürelerinin uzatılması, difüzyonla dondurulmuş jellerin hazırlanması, et ürünlerinde kullanılması ve daha bir çok üründe kullanımı yer almaktadır. Ayrıca aljinatlar, dondurmalarda da yumuşak bir doku elde etmek, buz-kristal oluşumunu geciktirmek amacıyla kullanılmaktadır (Boyle, 1959).

#### **1.1.1.3. Agar**

Agar, 1982 yılında Gıda Kimyası Kodeksi-III (1981) tarafından, kırmızı deniz yosununun *Rhodophyceae* sınıfından elde edilen “kurutulmuş hidrofilik poligalaktozit” olarak tanımlanmıştır. Elde edildiği deniz yosununun kaynağı ve üretim yöntemine göre agarlar, değişik tipik özellik göstermektedirler. Kolay kırılabilir bir yapıdan çok elastik bir jel yapısına kadar geniş özellik alanları mevcuttur (Poppe, 1995; Carr vd., 1995). Dayanıklılığı artırıcı ajan olarak meyveli pastaların dolgu maddelerinde, pasta kremalarında, bezelerde ve benzer şekilde fırıncılık ürünlerinde kullanılmaktadır (Glicksman, 1969).

#### **1.1.1.4. Gam Arabik**

Gam arabik, Leguminosea familyasından olan akasya ağaçlarının değişik çeşitlerinden elde edilen doğal bir sızıntı olmasından dolayı, Akasya gamı olarak da adlandırılmaktadır (Imeson, 1992). Yoğun olarak unlu mamuller, şekerlemeler, meşrubat ve emülsiyonlar, aroma kapsülleme ve bira gibi gıdalarda kullanılmaktadır. Fırınlama işleminden önce pastaların ya da bisküvilerin üzerine sürülen ya da püskürtme şeklinde uygulanan gam arabik solüsyonları, suyun buharlaşmasından sonra çekici ve parlak bir tabaka oluşturmaktadırlar (Imeson, 1992). Şekerlemelerde yapışmanın daha iyi sağlanması, esnekliğin düşürülmesi, şeker kristalizasyonunun önlenmesi amacıyla, jelatin bazlı şekerlemelere düşük seviyelerde gam arabik solüsyonları ilave edilebilmektedir (Reidel, 1983 ve 1986; Imeson 1992).

#### **1.1.1.5. Tragakant Gam**

Bir diğ er reçine gamı olan Tragakant gam; şekerleme ve kremalarda, suda     n r taraflarının yüksek olmasından dolayı, etkili bir su bağlayıcı ajan olarak görev yapmaktadır. Ayrıca tragakant gam bir çok hidrokolloid ile kıyaslandığında asidik çözeltelerde yüksek dayanıklılık özelliği göstermektedir. Dondurulmuş tatlılarda %0.2-0.5 düzeyindeki tragakant gam, buz kristalleşmesinin artışını kontrol ederek, depolama ve t k tim esnasında renk ve koku kaybını önlemektedir. Unlu mamullerin i  dolgu maddelerinde ise parlak, berrak ve kremsi yapıyı oluşturmak için bu gamın asit dayanıklılığından faydalanılmaktadır (Imeson, 1992).

#### **1.1.1.6. Karaya Gamı**

Karaya gamını tanımlamada *Bixaceace* familyasına ait *sterculiaurens* cinsi ağaçlardan elde edilen kurutulmuş sızıntı ifadesi kullanılmaktadır (Nussinovitch, 1997). Karaya gamının temel olarak kullanım alanları; mayonez, soslar, süt ürünleri, unlu mamuller ve et ürünleridir (Imeson, 1992). Bu gamın birleştirici özelliği sayesinde belli ölçülerde LBG'nin yerini alabildiği saptanmıştır. Unlu mamullerde kullanıldığında, bayatlamayı azaltmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır. Unlu mamullerde çoğunlukla karaya gamı esaslı kaplamalar ve parlaticılar kullanılmaktadır. Karaya gamı aynı zamanda, et partikülleri arasında daha kuvvetli bir yapışma elde etmek, işleme ve depolama esnasında suyu bağlamak, iyi bir dayanıklılık oluşturmak ve daha düşük kalorili et ürünleri üretmek amacıyla da kullanılmaktadır (Ryu vd., 1992).

#### **1.1.1.7. Keçi Boynuzu Gamı (LBG)**

LBG, Ceratonia siliqua adındaki keçi boynuzu ağacı tohumlarının rafine edilmiş endospermi olarak ifade edilmektedir (Rol, 1973). LBG buğday ununa eklendiğinde, daha uzun raf ömrü olan ve daha yumuşak yapıda, lezzetli bir ürün eldesi sağlanabilmektedir. Ayrıca bayatlama geciktirilmekte ve bisküvilerin, keklerin yüzeyine sürülen yumurta oranı da azaltılabilmektedir (Herald, 1986).

#### **1.1.1.8. Guar Gam**

Guar gam bitki tohumlarının öğütülmesi sonucu açığa çıkan endosperminden elde edilmekte olup, gıda ve endüstriyel saflıkta olmak üzere iki şekilde satılmaktadır. Gıda saflığında olana guar gam, saf öğütülmüş bir endosperm olmasına rağmen, endüstriyel saflıkta olan ise, bazı kimyasal katkıları kullanılarak üretilmektedir (Nussinovitch, 1997). Guar gam, barbekü ve et soslarında ve çeşitli salata soslarında faz ayrımı oluşmasını engellemek ve istenilen damak tadını yakalamak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca ketçap ve çeşnilerde viskoziteyi yükseltmek ve sinerezi engellemek için de kullanılır (Fox, 1992). Unlu mamuller üretiminde kuru karışımların hazırlanmasında, en fazla %0.15 oranında LBG ve guar gam ilavesiyle, hem karıştırma işlemi hem de ortaya çıkan karışımın özellikleri geliştirilmektedir. Kuru keke, pandispanyaya, bisküviye ve pizza karışımlarına guar gam eklendiğinde, karıştırma süresi azalmakta, karışımın homojenitesi artmakta, depolama sırasında üründeki nem kaybı daha az olmakta ve ürünlerin dondurulabilmeleri sağlanmaktadır (Cawley, 1964).

#### **1.1.1.9. Ksantan Gam**

Bir mikrobiyel fermentasyon gamı olan ksantan gamı, gıda katkısı olarak kullanılmaya başlandıktan sonra, düşük konsantrasyonlarda depolama dayanıklılığı, su bağlama kapasitesi ve ürüne estetik bir görünüm kazandırması gibi özelliklerinden dolayı gıda sanayide birçok alanda kullanılmaktadır (Urlacher ve Dalbe, 1992). Ksantan gamın akış özelliği (pseudoplastik), özellikle fırıncılık ürünleri üretiminde, yoğurma ve şekil verme aşamasında büyük önem arz etmektedir. Bu sayede yoğurma esnasındaki topaklaşma önlenmekte ve hamurun homojenliği geliştirilmektedir. Ayrıca ürünün hacmi artmakta ve pişirilen ürünlerin gözenek yapısı tek tip hale gelmektedir (Nussinovitch, 1997).

#### **1.1.1.10. Gellan Gam**

Ksantan gam gibi mikrobiyel gam olan gellan gam, başlıca şekerleme, reçel ve jölelerde, su bazlı jellerde, tart ve pudinglerde, evcil hayvanların gıdalarında, kek kremalarında, süt ürünlerinde jel oluşturucu ajan olarak kullanılmaktadır (Sanderson, 1990; Chalupa vd., 1994; Nussinovitch, 1997). Fırıncılık ürünlerinde dolgu malzemesi olarak

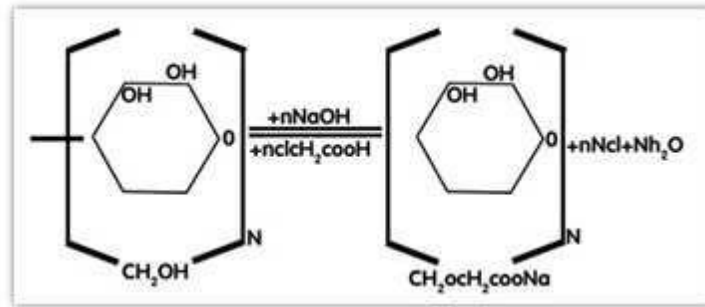
kullanıldığı zaman daha düzgün bir tekstür oluşmakta ve ağızda daha iyi bir tat bırakmaktadır. Ayrıca fırıncılık ürünlerinin depolama sürelerini, ısıl stabilitelerini yükseltmekte ve nem kaybını düşürmektedir (Anonymous, 1991).

#### 1.1.1.11. Pektin

Nişasta ve selüloz gibi yapısal diğer bir karbonhidrat da pektindir. Turunçgil kabuklarından ve elma posasından ticari üretimi yapılmaktadır (Christensen, 1986). Üretim metoduna, kaynağına ve sonraki işlemlere bağlı olarak pektinin özellikleri ve kompozisyonu değişmektedir. Pektin, taze veya işlenmiş sebzelerde yapı, meyve suyu ve şarabın durultulması, pürelerde ve meyve suyunda viskozite, reçel ve marmelat üretimlerinde jel oluşturuıcı özelliğinden dolayı gıda teknolojisinde önem taşımaktadır (Christensen, 1986; Costell vd., 1993; Coffin ve Fishman, 1994).

#### 1.1.1.12. Karboksimetil selüloz

Gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmakta olan, genellikle CMC olarak adlandırılan sodyum karboksimetil selüloz bir anyonik, polielektrolit selüloz türevidir (Greminger ve Krumel, 1980; Stelzer ve Klug, 1980; Zecher ve Van Coille, 1992). Genellikle gıdalara % 0.1-0.5 oranlarında katılan CMC su bağlama, nem tutma, stabilizasyon, tekstür ve görünüş düzeltme gibi değişik etkiler sağlamaktadır (Stelzer ve Klug, 1980). Karboksimetil selüloz selüloz zincirini oluşturan glukopiranoz monomerlerinin hidroksil gruplarına, karboksimetil gruplarının (-CH<sub>2</sub>-COOH) bağlanması sonucu meydana gelen bir selüloz türevidir.



Şekil 1.1. Karboksimetil selüloz yapısı

Karboksimetil selüloz molekülleri düşük konsantrasyon seviyelerinde, düz bir yapıya sahiptir. Fakat konsantrasyon arttıkça moleküller üst üste gelerek sarmal bir yapı formu oluşturur ve sıcaklığa bağlı olarak geri dönüşümlü jel haline gelir. İyon gücünün artırılması ve pH'ın düşürülmesi viskoziteyi düşürerek, polimerin daha sarmal bir yapı hali almasını sağlar. Karboksimetilselüloz pH 5.0-10.0 aralığında epeyce kararlıdır; fakat CMC' nin spesifik bir asit-stabil çeşidi dışında, pH 5.0' ın altındaki asitlendirme viskoziteyi ve kararlılığı düşürür. Selülozdan elde edilen karboksimetilselülozun genelde kullanılan formu sodyum (Na) tuzu şeklindedir. Karboksilik asidin Na tuzu olan Na-CMC polielektrolittir (Chowdhury ve Neale, 1963).

Karboksimetilselüloz toz halinde ve krem rengidir. Sudaki çözünürlüğü kolaydır. Organik çözücülerde çözünmez. Ağır metal tuzları ile tepkimeye sokulduğunda suda çözünmeyen, şeffaf, dayanıklı ve organik maddelerden etkilenmeyen bir film oluşturur. Yarı sentetik, suda çözünebilir polimerdir. Yüksek viskoz özelliğine sahiptir. Biyolojik olarak parçalanabilir özelliğe sahip olan CMC ısı, radyasyon ve oksit ajanlar ile bozulabilmektedir. Karboksimetilselüloz izoelektrik nokta altında negatif (-) özellik göstermektedir (Zorba, 2001).

Suda çözünmez özellikte olan gümüş, bakır, kurşun gibi metal iyonlu CMC' ye metalin suda çözünen bir formu ilave edilerek CMC çözeltisi oluşturulur. Karboksimetilselülozdan gıda, ilaç ve kozmetik uygulamalarında kıvam artırıcı, bağlayıcı, emülsifiye edici, koloidal süspanse edici ajan ve stabilizör olarak faydalanılmaktadır. Şekerin kristalizasyonunu engelleme özelliğine de sahiptir. Sabunlarda yüzey aktifliğini artıran CMC liflerdeki kirleri taşıy ve emer. CMC' nin teknik kalitesi tutkal üretiminde kullanılır. Çok iyi derecede film oluşturucu özellikleriyle, suda eriyebilen polimerdir. Kağıt gibi diğer selüloz maddeler için CMC'nin kendisi de selülozik yapıda olduğundan çok iyi bir yapıştırıcı olma özelliğine sahiptir(Zorba, 2001).

Genellikle CMC olarak isimlendirilen ve selüloz türevi olan sodyum karboksimetilselüloz, anyonik polielektrolit özelliktedir. Gıda endüstrisinde genellikle kullanılan formu sodyum tuzudur (Zorba, 2001). Karboksimetilselüloz odun veya pamuk kökenli selülozun sodyum hidroksit çözeltisi ile muameleye tabi tutulmasından elde edilen alkali selüloz monokloroasetik asitle tepkimeye sokulmaktadır. Bu reaksiyon sonucu oluşan ürün nötralleştirilir ve kurutulur. Sübstitüsyonun derecesi (SD) çözelti özelliklerini ve çözünürlüğü etkilemektedir. Gıda saflığında karboksimetilselülozun sübstitüsyon derecesi

(SD) 0.95 ile sınırlı tutulmaktadır. Çözünürlük için süstitüsyon derecesi 0.45 veya daha yüksek oranda olmalıdır (Zorba, 2001).

Karboksimetilselülozun DS 1-1.5 olduğu durumlarda çözeltileri psödoplastik davranış sergilerken düşük DS' lerde tiksotropik davranış sergilemektedir (Alexander, 1999).

Karboksimetilselüloz kolaylıkla suda çözünmesi, istenilen reolojik özellikleri taşıması ve kolay sindirilebilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.

Jelatin, kazein ve soya proteini gibi bazı gıda proteinlerinin çözünmesinde karboksimetilselüloz yardımcı olmaktadır. CMC-protein kompleksi oluşturarak çözünme işlemi gerçekleştirir ve viskozite artar. Pudingde serum ayrılmasını engellemek için kullanılmaktadır (Güven ve Hayaloğlu, 2001).

#### **1.1.1.12.1. Karboksimetil Selüloz Kullanım Alanları**

Karboksimetilselüloz farklı özelliklerinden dolayı çeşitli kullanım alanlarına sahiptir.

**Kozmetik:** Kıvamlaştırıcı, kıvam sabitleyici, koku stabilize edici, su bağlayıcı, tabaka oluşturucu, jelleştirici ve köpük arttırıcı olarak kullanılır. Kullanıldığı ürünler arasında diş macunları, şampuanlar, kremler, losyonlar ve jel halindeki ürünler sayılabilir. Sabunlarda yüzey aktifliği artıran CMC liflerdeki kirleri taşır ve absorplar.

**Eczacılık:** Yağlandırıcı olarak uçucu özellik göstermeyen göz damlalarının içeriklerinde kullanılır; gözde kurumayı önler. Kıvamlaştırıcı, sabitleyici ve film oluşturucu özellikleriyle kremlerde, losyonlarda ve merhemlerde kullanılır. Jel ürünlerde jel oluşturucu, kıvam artırıcı, kolloit önleyici ve film oluşturucu olarak kullanılır. Dayanıklılığının yüksek olması özelliği ile tablet haplarda bağlayıcı olarak kullanılır. Su bağlayarak hacim arttırma özelliğinden dolayı ishal haplarının içeriğinde kullanılır. Şuruplarda koyulaştırma amacıyla kullanılmaktadır. Süspansiyonlarda koyulaştırma ve yapı koruma işleviyle kullanılır.

**Seramik:** Seramikte ve camcılıkta sırlama işleminde, desenlerin oluşturulmasında ve kaplamacılıkta sabitleyici, koyulaştırıcı, yağlayıcı ve yapıyı koruyucu olarak kullanılır.

**Tekstil:** Kumaş üretiminde bağlayıcı olarak ve kıvam koyulaştırmada kullanılır. Sentetik haşıl maddesi olarak kullanılan CMC, nişastaya göre daha esnek fakat daha düşük mukavemetli haşıl filmi meydana getirir ve pamuk/polyester karışımlarının haşılmasına elverişlidir. Kumaş boyalarının kıvamını belirlemede, akışkanlığını kontrol etmede ve kolloit oluşumunu önlemede kullanılır.

**Kağıt Sanayi:** Kağıt ve kağıt ürünlerinde, hamura ilave edilerek, kağıdın sertliğini arttırmak için kullanılır. Kağıt yüzeylerine ilave edilerek, tutucu, yağa dirençli katman oluşturun, gözenekli ve dalgalı yapıyı kontrol edici olarak kullanılır. Renkli kağıt üretiminde ise kullanılan boyaların su içeriğini sabit tutmada, kıvamını ve akışkanlığını kontrol altına almaya yardımcı olur.

**Tütün:** Tütün endüstrisinde, sigara ve puro tütünün kağıda yapışmasını sağlayıcı olarak kullanılır.

**Deterjan:** Deterjanların içeriklerine eklenerek kirleri çözüp çamaşırlardan uzaklaştırmak ve beyaz yapının korunmasını sağlamak için kullanılır.

**Teknik Uygulamaları:** Karboksimetilselülozun teknik kalitesi tutkal üretiminde kullanılır. Film oluşturmada mükemmel özellikleriyle, suda eriyebilen polimerdir. Selülozik yapısından dolayı kağıt gibi diğer selüloz maddeler için de iyi bir yapıştırıcı olma özelliği göstermektedir. Duvar kağıdı yapıştırıcılarında ve lateks yapıştırıcılarda koyulaştırma ve su tutma amacı ile kullanılır. Tek başına ya da diğer polimerlerle birlikte iyi derecede duvar kağıdı tutkalı olma özelliği gösterir. Suda çözünürlüğünün kolay olmasından dolayı hazırlanması kolaydır, duvar kağıdının hemen yapışması gerçekleşir. Kuruma süresinin uzun olması ayarlamaların yapılmasına imkan verir. İyi derece de su kaybını kontrol etme niteliğine sahiptir. Baskıcılıkta su bazlı mürekkeplerin koyuluğunu ve akışkanlığı ayarlamak ve su koruyucu film oluşturmak için kullanılır.

**Gıda:** Başlıca kullanıldığı gıda ürünleri; bira, pasta arası krema, diyet ürünleri, şekerlemeler, bazı spesifik süt ürünleri, dondurma, krem peynir, reçel, marmelat, meyve suları, unlu gıdalar, meyve turtası doldurucuları, pişmiş ürünler ve pudinglerdir. Kıvamlaştırıcı, bağlayıcı, emülsifiye edici, koloidal süspanse edici ajan (salata sosunda) ve stabilizör olarak kullanılmaktadır. Şekerin kristalizasyonunu önleme özelliği de dikkate alınmalıdır.

- Unlu mamullerde kıvamı attırmak, su kaybını azaltmak ve tekstürü geliştirmek için kullanılır. Makarna ve benzeri ürünlerde kırılabilirliği indirmek açısından tercih edilir ve unlu mamullerde kullanım oranı ortalama %0.25-0.4 civarındadır.

- Tatlılarda kıvam verici, şeker kristallerinin oluşumunu kontrol edici, yapıyı geliştirici, topaklanmayı önleyici olarak kullanılır. Karboksimetilselüloz tatlılarda % 0.3-0.8 düzeyinde kullanılır, kokusuz ve tatsız özellikte olması nedeniyle, tatlıların kendilerine özgü olan tadını değiştirmez.

- Protein miktarı yüksek gıdalarda su bağlayıcı, ağız tadını geliştirici ve kıvamı muhafaza edici olarak kullanılır. Ayrıca CMC kullanımı protein ayrıştırılmasında uygulanan yöntemlerdendir. Peynir suyundan protein elde etmede CMC kullanılır.

- İçeceklerde meyve özütünün korunmasına fayda sağlar, hızlı kıvam artırıcı, damak tadını geliştirici ve protein içeriğini koruyucu olarak kullanılır.

- Donmuş tatlılarda; buz kristallerinin oluşumunu kontrol altına almak, yapıyı ve ağızda hissedilen tadı geliştirmek için kullanılır.

- Kalorisi olmadığı için düşük kalorili ürünlerde kıvamlaştırıcı olarak tercih edilir.

- Şuruplarda kıvam artırıcı ve berraklaştırıcı olarak kullanılır.

- Soslarda kıvamı koyulaştırıcı ve yapışkan yapıyı meydana getiren madde olarak kullanılır.

- Hayvan besinlerinde yağlayıcı madde, film oluşturucu, su tutucu, et suyunu koyulaştırıcı ve tesktürü koruyucu olarak kullanılır.

- Dondurma teknolojisinde % 0.15–0.27 oranında kullanılan karboksimetil selüloz, yüksek su tutma kapasitesi sayesinde iyi bir yapı oluşturarak kristalleşmeyi önler ve dondurma karışımının dövülme yeteneğini geliştirir (URL 1 ve 2, 2019).

## **1.2. Spektrofotometre**

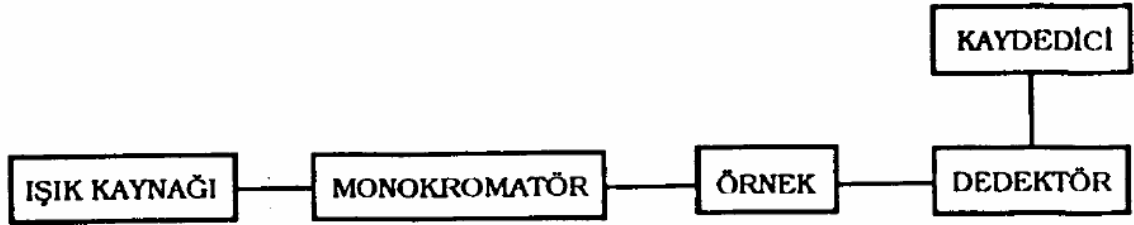
Günümüzde geliştirilen spektrofotometreler 200-2500 nm dalga boyları arasında ölçüm yapabilmektedir. Geliştirilen bu cihazlar ile hem ultraviyole (UV) hem görünür bölge (GB) hem de infrared (IR) bölgelerde ölçümler yapmak mümkündür. Yapılarına göre UV spektrofotometreleri tek ışın demetli ve çift ışın demetli spektrofotometreler olmak üzere iki gruba ayrılır.

### **➤ Tek Işın Yollu Spektrofotometreler**

Basit bir spektrofotometrede kaynaktan gelen ışık, bir mercekle yardımı ile toplanarak monokromatöre gönderilir ve dalga boyu seçiminden sonra bir aralıktan ilerletilerek örnek üzerine düşürülür. Uygun bir dedektörle örneğin ışığı emdiği miktar ölçülür, bu sinyal elektronik olarak çoğaltılır ve bir galvanometrede okunur. Bu bileşenlerin hepsinin aynı ışık yoluna yerleştirildiği bu tarz bir spektrofotometreye tek ışın yollu spektrofotometresini verilir. Böyle spektrofotometrelerde tek bir ışın demeti kullanılır. Sıfırlama ve ölçüm



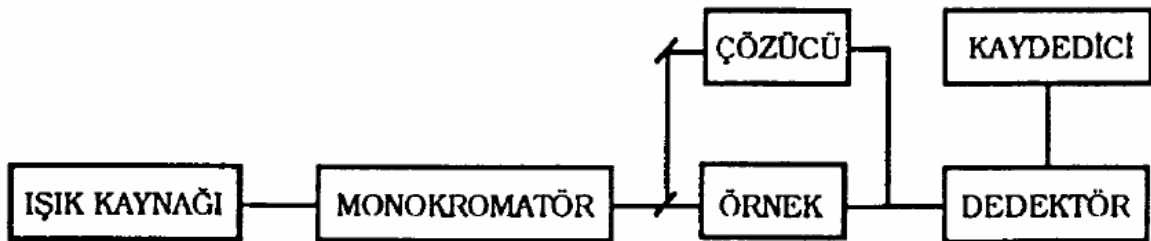
işlemleri ayrı ayrı yapılır. Bu tip cihazlar basit ve ucuz olmalarının yanında hassas ölçüm yapabilmelerinden dolayı da tercih sebebidirler. Kantitatif analizlerde kullanmak açısından oldukça uygun cihazlardır.



Şekil 1.2. Tek ışık yollu spektrofotometrenin şematik gösterimi

### ➤ Çift Işın Yollu Spektrofotometreler

“Sıfır” ve özellikle “yüz” ayarlarının her dalga boyunda yapılması oldukça zaman alıcı bir işlemdir. Spektrofotometrede, monokromatörden gelen ışığın eşit şiddette iki demete ayrılarak birinin örneğe, diğerinin ise sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesi ile bu işleme gerek kalmaz. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücünün geçirgenlik değeri ile karşılaştırılmış olur. İkiye bölünen ışık, iki farklı dedektörle tespit edilir ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Bu şekilde çalışan cihazlara çift ışın yollu spektrofotometreler denir. Burada iki dedektörün birbiri ile tam uyum içinde olması, yani aynı şiddetteki ışık ile eşit sinyali vermesi gerekir. Çift ışın yollu spektrofotometreler, tek ışın yollu olanlara göre hem optik hem de elektronik açıdan daha karmaşıktır. Çift ışın demetli cihazların en önemli avantajı zaman kazandırmaları ve voltaj değişikliklerinden etkilenmemeleridir. Tek ışın demetli cihazlara göre hassasiyetleri daha düşüktür.



Şekil 1.3. Çift ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı

### 1.2.1. Spektrofotometrelerin Çalışma Prensibi

Spektrofotometrelerin temel çalışma mantığı, hazırlanan çözeltiden belirli dalga boyunda ışık geçirilmesi ve bu ışının ne kadarının çözelti tarafından absorblandığının hesaplanması esasına dayanır. Çözelti tarafından tutulan ışın miktarı çözeltinin içerisindeki madde miktarı ile doğru orantılı olarak artar. Çözelti içerisinde bulunan bütün maddeler, ışının bir dalga boyunu absorblarken diğerlerini yansıtır veya geçirir. Maddenin belli bir dalga boyundaki bir ışını tutması, onun diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri (yoğunluk, erime, kaynama noktası, donma noktası vb.) gibi sabit bir özelliğidir. (MEB., 2012)

### 1.2.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Kızılötesi (IR) spektroskopisi, organik veya inorganik bileşiklerin karakterizasyonunda kullanılan bir cihazdır (Ono vd., 2011). IR spektrumu, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşiminden kaynaklanan frekanslarına karşılık gelen absorbsiyon pikleri ile örneğin parmak izini ortaya koymaktadır (Lin ve Wang, 2011). Maddelerin spektrumları kendine özgüdür. Optik izomerler bu durumun tek istisnasıdır. Organik madde spektrumlarının özellikle de 2000 cm<sup>-1</sup> den sonra gelen kısmı daha detaylıdır. Bu bölge parmak izi bölgesi olarak adlandırılır ve spektrumu iki misli genişleterek alınır. Bu şekilde madde hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmektedir (Gündüz, 2001).

FTIR spektroskopisi yalnızca mikrobiyel hücrelerin tanımlanmasında (fenotip, tür, alt-tür, patojenite, direnç vb.) değil aynı zamanda makromoleküllerin yapısal analizinde (doğallık, miktar ve moleküler bağların konformasyonu) de kullanılmaktadır (Essendoubi vd., 2007). Geniş spektrum alınabildiği için uygulama alanları (gıda, tarım, tıp, biyomedikal uygulamalar, kimya) geniştir (Kane vd., 2008).

Gıda sanayiinde nicel bir kontrol yöntemi olan fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi önemli bir potansiyele sahiptir ve birçok gıdada kimlik doğrulama ve tağşiş problemlerini çözmede başarıyla kullanılmaktadır (Papadopoulou vd., 2011; Reis vd., 2013).

Proteinlerin yapı taşı olan amino asitleri, kofaktör, redoks reaksiyonu, reaksiyona katılan enzimlerin oluşumu ve bağların yapısında meydana gelen değişikliklerin incelenmesinde kullanılan bir tekniktir (Iwaki vd., 2005).

FTIR tekniği gıdalardaki bozulmaların belirlenmesinde, patojen mikroorganizmaların tespiti ve stres şartları altında bakterilerin yapısal değişmelerinin çalışılması gibi kompozisyon analizinde ve gıda kalite kontrolünde kullanılmaktadır. Hücre bileşenlerinin, yağ asitleri, membran ve intraselüler proteinler, polisakkaritler ve nükleik asitler gibi, spektral karakterlerini incelemeye bu teknik kullanılır (Dziuba vd., 2005).

DNA'nın yapısının belirlenmesi çeşitli alanlarda özellikle biyolojik bilimlerde büyük önem taşımaktadır. Gen terapisi ve genetik mühendisliği çalışmalarında ortamın elektriksel yapısının değiştirilmesinin DNA aktarımlarının gerçekleşmesinde önemli bir rol üstlendiği belirlenmiştir. Bu tarz elektriksel yükleri farklı olan ortamlarda DNA'da oluşan şekil farklılıklarının tespitinde FTIR tekniği pratik bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Abu-Teir vd., 2008).

Bakteri örneklerinin sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında FTIR spektroskopisi ile bilgisayar tabanlı teknik kullanılmıştır. On dört tür için referans spektrumu içeren veri tabanı yapılarak, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Legionella* ve *Escherichia coli*' nin seçilmiş suşları tanımlanmıştır (Helm vd., 1991).

Infrared yöntem plastikler için geniş kullanım alanına sahip olan en uygun spektroskopik yöntemdir. Yöntemde meydana gelen yeni gelişmeler uygulanabilirliği daha da arttırmıştır. Günümüzde IR olmaksızın kompleks plastik formülasyonlarının ve malzemelerin analizlerini yapmak çok güçtür. Infrared tekniğinde, molekülün yapısındaki kimyasal bağların titreme, bükülme, eğilme, sallanma gibi fonksiyonları için ihtiyaç duyulan enerji infrared ışınların elektro manyetik enerjisinden absorplanır. Bu absorpsiyonlardan sağlanan IR spektrumları, molekül içindeki fonksiyonel grupları ortaya koyar. Ölçülen absorbanslar pikler ile gösterilir. Çoğunlukla infrared spektrumlar dalga numarası ile ifade edilir. Burada ölçülen absorbans, yoğunluğa ve numune kalınlığına doğrudan bağlıdır. Kimyasal bağlar C-H, C-C gibi eşit miktarda eşit seviyede enerji adsorplamaz. Yapılarına göre pikler kuvvetli, orta ve zayıf , şekillerine göre geniş, orta ve dar olarak tanımlanır. Piklerin bulunduğu yere, yapılarına ve şekillerine göre IR sepktrumları incelenerek numunelerde malzeme cinsi tayin edilir. Pik boyu ve pik alanı ölçölerek standartlar ile karşılaştırılıp miktar tayini de yapılabilir (Sırımoğlu vd., 2001).

### 1.3. Metot Validasyonu ve Verifikasyonu

Laboratuvarda yeni bir metot ilk defa kullanılacağında, yeni bir metot geliştirildiğinde, kullanılan metotta değişiklik yapılarak modifiye edildiğinde, geçerli kılınmış bir metot başka bir laboratuvarda çalışılacağında, kalite kontrol çalışmalarında metodun zamanla değiştiği görüldüğünde, farklı bir cihazla veya farklı bir analizci tarafından kullanıldığında, iki metodun eşitliğinin kıyaslanması gerektiği durumlarda validasyon yapılır (Akdağ, 2011).

Metot validasyonu, ulusal/uluslararası kabul görmüş standartlara göre, bir metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunu ve performansını yazılı olarak ortaya koymak için yapılan test ve ölçme işlemleridir. Kantitatif analizlerde laboratuvar tarafından yeni bir metot geliştirildiğinde aşağıdaki validasyon parametreleri uygulanır (GTHB, 2018):

- Seçicilik / Spesifiklik
- Tespit Limiti
- Ölçüm Limiti
- Ölçüm Aralığı/Doğrusallık
- Doğruluk
  - Kesinlik
    - Tekrarlanabilirlik
    - Tekrar Üretilebilirlik
  - Gerçeklik (Trueness)
    - Bias
    - Geri Kazanım
- Sağlamlık

**Verifikasyon:** Kantitatif analizlerde valide edilmiş ulusal veya uluslararası bir metodun laboratuvarda uygulanabilirliğinin görülmesi amacıyla aşağıdaki parametreler uygulanır (GTHB, 2018):

- Tespit Limiti
- Ölçüm Limiti
- Ölçüm Aralığı/Doğrusallık
- Doğruluk
  - Kesinlik
    - Tekrarlanabilirlik

- Tekrar Üretilebilirlik
- Gerçeklik (Trueness)
  - Bias
  - Geri Kazanım

### 1.3.1. Seçicilik

Analitik seçicilik “bir metodun, karışımlar veya matrisler içindeki belirli analitleri tanımlamak üzere, benzer özellik gösteren diğer bileşenlerin girişimleri olmaksızın kullanılabilme derecesini ifade eder (IUPAC, 2001).

Bir metodun seçiciliği (numunelerde bulunması muhtemel) girişime sebep olan belirli materyallerin kasıtlı olarak ilave edildiği numunelerdeki hedef analitin ölçülebilir kabiliyetinin çalışılmasıyla incelenir. Girişim olup olmadığının net olmadığı durumlarda, aranan analiti ölçebilme yeteneğinin farklı bağımsız metotlarla karşılaştırılmasıyla metodun seçiciliği incelenebilir (Magnusson ve Örnemark, 2014).

### 1.3.2. Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

Tespit limiti analitin, analiz protokolü uygulanarak kabul edilebilir bir kesinlikte tespiti yapılabilen en düşük konsantrasyon seviyesidir. Ölçüm limiti ise analitin, kabul edilebilir gerçeklik ve tekrarlanabilirlik kesinliğinde güvenilir bir şekilde ölçümünün yapılabildiği, en düşük miktardır. LOD ve LOQ belirlenmesinde değişik yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerden biri metodun niteliklerine göre tercih edilir. Tekrarlanabilirlik koşullarında en az 10 bağımsız analiz çalışması yapılır. Yapılan çalışmaların ortalaması ve standart sapması bulunur ve aşağıdaki yöntemlerden biri ile tayin/tespit limitleri hesaplanır (GTHB, 2018).

#### ➤ Birinci Yöntem:

$$LOD = 3 \times s'_0 \quad (1.1)$$

$$LOQ = 10 \times s'_0 \quad (1.2)$$

$s'_0$  = LOD, LOQ hesabında kullanılan düzeltilmiş standart sapma

➤ **İkinci Yöntem:**

Kabul edilebilir en düşük seviyede ilave edilmiş kör örnek ile en az 10 bağımsız analiz yapılır ve standart belirlenir. Kör örnekte analit yok ise direk olarak standart sapma LOD değeri için 3 ile, LOQ değerin için ise 10'la çarpılarak hesaplanır (GTHB, 2018).

$$LOD = 3 \times s_0 + \bar{X}_{\text{kör}} \quad (1.3)$$

$$LOQ = 10 \times s_0 + X_{\text{ort}} \quad (1.4)$$

$\bar{X}_{\text{kör}}$  : Kör örnek analizlerinin ortalaması

$s_0$  : Kör örnek analizlerinin standart sapması

➤ **Üçüncü Yöntem:**

Kalibrasyon eğrisinin çizdirildiği cihazlar için linearite çalışmasından elde edilen sonuçlardan LOD ve LOQ değerleri hesaplanabilir. Bu yöntemde ilk olarak rezidüel standart sapma ( $s_{res}$ ) hesaplanır; kör numunenin bulunamadığı durumlarda LOD hesabı bu yolla yapılabilir.

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - Y_{est})^2}{n-2}} \quad (1.5)$$

$Y_i$  : İlgili konsantrasyona karşı bulunan değer

$Y_{est}$  : İlgili konsantrasyona karşı lineer regresyon formülü kullanılarak elde edilen değer

$n$  : Konsantrasyon sayısı

Hesaplanan rezidüel standart sapma ve regresyon analizi sonucu elde edilen eğim değeri ( $b$ ) kullanılarak LOD ve LOQ tespit edilir. Bulunan LOD cihaz LOD'udur.

$$LOD = 3 \times \frac{s_{res}}{b} \quad (1.6)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{s_{res}}{b} \quad (1.7)$$

$b$  : regresyon analizi sonucu elde edilen eğim değeri ( $y = a + bx$ )

#### ➤ Dördüncü Yöntem:

Sinyal (S) ve gürültü (N) oranı ( $S/N$ ) kullanılarak hesaplama yapılabilir. Örnekte  $S/N$  oranının 3 olduğu seviye tespit limiti,  $S/N$  oranının 10 olduğu seviye tayin limiti olarak kabul edilebilir. Bu yöntem genellikle “base line noise” gösteren kromatografik metotlar için uygulanabilir. LOD ve LOQ bu yöntem ile hesaplandığında ölçüm limitinin doğrulanması gerekir. Doğrulama için kör örnek, hesaplanan LOD ve LOQ seviyesinde tekrarlanabilirlik koşullarında çalışılır. Kirlenmiş kör numunelerin ortalama yanıtı maksimum kör değerinden fazla ise tespit limiti doğrulanmış sayılır (GTHB, 2018).

#### 1.3.3. Ölçüm Aralığı/Doğrusallık

Doğrusallık çalışması metodun uygulama aralığının tespit edilmesi için yapılır. Ölçülen analitin miktarı ve dedektör cevabının kalibrasyon eğrisinde doğru orantılı olarak görüldüğü aralık ölçüm aralığıdır. Metot validasyon/verifikasyon çalışmalarında çalışılması planlanan analit konsantrasyonları ölçüm aralığında kalacak şekilde hazırlanır. Metoda ve çalışılan matrikse göre belirli sayıda ölçüm noktası ile standart eğri belirlenir. Standart eğri, içinde miktarı bilinen referans materyal ile veya kör numune içerisine ilave edilmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile oluşturulur. Her bir ölçüm noktasında en az iki ölçüm yapılır. Eurachem rehberinde en az 6 noktada, birde kör eklenerek ve her bir noktada tekrar sayısı 3 olarak, ISO 11095’de en az 3 farklı seviyede referans örnek ve tekrar sayısı ise en az 2 olarak belirtilmiştir. Her bir nokta için bağımsız dilüsyonlar hazırlanmalı ana solüsyondan seyreltme yapılmamalıdır. Analizi yapılan numune matriksinin yapısının farklılığına göre kalibrasyon eğrisinin de değişebileceği göz ardı edilmemelidir. Elde edilen yanıtla karşılık çizilen eğride maksimum ve minimum limitler belirlenmelidir. Kalibrasyon eğrisindeki en alt nokta kullanılacak analiz metodunun tayin limiti olmalıdır.

Sonuçlar grafiğe geçirilir ve “linear regresyon formülü” ile “korelasyon katsayısı” belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusallığı kontrol edilir. Korelasyon katsayısı  $> 0,99$  olmalıdır. Eğer korelasyon linear (doğrusal) değil ise ve problem analitik olarak çözümlenemiyorsa ilgili eğrideki parametreler, en küçük kare metodu kullanılarak belirlenmelidir (Yılmaz, 2013).

#### **1.3.4. Doğruluk**

Doğruluk, elde edilen ölçüm sonucunun gerçek değere yakınlığının ifadesidir. Kesinlik ve gerçeklik olmak üzere doğruluğun iki bileşeni vardır.

##### **1.3.4.1. Kesinlik**

Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine olan yakınlığını ifade eder ve sonuçların ortalama değer etrafındaki dağılımını gösterir (GTHB, 2018).

Kesinlik rastgele hataların dağılımını göstermektedir. Kesinlik ölçümünü etkileyen faktörler; zaman (zaman aralığının kısa veya uzun olması), kalibrasyon (aynı ekipmanda dahi ölçümler arasında kalibrasyonun yeniden yapılıp yapılmadığı), operatör (aynı veya farklı operatörler) ve ekipman (ölçümlerde aynı veya değişik ekipmanların kullanılıp kullanılmadığı) olup bu faktörlerdeki değişimlere göre kesinlik de değişmektedir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak iki kesinlik ölçümü bulunmaktadır (Yılmaz, 2013).

##### **1.3.4.1.1. Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik, aynı analistin, aynı cihaz ile kısa zaman aralığında yaptığı ve elde edilen sonuçlar arasında en küçük varyasyonun bulunması beklenen ölçüm sonuçlarının dağılımının ölçüsüdür (Magnusson ve Ornemark, 2014).

Bağımsız değişkenlerin kendi aralarındaki etkileşimlerinin incelenmesinde ve bu etkileşimlerin bağımlı değişkene olan etkilerini analiz etmede ANOVA kullanılır. Bağımsız değişkende grup sayısı çok ise ANOVA kullanılır. ANOVA ile “f” istatistiğine bakılır. Hesaplanan “f” değeri “f” ölçüt değerinden küçük ise gruplar arasında önemli bir fark yoktur şeklinde yorum yapılır (Tonya, 2011).

Tekrarlanabilirlik “r” harfi ile ifade edilir ve tekrarlanabilirlik şartlarında elde edilen kesinliktir. Tekrarlanabilirlik koşulları tanımı ISO 5725-1 ‘de aynı metot ile aynı örneklerde aynı laboratuvar, aynı ekipman ve aynı operatör tarafından kısa zaman aralığında yapılan bağımsız test çalışmaları olarak geçmektedir. Koşulların yakınlığından dolayı beklenen kesinlikte küçük olmaktadır (Yılmaz, 2013).



$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{ort})^2}{n-1}} \quad (1.8)$$

SD: Standart sapma

$x_i$ : analiz sonucu

$x_{ort}$ : analiz sonuçlarının ortalaması

n: analiz sayısı

$$\%RSD = \frac{SD}{x_{ort}} \times 100 \quad ; \quad RSD_r = \frac{SD_r}{x_{ort}} \quad (1.9)$$

$RSD_r$  : Tekrarlanabilirlik

#### 1.3.4.1.2. Tekrar Üretilirlik

Tekrar üretilebilirlik geçerli kılma çalışmalarında aynı metot ile çalışan laboratuvarlar arası varyasyonun ölçüdür. Ayrıca, laboratuvarlar arasında aynı niceliğin analiz edildiği ancak farklı metotlarla çalışıldığı durumlardaki varyasyonu da ifade edebilir (JCGM, 2012).

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ise, bir metodun aynı laboratuvarda aynı/farklı cihazlarla, ayrı analizciler tarafından, uzun zaman aralığında, aynı örneklerde yaptığı analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir ve aynı zamanda ara kesinlik olarak tanımlanır (GTHB, 2018). Kesinlik ifade türleri tablo 1.1' de verilmiştir.

$$\% RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left[ \frac{(x_i - y_i)}{x_{ort}} \right]^2}{2n}} \quad (1.10)$$

$x_i$ : Birinci tekrar sonucu

$y_i$ : İkinci tekrar sonucu

$x_{ort}$ : Paralel analiz sonuçlarının ortalaması

n: Paralel sayısı

Tablo 1.2. Kesinlik ifade türleri (TÜRKAK, 2019)

| Çalışma Türü                               | Ölçüm Koşulları |             | Cihaz, laboratuvar imkânları, ortam şartları | Zaman Aralığı | Kalibrasyon Eğrisi (uygunsa) | Laboratuvar |
|--|-----------------|-------------|--|---------------|------------------------------|-------------|
|  | Numune          | Analist     |  |               |                              |             |
| Tekrarlanabilirlik (r, sr, RSDr, %CVr)     | Aynı            | Aynı        | Aynı   | Kısa          | Aynı                         | Aynı        |
| Ara kesinlik (Ri, si, RSDi, %CVi)          | Aynı            | Aynı/farklı | Aynı/farklı                                  | Uzun          | Farklı                       | Aynı        |
| Tekrarüretilebilirlik* (R, sR, RSDR, %CVR) | Aynı            | Farklı      | Farklı                                       | Uzun          | Farklı                       | Farklı      |

\*Tekrarüretilebilirlik birden fazla laboratuvarın katılımıyla yapılan çalışmalar içindir.

#### 1.3.4.2. Gerçeklik

Sistematik hata (bias) hesabı yapılarak gerçeklik bulunur. Sistematik hata ölçüm yapılan metodunun gerçek sonucu verme yeteneğini ortaya koyar. Sistematik hatanın bulunabilmesi için doğru olarak kabul edilen referans ( gerçek) değer bilinmelidir (Yılmaz, 2013).

Çalışılan malzemeye göre gerçeklik değişik şekillerde isimlendirilebilmektedir. Gerçeklik referans materyal kullanılarak çalışıldığında “bias”; standart madde ile çalışıldığında “geri kazanım” olarak isimlendirilmektedir. Biasın yok edilmesi veya önemsiz düzeylere indirilmesi en önemli amaçtır (TÜRKAK R20.02, 2015).

Gerçeklik parametresi;

- Sertifikalı referans madde kullanma,
  - Bilinen konsantrasyonda kirlenmiş kör örnekle analizler yapma,
  - Referans bir metotla, geçerli kılınacak analiz sonuçlarını karşılaştırma,
  - Yeterlilik testlerine katılım,
- gibi yollardan herhangi biri kullanılarak tespit edilebilir (GTHB, 2018).

#### 1.3.5. Sağlamlık

Analitik bir yöntemin sağlamlığı, metot içindeki çeşitli parametrelerinde uygulanan küçük ancak planlı değişikliklerden etkilenmeden kalma düzeyinin ölçüsüdür. Sağlamlık metodun normal kullanım zamanındaki güvenilebilirliğinin bir göstergesidir (ICH, 2005).

Bir protokolün sağlamlığı, laboratuvarıda geliştirilmiş yöntemler, bilimsel bir yayından alınmış metotlar ve standardizasyon kuruluşlarının yayınladığı kapsamın dışında kalan metotlar için çalışılmalıdır (Magnusson ve Ornemark, 2014).

Sağlamlık çalışmalarının yapılabilmesi için analize etki eden faktörleri tespit etmek gerekir. Bu faktörler;

- rnek kompozisyonu,
- rnek miktarı,
- Üretim tarihi farklı kimyasallar,
- Kimyasalların saflık düzeyi,
- pH,
- Ekstraksiyon süresi,
- alkalama süresi,
- Sıcaklık,
- Basınç,
- Akış hızı,
- Kolon sıcaklığı vb olabilir.

Faktörler belirlendikten sonra, her bir faktör üzerinde belirli değişiklikler yapılır. Yapılan değişikliğe karşı sonuca önemli ölçüde etki eden faktörler tespit edilir ve bu faktörler metot prosedüründe açık bir şekilde ifade edilir (GTHB, 2018).

#### 1.4. lm Belirsizliği

lm belirsizliği, ölçüm sonucu ile beraber verilen, ölçülen büyüklüğe karşılık gelebilecek değerlerin dağılımını gösteren ve ölçüm sonucunun kalitesini belirleyen parametredir. A-tipi ve B-tipi olmak üzere 2 tip ölçüm belirsizliği vardır:

- **A Tipi:** lm sonucu elde edilen verilerin istatistiksel açıdan hesaplanabildiği belirsizliklerdir.
- **B Tipi:** Kalibrasyon sertifikaları, referans materyallerin sertifikaları gibi önceden elde edilmiş ölçüm sonuçlarının kullanıldığı belirsizliklerdir.

Belirsizlik bileşenlerinin hepsinin birleştirilmiş belirsizliğe katkısı aynı seviyede değildir. lm belirsizliğine katkı sağlayan bileşenler en büyük ölçüm belirsizliği bileşenin

1/3 den küçük ve bu bileşenlerin sayısı çok fazla değilse bunların ölçüm belirsizliği hesaplamalarda ihmal edilebilir (TÜRKAK R20.02, 2015).

Belirsizlik oluşturabilecek laboratuvar işlemlerinin belirsizlik genişliklerinin hesaplanması gerekir. Ancak toplam belirsizliğin hesaplanmasında dikkat edilmesi gereken belirsizlik bileşenlerinin belirlenmesi, önemli olmayanların göz ardı edilmesi gerekir. Belirsizlik bileşeni hesaplanmasında genel olarak 3 değişik yol izlenir (Maestroni, 2005):

- Laboratuvar da deneme çalışmaları ve ölçümler yaparak,
- Sertifikalardan ve üretici firmaların bilgi ve sonuçlarından, QA/QC verilerinden faydalanarak,
- Araştırmacının tecrübesi neticesinde vereceği kararları kullanarak.

### **1.5. Kalitatif Analizlerde Metot Validasyonu**

Kalitatif analizlerin IUPAC tarafından yapılan tanımı, bileşenlerin kimyasal reaktivitesi, çözünme özelliği, moleküler ağırlığı, erime noktası, emisyon ve absorbanans gibi ışıma özellikleri, kütle spektrumu, nükleer yarılanma süresi gibi kimyasal ve fiziksel niteliklerine göre tanımlandığı ve gruplandırıldığı analizlerdir şeklindedir (IUPAC, 2012).

Nitel bir metot, analitin kesim konsantrasyonu için “Evet/Hayır” cevabını etkili bir şekilde verir (Valcárcel vd., 2002). Kalitatif metotlarda, kesinlik, standart sapma veya bağıl standart sapma değerleri kullanılmaz ancak doğru ve yanlış pozitif ve doğru ve yanlış negatif oranları kullanılabilir. Kalitatif analizlerde uygulanacak metot validasyon/verifikasyon parametreleri (NMKL, 2007 ).

- Hassasiyet
- Doğruluk
- Yanlış negatif oranı
- Özgüllük
- Yanlış pozitif oranı
- Gözlenen ve beklenen sonuçların uyumu
- Minimum tespit sınırı

Kalitatif analizlerde sonucu “var/yok” veya “tespit edildi/tespit edilmedi” şeklinde verilmektedir. Kesinlik parametresi olarak bu analizlerde “yanlış pozitif” ve “yanlış negatif” oranları aşağıdaki formüllerle hesaplanır (Yılmaz, 2013).

% yanlış pozitifler = yanlış pozitiflerin sayısı/bilinen negatiflerin toplamı  $\times 100\%$

% yanlış negatifler = yanlış negatiflerin sayısı/bilinen pozitiflerin toplamı  $\times 100\%$

## 1.6. Önceki Çalışmalar

Karboksimetilselüloz; jelatin, kazein ve soya proteini gibi bazı gıda proteinlerinin çözünmesine yardımcı olmaktadır. CMC-protein kompleksi oluşturarak çözünme gerçekleştirir ve viskozite artar. Pudingde serum ayrılmasını engellemek amacıyla kullanılmaktadır (Güven ve Hayaloğlu, 2001). Güven (1998) farklı oranlarda yoğurda katılan karboksimetilselülozun sonuç vermediğini bildirmiştir.

Gülümser (1986) % 0.1 ve % 0.2 oranında karboksimetilselüloz ilave edildiğinde ayranların kıvamının arttığı ve duysal özelliklerinde herhangi bir olumsuz değişikliklerin olmadığı, fakat % 0.3 oranında ilave edildiğinde ayranın tadında değişimler gözlemlendiği belirtilmiştir. Karboksimetilselüloz ayranında % 0.3 oranında kullanıldığında serum ayrılmasının azaldığı ancak tamamen önlenemediği görülmüştür. Ayran üretiminde ısı işlemi ile birlikte karboksimetilselüloz kullanımının dayanıklılığı artırdığı tespit edilmiştir.

Aydar (1996) yoğurtlara eşit oranda su ve % 0.5 ile % 0.7 oranında olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda karboksimetilselüloz ilave ederek 60°C’de 15 dk ısı işlemi tabii tutarak ayranlar üretmiştir. % 0.7 oranında karboksimetilselüloz ilavesinin ve 60°C’de 15 dk ısı işleminin ayranın dayanıklılığı artırdığını bildirmiştir.

Altınayar (1997); süttten veya yoğurt kullanılarak değişik yöntemlerle üretilen ayranların niteliklerinin üretim yöntemlerinden etkilenmediğini bulmuştur. Yine aynı çalışmada karboksimetilselüloz ilave edilen ayranlarda kuru madde miktarında, yoğunluk ve viskozite değerlerinde yükselme, serum ayrılması değerlerinde azalma ve yağ, tuz, titrasyon asitliği, pH, asetaldehit ve tirozin değerlerinde ise herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür. Ayranın dayanıklılığını artırmak için 60°C’de 15 dk ısı işleminin ve optimum %0,7 oranında karboksimetilselüloz kullanımının etkili olduğu bulunmuştur.

Ayranlardaki başlıca tekstürel sorun olan serum ayrılmasının stabilizatör ilavesiyle azaltılması veya giderilmesine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Köksoy ve Kılıç (2004), geleneksel yolla ayran üretimi sırasında ayran sütüne farklı konsantrasyonlarda ilave ettikleri pektin, guar gum, locust bean gum (LBG) ve jelatinin ürünlerdeki etkilerini incelerken; Atamer vd. (1999), dayanıklı ayran üretiminde kullandıkları değişik oranlardaki pektinin, ayranların bazı özellikleri üzerindeki etkilerini incelemiştir.

Köksoy ve Kılıç (2004); tarafından yapılan çalışmada guar gum ve LBG kullanılarak üretilen ayranlardaki serum ayrılması en düşük seviyede bulunmuştur.

Atamer vd (1999) ise, depolamanın tüm aşamalarında % 0.4-0.6 ve 0.8 pektin katkılı ayranlarda serum ayrılması gözlenmezken, % 0.2 pektin katkılı örnekte ölçüm yapılamayacak bulanıklıkta serum ayrılması gözlemlenmiştir.

Jelatin, pektin, CMC (karboksi metil selüloz) ve çeşitli stabilizatör karışımları eklenerek üretilen ayranlarla ilgili yapılan diğer bir çalışmada da, stabilizatör kullanılmadan yapılan test örneklerinin duyusal özelliklerinin en yüksek değerlere sahip olduğu saptanmıştır. Araştırmacı CMC+karregen karışımı ilave ederek ürettiği ayranların serum ayrılması değerinin diğer örneklerden daha düşük seviyede olduğunu belirlemiştir (Şimşek, 1995).

Değişik yöntemlerle ayran yapımında karboksimetilselüloz kullanımı üzerinde çalışan Altınayar (1997) 30 günlük depolama sürecinde ayranların asetaldehit içeriklerini 3.21-6.68 ppm arasında tespit ederken, Aydar (1996) benzer bir çalışmada asetaldehit değerlerinin 3.08-6.35 ppm arasında değiştiğini tespit etmiştir.

Foley ve Mulcahy (1989) %5 şeker katılarak üretilen yoğurt içeceğinde serum ayrılmasını engellemede pektinin, propilen glikol aljinat ve karboksimetilselülozdan daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Süt proteini yüzdesi cinsinden %20'ye kadar pektin ilavesinde serum ayrılmasının engellendiği görülmüştür. Depolama sıcaklığının arttığı koşullarda serum ayrılmasının arttığı ve yağ oranı %2.3'e çıkarıldığında ise serum ayrılmasının azaldığı saptanmıştır. Isıl işlem yapılmış ve pektinle stabilize edilmiş yoğurt içeceğinin 20 hafta kadar depolama süresine sahip olduğu görülmüştür. Ürünlerin viskozitesi depolama sürecinde azalırken artan stabilizör miktarı ile arttığı gözlenmiştir. Serum ayrılmasında etki derecesine göre sıralama yapmak istenirse, sırasıyla pektin, propilen glikol aljinat ve karboksimetilselüloz şeklindedir. Viskozite açısından karşılaştırma yapıldığında en yüksek viskoziteye sırasıyla karboksimetilselüloz, propilen glikol aljinat ve pektinin sahip olduğu bulunmuştur. 65°C'de ısıl işlem uyguladıktan sonra 2 hafta depolama sonucunda karboksimetilselüloz ilaveli örneklerde büyük çökeltiler oluştuğu görülmüştür.

### **1.7. Çalışmanın Amacı**

Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde, (30 Haziran 2013 Pazar Sayı : 28693) fermantasyondan sonra ısıl işlem görmemiş aromalandırılmamış fermente süt ürünlerini doğal ürün olarak kabul edilmekte olup bunlarda hiçbir katkı maddesinin

olmaması gerektiği yazmaktadır. Karboksi metil selüloz, sodyum karboksi metil selüloz, selüloz gam (E466), çapraz-bağlı sodyum karboksi metil selüloz, çapraz bağlı selüloz gam (E468) enzimatik hidrolize karboksi metil selüloz, enzimatik hidrolize selüloz gam (E469) yoğurt ve ayran gibi fermente süt ürünlerine birçok özelliğinden dolayı katılmaktadır. Katılması yasak olan bu katkı maddesinin söz konusu ürünlerde tespitine yönelik validasyonu yapılmış analiz metotları bulunmamaktadır.

Bu çalışmamızın amacı sodyum karboksi metil selülozu tespit edecek metodu ortaya koyarak, bu katkı maddesinin tespitine yönelik başta yoğurt ve ayran olmak üzere validasyon çalışmalarını ve ölçüm belirsizliklerini tamamlayarak uygun metotları geliştirmek ve güvenli gıda üretimine katkı sağlamaktır. Bu çalışmamızın amaçlarından bir tanesi de validasyonu gerçekleştirilen metotların özel ve resmi gıda kontrol laboratuvarları, gıda analizleri yapan diğer kuruluşlar, gıda işletmeleri tarafından kullanılabilir hale getirilmesini sağlamaktır.

### **1.8. Çalışmanın Kapsamı**

Na – CMC, ticari önemi olan bir stabilizördür ve tanecik şeklinde üretilir. Suda kolay çözünmesi ve çok amaçlı özelliği nedeniyle yaygın kullanılan bir hidrokolloittir. Dondurma, şerbet ve dondurulmuş ürünlerde buz kristallerinin oluşumunu önleyici; krema, jöle ve pudinglerde sineresis olayını engelleyici; pasta ve diğer fırın ürünlerinde hacim artışı sağlayıcı ve suyu koruyucu; diyet gıdalar ve meşrubat sanayinde emülgatör ve stabilizör olarak kullanılmaktadır. Gıda sanayi üretiminde yasal düzenlemelere uygun olarak gıda katkı maddeleri kullanırsa sağlık açısından risk minimize edilir. Başka bir deyişle gıda sanayi ürettiği gıdada gıda katkı maddeleri kullanırken teknik gerekliliğin yanı sıra, yasal düzenlemelerde o gıda için izin verilen gıda katkı maddelerini, izin verilen miktarda kullanmak zorundadır. Gıda katkı maddeleri ile ilgili temel sorun bu noktadan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla üreticilere büyük sorumluluk düşmektedir.

Gıda sanayi yasal düzenlemelere uygun gıda katkı maddeleri kullanımını sosyal bir sorumluluk olarak görmeli, üretiminde oto kontrolünü yapmalı ve sağlık riski taşımayan gıdaları tüketime sunmalıdır. Sanayinin doğru gıda katkı maddeleri kullanımı ve katkı katılmayacak gıdalara katkı katılmaması, Devlet tarafından da sıkı bir şekilde denetlenmeli, üretici ve tüketiciler bu konularda eğitilmelidir. Gıdaların katkı maddeleri açısından denetlenmesi esnasında bir gıda için kullanılması yasak olan ama kullanıldığından şüphe

edilen katkı maddelerinin analizlerinin yapılması gereklidir. Na – CMC belirtildiği gibi kullanım amacı geniş bir katkı maddesi olduğundan özellikle yoğurt ve ayran gibi gıda ürünlerine katılması yasak olmasına rağmen katıldığı düşünülmektedir. Na – CMC yoğurt ve ayran gibi gıda ürünlerinde tespitine yönelik analiz metodu yoktur. Bu durumda katkı yönetmeliğine göre herhangi bir katkı maddesinin katılması yasak olan ürünlerde söz konusu katkı maddesinin analizleri yapılacaktır.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

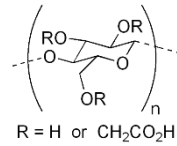
Yapılan çalışmalar esnasında Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümü araştırma laboratuvarı ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü araştırma laboratuvarındaki cihazlardan yararlanılmıştır.

#### 2.1.1. Cihazlar

- Spektrofotometre cihazı Shimatzu marka UV-1800
- FT-IR spektrometresi Perkin Elmer Frontier marka
- Terazî
- Santrifüj
- Tüp Karıştırıcı
- Muhtelif hacimlerde pistonlu pipetler
- Yoğurt mayalama makinası

#### 2.1.2. Kimyasallar

- Sülfirikasit ( $H_2SO_4$ ) Merck marka
- Fenol ( $C_6H_5OH$ ) Merck marka
- Bakır(II)sülfatpentahidrat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) Merck marka
- Karboksimetil selüloz sodyum tuzu Merck Marka



Kullanılan çözeltiler analitik saflıktadır.

## 2.2. Yoğurt ve Ayran Ürünlerinin Hazırlanması

Çalışmada; Nordica marka sekiz adet 180 mL hacme sahip kapaklı kavanozu bulunan yoğurt mayalama makinası kullanıldı. % 0.10, % 0.25, % 0.50, % 0.75, % 1.00 ve % 2.00 CMC içeren yoğurt üretimi için sırasıyla 0.18 g, 0.45 g, 0.90 g, 1.35 g, 1.8 g ve 3.6 g CMC 180 mL kavanozlara tartıldı. Üzerine 100 mL 85 °C' de süt (UHT süt) ilave edilerek çay kaşığı vasıtasıyla CMC' nin erimesi sağlandı. Üzerine 80 mL 85 °C' de süt ilave edilerek tekrar karıştırıldı. Sütün 42°C civarına kadar soğuması beklendikten sonra homojenizatör yardımıyla tamamen CMC'in erimesi için 200 rpm'de karıştırıldı. Cihaz önceden çalıştırılarak içindeki suyun sıcaklığının 42 °C'ye gelmesi sağlandı. Kavanozlar şekil 2.1'de görülen yoğurt mayalama makinesine yerleştirildi. 42 °C sıcaklığa gelen süt kavanozlarına % 2 olacak şekilde her bir kavanoza 3.60 g yoğurt mayası ilave edilerek her kavanoz iyi bir şekilde karıştırıldı. 2 adet içinde CMC bulunmayan kör numune de hazırlandı. Mayalama işlemi bittikten sonra mayalama cihazının kapağı kapatılarak 180 dk mayalama işlemine devam edildi. 180 dk sonunda oluşan yoğurtlar +4°C 'de buzdolabına alınarak soğutma işlemi yapıldı. Bu şekilde içinde belirli oranlarda CMC bulunan yoğurt numuneleri hazırlandı.



Şekil 2.1. Yoğurt ve ayran mayalama işlemi

Ayran üretimi için sütün kuru maddesi % 6 olacak biçimde sulandırıldı. Ayran için sulandırılan sütler 85 °C'ye ısıtıldı. % 0.10, % 0.25, % 0.50, % 0.75, % 1.00 ve % 2.00 CMC içeren ayran üretimi için sırasıyla 0.18 g, 0.45 g, 0.90 g, 1.35 g, 1.8 g ve 3.6 g CMC 180 mL kavanozlara tartıldı. Üzerine 100 mL 85 °C 'de ayarlanan süttten ilave edilerek çay kaşığı vasıtasıyla CMC'nin erimesi sağlandı. Üzerine 80 mL 85 °C 'de sulandırılmış süt ilave edilerek tekrar karıştırıldı. Sütün 42°C civarına kadar soğuması beklendikten sonra homojenizatör yardımıyla tamamen CMC'nin erimesi için 200 rpm'de karıştırıldı. Cihaz önceden çalıştırılarak içindeki suyun sıcaklığının 42 °C'ye gelmesi sağlandı. Kavanozlar şekil 2.1'de görülen yoğurt mayalama makinasine yerleştirildi. 42 °C sıcaklığa gelen süt kavanozlarına % 2 olacak şekilde her bir kavanoza 3.60 g yoğurt mayası ilave edilerek her kavanoz iyi bir şekilde karıştırıldı. 2 adet içinde CMC bulunmayan kör numune de hazırlandı. Mayalama işlemi bittikten sonra mayalama cihazının kapağı kapatılarak 180 dk mayalama işlemine devam edildi. 180 dk sonunda oluşan ayranlar +4 °C' de buzdolabına alınarak soğutma işlemi yapıldı. Bu şekilde içinde belirli oranlarda CMC bulunan ayran numuneleri hazırlandı.

### **2.3. Deney Tasarımlarının Yapılması**

#### **2.3.1. CMC' nin Kazein Proteinlerinden ve Diğer Bazı Enzimatik Parçalanma ile Matrislerden Ayrılması**

CMC ve kazein proteinleri düşük pH' larda etkileşim halindedir. Bu nedenle CMC' nin bu sistemden ayrılması gerekir. Yaklaşık 10 g kadar numune 250 mL erlene tartılarak bunun üzerine 6 g tuz 75 mL su ilave edilerek, 99 °C'de 10 dk ısıtıldı. 70 °C' a kadar soğutulup 25 mL buffer-papain karışımı ilave edildi.16 saat kadar inkübe edilerek, 40 °C' ye kadar soğutulup 10 mL 1 M CaCl<sub>2</sub> ve 2 g Hylo super cel ilave edildi. Qualitative Grade filter kağıdından süzüldü. Kalıntı 20 mL kadar saf su ile yıkanıp süzüntüler bir erlende biriktirildi ve kalıntı atıldı. Süzüntüye 2 g CPC ve 1 g Hylo supercel ilave edildi, 45 °C, 15 dk inkübe edilerek, soğutulup Reeve Angel No. 202 Qualitative Grade filitre kağıdından süzüldü, kalıntı 25 mL % 0.01 CPC-0.01 M NaCl ile yıkanarak kalıntı atıldı, süzüntü bir erlende önceki süzüntü ile biriktirildi. Filtrat 600 mL kadar saf su ile sulandırılıp 15 dakika 35 °C'de tutulup Hylo super cel kolonda süzülerek süzüntü atıldı. Kalıntı 50 mL % 0.01 CPC-0.01 M NaCl ile yıkanıp sonra 200 mL 0.5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile yıkanıp daha sonra % 0.01

CPC-0.01 M NaCl ile fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile negative oluncaya kadar yıkandı. Süzüntü atıldı. Kolonda Na-CMC kalıntısı farklı analiz yöntemleri için çeşitli şekilde kullanıldı. Ancak bu yöntemin hem uzun hem de kullanılan kimyasal maddenin çok olması hasebiyle ve pahalı olmasından dolayı ön hazırlama işleminde kullanılmasından vazgeçildi (Zorba ve ova, 1999)

### **2.3.2. CMC' nin 1000 mg/L CuSO<sub>4</sub> Çözeltisi ile Çöktürülmesi**

CMC ve kazein proteinleri düşük pH' larda etkileşim halindedir. pH 6.70 civarında bu etkileşim olmamaktadır. Bu özellikten faydalanarak CMC'nin 1000 mg/L CuSO<sub>4</sub> ile çöktürülmesi işlemi gerçekleştirildi (Juneja vd., 2013).

Yapılan deney şöyle uygulandı; 5 g homojenize edilmiş yogurt numunesinden 100 mL' lik behere tartıldı. Üzerine 40 mL saf su ilave edilip 10 dk kaynatıldı. Soğutulup pH 6.80-7.00 civarına ayarlandı. Tekrar 10 dk kaynatılarak soğutulup hacmi 50 mL' ye tamamlandı. Bundan sonra 50 mL' ye tamamlanmış olan çözelti süzgeç kağıdı ile 100 mL' lik bir erlene huni yardımı ile süzüldü. Süzüntüden 15 mL santrifüj tüplerine 10 mL alınarak 3000 devirde 10 dk. santrifüj edildi. Bundan 15 mL' lik santrifüj tüpüne 2 mL alınarak üzerine 5 mL 1000 mg/L CuSO<sub>4</sub> ilave edildi. Tüp karıştırıcısında 2 dk karıştırıldı. Oluşan Cu-CMC kompleksi 3000 devirde 10 dk. Santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım 50 mL balonjojeye aktarıldı. Santrifüj tüpünde kalan Cu-CMC kompleksine 5 mL saf su ilave edilip 2 dk tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Bu işlem toplamda 3 defa tekrarlandı. Her defasında üstteki berrak kısım 50 mL balonjojede biriktirildi. CMC' nin Cu<sup>++</sup> üzerinden miktar tayini için kullanıldı. Yıkamış olan çökelek CMC' nin diğer analizleri için kullanıldı.

### **2.3.3. Matris- Eşleşmesi Kalibrasyonun Hazırlanması**

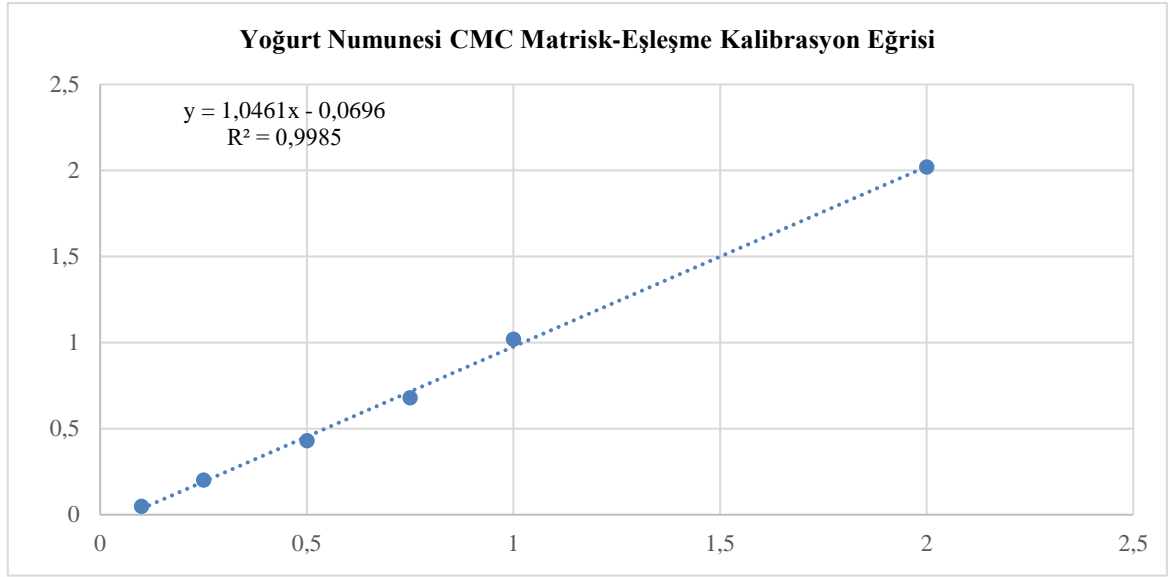
Madde 2.2' de belirtilen çalışmada; % 0.10, % 0.25, % 0.50, % 0.75, % 1.00 ve % 2.00 CMC içeren yogurt üretimi yapıldı. Her % CMC içeren numunelerden homojenize edilerek 5 g 100 mL' lik behere tartıldı. Üzerine 40 mL saf su ilave edilip 10 dk kaynatıldı. Soğutulup pH 6.80-7.00 civarına ayarlandı. Tekrar 10 dk kaynatılarak soğutulup hacmi 50 mL' ye tamamlandı. Bundan sonra 50 mL' ye tamamlanmış olan çözelti süzgeç kağıdı ile 100 mL' lik bir erlene huni yardımı ile süzüldü. Süzüntüden 15 mL santrifüj tüplerine 10 mL alınarak 3000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Bundan 15 mL' lik santrifüj tüpüne 2 mL

alınarak üzerine 5 mL 1000 mg/L  $\text{CuSO}_4$  ilave edildi. Tüp karıştırıcısında 2 dk karıştırıldı. Oluşan Cu-CMC kompleksi 3000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım 50 mL balonjojeye aktarıldı. Santrifüj tüpünde kalan Cu-CMC kompleksine 5 mL saf su ilave edilip 2 dk tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Bu işlem toplamda 3 defa tekrarlandı. Her defasında üstteki berrak kısım 50 mL balonjojede biriktirildi. Tüplerde kalan Cu-CMC kompleksine 2 mL saf su ilave edilerek bir mikrospatül yardımıyla kompleks karıştırıldı. Üzerine 100  $\mu\text{L}$  taze hazırlanmış fenol çözeltisi ( 4 g Fenol + 1 mL saf su iyice çalkalanarak sıvı hale getirildi) ilave edildi. Tüpte bulunan karışıma 5 mL derişik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( d:1.84 % 95-97) kaydırarak eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak iyice karıştırıldı. Aynı şekilde içinde CMC bulunmayan numuneye de işlemler uygulandı. Kör ve % 0.1 CMC’li numunede meydana gelen renkler şekil 2.2’ de gösterildiği biçimdedir.



Şekil 2.2. CMC’ li yoğurt ve içinde CMC olmayan yoğurdun verdiği renk

Oluşan rengin gelişimi için 15 dk beklendi. Tüpler çeşme suyu altında soğutuldu. Bu tüplerden kör ve diğer standartlardan 1 mL alınarak üzerlerine 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  çözeltisi ( 2 + 5, Saf Su +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ) ilave edildi. Tüp karıştırıcısında iyice karıştırıldı. Spektrofotometrede 490 nm’de okuma işlemine geçildi. Cihazın sıfır ayarı, analizde kullanılan içinde CMC olmayan kör numune ile yapıldı. Matriks-Eşleşme kalibrasyon eğrisi şekil 2.3’de gösterildiği biçimdedir.

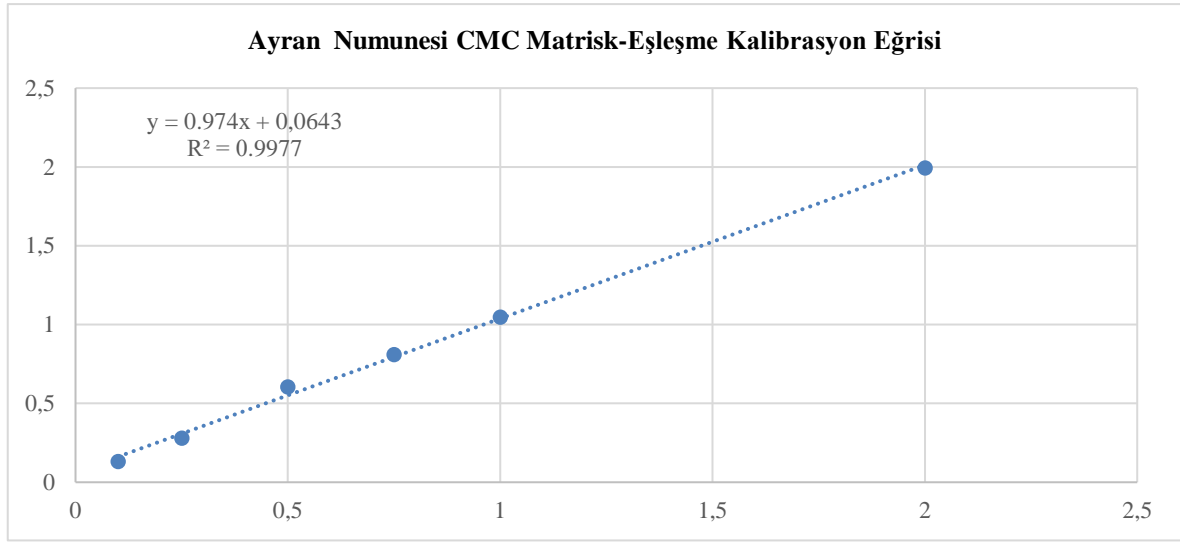


Şekil 2.3. Yoğurt numunesi CMC matrisk-eşleşme kalibrasyon eğrisi

Tablo 2.1. Yoğurt numunesi CMC matriks-eşleşme kalibrasyon eğrisi için okunan absorbans değerleri

| % Konsantrasyon | Absorbans |
|-----------------|-----------|
| 0.10            | 0.047     |
| 0.25            | 0.201     |
| 0.50            | 0.429     |
| 0.75            | 0.679     |
| 1.00            | 1.019     |
| 2.00            | 2.019     |

Oluşan rengin spektrofotometrede 200-800 nm spektrum taraması yapıldı. Oluşan renk 490 nm’de en yüksek absorbansı verdi. Oluşan absorbansa ait çıktı şekil 2.4.’ te verilmiştir.



Şekil 2.4. Ayran numunesi CMC matrisk-eşleşme kalibrasyon eğrisi

Tablo 2.2. Ayran numunesi CMC matriks-eşleşme kalibrasyon eğrisi için okunan absorbans değerleri

| % Konsantrasyon | Absorbans |
|-----------------|-----------|
| 0.10            | 0,131     |
| 0.25            | 0,280     |
| 0.50            | 0,604     |
| 0.75            | 0,810     |
| 1.00            | 1,047     |
| 2.00            | 1,994     |

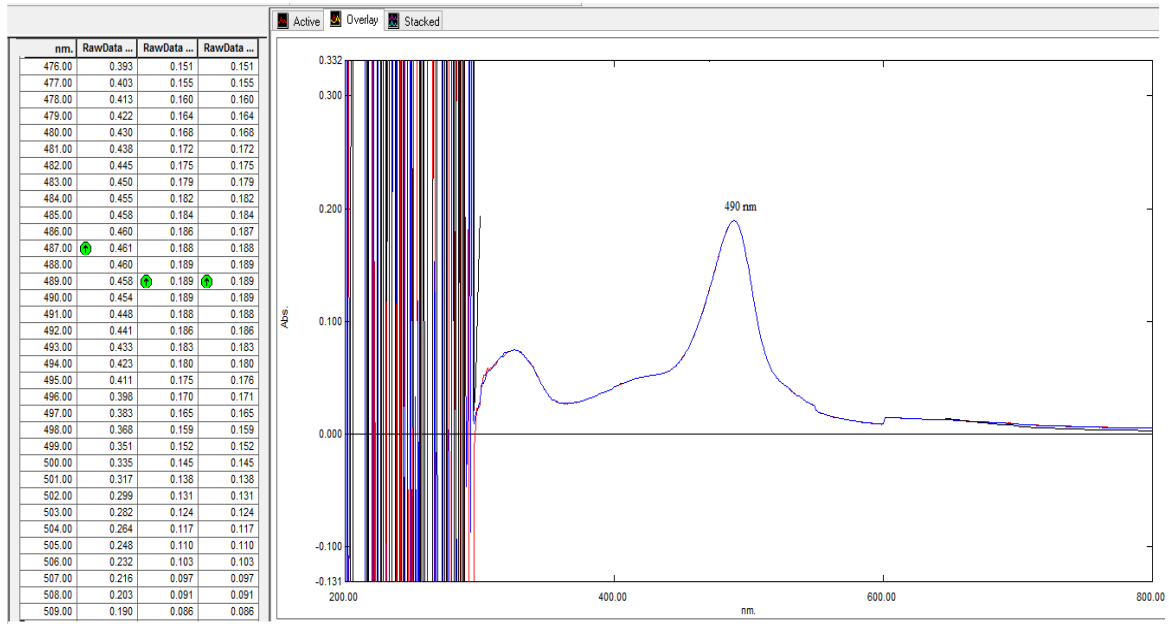
#### 2.3.4. Spektrum Tarama İşlemi

Bilinmeyen bir maddenin UV sahasındaki spektrumunun elde edilmesi ve bunun bilinen standartlarla karşılaştırılması ile o maddenin tanımlanması yapılabilir. Konsantrasyona karşı okunan, absorbans değerleri bir grafik kağıdı üzerinde noktalanarak birleştirilirse, o maddenin spektrumu elde edilir. Elde edilen spektrum, bilinen madde spektrumu ile karşılaştırılır. Bu şekilde üzerinde çalışılan bir maddenin spektrum taraması yapılarak en fazla absorbans verdiği dalga boyunda miktar tayini ile alakalı çalışmalar yapılabilir. Bu çalışmada Shimatzu marka UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanılarak, 2

mL saf suya 100 µL fenol çözeltisi ilave edilerek ve 5 mL derişik sülfirik asit ( H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ilave edilerek kör hazırlandı. % 0.25 CMC içeren yoğurt numunesi 2.3.3'deki gibi hazırlanarak oluşan rengin 200 ile 800 nm arasında spektrum taraması yapıldı.

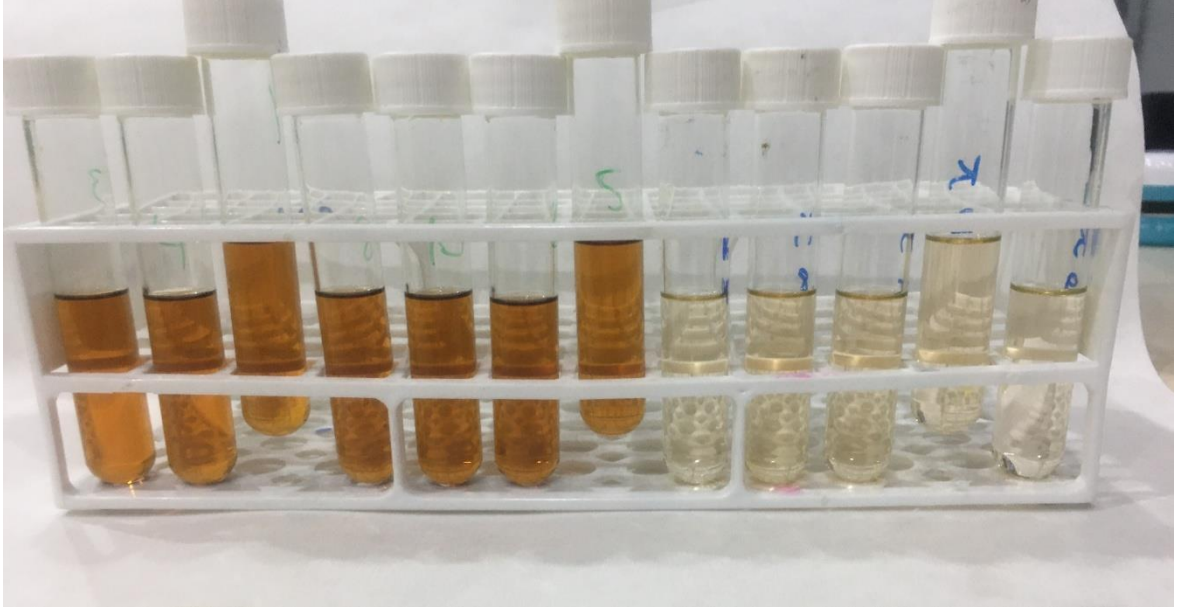
### 2.3.5. CMC' nin Renge Göre Kalitatif Tespiti İçin Numune Hazırlama ve Analizinin Yapılması

Kalitatif analizde iki analizci tarafından toplamda % 0.10 CMC içeren yoğurt numunesinde (+) pozitif olarak 24 adet çalışma, 20 adet de negatif çalışma yapıldı. Negatif çalışmada içinde CMC bulunmayan yoğurt numunesi çalışıldı. Bu çalışmanın deneysel kısmı 2.3.3 maddesinde anlatıldığı şekilde yapıldı. Renk değişimleri şekil 2.6'da görüldüğü gibi meydana geldi. Renk değişimine bakılarak var ya da yok tespiti yapılmış oldu. Ayrıca kör numune ile CMC ilave edilen numunelerin 275 nm ile 800 nm arasında spektrum taramaları yapılarak da karşılaştırma yapıldı. Kör numune ile CMC ilaveli numunenin spektrumları arasında fark bariz biçimde görülmektedir. Şekil 2.5'te spektrumlar verilmiştir. CMC bulunan numunenin 490 nm'de absorbandsının yüksek olduğu tespit edildi.



Şekil 2.5. CMC' nin Fenol+ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaksiyonundan vermiş olduğu rengin spektrum taraması



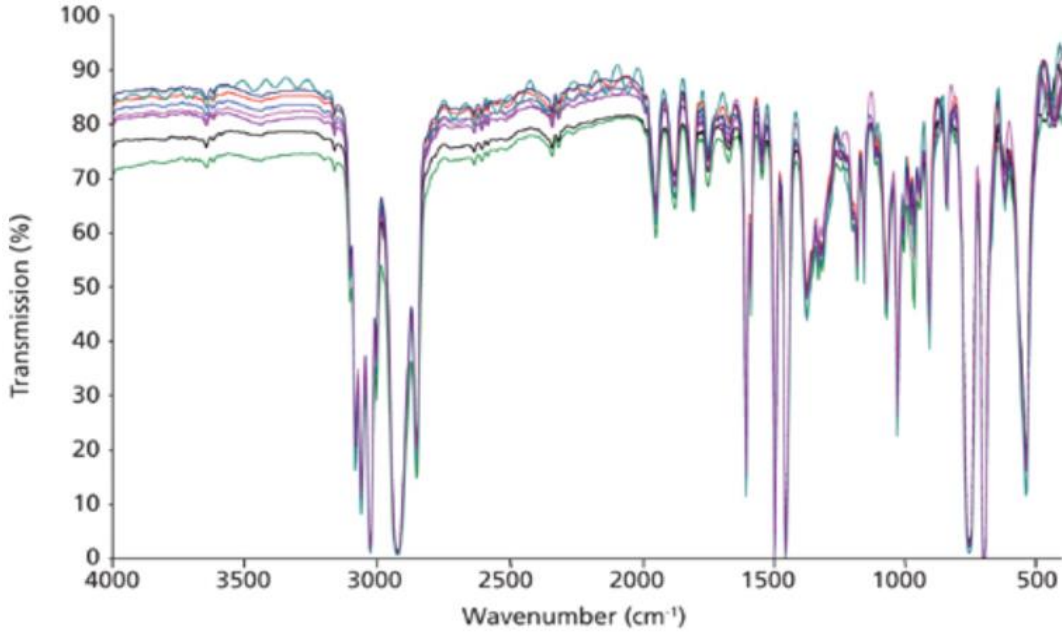


Şekil 2.6. CMC' nin Fenol+ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaksiyonundan vermiş olduğu renkler, kör ve % 0.25 CMC ' li yoğurt

### 2.3.6. CMC' nin FT-IR Spektroskopisi ile Kalitatif Tespiti İçin Numune Hazırlama ve Analizinin Yapılması

Kalitatif analizde iki analizci tarafından toplamda LOQ seviyesinde % 0.10 CMC içeren yoğurt numunesinde (+) pozitif çalışma olarak 20 adet çalışma, 20 adet de negatif çalışma yapıldı. Negatif çalışmada içinde CMC bulunmayan yoğurt numunesi çalışıldı. Pozitif çalışmada madde 2.2'de belirtildiği biçimde elde edilen % 0.10'lık CMC içeren yoğurt numunesi hazırlandı. Numunelerin FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) analizi için deneysel kısmı 2.3.3 maddesinde anlatıldığı şekilde yapıldı. Elde edilen Cu-CMC kompleksi ve kör numuneden elde edilen çökelek 105 ± 2 °C'de etüvde kurutuldu. Kurutulan Cu-CMC kompleksleri FT-IR analizi için her biri ayrı ayrı 1 mL'lik ependorf tüplerine konuldu. FT-IR analizi KTÜ Kimya bölümünde Perkin Elmer Frontier marka FT-IR spektrofotometre cihazında yapıldı.

Cihazın her kullanımdan önce kalibrasyonu cihaz kullanım talimatında yazan prosedürüne göre polistiren film, FT-IR spektrometrenin genel performansını kontrol etmek için kullanıldı. Spektrumlar, Perkin Elmer Frontier FT-IR spektrometresi üzerinde ölçülmüştür. Şekil 2.7'de verilmiştir. Cihazın ölçüm kapasitesi bu şekilde test edilmiştir.



Şekil 2.7. Polistiren film, FT-IR spektrometrenin genel performansını kontrol spektrumu

## 2.4. CMC Analizi ile Alakalı Yapılan Ancak Vazgeçilen Diğer Çalışmalar

### 2.4.1. Na-CMC' nin Kalitatif Analizi

Spektrofotometrik analiz yapmak için madde 2.3.1' de elde edilen kolonda bulunan kalıntı veya diğer çökelti 50 mL sıcak su ile çözülür. Bu çözeltiden 1 mL alınıp üzerine 5 damla 1 naftol ilave edilir. 2 mL derişik  $H_2SO_4$  ilave edilerek altta bir tabaka oluşturuldu. Tabakaların arasında kırmızı mor ara yüzün gelişmesi CMC' nin varlığını gösterdi. Bu şekilde tespit edildi veya tespit edilmedi şeklinde analiz yapılmış oldu. Bu çalışma 2.3.1' de anlatılan yönteme göre planmıştı ancak 2.3.1' deki yöntemden matriks girişimi olduğundan vazgeçildi. Bu yöntem kalitatif olarak 2.3.4. ve 2.3.5. ' e göre yapıldı.

### 2.4.2. Na-CMC' nin Spektrofotometrik, HPLC, GC Analizi

Üstteki ayırma işlemleri tamamlandıktan sonra Spektrofotometrik analiz yapmak için kolonda bulunan kalıntı 20 mL veya diğer   kelti % 30  $H_2SO_4$  ile (80  C) yıkandı, hacmi oda sıcaklığında 100 mL'ye % 30  $H_2SO_4$  ile tamamlandı. Çözeltiden 1 mL alınıp üzerine 9 mL 2,7 naftalin diol çözeltisi ilave edilecek kaynar su banyosunda 3 saat tutulup oda sıcaklığına kadar soğutulup, 540 nm' de spektrofotometrede köre karşı okuması

yapıldı. % 0.01, % 0.025, % 0.050, % 0.75 ve % 0.100 standartlara aynı işlem uygulanarak 540 nm’de spektrofotometrede köre karşı okuması yapıldı. Konsantrasyona karşı Absorbans grafikleri çizilip numunedeki CMC miktarı tespit edilecek biçimde planlandı. Ayrıca bu yöntem HPLC-UV, Na-CMC’ nin SPME- GC/MS-FID ile analizi, Na-CMC’ nin HS- GC/MS-FID ile analizleri CMC’ nin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile muamelesi ve oluşan formaldehitin DNPH ile muamelesi sonucu oluşan bileşiğin miktarının tespiti esasına dayanmaktaydı. Ancak yapılan denemelerde çok az miktarda formaldehit oluşması ve % geri alma oranlarının düşük olması nedeniyle bu yöntemler kullanılmadı. Bu yöntemlerin yerine daha sağlam ve % GA oranı yüksek olan geliştirmiş olduğumuz 2.3.3. ve 2.3.4.’te belirtilen metot kullanıldı.

## **2.5. Kantitatif Analiz Metodu ile Alakalı Yapılan Validasyon Çalışmaları**

Yapmış olduğum bu çalışmada hem kalitatif hem de kantitatif olarak analiz metodu geliştirildiği için kalitatif ve kantitatif olarak metot validasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

### **2.5.1. Kantitatif Analiz İçin Verifikasyon Parametreleri**

- Spesifiklik/Seçicilik
- Tespit Limiti (LOD)
- Ölçüm Limiti (LOQ)
- Lineerite
- Geri Kazanım
- Tekrarlanabilirlik
- Tekrar Üretilirlik
- Ölçüm Belirsizliği
- Sağlamlık

Metot validasyonu için numune matriksi olarak yoğurt ve ayran kullanıldı. Tekrarlanabilirlik çalışması için; iki analizci bir gün içinde 6 paralel çalışmayı % 0.25, %

0.50 ve % 1.00 konsantrasyonda gerçekleştirdiler; Tekrar üretilebilirlik çalışması için; iki analizci 6 farklı günde % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonda çalışma gerçekleştirdi. LOD ve LOQ çalışması için iki analizci % 0.10 konsantrasyonda 10 adet çalışma gerçekleştirdiler. Lineerite çalışması % 0.10, % 0.25, % 0.50, % 0.75, % 1.00 ve % 2.00 konsantrasyonda matriks-eşleşme kalibrasyonu ile yapıldı. Geri alma çalışması % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonda gerçekleştirildi. Metodun ölçüm aralığı % 0.10 - % 2.00 olarak tespit edildi. Tüm belirtilen çalışmalar yoğurt ve ayran numunelerinde gerçekleştirildi.

#### **2.5.1.1. Spesifiklik ve Seçicilik**

Yapmış olduğum çalışma; yoğurt ve ayran numunelerinde bulunan CMC'nin pH 6.70-7.00 aralığında ısıtılmak suretiyle kazeinatlardan ayrılması, CMC'nin 1000 mg/L  $\text{Cu}^{++}$  çözeltisi ile çöktürülmesi, elde edilen çökeleğin FT-IR ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak analiz edilmesi esasına dayanmaktadır. CMC'nin 1000 mg/L  $\text{Cu}^{++}$  ile çöktürülmesi burada spesifik olaydır. Ayrıca FT-IR analizi de CMC için spesifiktir. CMC'nin Fenol ve  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile 490 nm'de maksimum absorbası vermesi de spesiftir. CMC'nin  $\text{Cu}^{++}$  ile çöktürülmesi sadece CMC tarafından meydana gelmektedir. Bu nedenle de CMC'nin  $\text{Cu}^{++}$  ile yapmış olduğu kompleks seçicidir.

Madde 2.3.2.'de gerçekleştirilen yöntem yoğurt ve ayran numunelerinden CMC'nin izolasyonu için spesifik ve seçici bir yöntemdir.

#### **2.5.1.2. Tespit Limiti (LOD), Tayin Limiti (LOQ) ve Metot Tespit Limiti (MDL)**

Tespit sınırı (LOD) hesaplanması ve tayin sınırı (LOQ) hesaplanması aşağıda vermiş olduğum formüllere göre yapıldı. Tespit limiti ve tayin limiti çalışmasında; % 0.10 CMC içerecek şekilde yoğurt ve ayran numunesi hazırlandı. İki ayrı analizci tarafından hem ayran hem de yoğurt için 10' ar adet toplamda 20 adet çalışma yapıldı. Yöntem olarak 2.3.2, 2.3.3, maddelerinde verilen adımlar kullanıldı. Ortalama değerleri ve standart sapma değerleri hesaplandı. Metot deteksiyon limiti, belirli bir analitik yöntem ile bir maddenin ölçümlerinin kolayca kör bir ölçümden nasıl ayırt edilebileceğini tanımlayan istatistiksel olarak belirlenmiş değerdir. Metot deteksiyon limitleri matris, enstrüman ve analizciye özgüdür ve iyi tanımlanmış bir analitik yöntem gerektirir. Yapılan çalışma sonucunda 2.1, 2.2 ve 2.3' de belirtilen formüller kullanılarak LOD, LOQ ve MDL hesaplamaları yapıldı.

$$\text{LOD} : \text{SD} \times 3 \quad (2.1)$$

$$\text{LOQ} : \text{SD} \times 10 \quad (2.2)$$

LOD : Tespit Limiti (Limit of Detection)

LOQ : Tayin Limiti (Limit of Quantitation)

SD : Standart Sapma (Standard Deviation)

Metot deteksiyon limiti, farklı laboratuvarların kapasitelerini aynı metotlarla ve aynı laboratuvardaki farklı analitik metotlarla karşılaştırmak için kullanışlı bir değerlendirme sağlar. Metot Tespit Limiti (MDL), analit konsantrasyonunun sıfırdan büyük olduğuna ve % 99 güvenle ölçülebilen ve raporlanabilen bir maddenin minimum konsantrasyonudur. Bir numunenin analiti içeren belirli bir matristeki analizinden belirlenir.

$$\text{MDL} : (s) \times (t\text{-değeri}) \quad (2.3)$$

s: Analiz sonuçlarından elde edilen standart sapma

t- değeri : % 99 güven aralığında t tablosundan elde edilen değer

### 2.5.1.3. Lineerite ve Ölçüm Aralığı

Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin miktarı (konsantrasyonu) ve dedektör yanıtının (response) doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Metot geçerli kılma çalışmalarında analitin konsantrasyonları bu aralık dikkate alınarak planlanır. Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnek ve/veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Her bir ölçüm noktasında en az iki ölçüm yapılır. Eurachem rehberinde en az 6 noktada, bir de kör eklenerek ve her bir noktada tekrar sayısı 3 olarak, ISO 11095’de en az 3 farklı seviyede referans örnek ve tekrar sayısı ise en az 2 olarak belirtilmiştir. Her bir nokta ana solüsyondan dilüsyonlar yapılması yerine bağımsız olarak hazırlanmalıdır. Kalibrasyon eğrisinin analiz edilen örnek yapısının farklılığına göre değişebileceği göz ardı

edilmemelidir. Elde edilen yanıtla çizilen eğride üst ve alt sınırlar belirlenmelidir. Kalibrasyon eğrisinin en alt noktası uygulanan analiz metodunun tayin limiti olmalıdır. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “linear regresyon formülü” ile “korelasyon katsayısı” belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı  $>0,995$  olmalıdır. Regresyon hesabı için Excelde bulunan formüllerden yararlanılabilir. Eğer korelasyon linear (doğrusal) değil ise ve problem analitik olarak çözümlenemiyorsa ilgili eğrideki parametreler, en küçük kareler yöntemi kullanılarak belirlenmelidir.

#### **2.5.1.4. Geri Kazanım**

Geri alma çalışması, yoğurt ve ayran numunelerinde % 0.50 ve % 1.00 oranında CMC olacak biçimde yapıldı. Bu çalışmada iki farklı analizci tarafından her bir farklı konsantrasyonda 10 adet analiz olacak biçimde gerçekleştirildi. Yöntem olarak 2.3.2 ve 2.3.3 maddelerinde belirtilen adımlar kullanıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilen formüle göre % geri alma oranı hesaplandı.

$$\%R = [(CF - CU) / CA] \times 100 \quad (2.4)$$

CF : Analit eklenmiş kör örnek ölçüm sonucu

CU : Standart eklenmemiş kör örnek ölçüm sonucu

CA : Eklenen standart miktarı

#### **2.5.1.5. Kesinlik**

Bir metodun ölçüm sonuçlarının gerçek değere ve birbirine yakınlığını göstermek için kullanılır. Doğruluk; kesinlik ve gerçeklik olarak 2 parametreden meydana gelir. Kesinlik ile ölçüm sonuçlarında çıkan değerlerin birbirine yakınlığı ifade edilir. (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011). Bu 2 parametre için metotlarda, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır.

#### 2.5.1.5.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmasında aynı gün içerisinde % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonlarda olacak biçimde hem yoğurt hem de ayran için 6 tekrarlı olarak iki analizci tarafından çalışmalar yapıldı. Yöntem olarak 2.3, 2.4, 2.5 ve 2.6 maddelerinde anlatılan adımlar kullanıldı. Ardından ortalama değer, standart sapma değeri, % bağıl standart sapma değeri hesaplandı. Hesaplamada 1.3.4.1.1. tekrarlanabilirlik maddesinde anlatılan formül kullanıldı. Elde edilen % RSD<sub>r</sub> değeri horwitz formülünden hesaplanan % HRSD<sub>r</sub>'ye göre değerlendirildi.

#### 2.5.1.5.2. Ara Kesinlik ( Laboratuvar İçi Tekrar Üretilirlik)

Tekrar üretilebilirlik çalışmasında altı farklı gün içerisinde hem yoğurt, hem de ayran numuleri % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyon değerlerinde iki analizci tarafından çalışma gerçekleştirildi. Yöntem olarak 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 ve 2.6 maddelerinde anlatılan adımlar kullanıldı. Ardından ortalama değer, standart sapma değeri, % bağıl standart sapma değeri hesaplandı. Hesaplamada 1.3.4.1.2. tekrar üretilebilirlik maddesinde anlatılan formül kullanıldı. Elde edilen % RDS<sub>R</sub> değeri horwitz formülünden hesaplanan % HRSD<sub>R</sub>'ye göre değerlendirildi.

### 2.6. Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasında; doğruluk ve kesinlikten (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik) kaynaklanan standart belirsizlikler kullanıldı. Hesaplanan standart belirsizlikler kullanılarak birleştirilmiş % 95 güven aralığında k=2 için genişletilmiş belirsizlik hesaplandı. Mevzuat gerekli olduğunda karar kuralı uygulanmaktadır. Belirsizlik sonucu verilirken aşağıdaki hesaplama yöntemi kullanılmıştır.

$$\text{ÖB} = C \pm C \cdot UG \quad (2.5)$$

ÖB : Ölçüm belirsizliği

C : Elde edilen analitik sonuç

UG : Genişletilmiş belirsizlik (olarak % 95 k=2 güven aralığında )

## 2.7. Kalitatif Analiz İçin Verifikasyon Parametreleri

İyi bilindiği gibi, numunelere rutin olarak herhangi bir analitik yöntem uygulanmadan önce, valide edilmeli, dolayısıyla performans özellikleri tanımlanmalı ve uygun şekilde değerlendirilmelidir. ISO / IEC 17025 standardı, yöntem validasyonunun önemini ve analitik laboratuvarda uygulanmasını açıklar. Kalitatif analizlerde sonuçlar var ya da yok, tespit edildi yada tespit edilemedi biçiminde raporu düzenlenmektedir. Sayısal bir değer verilmediğinden kantitatif analizlerde olduğu gibi sayısal bir kesinlik değeri vb. tespit edilemez. Kalitatif analizlerde uygulanabilecek validasyon/verifikasyon parametreleri aşağıda verilmiştir.

- Hassasiyet (SE)
- Doğruluk (RA)
- Yanlış Negatif Oranı (FN)
- Özgüllük (SP)
- Yanlış Pozitif Oranı (FP)
- Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumu
- Minimum Tespit Sınırı (LOD)

Kalitatif analiz için iki farklı yöntem kullanıldı. Birinci yöntemde FT-IR spektrofotometresi kullanıldı. Toplam da her biri için içersinde CMC bulunmayan yoğurt ve ayran örnekleri hazırlandı. Sonuçların değerlendirmesi tablo 2.3' de verilen olasılık tablosuna göre yapıldı.

Tablo 2.3. Elde edilen sonuçların değerlendirmesinde kullanılan olasılık tablosu

| Metot       | Analiz Sonucu       |                     |                 |
|-------------|---------------------|---------------------|-----------------|
|             | Pozitif (+)         | Negatif (-)         | Toplam          |
| Pozitif (+) | +/+ N <sub>11</sub> | -/+ N <sub>12</sub> | N <sub>1-</sub> |
| Negatif (-) | +/- N <sub>21</sub> | -/- N <sub>22</sub> | N <sub>2-</sub> |
| Toplam      | N <sub>-1</sub>     | N <sub>-2</sub>     | N               |



Olasılık tablosu biyolojik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Olasılık hesaplamasına dayanırlar. Diğer formatlar mümkün olsa da, en basit ve en yaygın olarak kullanılanlar iki kategorili bir sınıflandırma sağlayanlardır: pozitif veya negatif, düzenleyici konsantrasyon seviyesinin üstünde veya altında, vb daha sonra, nitel yöntem sonucu kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılır. Doğrulama yöntemi. Bu tablodan yalnızca dört performans parametresini (yanlış pozitif, yanlış negatif, duyarlılık ve belirsizlik oranları) ve iki öngörücü değeri (pozitif, PPV ve negatif, NPV) hesaplamak mümkündür. Bu yaklaşımın temel özelliklerinden biri, kalitatif yöntemin nasıl performans gösterdiğine dair genel bir vizyon vermesidir, ancak her bir örnek için hata olasılığı hesaplanmadığı için bireysel bilgi vermez. Bu, bilinmeyen örneğin, olasılık tablosunu oluşturmak için kullanılan örneklerle aynı istatistiksel davranışa sahip olduğu varsayıldığı anlamına gelir. Dezavantajlardan biri, olasılık tablosunun kapasitesinin, onu oluşturmak için kullanılan analiz edilen toplam numune sayısına ve deney tasarımına bağlı olmasıdır. Ayrıca tüm numunelerin hem nitel hem de doğrulayıcı yöntemler kullanılarak analiz edilmesi gerektiğine dikkat edilmelidir (Trullols vd., 2004).

### 2.7.1. Hassasiyet (SE)

Genel olarak kalitatif yöntemlerde hassasiyet, bir yöntemin gerçekten pozitif örnekleri tespit etme yeteneğidir. Matematiksel olarak ifade edildiğinde pozitif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlardan pozitif olanların, toplam pozitif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlara oranıdır. Aşağıdaki formüllerle hesaplama yapıldı. Metot validasyonunda/verifikasyonunda metotlar, hassasiyetleri % 90 veya daha yüksek olarak bulunmuşsa kabul edilebilir olarak değerlendirilir.

$$SE = N_{11}/N_{1\_} \quad (2.6)$$

$$\text{Rölatif SE (\%)} = 100 \times N_{11}/N_{1\_} \quad (2.7)$$

Bu çalışmada yoğurt numunesinden 21 adet pozitif çalışma, ayran numunesinde 24 adet pozitif çalışma yapıldı. Hassasiyet ile ilgili hesaplama üstte verilen formüllere göre yapıldı.

### 2.7.2. Doğruluk (RA)

Kesinlik, doğru pozitif ve doğru negatiflerin oranları olarak ifade edilebilir. Bu oranların hassasiyet ve spesifiklik ile ilgili olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. İki farklı metot ile elde edilen sonuçların, çalışmaların veya beklenen sonuçlar ile elde edilen sonuçların uyum derecesidir.

$$RA = (N_{11} + N_{22})/N \quad (2.8)$$

$$\text{Rölatif RA (\%)} = 100 \times (N_{11} + N_{22})/N \quad (2.9)$$

Metot validasyon/verifikasyonunda metotlar, doğrulukları %90 veya daha yüksekse kabul edilebilir olarak değerlendirilebilirler. Bu çalışmada yoğurt numunesinden 21 adet pozitif çalışma, ayran numunesinde 24 adet pozitif çalışma, yoğurt numunesinden 20 adet negatif çalışma, ayran numunesinde 20 adet negatif çalışma yapıldı. Doğruluk parametresinin hesaplanması üstte verilen formüllere göre yapıldı.

### 2.7.3. Yanlış Negatif Oranı (FN)

Yanlış negatif oranı; test örneğinin yöntemde negatif olarak sınıflandırıldığı göz önüne alındığında, bir test örneğinin bilinen bir pozitif olma olasılığıdır. Analiz sonucunun pozitif çıkması beklenirken negatif olarak elde edilen sonuçların, pozitif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlara oranıdır.

$$FN = N_{12}/N_{1+} \quad (2.10)$$

Metot validasyon/verifikasyon çalışmasında kabul edilebilir olarak değerlendirilmesi için yanlış negatif oranı %10'u geçmemelidir. Bu çalışmada yoğurt numunesinden 21 adet pozitif çalışma, ayran numunesinde 24 adet pozitif çalışma yapıldı. Yanlış negatif oranı ile ilgili hesaplama üstte verilen formüllere göre yapıldı.

#### 2.7.4. Özgüllük (SP)

Özgüllük; bir yöntemin gerçekten negatif numuneleri negatif olarak tespit etme yeteneği olarak tanımlanır. Aynı şekilde, özgüllük oranı, belirli bir konsantrasyon için, test örneğinin bilinen bir negatif olduğu göz önüne alındığında, yöntemin test örneğini negatif olarak sınıflandırma olasılığıdır. Negatif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlardan negatif olarak elde edilenlerin, toplam negatif olarak beklenenlere oranı şu şekilde ifade edilebilir:

$$SP = N_{22}/N_{2\_} \quad (2.11)$$

$$\% \text{ Rölatif SP} = 100 \times N_{22}/N_{2\_} \quad (2.12)$$

Metot validasyon/verifikasyon çalışmasının kabul edilebilir olarak değerlendirilmesinde özgüllükleri %90 veya daha yüksekse kabul edilebilir olarak değerlendirilebilirler. Bu çalışmada yoğurt numunesinden 21 adet pozitif çalışma, ayran numunesinde 24 adet pozitif çalışma yapıldı. Özgüllük oranı ile ilgili hesaplama üstte verilen formüllere göre yapıldı.

#### 2.7.5. Yanlış Pozitif Oranı (FP)

Yanlış pozitif oranı, bir analiz çalışmasında test numunesinin gerçek negatif analiz sonuçlarında yanlış pozitif sonuçlarının olduğu ve negatif olarak elde edilmesi umulan sonuçlardan pozitif olarak tespit edilenlerin, toplam negatif olarak elde edilmesi umulan sonuçlara oranını ifade eder.

$$FP = N_{21}/N_{2\_} \quad (2.13)$$

Metot validasyon/verifikasyon çalışmasında kabul edilebilir olarak değerlendirilmesi için yanlış pozitif oranı %10'u aşmamalıdır. Bu çalışmada yoğurt numunesinden 21 adet pozitif çalışma, ayran numunesinde 24 adet pozitif çalışma yapıldı. Yanlış pozitif oranı ile ilgili hesaplama üstte verilen formüllere göre yapıldı.

### 2.7.6. Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumunu

Beklenen gerçek analiz sonuçları ile gözlenen yani validasyon/verifikasyon çalışmalarından elde edilen analiz sonuçlarının istatistiki olarak %90 güven aralığında ne oranda uyumlu olduğunu tespit etmek amacıyla Cohen's Kappa Coefficient Testi kullanılır. Kappa değeri %90 güven aralığında aşağıda verilen formüle göre hesaplanır. Kappa'ya göre metodun uygunluğu değerlendirildiğinde; aşağıda verilen formüle göre işlem yapılır ve elde edilen K değerine göre yorumlanır.

$$RA=P0= N_{11}+ N_{22} /N \quad (2.14)$$

$$Pe=( N_{1-}X N_{-1})+( N_{2-} X N_{2-} )/N^2 \quad (2.15)$$

$$K= P0- Pe /1- Pe \quad (2.16)$$

$N_{11}$ : Gerçekte pozitif olup, analiz sonucunda da pozitif saptanan örnek sayısı

$N_{22}$ : Gerçekte negatif olup, analiz sonucunda da negatif saptanan örnek sayısı

$N_{1-}$ : Gerçekte pozitif olan toplam örnek sayısı

$N_{2-}$ : Gerçekte negatif olan toplam örnek sayısı

$N_{-1}$ : Analiz sonucunda pozitif saptanan toplam örnek sayısı

$N_{-2}$ : Analiz sonucunda negatif saptanan toplam örnek sayısı

$N$ : Çalışmada kullanılan toplam örnek sayısı

Değerlendirmesi  $K < 0.20$  kötü,  $K 0.20-0.40$  vasat,  $K 0.41-0.60$  makul,  $K 0.61-0.80$  iyi,  $K > 0.80$  çok iyi biçiminde verilen şartlara göre yorumlandı. Bu çalışmada yoğurt numunesinden 21 adet pozitif çalışma, ayran numunesinde 24 adet pozitif çalışma yapıldı. Sonuçların uyum oranı ile ilgili hesaplama üstte verilen formüllere göre yapıldı.

### 2.7.7. Minimum Tespit Sınırı (LOD)

Bir analiz metodunun tespiti yapılacak olan analitin doğru ve güvenilir olarak saptayabildiği en düşük miktardır. Bu miktarı laboratuvarında tespit edebilmek için değişik konsanstrasyonlarda kirlenme yapılarak metodun tespit edilebileceği en düşük miktar belirlenir ve tespit edilen bu miktarda en az 6 adet analiz yapılır.

Bu amaçla % 0.10 CMC içeren yoğurt ve ayran numunelerinden 10 adet analiz yapılmış ve LOQ seviyesinin tespiti yapılmıştır.

### **2.7.8. Metot Sağlamlığı**

Bir metodun veya analiz prosedürünün sağlamlığı (Robustness/Ruggedness), analiz sonuçlarının, analiz koşullarındaki küçük değişiklikler karşısında etkilenmeden kalma kapasitesidir. Yani bir analiz sonucu analiz koşullarındaki küçük değişikliklere karşı hassas değilse metot sağlamdır. Sağamlık çalışmasında numune miktarı, pH, kaynatma süresi gibi metot parametrelerinde bazı sapmaların analiz sonuçları üzerine etkisi incelenmiştir. Yaptığım çalışmada numune miktarı 10 g ve 2.5 g olarak çalışıldı. pH 7:10 ve 7:05 olacak biçimde çalışıldı. Kaynatma süresinde 15 dk ve 5 dk olarak tutuldu.

### **3. BULGULAR VE TARTIŞMA**

#### **3.1. Kantitatif Çalışmaya Ait Validasyon Bulguları**

Elde edilen analiz sonuçlarının hesaplamaları excel programı üzerinde yapılarak genel olarak değerlendirmeleri hedef % RSD<sub>r</sub>, % RSD<sub>R</sub> ve % GA üzerinden yapıldı. LOD ve LOQ çalışmaları değerlendirildi. Lineer aralık ve ölçüm aralığı çalışmaları yapıldı.

##### **3.1.1. Tespit Limiti (LOD), Tayin Limiti (LOQ) ve Metot Tespit Limiti (MDL) Çalışma Sonuçları**

Özellikle enstrümental analizler başta olmak üzere, bazı yaş kimya analizlerinde de olmak üzere metot validasyon ve verifikasyon çalışmalarında tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ), en önemli iki performans parametrelerindendir. Bir numunede tespiti yapılacak olan analitin tespit edilebilen en küçük konsantrasyonu tespit limiti (Limit of Detection, LOD) olarak tanımlanır. Aynı zamanda, blank olarak kullanılan bir örnekten istatistiki olarak farklı tespit edilebilen en düşük konsantrasyon seviyesi (% 99 güven aralığında) tespit limitidir (LOD). Sinyal ve gürültü oranının 5 'ten büyük olduğu bölgede tespit limiti (LOD) biçiminde tanımlanır (Ripp, 1996).

Kabul edilebilecek bir doğrulukta, tekrar edilebilirlikte tayin edilebilen ve raporlanabilen en düşük konsantrasyon tayin limiti (Limit of Quantification, LOQ) olarak tanımlanır. Numune içinde ölçümü yapılacak olan değer kabul edilebilecek bir kesinlik ve doğrulukta ölçümü yapılabilen en düşük miktarı tayin limiti olarak tanımlanır. Bir dizi yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen deneysel çalışmaya ait sonuçların standart sapmasının 10 katı LOQ olarak tanımlanır (Ripp, 1996).

Belirli bir analiz metodu ile analizi yapılacak olan bir analitin analiz sonuçlarının kolayca blank bir numuneden elde edilecek analiz sonuçlarından nasıl ayırt edilebileceğini belirten istatistiki olarak belirlenmiş değer metot tespit limiti olarak tanımlanır. Metot tespit limitinde matriks, cihaz ve analizciye özgün olan ve iyi tanımlanmış bir analitik metot gerektirir. Metot tespit limiti, farklı laboratuvarların analiz kapasitelerinin aynı metotlarla ve aynı laboratuvardaki farklı analitik metotlarla karşılaştırabilmek için kullanılabilecek bir mekanizma olarak da görülür (Ripp, 1996).

Tayin limiti istatistiki olarak elde edilen bir sonuçtur. Validasyon ve verifikasyonu yapılan yöntemin bu amaçla yapılan çalışmasının kabul edilebilir standart sapmasıdır. Doğrulanması gerekir. İçinde aranan analitin olmadığı bir numuneye tayin sınırı (LOQ) için tespit edilen miktarda ilave edilip, tekrar edilebilirlik koşullarında en az 5 tekrar analizinin yapılması gerekir. Bu tekrar edilen analizlerin ortalama değeri ( $X_{LOQ}$ ) ve standart sapmasının ( $SD_{LOQ}$ ) hesaplanması gerekir. Elde edilen bu sonuçlar, hesaplanmış olan konsantrasyon limitinin kesinliğinin, kabul edilebilir limitin altında olup olmadığını ortaya koymuş olur (Bratinova vd., 2009). Bu amaçla LOQ seviyesinin kontrolü için 5 adet çalışma yapıldı.

Tablo 3.1. Yoğurt numunesi tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve metot tespit limiti (MDL) sonuçları

| MDL, LOD ve LOQ Hesaplama                    |      |                            |                  |             |  |
|--|------|----------------------------|------------------|-------------|--|
| Analizciler                                  |      | Maddenin Adı               | CMC              |             |  |
|  |      | Metot                      |                  |             |  |
|  |      | Tarih                      | 12.11.2019       |             |  |
|  |      | Cihaz                      | Spektrofotometre |             |  |
|  |      | İlave Edilen Konsantrasyon | 0.10             |             |  |
| A1   | A2   | Birimi(%)                  | %                | % Geri Alma |  |
| 0.10   | 0.10 | Tekrar 1                   | 0.10             | 100.07      |  |
| 0.08   | 0.10 | Tekrar 2                   | 0.09             | 90.99       |  |
| 0.08   | 0.11 | Tekrar 3                   | 0.09             | 93.85       |  |
| 0.08   | 0.11 | Tekrar 4                   | 0.09             | 93.85       |  |
| 0.08   | 0.09 | Tekrar 5                   | 0.09             | 89.07       |  |
| 0.10   | 0.13 | Tekrar 6                   | 0.12             | 115.84      |  |
| 0.13   | 0.09 | Tekrar 7                   | 0.11             | 112.02      |  |
| 0.10   | 0.11 | Tekrar 8                   | 0.11             | 105.80      |  |
| 0.08   | 0.10 | Tekrar 9                   | 0.09             | 90.99       |  |
| 0.13   | 0.09 | Tekrar 10                  | 0.11             | 112.49      |  |
| Ortalama                                     |      |                            | 0.10             |             |  |
| Standart Sapma                               |      |                            | 0.01             |             |  |
| MDL%   |      |                            | 0.03             |             |  |
| LOD %  |      |                            | 0.03             |             |  |
| LOQ %  |      |                            | 0.10             |             |  |
| Yüksek ilave Kontrolü (MDL*10>İlave Miktarı) |      |                            | 0.29*            | > 0.10      |  |
| Düşük İlave Kontrolü( MDL<İlave Miktar)      |      |                            | 0.03*            | < 0.10      |  |
| S/N oranı                                    |      |                            | 9.83*            | < 10        |  |
| Geri Alma Oranı %                            |      |                            | 100.50           |             |  |
| DeneySEL LOQ Kontrolu                        |      |                            | % 0.10±0.02      |             |  |

A1 Analizci 1, A2 analizci 2, \* uygundur

Yoğurtta CMC analizi için bu değerler % 0.10 ± 0.02, ayran için bu değer % 0.11 ± 0.03 olarak bulundu. Yapmış olduğum bu çalışmada yoğurt örneği için LOD % 0.03, LOQ % 0.10 ve MDL % 0.03 olarak, ayran için LOD % 0.03, LOQ % 0.11 ve MDL % 0.03 olarak tespit edildi. Elde etmiş olduğum bu sonuçların uygunluğu 5 farklı noktada değerlendirmesi yapılarak teyit edildi (Ripp, 1996).

Tablo 3.2. Ayran numunesi tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve metot tespit limiti (MDL) sonuçları

| <b>MDL, LOD ve LOQ Hesaplama</b>                       |           |                  |             |                    |
|--|-----------|------------------|-------------|--------------------|
| <b>Maddenin Adı</b>                                    |           | <b>CMC</b>       |             |                    |
| <b>Metot</b>   |           |                  |             |                    |
| <b>Tarih</b>   |           | 18.11.2019       |             |                    |
| <b>Cihaz</b>   |           | Spektrofotometre |             |                    |
| <b>Analizciler</b>                                     |           | 0.10             |             |                    |
| <b>İlave Edilen Konsantrasyon</b>                      |           |                  |             |                    |
| <b>A1</b>  | <b>A2</b> | <b>Birimi(%)</b> | <b>%</b>    | <b>% Geri Alma</b> |
| 0.09   | 0.09      | <b>Tekrar 1</b>  | 0.09        | 93.56              |
| 0.10   | 0.10      | <b>Tekrar 2</b>  | 0.10        | 96.90              |
| 0.12   | 0.10      | <b>Tekrar 3</b>  | 0.11        | 106.44             |
| 0.12   | 0.11      | <b>Tekrar 4</b>  | 0.11        | 110.25             |
| 0.09   | 0.09      | <b>Tekrar 5</b>  | 0.09        | 87.36              |
| 0.11   | 0.12      | <b>Tekrar 6</b>  | 0.11        | 114.07             |
| 0.09   | 0.10      | <b>Tekrar 7</b>  | 0.09        | 94.99              |
| 0.10   | 0.11      | <b>Tekrar 8</b>  | 0.10        | 104.53             |
| 0.11   | 0.10      | <b>Tekrar 9</b>  | 0.10        | 102.15             |
| 0.13   | 0.09      | <b>Tekrar 10</b> | 0.13        | 125.04             |
| <b>Ortalama</b>  |           |                  | 0.10        |                    |
| <b>Standart Sapma</b>                                  |           |                  | 0.01        |                    |
| <b>MDL%</b>  |           |                  | 0.03        |                    |
| <b>LOD %</b>   |           |                  | 0.03        |                    |
| <b>LOQ %</b>   |           |                  | 0.11        |                    |
| <b>Yüksek ilave Kontrolü (MDL*10&gt;İlave Miktarı)</b> |           |                  | 0.31*       | > 0.10             |
| <b>Düşük İlave Kontrolü( MDL&lt;İlave Miktar)</b>      |           |                  | 0.03*       | < 0.10             |
| <b>S/N oranı</b>                                       |           |                  | 9.33*       | < 10               |
| <b>Geri Alma Oranı %</b>                               |           |                  | 103.53      |                    |
| <b>DeneySEL LOQ Kontrolü</b>                           |           |                  | % 0.11±0.03 |                    |

A1 Analizci 1, A2 analizci 2, \* uygundur

Yoğurt numunesinin LOD, LOQ ve MDL'ye ait çalışmaların birinci nokta kontrolünde; yüksek ilaveli miktar kontrolünde MDL\*10 değerinin ilave edilen miktardan



(% 0.10) büyük olması belirlenmiştir. Bu değerlendirme ile ilgili tablo 3.1'e bakıldığında  $MDL \times 10 > \text{İlave Miktar}$ ;  $0.29 > 0.10$  gerekliliğini sağlamaktadır. Ayran numunesi için birinci kontrolde tablo 3.2' de görüldüğü üzere  $MDL \times 10 > \text{İlave Miktar}$ ;  $0.31 > 0.10$  gerekliliğini sağlamaktadır.

Yoğurt ve ayran numunelerinin LOD, LOQ ve MDL'ye ait çalışmalarında ikinci nokta kontrolünde; tespit edilen MDL oranı ile ilave edilen miktar arasında karşılaştırma yapıldı. Bu değerlendirmede MDL ilave edilen miktardan küçük olması şarttır. Tablo 3.1'de verildiği gibi  $MDL < \text{İlave Miktar}$ ;  $0.03 < 0.10$  durumu yoğurt numunesi için sağlanmaktadır. Ayran numunesi için de tablo 3.2'de verildiği gibi  $MDL < \text{İlave Miktar}$ ;  $0.03 < 0.10$  durumunu karşılamaktadır.

Yapılan üçüncü nokta kontrolünde S/N oranına bakıldı. Bu parametrenin  $< 10$  olması gerekmektedir (Ripp, 1996). Tablo 3.1'de verildiği gibi bu değer yoğurt numunesi için 9.83 ve ayran için de 9.33 olarak tespit edildi.

Yapılan dördüncü nokta kontrolünde  $MDL < \text{Gerekliklik şartını}$  sağlayıp sağlamadığına bakıldı. Türk Gıda Kodeksine göre CMC bulunmaması gerekmektedir. Metot için % 0.10 LOQ seviyesi tespit edilmiştir. Bu seviye oldukça düşüktür.

Beşinci nokta kontrolünde LOD, LOQ ve MDL çalışmalarının % geri alma kontrolü yapılmıştır. Guidelines for Standard Method Performance Requirements AOAC Official Methods of Analysis (2016) Appendix F, p.2'ye göre geri kazanım kriteri çalışmış olduğum konsantrasyonda % 95 - %105 aralığında olması gerekmektedir. Tablo 3.1 ve 3.2 'de elde edilen geri alma sonuçları da bu validasyon çalışması için uygun olarak tespit edilmiştir.

Yoğurt ve ayran gibi süt ürünlerinde CMC analizi için LOD, LOQ ve MDL çalışmaları ortaya konularak metodun tayin limiti, tespit limiti ve metot tespit limiti tanımlanmıştır.

### **3.1.2. Geri Alma (Gerçeklik) Analiz Sonuçları**

Yapmış olduğum % geri alma çalışmasında yoğurt ve ayran numunesi kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan % 0.50 ve % 1.00 CMC içeren yoğurt ve ayran numuneleri hazırlandı.

% Geri alma; analiz sonucunda elde edilen deneysel değer gerçeğe oranı olarak ifade edilir. Geri alma çalışmasında, numuneye belirli konsantrasyonda analit eklenerek kullanılan analiz metodunun doğru çalışıp çalışmadığı tespit edilir. Bu biçimde yapılmış olan bu çalışma % geri alma olarak ifade edilir (Naga, 2012). Kabul edilebilecek ortalama

geri kazanımın aralığı, analitin konsantrasyonu azaldıkça genişler. Söz konusu bu durum 1 ppb' den %100' e kadar olan analit konsantrasyonları için hedef ortalama geri kazanım aralıkları sağlar. Konsantrasyona bağlı olarak % geri kazanım aralıkları AOAC 2016'da verilmiştir. Geri alma çalışması iki farklı biçimde yapılabilir. Birinci yöntemde numune içerisinde aranan analit var ise numune içine çalışması hedeflenen konsantrasyonda analit ilave edilerek analizi yapılır. Aynı zamanda bu numuneden kör olarak çalışılır. Elde edilen sonuçlardan % GA hesaplanır. İkinci yöntemde numune analit içermediğinden direk hedeflenen konsantrasyonda ilave yapılarak % GA oranı belirlenir. Yapmış olduğum bu çalışmada ikinci yöntemi kullandım.

Tablo 3.3. Yoğurt numunesi % 0.5 konsantrasyonda geri alma çalışması

| Yoğurt numunesi<br>% 0.5 konsantrasyon çalışması       | n  | Analizci<br>1 | Analizci<br>2 | % GA   | % GA   | Uygunluk | Uygunluk |
|--|----|---------------|---------------|--------|--------|----------|----------|
|  | 1  | 0.50          | 0.49          | 100.11 | 97.70  | uygun    | uygun    |
|  | 2  | 0.50          | 0.49          | 100.67 | 97.56  | uygun    | uygun    |
|  | 3  | 0.48          | 0.50          | 96.57  | 99.96  | uygun    | uygun    |
|  | 4  | 0.50          | 0.50          | 99.96  | 99.40  | uygun    | uygun    |
|  | 5  | 0.50          | 0.50          | 99.40  | 100.11 | uygun    | uygun    |
|  | 6  | 0.50          | 0.52          | 100.11 | 103.93 | uygun    | uygun    |
|  | 7  | 0.51          | 0.50          | 102.51 | 99.96  | uygun    | uygun    |
|  | 8  | 0.49          | 0.50          | 98.27  | 99.40  | uygun    | uygun    |
|  | 9  | 0.50          | 0.50          | 100.25 | 100.11 | uygun    | uygun    |
|  | 10 | 0.48          | 0.52          | 95.15  | 103.22 | uygun    | uygun    |
| % GA- Ortalama   |    |               |               |        |        |          | 99.72    |
| % GA- Standart sapma                                   |    |               |               |        |        |          | 2.07     |
| n  |    |               |               |        |        |          | 20       |
| Ux=Standart sapma/ $\sqrt{n}$                          |    |               |               |        |        |          | 0.4638   |
| Ui   |    |               |               |        |        |          | 0.5000   |
| t <sub>deneysel</sub>                                  |    |               |               |        |        |          | 0.611    |
| t (tablo_%95 confidence level.two-tailed.n-1=19)       |    |               |               |        |        |          | 2.090    |
| t< t(tablo) ise Ux.t $\geq$ t(tablo) ise Ui kullanılır |    |               |               |        |        |          |          |

% 0.50'lik CMC ilaveli yoğurt numunesinin geri alma çalışması oranı ortalama % 99.72  $\pm$  2.07 olarak tespit edildi. Elde edilen bu sonuçların uygunluk değerlendirmesi AOAC 2016'nın tablo 5a'sında verilen % 95-105 çalışılan konsantrasyona göre beklenen % geri alma oranlarına uygun olarak bulundu.

Validasyon/verifikasyon çalışmalarında CRM veya RM ile çalışıldığı zaman gerçeklik parametresi olarak da % geri alma çalışması kullanılabilir. CRM ya da RM olmadığı zamanlarda spike yapmak suretiyle gerçeklik çalışması yapılabilir. Gerçeklik çalışmasının uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla t-testi ya da % bağıl hata oranı kullanılır. Doğruluk çalışmasında % bağıl hataya bakılıp bir değerlendirme yapılabilir. Mevzuat vs durumlar belirtmedikçe % bağıl hata % 10 ‘dan küçük olmalıdır.

Yapmış olduğum % geri alma çalışmasının aynı zamanda gerçeklik parametresi olarak değerlendirmesi t testine görey yapıldı. % 0.50’ lik geri alma çalışmasında, T tablosunda yapılan 20 çalışma için serbestlik derecesi 19 olup  $t_{0.95}=2.090$  ‘dir.  $t_{\text{deneysel}} < t_{\text{tablo}}$  ;  $0.61 < 2.09$  olduğundan yaptığım çalışmanın uygun olduğunu tespit etmiş olduk. Söz konusu analiz sonuçları ve istatistiki değerlendirmeler tablo 3.3’ de verildi.

Tablo 3.4. Yoğurt numunesi % 1.0 konsantrasyonda geri alma çalışması

| Yoğurt numunesi<br>% 1.0 konsantrasyon çalışması                             | n  | Analizci<br>1 | Analizci<br>2 | % GA   | % GA   | Uygunluk | Uygunluk |
|--|----|---------------|---------------|--------|--------|----------|----------|
|  | 1  | 1.02          | 0.98          | 101.77 | 98.14  | uygun    | uygun    |
|  | 2  | 1.00          | 1.01          | 100.05 | 101.10 | uygun    | uygun    |
|  | 3  | 1.03          | 1.01          | 103.01 | 101.00 | uygun    | uygun    |
|  | 4  | 1.01          | 0.97          | 101.10 | 96.99  | uygun    | uygun    |
|  | 5  | 1.01          | 1.01          | 101.00 | 101.10 | uygun    | uygun    |
|  | 6  | 1.03          | 0.98          | 103.49 | 97.85  | uygun    | uygun    |
|  | 7  | 1.03          | 1.01          | 102.82 | 101.19 | uygun    | uygun    |
|  | 8  | 1.02          | 0.98          | 102.44 | 98.04  | uygun    | uygun    |
|  | 9  | 1.02          | 1.02          | 102.15 | 102.15 | uygun    | uygun    |
|  | 10 | 1.00          | 0.99          | 99.86  | 98.90  | uygun    | uygun    |
| % R- Ortalama  |    |               |               |        |        |          | 100.71   |
| % R- Standart sapma  |    |               |               |        |        |          | 1.88     |
| n  |    |               |               |        |        |          | 20       |
| $U_x = \text{Standart sapma} / \sqrt{n}$                                     |    |               |               |        |        |          | 0.4193   |
| $U_i$  |    |               |               |        |        |          | 0.5000   |
| $t_{\text{deneysel}}$  |    |               |               |        |        |          | 1.687    |
| t (tablo_ %95 confidence level.two-tailed.n-1=19)                            |    |               |               |        |        |          | 2.090    |
| $t < t(\text{tablo})$ ise $U_x, t \geq t(\text{tablo})$ ise $U_i$ kullanılır |    |               |               |        |        |          |          |

Tablo 3.4’de CMC ile ilgili yoğurt numunesinde % 1.00’lik çalışmamda geri alma oranı ortalama %  $100.71 \pm 1.88$  olarak tespit edildi. Elde edilen bu sonuçların uygunluk

değerlendirmesi AOAC 2016' nın tablo 5a' sında verilen % 97-103 çalışılan konsantrasyona göre beklenen % geri alma oranlarına uygun olarak bulundu.

Yoğurt numunesiyle yapmış olduğum % geri alma çalışmasının aynı zamanda gerçeklik parametresi olarak da değerlendirmesi t testine göre yapıldı. % 1.00'lik geri alma çalışmasında, T tablosunda yapılan 20 çalışma için serbestlik derecesi 19 olup  $t_{0.95}=2.090$ 'dır.  $t_{deneyse} < t_{tablo}$  ;  $1.69 < 2.09$  olduğundan yaptığım çalışmanın uygun olduğunu tespit etmiş olduk. Söz konusu analiz sonuçları ve istatistiki değerlendirmeler tablo 3.4' de verildi.

Tablo 3.5. Ayran numunesi % 0.50 konsantrasyonda geri alma çalışması

| Ayran numunesi<br>% 0.50 konsantrasyon çalışması  | n  | Analizci<br>1 | Analizci<br>2 | % GA   | % GA   | Uygunluk | Uygunluk |
|---|----|---------------|---------------|--------|--------|----------|----------|
|   | 1  | 0.50          | 0.48          | 100.06 | 95.54  | uygun    | uygun    |
|   | 2  | 0.49          | 0.49          | 97.60  | 98.21  | uygun    | uygun    |
|   | 3  | 0.51          | 0.50          | 102.32 | 99.67  | uygun    | uygun    |
|   | 4  | 0.50          | 0.48          | 99.65  | 95.13  | uygun    | uygun    |
|   | 5  | 0.49          | 0.50          | 97.39  | 99.24  | uygun    | uygun    |
|   | 6  | 0.50          | 0.48          | 99.03  | 96.12  | uygun    | uygun    |
|   | 7  | 0.51          | 0.52          | 101.91 | 103.35 | uygun    | uygun    |
|   | 8  | 0.50          | 0.50          | 99.65  | 99.08  | uygun    | uygun    |
|   | 9  | 0.50          | 0.49          | 100.27 | 97.80  | uygun    | uygun    |
|   | 10 | 0.50          | 0.50          | 99.24  | 99.65  | uygun    | uygun    |
| % R- Ortalama                                     |    |               |               |        |        |          | 99.05    |
| % R- Standart sapma                               |    |               |               |        |        |          | 2.11     |
| n   |    |               |               |        |        |          | 20       |
| Ux=Standart sapma/ $\sqrt{n}$                     |    |               |               |        |        |          | 0.4721   |
| Ui  |    |               |               |        |        |          | 0.5000   |
| $t_{deneyse}$                                     |    |               |               |        |        |          | 2.020    |
| t (tablo_%95 confidence level.two-tailed.n-1=19)  |    |               |               |        |        |          | 2.090    |
| t< t(tablo) ise Ux.t ≥ t(tablo) ise Ui kullanılır |    |               |               |        |        |          |          |

CMC ile ilgili ayran numunesinde % 0.50'lik çalışmamda geri alma çalışması oranı ortalama %99.05±2.11 olarak tespit edildi. Elde edilen bu sonuçların uygunluk değerlendirmesi AOAC 2016'nın tablo 5a' sında verilen % 95-105 çalışılan konsantrasyona göre beklenen % geri alma oranlarına uygun olduğu tespit edildi.

Yapmış olduğum % geri alma çalışmasının aynı zamanda gerçeklik parametresi olarak da değerlendirmesi t testine göre yapıldı. % 0.50'lik geri alma çalışmasında, T

tablosunda yapılan 20 çalışma için serbestlik derecesi 19 olup  $t_{0.95}=2.090$ 'dir.  $t_{\text{deneysel}} < t_{\text{tablo}}$ ;  $2.02 < 2.09$  olduğundan yaptığım çalışmanın uygun olduğunu tespit etmiş olduk. Söz konusu analiz sonuçları ve istatistiki değerlendirmeler tablo 3.5' de verildi.

Tablo 3.6. Ayran numunesi % 1.00 konsantrasyonda geri alma çalışması

| Ayran numunesi<br>% 1.00 konsantrasyon çalışması | n  | Analizci<br>1 | Analizci<br>2 | % GA   | % GA   | Uygunluk | Uygunluk |
|--|----|---------------|---------------|--------|--------|----------|----------|
|  | 1  | 1.00          | 1.01          | 100.17 | 100.79 | uygun    | uygun    |
|  | 2  | 0.98          | 1.00          | 98.22  | 99.76  | uygun    | uygun    |
|  | 3  | 0.99          | 1.00          | 98.84  | 100.48 | uygun    | uygun    |
|  | 4  | 1.00          | 1.02          | 100.48 | 101.82 | uygun    | uygun    |
|  | 5  | 0.99          | 0.99          | 98.94  | 98.74  | uygun    | uygun    |
|  | 6  | 0.99          | 0.99          | 98.94  | 99.46  | uygun    | uygun    |
|  | 7  | 0.99          | 0.99          | 98.84  | 98.74  | uygun    | uygun    |
|  | 8  | 0.99          | 0.99          | 98.84  | 98.69  | uygun    | uygun    |
|  | 9  | 1.00          | 1.00          | 100.48 | 100.17 | uygun    | uygun    |
|  | 10 | 1.00          | 0.99          | 99.97  | 98.94  | uygun    | uygun    |
| % R- Ortalama                                    |    |               |               |        |        | 99.57    |          |
| % R- Standart sapma                              |    |               |               |        |        | 0.94     |          |
| n  |    |               |               |        |        | 20       |          |
| Ux=Standart sapma/√n                             |    |               |               |        |        | 0.2099   |          |
| Ui   |    |               |               |        |        | 0.5000   |          |
| t <sub>deneysel</sub>                            |    |               |               |        |        | 2.067    |          |
| t (tablo_%95 confidence level.two-tailed.n-1=19) |    |               |               |        |        | 2.090    |          |
| t<t(tablo) ise Ux.t ≥ t(tablo) ise Ui kullanılır |    |               |               |        |        |          |          |

Tablo 3.6'da CMC ile ilgili ayran numunesinde % 1.00'lik çalışmamda geri alma çalışması oranı ortalama %  $99.57 \pm 0.94$  olarak tespit edildi. Elde edilen bu sonuçların uygunluk değerlendirmesi AOAC 2016'nın tablo 5a'sında verilen %97-103 çalışılan konsantrasyona göre beklenen % geri alma oranlarına uygun olarak bulundu.

Ayran numunesiyle yapmış olduğum % geri alma çalışmasının aynı zamanda gerçeklik parametresi olarak da değerlendirmesi t testine göre yapıldı. % 1.00'lik geri alma çalışmasında, T tablosunda yapılan 20 çalışma için serbestlik derecesi 19 olup  $t_{0.95}=2.090$ 'dir.  $t_{\text{deneysel}} < t_{\text{tablo}}$ ;  $2.07 < 2.09$  olduğundan yaptığım çalışmanın uygun olduğunu tespit etmiş olduk. Söz konusu analiz sonuçları ve istatistiki değerlendirmeler tablo 3.6'da verildi.

### 3.1.3. Tekrarlanabilirlik Çalışması Analiz Sonuçları

Bir analiz metodunun tekrarlanabilirliği; söz konusu metodunun aynı analizci, aynı metot, aynı zaman içersinde yapmış olduğu çalışmalardan elde edilen sonuçların birbirine olan uygunluk derecesi olarak tanımlanabilir. Bir numunede aranan bir analit için, birden fazla numune alınarak yapılan çalışmada elde edilen analiz sonuçlarının birbiriyle uyumlu olması gereklidir. Bir analiz metodunun tekrarlanabilirliği genellikle analiz sonuçlarının % RSD<sub>r</sub> (bağıl standart sapma) değeri ile değerlendirilir. Tekrarlanabilirlik için kabul edilebilirlik % RSD<sub>r</sub> sınırı yapılan çalışmadaki konsantrasyona bağlıdır. Bu değerler kullanılan analiz metotlarında, bazı dokümanlarda ve ülkemizde TGK numune alma analiz metotları tebliğlerinde verilmiştir (AOAC, 2016; TGK, 2016/4; TS EN ISO 712, 2012).

Tekrarlanabilirlik çalışmasında iki analizci tarafından bir adet yoğurt ve bir adet ayran numunesi kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan yoğurt ve ayran numunelerinde %0.25, % 0.50 ve % 1.00 olacak biçimde CMC miktarı ilave yapılarak madde 2.2’ de belirtildiği şekilde üretimi yapıldı. İki analizci her bir farklı konsantrasyonda 6’şar adet çalışma gerçekleştirdi. Elde edilen sonuçlar tablo 3.7-3.12 ‘lerde verildi.

Yoğurt numunesinin % 0.25’lik CMC tekrarlanabilirlik çalışmasına ait veriler tablo 3.7’de verildi. Elde edilen değerleri yorumlandığımızda; birinci ve ikinci analizcinin deneysel % RSD<sub>r</sub>’leri sırasıyla % 3.00, % 2.56 ve birleştirilmiş % RSD<sub>rpool</sub> % 2.80 olarak bulundu. Hem analizci ortalamalarına göre elde edilen sonuçlardan hem de genel ortalamaya göre elde edilen sonuçlardan horwizit eşitliği kullanılarak % HRSD<sub>r</sub> hesaplandı ve % 3.25 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen hem analizciler bazında tekrarlanabilirlik % RSD ‘leri hem de birleştirilmiş % RSD<sub>r</sub>’ler hedef % HRSD<sub>r</sub>’den küçük olduğu için % 0.25’lik tekrarlanabilirlik çalışmasının uygun olduğu tespit edildi. % HRSD<sub>r</sub> aşağıda verilen horwizit eşitliği formülüne göre hesaplandı. % HRSD<sub>r</sub>’ler tablo 3.7’de verildi. Uygunluk değerlendirmeleri bunlara göre yapıldı.

$$\% \text{HRSD}_r = 2^{1-0.5 \log C} \times 0.66 \quad (3.1)$$

Çalışmanın bu kısmında % 0.25’lik çalışmada; analizcilerin kendi çalışmaları arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü ile analizciler arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü yapılmış oldu. Analizci 1 için 6 paralel analizde (f(6)=4) tekrarlanabilirlik limiti 0.031 ve min-max farkı 0.02 olarak bulundu. Analizci 2 için (f(6)=4) tekrarlanabilirlik limiti

0.026 ve min-max farkı 0.02 olarak bulundu. Analizciler aralarındaki değerlendirmede ise ( $f(2)=2.8$ ) 0.020 ve min-max farkı 0.002 olarak bulundu. Analizcilerin kendi içindeki ve aralarındaki tekrarlanabilirlik limitleri uygun olarak tespit edildi.

Tablo 3.7. Yoğurt numunesi % 0.25 tekrarlanabilirlik çalışması

| I.Analizci |  | II.Analizci |                             |
|------------|--|-------------|-----------------------------|
| % 0.25     |  | % 0.25      |                             |
| n          | Sonuçlar                                       | n           | Sonuçlar                    |
| 1          | 0.27   | 1           | 0.25                        |
| 2          | 0.24   | 2           | 0.27                        |
| 3          | 0.25   | 3           | 0.25                        |
| 4          | 0.25   | 4           | 0.25                        |
| 5          | 0.25   | 5           | 0.25                        |
| 6          | 0.25   | 6           | 0.25                        |
|            | Ortalama                                       |             | Ortalama                    |
|            | 0.25   |             | 0.25                        |
|            | Standart sapma                                 |             | Standart sapma              |
|            | 0.01   |             | 0.01                        |
|            | % RSD <sub>r</sub>                             |             | % RSD <sub>r</sub>          |
|            | 3.03   |             | 2.56                        |
|            | %HRSD <sub>r</sub>                             |             | % HRSD <sub>r</sub>         |
|            | 3.25   |             | 3.25                        |
|            | n-1  |             | n-1                         |
|            | 5  |             | 5                           |
|            | Tekrarlanabilirlik kontrolü                    |             | Tekrarlanabilirlik kontrolü |
|            | uygun  |             | uygun                       |
|            | Tekrarlanabilirlik limiti                      |             | Tekrarlanabilirlik limiti   |
|            | (f(6)=4)                                       |             | (f(6)=4)                    |
|            | 0.031  |             | 0.026                       |
|            | max-min  |             | max-min                     |
|            | 0.02   |             | 0.02                        |
|            | Tekrarlanabilirlik limitine                    |             | Tekrarlanabilirlik limitine |
|            | uygunluk kontrolü                              |             | uygunluk kontrolü           |
|            | uygun  |             | uygun                       |
|            | (RSD <sup>2</sup> )*(n-1)                      |             | (RSD <sup>2</sup> )*(n-1)   |
|            | 45.79  |             | 32.66                       |
|            | Tekrarlanabilirlik limiti (f(2)=2.8)           |             | 0.020                       |
|            | max-min  |             | 0.002                       |
|            | Tekrarlanabilirlik limitine                    |             | uygun                       |
|            | uygunluk kontrolü (analizciler arası)          |             |                             |
|            | Genel Ortalama %                               |             | 0.25                        |
|            | Birleşik Standart Sapma                        |             | 0.01                        |
|            | % RSD <sub>r,pool</sub> (genel)                |             | 2.80                        |
|            | %HRSD <sub>r</sub>                             |             | 3.25                        |
|            | Tekrarlanabilirlik kontrolü <sub>(genel)</sub> |             | uygun                       |

Yoğurt numunesi % 0.50'lik CMC tekrarlanabilirlik çalışmasına ait veriler tablo 3.8'de verildi. Elde edilen değerleri yorumladığımızda; birinci ve ikinci analizcinin deneysel % RSD<sub>r</sub>'leri sırasıyla % 2.13, % 2.67 ve birleştirilmiş % RSD<sub>r,pool</sub> % 2.42 olarak bulundu. Hem analizci ortalamalarına göre elde edilen sonuçlardan hem de genel ortalamaya göre elde edilen sonuçlardan horwitz eşitliği kullanılarak % HRSD<sub>r</sub> hesaplandı ve sırasıyla % 2.89,

% 2.91 ve %  $HRSD_{rpool}$  % 2.90 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen hem analizciler bazında tekrarlanabilirlik % RSD 'leri hem de birleştirilmiş %  $RSD_r$ 'ler hedef %  $HRSD_r$ 'den küçük olduğu için % 0.50'lik tekrarlanabilirlik çalışmasının uygun olduğu tespit edildi. Uygunluk değerlendirmeleri bunlara göre yapıldı.

Tablo 3.8. Yoğurt numunesi % 0.50 tekrarlanabilirlik çalışması

| I.Analizci                                   |                 | II.Analizci                        |                 |
|--|-----------------|------------------------------------|-----------------|
| % 0.50                                       |                 | % 0.50                             |                 |
| <b>n</b>                                     | <b>Sonuçlar</b> | <b>n</b>                           | <b>Sonuçlar</b> |
| 1  | 0.56            | 1                                  | 0.54            |
| 2  | 0.55            | 2                                  | 0.50            |
| 3  | 0.55            | 3                                  | 0.54            |
| 4  | 0.55            | 4                                  | 0.51            |
| 5  | 0.55            | 5                                  | 0.51            |
| 6  | 0.52            | 6                                  | 0.52            |
| <b>Ortalama</b>                              | 0.55            | <b>Ortalama</b>                    | 0.52            |
| <b>Standart sapma</b>                        | 0.01            | <b>Standart sapma</b>              | 0.01            |
| <b>% RSDr</b>                                | 2.13            | <b>% RSDr</b>                      | 2.67            |
| <b>%HRSDr</b>                                | 2.89            | <b>% HRSDr</b>                     | 2.91            |
| <b>n-1</b>                                   | 5               | <b>n-1</b>                         | 5               |
| <b>Tekrarlanabilirlik kontrolü</b>           | uygun           | <b>Tekrarlanabilirlik kontrolü</b> | uygun           |
| <b>Tekrarlanabilirlik limiti</b>             |                 | <b>Tekrarlanabilirlik limiti</b>   |                 |
| <b>(f(6)=4)</b>                              | 0.047           | <b>(f(6)=4)</b>                    | 0.056           |
| <b>max-min</b>                               | 0.03            | <b>max-min</b>                     | 0.03            |
| <b>Tekrarlanabilirlik limitine</b>           |                 | <b>Tekrarlanabilirlik limitine</b> |                 |
| <b>uygunluk kontrolü</b>                     | uygun           | <b>uygunluk kontrolü</b>           | uygun           |
| <b>(RSD<sup>2</sup>)*(n-1)</b>               | 22.65           | <b>(RSD<sup>2</sup>)*(n-1)</b>     | 35.74           |
| <b>Tekrarlanabilirlik limiti (f(2)=2.8)</b>  |                 | 0.036                              |                 |
| <b>max-min</b>                               |                 | 0.026                              |                 |
| <b>Tekrarlanabilirlik limitine</b>           |                 | uygun                              |                 |
| <b>uygunluk kontrolü (analizciler arası)</b> |                 |                                    |                 |
| <b>Genel Ortalama %</b>                      |                 | 0.53                               |                 |
| <b>Birleşik Standart Sapma</b>               |                 | 0.01                               |                 |
| <b>% RSD<sub>rpool</sub>(genel)</b>          |                 | 2.42                               |                 |
| <b>%HRSD<sub>r</sub></b>                     |                 | 2.90                               |                 |
| <b>Tekrarlanabilirlik kontrolü(genel)</b>    |                 | uygun                              |                 |

Çalışmanın bu kısmında % 0.50'lik çalışmada; analizcilerin kendi çalışmaları arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü ile analizciler aralarındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü yapılmış oldu. Analizci 1 için 6 paralel analizde (f(6)=4) tekrarlanabilirlik limiti 0.047 ve min-max farkı 0.03 olarak bulundu. Analizci 2 için (f(6)=4) tekrarlanabilirlik



limiti 0.056 ve min-max farkı 0.03 olarak bulundu. Analizciler aralarındaki değerlendirmede ise ( $f(2)=2.8$ ) 0.036 ve min-max farkı 0.026 olarak bulundu. Analizcilerin kendi içindeki ve aralarındaki tekrarlanabilirlik limitleri uygun olarak tespit edildi.

Tablo 3.9. Yoğurt numunesi % 1.00 tekrarlanabilirlik çalışması

| I.Analizci   |          | II.Analizci                                      |          |
|--|----------|--|----------|
| %  |          | %  |          |
| 1.00   |          | 1.00   |          |
| n  | Sonuçlar | n  | Sonuçlar |
| 1  | 1.00     | 1  | 1.00     |
| 2  | 1.00     | 2  | 0.99     |
| 3  | 0.99     | 3  | 0.99     |
| 4  | 0.99     | 4  | 0.99     |
| 5  | 0.99     | 5  | 1.00     |
| 6  | 0.99     | 6  | 1.00     |
| Ortalama   | 0.99     | Ortalama   | 1.00     |
| Standart sapma   | 0.00     | Standart sapma                                   | 0.01     |
| % RSD <sub>r</sub>   | 0.35     | % RSD <sub>r</sub>                               | 0.53     |
| %HRSD <sub>r</sub>   | 2.64     | % HRSD <sub>r</sub>                              | 2.64     |
| n-1  | 5        | n-1  | 5        |
| Tekrarlanabilirlik kontrolü  | uygun    | Tekrarlanabilirlik kontrolü                      | uygun    |
| Tekrarlanabilirlik limiti<br>( $f(6)=4$ )                            | 0.014    | Tekrarlanabilirlik limiti ( $f(6)=4$ )           | 0.021    |
| max-min  | 0.01     | max-min  | 0.01     |
| Tekrarlanabilirlik limitine<br>uygunluk kontrolü                     | uygun    | Tekrarlanabilirlik limitine<br>uygunluk kontrolü | uygun    |
| ( $RSD^2$ )*(n-1)  | 0.62     | ( $RSD^2$ )*(n-1)                                | 1.39     |
| Tekrarlanabilirlik limiti ( $f(2)=2.8$ )                             |          | 0.013  |          |
| max-min  |          | 0.012  |          |
| Tekrarlanabilirlik limitine<br>uygunluk kontrolü (analizciler arası) |          | uygun  |          |
| Genel  |          |  |          |
| Ortalama %   |          | 0.99   |          |
| Birleşik Standart Sapma  |          | 0.00   |          |
| % RSD <sub>rpool</sub> (genel)                                       |          | 0.45   |          |
| %HRSD <sub>r</sub>   |          | 2.64   |          |
| Tekrarlanabilirlik kontrolü <sub>(genel)</sub>                       |          | uygun  |          |

Yoğurt numunesi %1.00'lik CMC tekrarlanabilirlik çalışmasına ait veriler tablo 3.9'da verildi. Elde edilen değerleri yorumladığımızda; birinci ve ikinci analizcinin deneysel % RSD<sub>r</sub>'leri sırasıyla % 0.35, % 0.53 ve birleştirilmiş % RSD<sub>rpool</sub> % 0.45 olarak bulundu. Hem analizci ortalamalarına göre elde edilen sonuçlardan hem de genel ortalamaya göre elde

edilen sonuçlardan horwizit eşitliği kullanılarak %  $HRSD_r$  hesaplandı ve sırasıyla % 2.64, % 2.64 ve %  $HRSD_{rpool}$  % 2.64 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen hem analizciler bazında tekrarlanabilirlik %  $RSD_r$  'leri hem de birleştirilmiş %  $RSD_r$  'ler hedef %  $HRSD_r$  'den küçük olduğu için % 1.00'lik tekrarlanabilirlik çalışmasının uygun olduğu tespit edildi. Uygunluk değerlendirmeleri bunlara göre yapıldı.

Çalışmanın bu kısmında % 1.00'lik çalışmada; analizcilerin kendi çalışmaları arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü ile analizciler aralarındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü yapılmış oldu. Analizci 1 için 6 paralel analizde ( $f(6)=4$ ) tekrarlanabilirlik limiti 0.014 ve min-max farkı 0.01 olarak bulundu. Analizci 2 için ( $f(6)=4$ ) tekrarlanabilirlik limiti 0.021 ve min-max farkı 0.01 olarak bulundu. Analizciler aralarındaki değerlendirmede ise ( $f(2)=2.8$ ) 0.013 ve min-max farkı 0.012 olarak bulundu. Analizcilerin kendi içindeki ve aralarındaki tekrarlanabilirlik limitleri uygun olarak tespit edildi.

Ayran numunesinin % 0.25'lik tekrarlanabilirlik çalışması tablo 3.10'da verilmiştir. Elde edilen bu değerleri yorumladığımızda; %  $RSD_r$  'leri sırasıyla % 2.50, % 1.06 ve birleştirilmiş %  $RSD_r$  % 1.92 olarak bulundu. Hem analizci ortalamalarına göre elde edilen sonuçlardan hem de genel ortalamaya göre elde edilen sonuçlardan horwizit eşitliği kullanılarak hesaplanan %  $HRSD_r$  sırasıyla % 3.26, % 3.25 ve % 3.25 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen hem analizciler bazında tekrarlanabilirlik %  $RSD_r$  'leri hem de birleştirilmiş %  $RSD_r$  'ler hedef %  $HRSD_r$  'lerden küçük olduğu için ayran için yapılan % 0.25' lik tekrarlanabilirlik çalışmasının uygun olduğu tespit edildi.

% 0.25'lik çalışmada hem analizcilerin kendi çalışmaları arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü hem de analizciler arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü yapıldı. Analizci 1 için 6 paralel analizde ( $f(6)=4$ ) 0.025 ve min-max farkı 0.02 olarak, analizci 2 için ( $f(6)=4$ ) 0.011 ve min-max farkı 0.01 ve analizciler arasında ise ( $f(2)=2.8$ ) 0.013 ve min-max farkı 0.002 olarak bulundu. Analizcilerin kendi içindeki ve arasındaki tekrarlanabilirlik limitleri uygun olarak bulundu.

Ayran numunesi % 0.50'lik CMC tekrarlanabilirlik çalışmasına ait veriler tablo 3.11'de verildi. Elde edilen değerleri yorumladığımızda; birinci ve ikinci analizcinin deneysel %  $RSD_r$  'leri sırasıyla % 2.62, % 2.83 ve birleştirilmiş %  $RSD_{rpool}$  % 2.73 olarak bulundu. Hem analizci ortalamalarına göre elde edilen sonuçlardan hem de genel ortalamaya göre elde edilen sonuçlardan horwizit eşitliği kullanılarak %  $HRSD_r$  hesaplandı ve sırasıyla % 2.96, % 2.95 ve %  $HRSD_{rpool}$  % 2.95 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen hem analizciler bazında tekrarlanabilirlik %  $RSD_r$  'leri hem de birleştirilmiş %  $RSD_r$  'ler hedef %

HRSD<sub>r</sub>'den küçük olduğu için % 0.50 'lik tekrarlanabilirlik çalışmasının uygun olduğu tespit edildi. Uygunluk değerlendirmeleri bunlara göre yapıldı.

Tablo 3.10. Ayran numunesi % 0.25 tekrarlanabilirlik çalışması

| <b>I. Analizci</b>   |                 | <b>II. Analizci</b>                                  |                 |
|--|-----------------|--|-----------------|
| <b>0.25%</b>   |                 | <b>0.25%</b>   |                 |
| <b>n</b>   | <b>Sonuçlar</b> | <b>n</b>   | <b>Sonuçlar</b> |
| <b>1</b>   | 0.26            | <b>1</b>   | 0.25            |
| <b>2</b>   | 0.24            | <b>2</b>   | 0.26            |
| <b>3</b>   | 0.25            | <b>3</b>   | 0.25            |
| <b>4</b>   | 0.25            | <b>4</b>   | 0.25            |
| <b>5</b>   | 0.25            | <b>5</b>   | 0.25            |
| <b>6</b>   | 0.25            | <b>6</b>   | 0.25            |
| <b>Ortalama</b>  | 0.25            | <b>Ortalama</b>                                      | 0.25            |
| <b>Standart sapma</b>  | 0.01            | <b>Standart sapma</b>                                | 0.00            |
| <b>% RSD<sub>r</sub></b>   | 2.50            | <b>% RSD<sub>r</sub></b>                             | 1.06            |
| <b>%HRSD<sub>r</sub></b>   | 3.26            | <b>% HRSD<sub>r</sub></b>                            | 3.25            |
| <b>n-1</b>   | 5               | <b>n-1</b>   | 5               |
| <b>Tekrarlanabilirlik kontrolü</b>                                       | uygun           | <b>Tekrarlanabilirlik kontrolü</b>                   | uygun           |
| <b>Tekrarlanabilirlik limiti (f(6)=4)</b>                                | 0.025           | <b>Tekrarlanabilirlik limiti (f(6)=4)</b>            | 0.011           |
| <b>max-min</b>   | 0.02            | <b>max-min</b>                                       | 0.01            |
| <b>Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü</b>                     | uygun           | <b>Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü</b> | uygun           |
| <b>(RSD<sup>2</sup>)*(n-1)</b>   | 31.23           | <b>(RSD<sup>2</sup>)*(n-1)</b>                       | 5.623           |
| <b>Tekrarlanabilirlik limiti (f(2)=2.8)</b>                              |                 |  | 0.013           |
| <b>max-min</b>   |                 |  | 0.002           |
| <b>Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü (analizciler arası)</b> |                 |  | uygun           |
| <b>Genel Ortalama %</b>  |                 |  | 0.25            |
| <b>Birleşik Standart Sapma</b>   |                 |  | 0.00            |
| <b>% RSD<sub>r, pool</sub>(genel)</b>                                    |                 |  | 1.92            |
| <b>%HRSD<sub>r</sub></b>   |                 |  | 3.25            |
| <b>Tekrarlanabilirlik kontrolü<sub>(genel)</sub></b>                     |                 |  | uygun           |

% 0.50'lik çalışmada hem analizcilerin kendi çalışmaları arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü hem de analizciler arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü yapıldı. Analizci 1 için 6 paralel analizde (f(6)=4) 0.05 ve min-max farkı 0.04 olarak, analizci 2 için (f(6)=4) 0.054 ve min-max farkı 0.03 ve analizciler arasında ise (f(2)=2.8) 0.036 ve min-max farkı 0.008 olarak bulundu. Analizcilerin kendi içindeki ve arasındaki tekrarlanabilirlik limitleri uygun olarak bulundu.

Tablo 3.11. Ayran numunesi %0.50 tekrarlanabilirlik çalışması

| I. Analizci   |          | II. Analizci                                  |          |
|---|----------|---|----------|
| % 0.50  |          | % 0.50  |          |
| n   | Sonuçlar | n   | Sonuçlar |
| 1   | 0.48     | 1   | 0.50     |
| 2   | 0.48     | 2   | 0.49     |
| 3   | 0.45     | 3   | 0.47     |
| 4   | 0.48     | 4   | 0.47     |
| 5   | 0.49     | 5   | 0.49     |
| 6   | 0.47     | 6   | 0.47     |
| Ortalama  | 0.47     | Ortalama                                      | 0.48     |
| Standart sapma  | 0.01     | Standart sapma                                | 0.01     |
| % RSD <sub>r</sub>  | 2.62     | % RSD <sub>r</sub>                            | 2.83     |
| %HRSD <sub>r</sub>  | 2.96     | % HRSD <sub>r</sub>                           | 2.95     |
| n-1   | 5        | n-1   | 5        |
| Tekrarlanabilirlik kontrolü                                       | uygun    | Tekrarlanabilirlik kontrolü                   | uygun    |
| Tekrarlanabilirlik limiti (f(6)=4)                                | 0.050    | Tekrarlanabilirlik limiti (f(6)=4)            | 0.054    |
| max-min   | 0.04     | max-min                                       | 0.03     |
| Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü                     | uygun    | Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü | uygun    |
| (RSD <sup>2</sup> )*(n-1)   | 34.3820  | (RSD <sup>2</sup> )*(n-1)                     | 40.0182  |
| Tekrarlanabilirlik limiti (f(2)=2.8)                              |          | 0.036   |          |
| max-min   |          | 0.008   |          |
| Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü (analizciler arası) |          | uygun   |          |
| Genel Ortalama %  |          | 0.48  |          |
| Birleşik Standart Sapma   |          | 0.01  |          |
| % RSD <sub>r,pool</sub> (genel)                                   |          | 2.73  |          |
| %HRSD <sub>r</sub>  |          | 2.95  |          |
| Tekrarlanabilirlik kontrolü <sub>(genel)</sub>                    |          | uygun   |          |

Ayran numunesi % 1.00'lik CMC tekrarlanabilirlik çalışmasına ait veriler tablo 3.12'de verildi. Elde edilen değerleri yorumladığımızda; birinci ve ikinci analizcinin deneysel % RSD<sub>r</sub> 'leri sırasıyla % 0.96, % 0.38 ve birleştirilmiş % RSD<sub>r,pool</sub> değeri % 0.73 olarak bulundu. Hem analizci ortalamalarına göre elde edilen sonuçlardan hem de genel ortalamaya göre elde edilen sonuçlardan horwitz eşitliği kullanılarak % HRSD<sub>r</sub> hesaplandı ve sırasıyla % 2.64, % 2.64 ve % HRSD<sub>r,pool</sub> 2.64 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen hem analizciler bazında tekrarlanabilirlik %RSD<sub>r</sub> 'leri hem de birleştirilmiş % RSD<sub>r</sub>'ler hedef % HRSD<sub>r</sub>' den küçük olduğu için % 1.00 'lik tekrarlanabilirlik çalışmasının uygun olduğu tespit edildi. Uygunluk değerlendirmeleri bunlara göre yapıldı.

Tablo 3.12. Ayran numunesi % 1.00 tekrarlanabilirlik çalışması

| I. Analizci   |          | II. Analizci                                  |          |
|---|----------|---|----------|
| % 1.00  |          | % 1.00  |          |
| n   | Sonuçlar | n   | Sonuçlar |
| 1   | 0.99     | 1   | 1.00     |
| 2   | 1.01     | 2   | 1.00     |
| 3   | 1.01     | 3   | 1.00     |
| 4   | 1.01     | 4   | 1.01     |
| 5   | 1.01     | 5   | 1.00     |
| 6   | 0.99     | 6   | 1.00     |
| Ortalama  | 1.01     | Ortalama                                      | 1.00     |
| Standart sapma  | 0.01     | Standart sapma                                | 0.00     |
| % RSD <sub>r</sub>  | 0.96     | % RSD <sub>r</sub>                            | 0.38     |
| %HRSD <sub>r</sub>  | 2.64     | % HRSD <sub>r</sub>                           | 2.64     |
| n-1   | 5        | n-1   | 5        |
| Tekrarlanabilirlik kontrolü                                       | uygun    | Tekrarlanabilirlik kontrolü                   | uygun    |
| Tekrarlanabilirlik limiti (f(6)=4)                                | 0.038    | Tekrarlanabilirlik limiti (f(6)=4)            | 0.015    |
| max-min   | 0.02     | max-min                                       | 0.01     |
| Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü                     | uygun    | Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü | uygun    |
| (RSD <sup>2</sup> )*(n-1)   | 4.57     | (RSD <sup>2</sup> )*(n-1)                     | 0.71     |
| Tekrarlanabilirlik limiti (f(2)=2.8)                              |          | 0.020   |          |
| max-min   |          | 0.020   |          |
| Tekrarlanabilirlik limitine uygunluk kontrolü (analizciler arası) |          | uygun   |          |
| Genel Ortalama %  |          | 1.00  |          |
| Birleşik Standart Sapma   |          | 0.01  |          |
| % RSD <sub>r</sub> pool(genel)                                    |          | 0.73  |          |
| %HRSD <sub>r</sub>  |          | 2.64  |          |
| Tekrarlanabilirlik kontrolü(genel)                                |          | uygun   |          |

% 1.00'lik çalışmada hem analizcilerin kendi çalışmaları arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü hem de analizciler arasındaki tekrarlanabilirlik limiti kontrolü yapıldı. Analizci 1 için 6 paralel analizde (f(6)=4) 0.038 ve min-max farkı 0.02 olarak, analizci 2 için (f(6)=4) 0.015 ve min-max farkı 0.001 ve analizciler arasında ise (f(2)=2.8) 0.02 ve min-max farkı 0.02 olarak bulundu. Analizcilerin kendi içindeki ve arasındaki tekrarlanabilirlik limitleri uygun olarak bulundu.

Kesinlik, benzer koşullar altında bir dizi deney yoluyla elde edilen veriler arasındaki yakınlığın bir ölçüsüdür. Analitik yöntemler için, yöntemin belirtilen koşulları altında elde edilen sonuçlar arasındaki yakınlıktır. Kesinlik, bir yöntemde oluşabilecek rastgele hatayı

görüntülemeyi amaçlamaktadır. Kesinlik, hiçbir koşulda doğrulukla karıştırılmamalıdır. Bir yöntem kesin olabilir ancak doğru olmayabilir veya tam tersi veya her ikisi birden olabilir. Kesinliğin ölçüldüğü yaygın olarak kabul edilen iki parametre tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliktir. Tekrarlanabilirlik bize, kısa bir zaman aralığında tekrarlanan bir dizi deneyden sonra analitik sonuçların yakınlığını anlatır. Tekrarlanabilirlik test içi hassasiyet olarak da adlandırılır. Burada, yöntem genellikle aynı gün içinde aynı operatör tarafından birçok kez gerçekleştirilir.

Yapmış olduğum bu çalışmada tekrarlanabilirlik parametreleri süt ürünleri matriksini temsil etmesi bakımından bir adet yoğurt ve bir ayran numunesiyle yapıldı. CMC için yoğurt ve ayran örneklerinde % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonda olacak biçimde çalışıldı. Her bir analizci için elde edilen ve birleştirilmiş %  $RSD_r$  değerleri hesaplanan hedef %  $HRSD_r$  değerlerinden küçük olduğu için yapmış olduğum validasyon çalışmasında metodun tekrarlanabilirlik parametreleri uygundur.

#### **3.1.4. Ara Kesinlik (Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik) Çalışması Analiz Sonuçları**

Tekrar üretilebilirlik, farklı analizcilerin farklı zamanlardaki farklı konsantrasyonlardaki elde edilen sonuçlarının birbiri ile tutarlılığıdır. Farklı analizcilerle ve farklı işlevsel, çevresel şartlar altında ama aynı yöntem ile analiz tekrarlanır. Eğer analizler laboratuvar içi yapılıyorsa ara kesinlik olarak tanımlanır, bu şekilde bir yöntem farklı günlerde, farklı konsantrasyonlarda farklı analizciler tarafından uygulandığında elde edilen analitik sonuçların yakınlığını analiz ederek laboratuvar içindeki farklılıkları yansıtır. Bu nedenle, ara kesinlik günlük analiz edilir, analizci analizci, konsantrasyon konsantrasyon şeklinde. Alternatif olarak, ara kesinlik, tüm yönleri bir arada kapsayan 6 deneyden oluşan bir “matris yaklaşımı” ile de değerlendirilebilir. Bir yöntemin ara kesinliği genellikle analiz sonuçlarının %  $RSD_i$  (bağıl standart sapma) değeri ile ölçülür. Kesinlik testlerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilir. Sonucun her bir hassasiyet tipi için standart sapma ( $s_i$ ), göreceli standart sapma ( $RSD_i$ , varyans katsayısı) açısından sunulması önerilmektedir. Bir enstrümanın belirli bir değer aralığında tutarlı veriler üretme yeteneğini güvenle analiz etmemizi sağlar. Başka bir deyişle, içinde kesin ve güvenilir veriler üretebileceği yöntemin aralığını bilmemizi sağlar. Tekrarüretilebilirlik için kabul edilebilirlik sınırı, yapılan analizin çalışılan konsantrasyonuna bağlıdır. Bu sınırlar

kullanılan metotlarda, bazı dokümanlarda ve ülkemizde TKG numune alma analiz metotları tebliğlerinde verilmiştir (AOAC, 2016).

Tablo 3.13. Yoğurt numunesi % 0.25 ara kesinlik çalışması

| Günler                 | 1.Gün | 2.Gün | 3.Gün | 4.Gün | 5.Gün | 6.Gün |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Anal. 1                | 0.25  | 0.24  | 0.25  | 0.24  | 0.25  | 0.25  |
| Anal. 2                | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.24  | 0.25  |
| Ort.                   | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.24  | 0.25  | 0.25  |
|                        | Uygun | Uygun | Uygun | Uygun | Uygun | Uygun |
| Zaman dilimi sayısı(k) |       |       |       |       |       | 6     |
| Analizci sayısı (n)    |       |       |       |       |       | 2     |

| Genel ortalama                                   | 0.25    |
|--|---------|
| Ortalamanın varyansı ( $S_a^2$ )                 | 0.00001 |
| Tekrarlanabilirlikvaryansı ( $S_r^2$ )           | 0.00010 |
| Günler arası varyans ( $S_b^2$ )                 | 0.0000  |
| Tekrarüretilebilirlikvaryansı ( $S_i^2$ )        | 0.00010 |
| Tekrarüretilebilirlik standart sapması ( $S_i$ ) | 0.010   |
| RSD <sub>i</sub>                                 | 0.04    |
| % RSD <sub>i</sub>                               | 4.12    |
| n-1(genel)                                       | 11      |
| (RSD2)*(n-1)                                     | 0.019   |
| Analizci 1 Ortalama                              | 0.25    |
| Analizci 2 Ortalama                              | 0.25    |
| Tekrarüretilebilirlik limiti (f(2)=2.8)          | 0.12    |
| max-min  | 0.01    |
| Tekrarüretilebilirlik limitine uygunluk kontrolü | Uygun   |
| %RSD <sub>i</sub>                                | 4.12    |
| %HRSD <sub>R</sub>                               | 4.94    |
| Tekrarüretilebilirlik uygunluk değerlendirilmesi | Uygun   |

Tekrarüretilebilirlik çalışmasında iki analizci tarafından bir adet yoğurt ve bir adet ayran kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan yoğurt ve ayran örneklerinde CMC miktarı % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 olacak biçimde hazırlanarak gerçekleştirildi.

Yoğurt CMC analizi % 0.25 tekrar üretilebilirlik çalışması tablo 3.13’de verildi. Bu sonuçları yorumladığımızda; birinci ve ikinci analizcinin ortalama sonuçları sırasıyla % 0.25  $\pm$  0.01, % 0.25  $\pm$  0.01 ve genel ortalama % 0.25  $\pm$  0.01 olarak bulundu, deneysel olarak % RSD<sub>i</sub>’ si % 4.12 olarak tespit edildi. Çalışılan konsantrasyon için 3.2.’de verilen horwizit eşitliği kullanılarak hesaplanan hedef % HRSD<sub>R</sub> % 4.94 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen tekrarüretilebilirlik % RSD<sub>i</sub> ‘si hedef % HRSD<sub>R</sub>’den küçük olduğu için % 0.25’lik tekrar üretilebilirlik çalışmasının uygun olduğu tespit edildi.

$$\% \text{ HRSD}_i = 2^{1-0.5 \log C} \quad (3.2)$$





analiz ortalamalarının değerlendirilmesinde 0.01 olarak bulundu. Elde edilen bu sonuç uygundur.

Tablo 3.15. Yoğurt numunesi % 1.00 ara kesinlik çalışması

| Günler                 | 1.Gün | 2.Gün | 3.Gün | 4.Gün | 5.Gün | 6.Gün |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Anal. 1                | 1.03  | 0.99  | 1.02  | 1.02  | 1.00  | 1.01  |
| Anal. 2                | 1.00  | 0.99  | 0.99  | 1.01  | 0.99  | 1.00  |
| Ort.                   | 1.01  | 0.99  | 1.00  | 1.01  | 1.00  | 1.00  |
|                        | Uygun | Uygun | Uygun | Uygun | Uygun | Uygun |
|                        |       |       |       |       |       |       |
| Zaman dilimi sayısı(k) |       |       |       |       |       | 6     |
| Analizci sayısı (n)    |       |       |       |       |       | 2     |

|  |         |
|--|---------|
| Genel ortalama                                   | 1.00    |
| Ortalamanın varyansı ( $S_d^2$ )                 | 0.00020 |
| Tekrarlanabilirlikvaryansı ( $S_{rp}^2$ )        | 0.00119 |
| Günler arası varyans ( $S_b^2$ )                 | -0.0005 |
| Tekrarüretilebilirlikvaryansı ( $S_i^2$ )        | 0.00119 |
| Tekrarüretilebilirlik standart sapması ( $S_i$ ) | 0.034   |
| RSD <sub>i</sub>                                 | 0.034   |
| % RSD <sub>i</sub>                               | 3.44    |
| n-1(genel)                                       | 11      |
| (RSD2)*(n-1)                                     | 0.013   |
| Analizci 1 Ortalama                              | 1.01    |
| Analizci 2 Ortalama                              | 1.00    |
| Tekrarüretilebilirlik limiti (f(2)=2.8)          | 0.10    |
| max-min  | 0.01    |
| Tekrarüretilebilirlik limitine uygunluk kontrolü | Uygun   |
| %RSD <sub>i</sub>                                | 3.44    |
| %HRSD <sub>R</sub>                               | 4.00    |
| Tekrarüretilebilirlik uygunluk değerlendirilmesi | Uygun   |

Yoğurt CMC analizi % 1.00 tekrar üretilebilirlik çalışması tablo 3.15’de verildi. Bu sonuçları değerlendirdiğimizde; birinci ve ikinci analizcinin ortalama sonuçları sırasıyla %  $1.01 \pm 0.03$ , %  $1.00 \pm 0.03$  ve genel ortalama %  $1.00 \pm 0.03$  olarak bulundu, deneysel olarak %  $RSD_i$ ’si %3.44 olarak tespit edildi. Çalışılan konsantrasyon için horwizit eşitliği kullanılarak hesaplanan hedef %  $HRSD_R$  % 4.00 olarak bulundu. Deneysel olarak elde edilen tekrarüretilebilirlik %  $RSD_i$ ’si hedef %  $HRSD_R$ ’den küçük olduğu için % 1.00’lik tekrar üretilebilirlik çalışması bakımından uygun olduğu tespit edilmiştir.

% 1.00'lik çalışmamda analizcilerin arasındaki tekrar üretilebilirlik limiti kontrolü yapıldı, analizciler arasında paralel analizde ( $f(2)=2.8$ ) 0.10 limit olarak bulundu. Analizcilerin aralarındaki tekrar üretilebilirlik limitleri farklı günlerde yapılan analizlerde ve analiz ortalamalarının değerlendirilmesinde 0.01 olarak bulundu. Elde edilen bu sonuç uygundur.







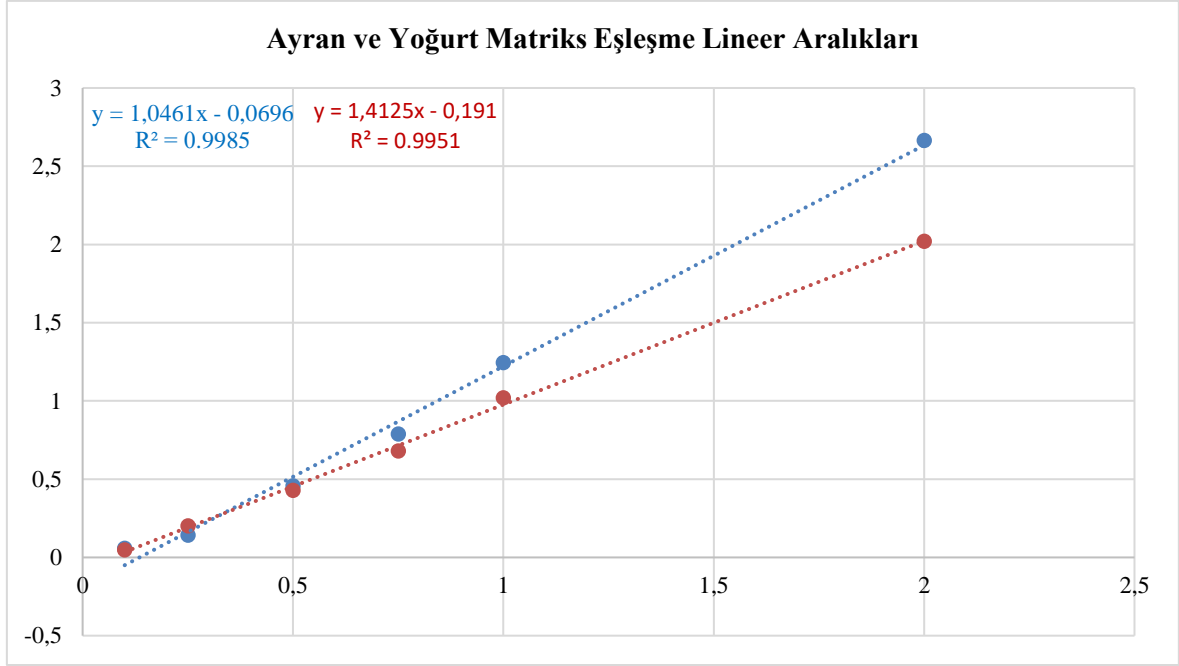
numunelerinde % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonlarda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar tablo 3.13- 3.18'deki deneysel %RSD<sub>i</sub> değerleri yine tablo 3.13- 3.18'de hesaplanan hedef %HRSD<sub>R</sub> değerlerinden küçük olduğu için geliştirmiş olduğumuz analiz metodunun tekrar üretilebilirlik validasyon parametresi uygun olarak bulundu.

Laboratuvar içi ara kesinlik, farklı analizcilerin, farklı zamanlarda, farklı konsantrasyonlarda çalışılması ile elde edilen sonuçlardaki tutarsızlıkları yansıtmaktadır. Ara kesinlik çalışmasının validasyondaki amacı, aynı laboratuvar, geliştirme aşaması sona erdiğinde yöntemin aynı sonuçları vereceğini doğrulamaktır.

### **3.1.5. Lineerite ve Ölçüm Aralığı**

Çalışma aralığı metodun kabul edilebilir bir gerçeklik ve kesinlikte uygulanabilir olduğu aralıktır. Çalışma aralığının en düşük noktası LOQ ve en yüksek noktası analitik seviyede önemli farklılıkların gözlemlendiği derişim seviyesidir. Çalışma aralığına ait veriler genellikle metodun geliştirilmesi sırasında elde edilir. Çalışma aralığı genel olarak hem cihaz için hem de analiz metodu için geçerli bir tanımdır. Numunenin ön işlem görmeden direkt olarak ölçüldüğü durumlarda iki çalışma aralığı aynıdır. Metodun ve cihazın, belirlenmiş olan çalışma aralığında çalışıp çalışmadığı incelenmelidir.

Cihazın kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analizinde lineer regresyon tercih edildi. Bu nedenle kalibrasyon standart çözeltileri çok hassas bir şekilde hazırlandı. Bu bağlamda, öncelikle izlenebilirliği olan belirli saflıktaki katı formda CMC sertifikalı referans standartı temin edildi. Bu referans standart matriks eşleşme kalibrasyon eğrisi için hem ayran hem de yoğurt matriksinde kullanıldı. Bu amaçla kör, % 0.1, % 0.25, % 0.50, % 0.75, % 1.00 ve % 2.00 konsantrasyonlarda kalibrasyon standart çözeltisi ayran ve yoğurt üretilerek hazırlandı.



Şekil 3.1. Yoğurt ve ayran numunesi CMC matrisk-eşleşme kalibrasyon eğrisi

Yapmış olduğum çalışmada hem lineer aralık hem de çalışma aralığı % 0.1, % 0.25, % 0.50, % 0.75, % 1.00 ve % 2.00 konsantrasyonlarda çalışılarak alt limit % 0.10 ve üst limit % 2.00 olarak belirlendi. Şekil 3.1’de ayran ve yoğurt matriks eşleşme lineer aralığı, ölçüm aralığına ait yapılan çalışma verilmiştir. Burada mavi ile verilen ayran numunesine ait kırmızı ile verilen yoğurt numunesine ait değerlerdir. Ayran için  $R^2$  değeri 0.9985 ve yoğurt için  $R^2$  değeri 0.9951 olarak bulundu ve bu değerler uygundur. Metodun LOQ değerleri madde 3.1.1’de belirtildiği gibi ayran için % 0.11 ve yoğurt için % 0.10 olarak hesaplanmıştı. Yapmış olduğum çalışmada numuneden gelebilecek olan girişimleri engellemek için matriks eşleşme kalibrasyon eğrisi kullanıldı. Kalibrasyon için kullanılan standartlara uygulanan işlemler numuneye de aynı biçimde uygulandığı için burada metod ve cihazın ölçüm aralığı aynıdır.

### 3.1.6. Hesaplanan Toplam Ölçüm Belirsizliği

Gıda analizlerinde kaliteli, doğru, tekrarlanabilir sonuçları üretmek ve zamanında analiz sonuçlarını rapor etmek önemlidir. Raporlanacak sonuçlar gıda maddesinin uygunluk değerlendirmesinde kabul ya da kabul edilmeme durumunu etkileyeceğinden buradaki sorumluluk büyüktür. Bu sorumluluk yapılmış olan analitik çalışma ve elde edilen analiz

sonuçlarına göre yapılır. Ancak, elde edilen analiz sonuçları her zaman kesin bir sonuç olmayabilir. Bu sebeple ölçüm belirsizliği konsepti ortaya konulmuştur. Ölçüm belirsizliği analiz basamaklarında oluşan ve raporlanan analiz sonuçlarını etkileyen etkenleri içermektedir (Çelebiler vd., 2011, Matson vd., 2010).

Yapılan hata mefhumunun haricinde; matriks etkisi, girişimler, kullanılan referans materyaller, kütle ve hacimsel belirsizlikler, çevresel faktörler, ölçüm yöntemleri ve ölçüm süreçlerine etki eden durumlar ve etmenler ölçüm sonuçlarının belirsizliğine ilave yapabilir (Çelebiler vd., 2011). Ölçüm belirsizliği, laboratuvar tarafından elde edilmiş olan neticenin kalitesini akseder ve neticenin gerçek değerini ne ölçüde etkilediğini gösterir. Neticelerle beraber ölçüm belirsizliği de verilirse, neticeyi kullananlara ölçümün kalitesi hakkında bilgi verilmiş olur (Bal vd., 2014). Hesaplanmış olan ölçüm belirsizliği sistematik ya da rastgele hataların neticesinde meydana gelebilir.

Gıda analizi yapan laboratuvarlar ölçüm belirsizliğini hesap etmek suretiyle tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve gerçeklik safhalarının da gözden geçirmeyi yapmış olurlar. Bu amaçla TÜRKAK R20.02 rehberinde verildiği gibi aşağıdan yukarı veya yukarıdan aşağı yaklaşımla ölçüm belirsizliği hesap edilmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımda; analiz sürecindeki her bir safhada belirsizlik tahmini yapılmakta, basamakların belirsizliği hesap edildikten sonra bunların bileşimleri ve analiz sonucu ile toplam ölçüm belirsizliği hesap edilmektedir. Yukarıdan aşağı hesaplamada ise; analiz sonucunun toplam belirsizliğinin hesap edilmesinde tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve gerçeklik verileri kullanılmaktadır.

Yapmış olduğum bu araştırma çalışmasında yukarıdan aşağı modeli kullanıldı. Yoğurt ve ayran örneklerine ait gerçeklik (Geri alma), tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri kullanıldı. % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonların yoğurt ve ayran örneklerine ait ölçüm belirsizliği sonuçları ayrı hesap edildi. Daha sonra yoğurt için bir ölçüm belirsizliği sonucu ve ayran için ölçüm belirsizliği hesap edildi. Son adımda da metodun birleştirilmiş ölçüm belirsizliği sonucu hesaplandı. Yapılan çalışmalara ait değerler tablo 3.19' dan 3.27'ye kadar olan tablolarda verildi.

Tablo 3.19. Yoğurt % 0.25 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |        |      |        |
|--|--------|------|--------|
| Parametre  | Değer  |      |        |
|  | (X)    | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 100.00 | 0.00 | 0.000  |
| Tekrarlanabilirlik   | 100.00 | 2.80 | 0.028  |
| Ara Kesinlik   | 100.00 | 4.12 | 0.041  |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |        |      | 0.05   |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |        |      | 0.10*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |        |      |        |

Tablo 3.20. Yoğurt % 0.50 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |       |      |        |
|--|-------|------|--------|
| Parametre  | Değer |      |        |
|  | (X)   | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 99.72 | 0.28 | 0.0028 |
| Tekrarlanabilirlik   | 100   | 2.42 | 0.0242 |
| Ara Kesinlik   | 100   | 4.36 | 0.0436 |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |       |      | 0.05   |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |       |      | 0.10*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |       |      |        |

Tablo 3.21. Yoğurt % 1.00 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |        |      |        |
|--|--------|------|--------|
| Parametre  | Değer  |      |        |
|  | (X)    | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 100.00 | 0.14 | 0.0014 |
| Tekrarlanabilirlik   | 100.00 | 0.73 | 0.0073 |
| Ara Kesinlik   | 100.00 | 3.45 | 0.0345 |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |        |      | 0.035  |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |        |      | 0.07*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |        |      |        |



Tablo 3.22. Ayran % 0.25 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |        |      |        |
|--|--------|------|--------|
| Parametre  | Değer  |      |        |
|  | (X)    | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 100.00 | 0.00 | 0.0000 |
| Tekrarlanabilirlik   | 100.00 | 1.92 | 0.0192 |
| Ara Kesinlik   | 100.00 | 3.60 | 0.0360 |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |        |      | 0.041  |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |        |      | 0.08*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |        |      |        |

Tablo 3.23. Ayran% 0.50 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |        |      |        |
|--|--------|------|--------|
| Parametre  | Değer  |      |        |
|  | (X)    | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 99.05  | 0.95 | 0.0096 |
| Tekrarlanabilirlik   | 100.00 | 2.73 | 0.0273 |
| Ara Kesinlik   | 100.00 | 3.97 | 0.0397 |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |        |      | 0.049  |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |        |      | 0.10*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |        |      |        |

Tablo 3.24. Ayran % 1.00 konsantrasyon toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |        |      |        |
|--|--------|------|--------|
| Parametre  | Değer  |      |        |
|  | (X)    | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 99.57  | 0.43 | 0.0043 |
| Tekrarlanabilirlik   | 100.00 | 0.73 | 0.0073 |
| Ara Kesinlik   | 100.00 | 3.45 | 0.0345 |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |        |      | 0.036  |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |        |      | 0.07*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |        |      |        |

Tablo 3.25. Yoğurt birleştirilmiş toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |        |      |        |
|--|--------|------|--------|
| Parametre  | Değer  |      |        |
|  | (X)    | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 100.14 | 0.14 | 0.0014 |
| Tekrarlanabilirlik   | 100.00 | 2,15 | 0.0215 |
| Ara Kesinlik   | 100.00 | 3.99 | 0.0399 |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |        |      | 0.045  |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |        |      | 0.09*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |        |      |        |

Tablo 3.26. Ayrar birleştirilmiş toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik   |        |      |        |
|--|--------|------|--------|
| Parametre  | Değer  |      |        |
|  | (X)    | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 99.54  | 0.46 | 0.0046 |
| Tekrarlanabilirlik   | 100.00 | 1.97 | 0.0197 |
| Ara Kesinlik   | 100.00 | 3.68 | 0.0368 |
| Relatif birleşik belirsizlik=                                  |        |      | 0.042  |
| *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (U <sub>x</sub> )= |        |      | 0.08*  |
| *%95 güven aralığı, k=2  |        |      |        |

Tablo 3.27. Metodun birleştirilmiş toplam belirsizlik hesabı

| Toplam Belirsizlik |  |      |        |
|--------------------|--|------|--------|
| Parametre          | Değer  |      |        |
|                    | (X)  | u(X) | u(X)/X |
| Gerçeklik (bias)   | 99,84  | 0,16 | 0,0016 |
| Tekrarlanabilirlik | 100,00   | 2,06 | 0,0206 |
| Ara Kesinlik       | 100,00   | 3,84 | 0,0384 |
|                    | Relatif birleşik belirsizlik=                          |      | 0,044  |
|                    | *Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik ( $U_x$ )= |      | 0,09*  |

\*%95 güven aralığı,  $k=2$

### 3.1.6.1. Analiz Sonucunun Ölçüm Belirsizliği Kullanılarak Kabul Uygun Sonuca Göre Karar Kuralı Örneği ile Yapılacak Raporlaması

Yoğurt CMC analizine ait analitik sonuç;

CMC: % 0.35 olarak bulunmuştur.

Genişletilmiş belirsizlik  $U_G = 0.09$  ( $k=2$  % 95) hesaplanmıştır.

$$\text{Ölçüm belirsizliği} = 0.35 \times 0.09$$

$$\text{Ölçüm belirsizliği} = \% 0.03$$

CMC Türk Gıda Kodeksine göre bulunmaması gerekmektedir. Bu nedenle de karar kuralı uygulanmaz.

Ölçüm belirsizliği, ölçüm sonuçlarının valide edilmiş analiz metotları ile yapıldığını ve güvenilirlik düzeyini gösterir. Verilen sonuçların doğruluğunun şüpheli olduğunu göstermez. Ölçüm sonuçlarının dağılımını gösteren bir değerdir. Ölçüm sonuçlarını karşılaştırırken ve limitlere uygunluğu açısından karar verirken önemlidir. CMC analizi ile ilgili validasyon çalışmasında ölçüm belirsizliği % 95 güven aralığında  $U_x \pm \% 9.00$  olarak bulundu.

## **RAPORLAMA**

| <b><u>Analizler</u></b> | <b><u>Sonuc</u></b> | <b><u>Ölçüm Limiti</u></b> | <b><u>Geri Kazanım</u></b> | <b><u>Ölçüm Belirsizliği</u></b> | <b><u>Uygunluk Değer.</u></b> | <b><u>An. Met.</u></b> |
|-------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| 1. CMC                  | : % 0.35            | % 0.10                     | -                          | ±% 0.03*                         | Uygun<br>Değil**              | İşletme içi<br>metot   |

\*  $k=2$  % 95 güven aralığında analitik sonuç  $x$   $U_G$  ile elde edilen Ö.B. sonucu

\*\* Elde edilen analiz sonucundan ölçüm belirsizliği çıkartıldığında elde edilen sonuç Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2009/25) uygun değildir.

Genel olarak bu biçimde analiz sonuçları verilirken uluslararası standardizasyon kuralları içinde ölçüm belirsizliklerinin hesap edilmesi gerekmektedir. Örneğin; müşteri (özel, resmi) tarafından herhangi bir parametere ile ilgili yapılan analizde bir partinin veya alt partinin kabulü ile ilgili uygunluk beyanı istendiğinde karar kuralı şartlarında müşteri ile anlaşıldığında laboratuvara gelen numunenin analitik sonuçun uygunluk değerlendirmesi, analizin mevzuatına bağlı olarak gerektiğinde geri almaya göre düzeltilmiş olan sonuçtan ölçüm belirsizliğinin (  $k=2$  % 95 güven aralığı) çıkarılmasıyla elde edilen sonuca göre yapılır. Elde edilen analiz sonucu Türk Gıda Kodeksi ilgili maddesinde verilen maksimum limitleri aşıyorsa uygun değil kabul edilir. Aşmıyorsa uygun kabul edilir. Muayene ve analiz raporunda mevzuata uygunluk durumu açık biçimde yazılır. Analiz sonucunun geri kazanım ve ölçüm belirsizliği(  $k=2$  % 95 güven aralığı) hesaba katılarak düzeltildiği muayene ve analiz raporunda belirtilir.

### **3.1.7. Piyasadan Alınan Yoğurt ve Ayrın Numunelerine Ait CMC Analizi Sonuçları**

Piyasadan alınan ve tablo 3.28' de isimleri verilen ürünlerde CMC analizi yapıldı. Her bir numune için 3 adet paralel çalışma gerçekleştirildi.

Tablo 3.28. Piyasadan alınanan yoğurt ve ayran numunelerine ait CMC sonuçları

| No | Ürün İsmi | CMC         |
|----|-----------|-------------|
| 1  | Yoğurt    | TELA        |
| 2  | Yoğurt    | TELA        |
| 3  | Yoğurt    | TELA        |
| 4  | Yoğurt    | TELA        |
| 5  | Yoğurt    | TELA        |
| 6  | Yoğurt    | % 0.31±0.06 |
| 7  | Yoğurt    | TELA        |
| 8  | Yoğurt    | TELA        |
| 9  | Yoğurt    | TELA        |
| 10 | Ayran     | TELA        |
| 11 | Ayran     | TELA        |
| 12 | Ayran     | TELA        |
| 13 | Ayran     | % 0.43±0.09 |
| 14 | Ayran     | TELA        |
| 15 | Ayran     | TELA        |

Yapmış olduğum çalışmada iki adet numunede bir adet yoğurt ve bir adet ayran numunesinde CMC tespit edildi. Diğer ürünlerde tespit edilebilir limitin altında bulundu.

### **3.2. Kalitatif Analiz Sonuçları**

LOQ seviyesi olan % 0.10'luk çalışma 2.2, 2.3.5 ve 2.3.6 maddelerde verilen yöntemler kullanılarak yapıldı. Kalitatif analiz iki farklı şekilde değerlendirildi. Bu amaçla FI-TR cihazı ve UV-VIS Spektrofotometre cihazına ait analiz sonuçları kullanıldı. Her iki cihaza ait sonuçların değerlendirmesi 3.2.1, 3.2.2 ve devam eden diğer maddelerde verildi.

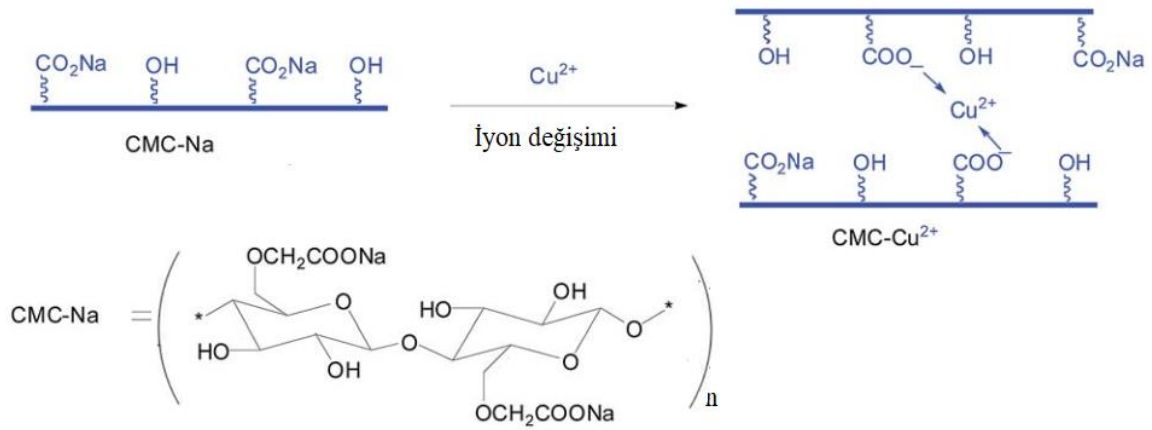
#### **3.2.1. FI-TR Cihazı İle Kalitatif Analiz Sonuçları**

Katı halde, sıvı halde ve çözelti halinde bulunan organik bileşiklerin yapılarında bulunan fonksiyonel grupların tespit edilmesinde, iki bileşiğin aynı olup olmadığı konusunda karşılaştırmalarda, bileşiğin yapısındaki bağların durumunun belirlenmesinde, bağlanma yerleri hakkında bilgi edilmesinde ve bileşiğin aromatik veya alifatik olup olmadığı tespit edilmesinde kullanılır. Bunun haricinde karbonhidratların, fosfolipitlerin, aminoasitlerin ve proteinlerin yapı analizlerinde kullanılır. FTIR özellikle polimer maddelerin analizlerinde, ilaç ve adli tıp analizlerinde kullanılırken, malzeme bilimlerinde, kimyada ve seramik sanayideki analizlerin de bu tekniğin uygulanması oldukça yoğundur. Çeşitli organik ve inorganik örneklerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılmasına imkan verir. FTIR spektroskopisi; gaz, sıvı kromatografisi, kütle spektroskopisi gibi diğer analitik metotlara göre daha başarılı biçimde endüstride çok iyi bir tanımlama aracı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda söz konusu bu teknik, "yeşil" bir analiz yöntemi ve sarf malzemelerinin maliyetinde tasarruf edebilme avantajı nedeniyle hızlı, doğru sonuçlar vermektedir.

Çalışmamda CMC'nin yoğurt ve ayran örneklerinde tespit edilmesi için FITR spektrofotometresi kullanıldı. Bunun için saf CMC numunesi, Saf CMC'nin  $\text{Cu}^{++}$  ile çöktürülmesi ile elde edilen numuneler, içersinde CMC bulunmayan yoğurt numunesi, içinde CMC bulunan ve  $\text{Cu}^{++}$  çöktürülen yoğurt numunesi, içersinde CMC bulunmayan ayran numunesi, içinde CMC bulunan ve  $\text{Cu}^{++}$  çöktürülen ayran numunelerinin analizleri yapıldı.

Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) polimer yapısındaki kimyasal değişiklikleri gösterir. CMC'nin FTIR spektrumları Ek Şekil 1.1.'de verilmiştir.  $3310.93\text{cm}^{-1}$  gözlemlenen pikler CMC'nin FTIR spektrumları için -OH germe bantlarını gösterir.  $2901.44\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler C-H grubunun gerilmesinden dolayı kaynaklanmaktadır.  $1582\text{cm}^{-1}$  'te gözlenen pikler hidrokarbon grupları (-CH<sub>2</sub>- makaslama), karbonil grupları (C = O germe) aittir.  $1411\text{cm}^{-1}$  ve  $1319\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler CMC'nin FTIR spektrumları için -CH<sub>2</sub>- ve -OH bağlanması ile ilişkilendirilir.  $1045\text{cm}^{-1}$ 'de bir eter piki CMC molekülünde bir -OCH<sub>2</sub>COO- grubunun olduğunu göstermektedir. Literatürde verilen FTIR spektrumları ile benzer bulundu (Ramli vd., 2015).

Saf CMC + Cu<sup>++</sup> kompleksinin FTIR spektrumları Ek Şekil 1.1.-1.5.'de verilmiştir.  $3284\text{cm}^{-1}$  gözlemlenen pikler CMC'nin FTIR spektrumları için OH gerilme bantlarını gösterir.  $2928\text{cm}^{-1}$  ve  $2853\text{cm}^{-1}$  gözlemlenen güçlü absorpsiyon pikleri sırasıyla CH<sub>2</sub>- grubunun asimetrik C-H germe titreşimi ve simetrik C-H gerilme titreşimidir ve bu grupların gerilmesinden dolayı kaynaklanmaktadır.  $1743\text{cm}^{-1}$  'te yeni gözlemlenen güçlü absorpsiyon piki karbonil gruplarına -C = O gerilme titreşimine aittir.  $1640\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen güçlü bir absorpsiyon bandının varlığı, karboksil grubunun -COO<sup>-</sup> varlığını göstermektedir.  $1523\text{cm}^{-1}$  ve  $1456\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler CMC'nin FTIR spektrumları için CH<sub>2</sub> ve OH bağlanması ile ilişkilendirilir.  $1159\text{cm}^{-1}$  ve  $1096\text{cm}^{-1}$ 'de piki C-O gruplarının germe durumunu göstermektedir. Bakır'ın -COO<sup>-</sup> grubu ile etkileşim halinde olması  $1743\text{cm}^{-1}$  'te yeni güçlü -C = O absorpsiyon piki ve  $2928\text{cm}^{-1}$  ve  $2853\text{cm}^{-1}$  gözlemlenen güçlü absorpsiyon pikleri -CH<sub>2</sub>- grubunun asimetrik C-H gerilme titreşimi ve simetrik C-H gerilme titreşiminin de güçlü absorpsiyon bantlarının oluşmasına neden olmuştur.  $1640\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen güçlü absorpsiyon piki -COO<sup>-</sup> varlığını teyit etmektedir (Liu vd., 2016).



Şekil 3.2 CMC-Bakır kompleksi

Kör numune + Cu<sup>++</sup> kompleksinin FTIR spektrumları Ek Şekil 1.3.'de verilmiştir. 3290 cm<sup>-1</sup> gözlemlenen pikler yoğurt numunesinin Cu<sup>++</sup> kompleksinin FTIR spektrumları için -OH germe bantlarını gösterir. 2928 cm<sup>-1</sup> gözlemlenen güçlü absorpsiyon pikleri sırasıyla -CH<sub>2</sub>- grubunun asimetrik C-H gerilme titreşimi bu grupların gerilmesinden dolayı kaynaklanmaktadır. CMC bulunmayan numune + Cu<sup>++</sup> kompleksi 1743 cm<sup>-1</sup> 'te absorpsiyon piki vermemiştir. 1640 cm<sup>-1</sup>'de gözlemlenen güçlü bir absorpsiyon bandının varlığı, karboksil grubunun -COO<sup>-</sup> varlığını göstermektedir. Laktik asit olabilir. 1437 cm<sup>-1</sup>'deki pikler kör numunenin FTIR spektrumları için -CH<sub>2</sub>- ve -OH bağlanması ile ilişkilendirilir.

Yapmış olduğum çalışmada kör ve CMC ilaveli numunelerin FITR spektrumları karşılaştırıldığında önemli derecede fark ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde CMC katılan bir numunede içinde CMC olmayan kör numune ile CMC olan bir numunenin analizi bu şekilde yapılabilecektir. Bununla ilgili validasyon çalışmaları 3.2.3 maddesinden sonra verilmiştir.

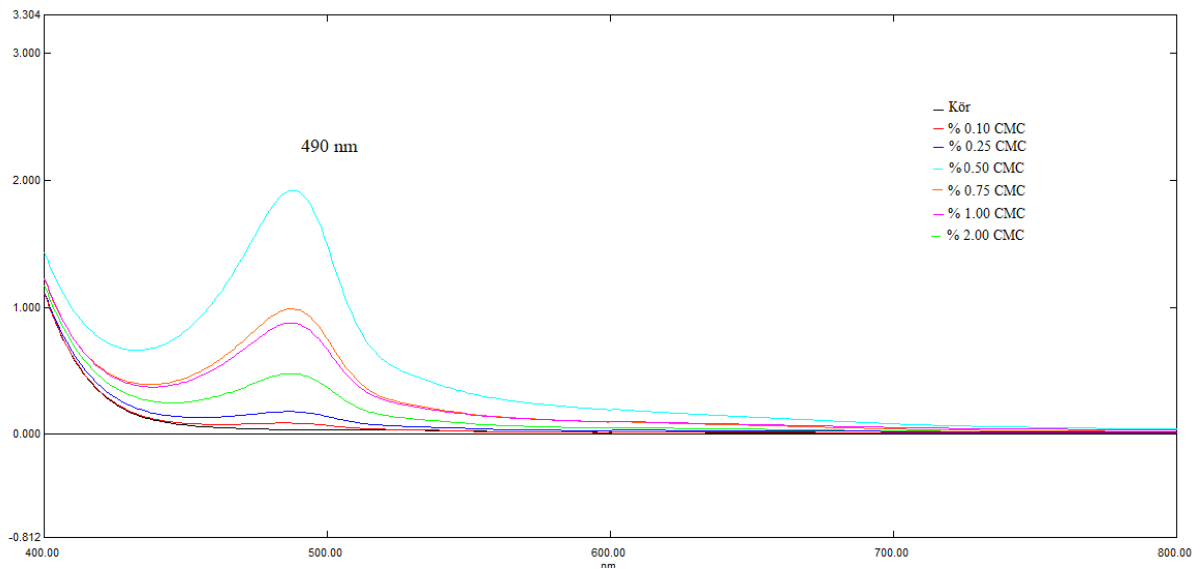
### 3.2.2. Spektrofotometre Cihazı İle Kalitatif Analiz Sonuçları

UV spektrofotometre cihazı ile analiz çalışmalarında birçok uygulama yapılmaktadır. Örneğin, fonksiyonel bir grubu tespit etmek için kullanılır. Karmaşık bir bileşikte kromoforun yokluğunu veya varlığını tespit etmek için kullanılabilir. Aynı zamanda polienlerdeki konjugasyon derecesini tespit etmek için de kullanılabilir. Çift bağlarda bir artış olduğunda, emilim daha uzun dalga boyuna çekilir. Ek olarak, bilinmeyen bileşikler



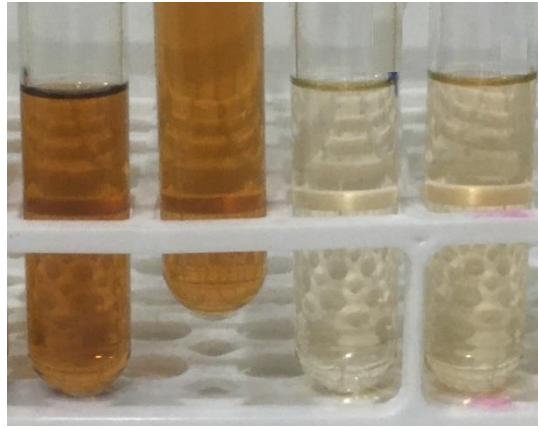
tanımlamak için UV spektroskopisi kullanılabilir. Bilinmeyen bir bileşiğin spektrumu, bir referans bileşiğin spektrumu ile karşılaştırılır. Her iki spektrum da çakışırsa, bu bilinmeyen bileşik başarıyla tanımlanabilir. UV spektroskopisi ayrıca geometrik bir izomerin konfigürasyonlarının belirlenmesine yardımcı olabilir. Cis-alkenlerin, trans-alkenlere kıyasla farklı bir dalga boyunda emildiği tespit edilmiştir. İzomerlerden biri koplanar olmayan bir yapı ile gelirse, yine de UV spektroskopisi ile belirlenebilir. UV/Vis spektroskopisi ile hem saf halde hem de biyolojik karışımlarda belirli bileşik sınıflarını tanımlamak için kalitatif analiz yapılabilir. UV/Vis spektroskopisinin daha ileri analitik amaçlara uygulanması oldukça sınırlıdır, ancak uygun özelliklerin ve parametrelerin bulunduğu sistemler için mümkündür. Son olarak, bu araç bir maddenin saflığını belirleyebilir. Bunu yapmak için, numune çözeltisinin emme oranı, referans çözeltinin emme oranı ile karşılaştırılacaktır. Emilimin yoğunluğu, bir maddenin saflığını hesaplamak için kullanılabilir.

Bu çalışmada Shimadzu marka UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanılarak 2 mL saf suya 100 µL fenol çözeltisi ilave edilerek ve 5 mL derişik Sülfirik asit (  $H_2SO_4$  ) ilave edilerek kör hazırlandı. % 0.10 CMC içeren yoğurt numunesi 2.3.3'deki gibi hazırlanarak oluşan rengin 200 ile 800 nm arasında spektrum taraması yapıldı. Oluşan kompleksin 490 nm maksimum absorbands verdiği tespit edildi. Tarama sonucu ile ilgili elde edilen sonuç şekil 3.3.'de verildi.



Şekil 3.3. Spektrum tarama sonuçları

Şekil 3.3.'de absorbansları değerlendirdiğimizde; deneysel çalışmada tarama işleminde 2 mL saf su + 0.1 mL fenol çözeltisi + 5 mL derişik  $H_2SO_4$  çözeltisi spektrofotometrenin 0 (sıfır) ayarı için kullanıldı. Yapılan çalışmada matriks-eşleşme kalibrasyon eğrisi metodunda kullanılan konsatrasyonlardaki CMC standartlarının taraması gerçekleştirildi. Kör numune ile % 0.10 CMC ilaveli numunenin absorbanslarının karşılaştırıldığında önemli derece fark vardır. Ayrıca görsel olarak da bakıldığında kör ile % 0.10 arasında fark şekil 3.4.'te görölmektedir.



Şekil 3.4. Kör ve % 0.10 CMC numuneler arasındaki renk

LOQ seviyesinde % 0.10 CMC katılan bir yoğurt ve ayran numunesi kör numune ile karşılaştırma yapılmak suretiyle bu yöntemle tespit edilebilecektir.

### 3.2.3. Hassasiyet (Doğru pozitif) Oranı (SNR)

Kalitatif analizlerde tespit edilecek olan analitin bulunduğu numunelerde analiz sonucunda pozitif sonuç alınma oranıdır. Bu oran, analitin bulunmadığı veya referans bir metot ile negatif olduğu belirlenen numunelerde geçerli kılınan metot uygulandığında elde edilen doğru pozitif (TP) sonuç sayısının, doğru pozitif sonuç sayısı (TP) ile yanlış negatif sonuç sayısı (FN) toplamına eşit olan gerçek pozitif sonuç sayısı toplamına oranıdır. Yapmış olduğum çalışmada iki farklı yöntem kullanılarak Hassasiyet (Doğru pozitif) oranı (SNR) 2.6 ve 2.7'de verilen denklemler kullanılarak hesaplandı. FITR çalışmasında yoğurt numunesi için toplamda 21 adet örnekte doğru pozitif (TP) sayısı 21 adet olarak tespit edildi. Negatif sonuç sayısı (FN) 0 (sıfır) olarak bulundu. Elde edilen hassasiyet sonucu % 100.00 olarak hesaplandı. FITR çalışmasına ait sonuçlar hassasiyet parametresine ait validasyon

alışmaları tablo 3.29’da grlmektedir. Metot validasyon/verifikasyonunda metotlar, doğrulukları % 90 veya daha yüksekse kabul edilebilir olarak değerlendirilebilirler. Yapmış olduğum çalışmada % 100 olarak bulunduğu için hassasiyet parametresi uygun olarak bulundu.

Tablo 3.29. FITR yoğurt numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları

| Referans Metot | Analiz Sonucu |             |        |
|----------------|---------------|-------------|--------|
|                | Pozitif (+)   | Negatif (-) | Toplam |
| Pozitif (+)    | 21            | 0           | 21     |
| Negatif (-)    | 0             | 20          | 20     |
| Toplam         | 21            | 20          | 41     |
| % Doğruluk     | 100.00        |             |        |
| %Hassasiyet    | 100.00        |             |        |
| zgnlk       | 100.00        |             |        |
| Seçicilik      | -0.29         |             |        |
| Yanlış Pozitif | 0.00          |             |        |
| Yanlış Negatif | 0.00          |             |        |

FITR çalışmasında ayran numunesi için toplamda 24 adet örnekten doğru pozitif (TP) sayısı 24 adet olarak tespit edildi. Negatif sonuç sayısı (FN) 0 (sıfır) olarak bulundu. Elde edilen hassasiyet sonucu % 100.00 olarak hesaplandı. FITR çalışmasına ait sonuçlar hassasiyet parametresine ait validasyon çalışmaları tablo 3.30’da grlmektedir.

Grsel çalışmasında yoğurt numunesi için toplamda 12 adet örnekten doğru pozitif (TP) sayısı 12 adet olarak tespit edildi. Negatif sonuç sayısı (FN) 0(sıfır) olarak bulundu. Elde edilen hassasiyet sonucu % 100.00 olarak bulundu. FITR çalışmasına ait sonuçlar hassasiyet parametresine ait validasyon çalışmaları tablo 3.31’de grlmektedir. Metot validasyon/verifikasyonunda metotlar, doğrulukları % 90 veya daha yüksekse kabul edilebilir olarak değerlendirilebilirler. Yapmış olduğum çalışmada % 100 olarak bulunduğu için hassasiyet parametresi uygun olarak bulundu.

Tablo 3.30. FITR ayran numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları

| Referans Metot | Analiz Sonucu |             |        |
|----------------|---------------|-------------|--------|
|                | Pozitif (+)   | Negatif (-) | Toplam |
| Pozitif (+)    | 24            | 0           | 24     |
| Negatif (-)    | 0             | 20          | 20     |
| Toplam         | 24            | 20          | 44     |
| % Doğruluk     | 100           |             |        |
| % Hassasiyet   | 100           |             |        |
| % Özgünlük     | 100           |             |        |
| Seçicilik      | -0,26         |             |        |
| Yanlış Pozitif | 0,00          |             |        |
| Yanlış Negatif | 0,00          |             |        |

Görsel çalışmasında ayran numunesi için toplamda 11 adet örnekte doğru pozitif (TP) sayısı 11 adet olarak tespit edildi. Negatif sonuç sayısı (FN) 0 (sıfır) olarak bulundu. Elde edilen hassasiyet sonucu % 100.00 olarak bulundu. FITR çalışmasına ait sonuçlar hassasiyet parametresine ait validasyon çalışmaları tablo 3.32’de görülmektedir.

Tablo 3.31. Görsel yoğurt numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları

| Referans Metot | Analiz Sonucu |             |        |
|----------------|---------------|-------------|--------|
|                | Pozitif (+)   | Negatif (-) | Toplam |
| Pozitif (+)    | 12            | 0           | 12     |
| Negatif (-)    | 0             | 12          | 12     |
| Toplam         | 12            | 12          | 24     |
| % Doğruluk     | 100,00        |             |        |
| % Hassasiyet   | 100,00        |             |        |
| % Özgünlük     | 100,00        |             |        |
| Seçicilik      | -0,30         |             |        |
| Yanlış Pozitif | 0,00          |             |        |
| Yanlış Negatif | 0,00          |             |        |

Tablo 3.32. Görsel ayran numunelerine ait CMC nitel analiz sonuçları

| Referans Metot | Analiz Sonucu |             |        |
|----------------|---------------|-------------|--------|
|                | Pozitif (+)   | Negatif (-) | Toplam |
| Pozitif (+)    | 11            | 0           | 11     |
| Negatif (-)    | 0             | 13          | 13     |
| Toplam         | 11            | 13          | 24     |
| % Doğruluk     | 100           |             |        |
| % Hassasiyet   | 100           |             |        |
| % Özgünlük     | 100           |             |        |
| Seçicilik      | -0,34         |             |        |
| Yanlış Pozitif | 0,00          |             |        |
| Yanlış Negatif | 0,00          |             |        |

#### 3.2.4. Doğruluk (RA)

Doğru analiz sonuçlarının elde edilme oranıdır. Çalışma esnasında yapılan doğru pozitif (TP) sonuçları ile doğru negatif (TN) analiz sonuçlarının toplamalarının analiz sonuçlarının toplamına oranın % olarak ifadesidir. FITR ile yapılan çalışmada Tablo 3.29 ve 3.30’da verildiği üzere doğruluk oranları ayran ve yoğrut numunesi için % 100 olarak tespit edildi. Metot validasyon/verifikasyonunda metotlar, doğrulukları % 90 veya daha yüksekse kabul edilebilir olarak değerlendirilebilirler. Yapmış olduğum çalışmada % 100 olarak bulunduğu için doğruluk parametresi uygun olarak bulundu.

Görsel yöntem ile yapılan çalışmada Tablo 3.31 ve 3.32’de verildiği üzere doğruluk oranları ayran ve yoğrut numunesi için % 100 olarak tespit edildi. Metot validasyon/verifikasyonunda metotlar, doğrulukları % 90 veya daha yüksekse kabul edilebilir olarak değerlendirilebilirler. Yapmış olduğum çalışmada % 100 olarak bulunduğu için doğruluk parametresi uygun olarak bulundu.

### **3.2.5. Yanlış Negatif Oranı (FN)**

Pozitif olarak tespit edilmesi gerekirken negatif olarak elde edilmiş olan sonuçların, pozitif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlara oranıdır. Metot validasyon/verifikasyon çalışmalarında metodun kabul edilebilir kabul edilmesi için yanlış negatif oranı %10'u aşmamalıdır. FTIR Spektrofotometresi için tablo 3.29 ve 3.30'da verildiği üzere yanlış negatif oranları ayran ve yoğurt numunesi için % 0 olarak tespit edildi.

Görsel yöntem ile yapılan çalışmada tablo 3.31 ve 3.32'de verildiği üzere yanlış negatif oranları ayran ve yoğurt numunesi için % 0 olarak tespit edildi.

### **3.2.6. Özgüllük (SP)**

Negatif olarak tespit edilmesi beklenen analiz sonuçlarından negatif olarak elde edilenlerin, toplam negatif olarak beklenenlere oranı olarak tanımlanır. Metot validasyon/verifikasyonunda analiz metotlarının, özgüllükleri % 90 veya daha yüksekse kabul edilebilir olarak değerlendirilebilirler. FTIR spektrofotometresi için tablo 3.29 ve 3.30'da verildiği üzere yapmış olduğum çalışmada özgüllük oranı %100 olarak bulunduğu için doğruluk parametresi uygun olarak tespit edildi.

Görsel yöntem ile yapılan çalışmada tablo 3.31 ve 3.32'de verildiği üzere yapmış olduğum çalışmada özgüllük oranı % 100 olarak bulunduğu için doğruluk parametresi uygun olarak tespit edildi.

### **3.2.7. Yanlış Pozitif Oranı (FP)**

Negatif olarak elde edilmesi beklenen analiz sonuçlarından pozitif olarak elde edilenlerin, toplam negatif olarak elde edilmesi beklenen analiz sonuçlarına oranı olarak tanımlanır. Metot validasyon/verifikasyon çalışmalarında metodun kabul edilebilir olması için yanlış pozitif oranı % 10'u aşmamalıdır. FTIR spektrofotometresi için tablo 3.29 ve 3.3'de verildiği üzere yapmış olduğum çalışmada yanlış pozitif oranı % 0 olarak bulunduğu için yanlış pozitif parametresi uygun olarak tespit edildi.

Görsel yöntem ile yapılan çalışmada tablo 3.31 ve 3.32'de verildiği üzere yapmış olduğum çalışmada yanlış pozitif oranı % 0 olarak bulunduğu için yanlış pozitif parametresi uygun olarak tespit edildi.

### **3.2.8. Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumu**

Beklenen gerçek sonuçlar ile gözlenen validasyon/verifikasyon çalışmasında elde edilen sonuçların istatistiksel olarak %90 güven aralığında ne oranda uyumlu olduğunu belirlemek için Cohen's Kappa Coefficient Test kullanıldı. Madde 2.7.6'da kullanılan formül ve değerlendirme kriterleri verilmiştir. Değerlendirmesi  $K < 0.20$  kötü,  $K 0.20-0.40$  vasat,  $K 0.41-0.60$  makul,  $K 0.61-0.80$  iyi,  $K > 0.80$  çok iyi biçiminde verilen şartlara göre yorumlandı. Yapmış olduğum FITR spektrofotometresi ile yapılan çalışmada yoğurt analizi için  $K=1.00$  olarak bulundu. Metot çok iyi olarak tespit edilmiştir. Yapmış olduğum çalışmada ayran analizi için  $K=1.00$  olarak bulundu. Metot çok iyi olarak tespit edilmiştir.

Yapmış olduğum göresel yöntem ile yapılan çalışmada yoğurt analizi için  $K=1.00$  olarak bulundu. Metot çok iyi olarak tespit edilmiştir. Yapmış olduğum çalışmada ayran analizi için  $K=1.00$  olarak bulundu. Metot çok iyi olarak tespit edilmiştir.

### **3.2.9. Minimum Tespit Sınırı (LOD)**

Bu amaçla % 0.10 CMC içeren yoğurt ve ayran numunelerinden 10 adet analiz yapıldı ve LOQ seviyesi madde 3.1.1' de verilen tabloda hesaplaması yapıldı. Yoğurt için bu değer % 0.11 ve ayran için % 0.11 olarak tespit edildi. Aynı zamanda istatistiki olarak elde edilen bu sonuçlardan 5 adet analiz yapılarak doğrulaması yapıldı.

### **3.2.10. Metot Sağlamlığı**

Analitik bir yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük fakat kasıtlı değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin ölçüsüdür ve normal kullanım sırasında güvenilirliğinin bir göstergesidir. Örneğin, bir kromatografik yöntemin sağlamlığı, mobil faz bileşimi, pH ve iyonik güç, sıcaklık ve farklı kolon partileri veya tedarikçileri gibi parametrelerdeki değişikliklerle değerlendirilebilir. Sağlamlığın değerlendirilmesi yöntem geliştirme aşamasında dikkate alınmalıdır. Aslında, bir yöntemin validasyonu işlemi, validasyon çalışmaları yapılana kadar metot koşullarının kabul edilebilir olup olmadığını bilmek mümkün olmadığından, metot koşullarının gerçek gelişiminden ayrılamaz. Bu nedenle, yeni bir analitik yöntemin geliştirilmesi ve onaylanması etkileşimli bir süreç olabilir.

Kromatografinin sağlamlığının değerlendirilmesi yöntemleri genellikle karmaşık ve zahmetlidir. Yapılması gereken çok sayıda analitik parametre testi yapılır. Bazı değerlendirilecek analitik parametrelerde küçük nominal şartlar ve istatistiksel değişimlerin yorumlanmasında Student's t-test veya ANOVA testi kullanılabilir (Dejaegher ve Heyden, 2007).

Sağlamlığı belirlemek için diğer daha geniş bir alternatif analitik yöntemlerden biri Youden'in testidir. Bu test sadece yöntemin sağlamlığını değerlendirmekle kalmaz, aynı zamanda her bir analitik parametrenin nihai sonuçlarının bireysel değişikliklerin etkilerini tespit edebilecek şekildedir (Youden ve Steiner, 1975).

Yapmış olduğum çalışmada sağlamlık kontrolü için madde miktarında değişiklik, pH ayarlamasında değişiklik, kaynatma süresinde değişiklik yapıldı. Yapılan değişiklikler metodu etkilemedi. Yapılan çalışmalar % 0.10 düzeyinde ilave edilen örneklerde yapıldı. Sonuçların değerlendirmesinde  $t_{0.95}$ -test uygulandı. Elde edilen sonuçlar tablo 3.33'de verilmiştir.

Tablo 3.33. Sağlamlık parametresinin değerlendirilmesi

|  | pH Değişikliği |       | Kaynatma Süresi |       | Numune Miktarı Değişikliği |       |
|--|----------------|-------|-----------------|-------|----------------------------|-------|
|  | Yoğurt         | Ayran | Yoğurt          | Ayran | Yoğurt                     | Ayran |
| <b>% R- Ortalama</b>                                       | 99.82          | 99.28 | 100.84          | 98.99 | 99.20                      | 98.46 |
| <b>Standart sapma</b>                                      | 3.40           | 4.98  | 4.19            | 2.94  | 4.17                       | 4.52  |
| <b>n</b>   | 10             | 10    | 10              | 10    | 10                         | 10    |
| <b><math>U_x = \text{Standart sapma} / \sqrt{n}</math></b> | 1.08           | 1.57  | 1.32            | 0.93  | 1.32                       | 1.43  |
| <b><math>U_i</math></b>                                    | 0.51           | 1.08  | 0.51            | 1.33  | 0.50                       | 1.33  |
| <b><math>t_{\text{deneysel}}</math></b>                    | 0.17           | 0.46  | 0.64            | 1.08  | 0.61                       | 1.08  |
| <b>t (tablo_%95 confidence level.two-tailed.n-1=19)</b>    | 1.83           | 1.83  | 1.83            | 1.83  | 1.83                       | 1.83  |
| <b>Uygunluk</b>  | Uygun          | Uygun | Uygun           | Uygun | Uygun                      | Uygun |

Sağlamlık parametresi ile alakalı yapılan çalışmada pH ayarlamasında değişiklik, kaynatma süresinde değişiklik yapıldı. Bununla ilgili olarak tablo 3.33'e baktığımız zaman pH ayarlamasındaki değişiklikte yoğurt için  $t_{\text{deneysel}}$  0.17, ayran için  $t_{\text{deneysel}}$  0.46 ve  $t_{0.95}$



tablodan 1.83 olarak bulundu. Deneysel çalışmaların değeri tablodan küçük olduğu için pH değişikliği uygun olarak bulundu.

Kaynatma süresi değişikliğinde yoğurt için  $t_{\text{deneysel}}$  0.64, ayran için  $t_{\text{deneysel}}$  1.08 ve  $t_{0.95}$  tablodan 1.83 olarak bulundu. Deneysel çalışmaların değeri tablodan küçük olduğu için kaynatma süresi değişikliği uygun olarak bulundu.

Numune miktarındaki değişiklikte yoğurt için  $t_{\text{deneysel}}$  0.61, ayran için  $t_{\text{deneysel}}$  1.08 ve  $t_{0.95}$  tablodan 1.83 olarak bulundu. Deneysel çalışmaların değeri tablodan küçük olduğu için numune miktarı değişikliği uygun olarak bulundu.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğum kantitatif analiz çalışmasında yoğurt numunesi için MDL % 0.03, LOD % 0.03 ve LOQ % 0.10 olarak bulundu. Ayran için yapılan çalışmada bu değerler MDL % 0.03, LOD % 0.03 ve LOQ % 0.11 olarak bulundu. Elde edilen bu değerlerin uygunluğunun 5 farklı noktada kontrolü yapıldı. Türk Gıda Kodeksinde CMC yoğurt ve ayran gibi süt ürünlerinde hiç olmaması gerekmektedir. Dolayısıyla ortaya koymuş olduğum metodun LOQ seviyesi % 0.10 olarak bulunmuştur.

Yoğurt ve ayran numuneleri ile yapılan % 0.50 ve % 1.00 CMC ilavesi yapılarak gerçekleştirilen geri alma çalışmalarında % 0.50' lik CMC ilaveli yoğurt numunesinin geri alma çalışması oranı ortalama  $99.72 \pm 2.07$  olarak, yoğurt numunesinde % 1.00'lik çalışmamda geri alma çalışması oranı ortalama  $100.71 \pm 1.88$ , ayran numunesinde % 0.50'lik çalışmamda geri alma çalışması oranı ortalama  $99.05 \pm 2.11$  ve ayran numunesinde % 1.00'lik çalışmamda geri alma çalışması oranı ortalama  $99.57 \pm 0.94$  olarak bulundu. Yapılan çalışmada, geri kazanım iyi analitik performans göstermiştir ve elde edilen iki farklı konsantrasyondaki sonuçlar AOAC, 2016'da verilen limitleri karşılamaktadır. Dolayısıyla metodun geri alma oranları çok iyidir.

CMC için tekrarlanabilirlik çalışması için; yoğurt ve ayran örneklerinde % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonda olacak biçimde çalışıldı. Elde edilen her bir analizci için elde edilen ve birleştirilmiş %  $RSD_r$  değerleri hesaplanan hedef %  $HRSD_r$  değerlerinden küçük olduğu için yapmış olduğum validasyon çalışmasında metodun tekrarlanabilirlik parametreleri uygundur.

Yaptığım tekrar üretilebilirlik çalışmasında; CMC ile ilgili olduğu için süt ürünleri matrisini temsil etmesi bakımından yoğurt ve ayran numesi çalışıldı. CMC Türk Gıda Kodeksine göre süt ürünlerine katılması yasak olan bir katkı maddesidir. Bu parametrede yoğurt ve ayran numunelerinde % 0.25, % 0.50 ve % 1.00 konsantrasyonlarda çalışıldı. Elde edilen sonuçların deneysel %  $RSD_i$  değerleri hesaplanan hedef %  $HRSD_R$  değerlerinden küçük olduğu için geliştirmiş olduğumuz analiz metodunun tekrar üretilebilirlik validasyon parametresi uygun olarak bulundu.

Ölçüm sonuçlarını karşılaştırırken ve limitlere uygunluğu açısından karar verirken belirsizlik önemlidir. CMC analizi ile ilgili validasyon çalışmasında ölçüm belirsizliği  $k=2$  % 95 güven aralığında genişletilmiş belirsizlik  $\pm U_x$  % 9.00 (0.09) olarak bulundu.

Yapmış olduğum çalışmada ayran ve yoğurt numuneleri için; hassasiyet parametresi %100 olarak, doğruluk parametresi %100 olarak, yanlış negatif oranları %0 olarak, özgüllük oranı %100 olarak, yanlış pozitif oranı %0 olarak bulunmuştur. Yapmış olduğum çalışmada yoğurt analizi için  $K=1.00$  olarak bulundu. Metot çok iyi olarak tespit edilmiştir. Yapmış olduğum çalışmada ayran analizi için  $K=1.00$  olarak bulundu. Metot hem FITR ile hem de spektrofotometrik olarak çok iyi tespit edilmiştir.

CMC'nin yoğurt ve ayran ürünlerinde tespiti ile ilgili yapmış olduğum validasyon çalışmasında sağlamlık parametresi uygun olarak bulundu. Dolayısıyla metodun sağlam olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; yapmış olduğum bu çalışmada CMC bulunan süt ürünlerinde yapılan analizlerin tespit edilmesindeki yeni bir kalitatif ve kantitatif analiz metodu ortaya koyulmuştur. Kalitatif ve kantitatif olarak gerçekleştirilen bu metodun validasyon çalışmaları yapılmış olup bu metot CMC analizi yapan laboratuvarlar tarafından kullanılabilecek bir hale getirilmiştir.

CMC Türk Gıda Kodeksine göre süt ürünlerinde bulunmaması gerekir. Geliştirmiş olduğum bu metotla süt ürünlerinde % 0.10 civarında katılan CMC miktarı tespit edilebilecektir.

Yapmış olduğum bu çalışmayı A sınıf dergilerde yayınlanması sağlanarak, bu analizi yapmak isteyen gıda kontrol laboratuvarları tarafından dergiye atıf yapılarak analizinde kullanılabilecek bir metot olacaktır.

## 5. KAYNAKLAR

- Abu-Teir, M., Abu-Taha, M., Al-Jamal, A. ve Eideh, H., 2008. DNA Infrared Absorbency Detection Using Photo pyroelectricTechnique and FTIR Spectroscopy, J. Appl. Biol. Sci., 2, 3, 113-119.
- Akdağ, İ., 2011. İstanbul Metot Validasyonu-Kimyasal Analizlerde Belirsizlik Seminerleri Eğitim Notları, 100 s.
- Akın, N., 2006. Modern Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi, Damla Ofset, Konya, 456s.
- Alexander, R.J.,1999. HydrocolloidGums: SyntheticProducts, Cereal Foods World, 44, 10, 722-724.
- Altınayar, A.,1997. Farklı Yöntemlerle Ayran Üretiminde Karboksimetil Selüloz Kullanımı.Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 65s.
- Anderson, D.M. ve Andon, S.A., 1988. Water-SolubleFoodGumsandTheir Role in Product Development, Cereal Foods World, 33, 10-14.
- Anonymous, 1991. Gellangum a stabiliser of manymeans, Prepared Foods, 160, 6, 125.
- AOAC, 2016. Guidelines for Standard Method Performance Requirements AOAC Official Methods of Analysis, Appendix F, p. 2
- Atamer, M., Gürsel, A., Tamuçay, B., Gençer, N., Yıldırım, G., Odabaşı, S., Karademir, E., Şenel, E. ve Kırdar, S., 1999. Dayanıklı Ayran Üretiminde Pektin Kullanım Olanakları Üzerine Bir Araştırma, Gıda, 24, 2, 119-126.
- Aydar, K.,1996. Ayran Üretiminde Karboksimetil Selüloz Kullanımı.Yüksek Lisans Tezi,Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 57s.
- Bal, C., Serdar M.A., Güngör O.T., Çelik H.T., Abuşoğlu S. ve Uğuz N., 2014. Biyokimya Parametrelerinin Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması, Türk J. Biochem., 39, 538-543.
- Blanc, B., 1986. The Nutritional Value of Yoghurt, Int. J. Immunotherapy, 2, 25-47.
- Boyle, J.L., 1959. The Stabilization of Ice-creamand Icelollies, Australia, Food Technol., 11, 543.
- Bratinova S., Raffael B. ve Simoneau C., 2009. Guidelines For Performance Criteria And Validation Procedures Of Analytical Methods Used in Controls Of Food Contact Materials, European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection, ISBN 978-92-79-14483-7, s.35
- Carr, J.M., Sufferling, K. ve Poppe, J., 1995. Hydrocolloids and Their Use in The Confectionery Industry, Food Technol., 49, 7, 41-42.

- Cawley, R.W., 1964. The Role of Wheat Flour Pentosans in Baking. II. Effect of Added Flour Pentosans and Other Gums on Gluten-Starch Loaves, J. Sci. Food Agric., 15, 5, 834-839.
- Chalupa, W.F., Colegrove, G.T., Sanderson, G.R. ve Valli, R.C., 1994. Simple Films and Coating Made with Gellan Gum. Res. Disclosure, 36116, p. 244.
- Chowdhury, F.H. ve Neale, S.M., 1963. Acid Behavior of Carboxylic Derivatives of Cellulose. Part 1. Carboxymethyl cellulose, J. Polymer Sci., 1, 2881-2891.
- Christensen, S.H., 1986. Pectins in Food Hydrocolloids. Vol. III.M. Glicksman(ed.), CRC press, Boca Raton, F.L., 206-227.
- Coffin, D.R. ve Fishman, M.L., 1994. Physical and Mechanical Properties of Highly Plasticized Pectin Starch Films, J. Appl. Polym. Sci., 54, 9, 1311-1320.
- Costell, E., Carbonell, E. ve Duran, L., 1993. Rheological Indexes of Fruit Content in Jams-Effect of Formulation on Flok Plasticity of Shared Strawberry and Peach Jams, J. Text. Studies. 24, 14, 375-390.
- Cottrell, I. W. ve Kovacs, P., 1980. Alginates in Handbook of Water-Soluble Gums and Resins.Ch. 2. R. L. Davidson(ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 1-43.
- Çelebiler A, Serin H, Güleç D ve Karaca B., 2011. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Ölçüm Belirsizliği: Pratik Uygulama, Türk J. Biochem., 36, 362-366.
- Davidson, R.L., 1980. Handbook of Water-soluble Gums and Resins, McGraw Hill, New York, 700s.
- Demirci, M. ve Şimşek, O., 1997. Süt İşleme Teknolojisi, Hasad Yayıncılık, İstanbul.
- Dejaegher, B.; Heyden, Y. V., 2007. Ruggedness and Robustness Testing, J. Chromatogr. A., 1158, 1-2, 138-157.
- Dziuba B., Babuchowski A., Nalecz D. ve Niklewicz M., 2005. Identification of Lactic Acid Bacteria Using FTIR Spectroscopy and Cluster Analysis, Int. Dairy J., 17, 3, 183-189.
- Essendoubi, M., Toubas D., Lepouse C., Leon A., Bourgeade F., Pinon J.M., Manfait M. ve Sockalingum G.D., 2007. Epidemiological Investigation and Typing of *Candida Glabrata* Clinical Isolates by FTIR Spectroscopy, J. Microbiol Methods, 71, 3, 325-331.
- Foley, J. ve Mulcahy, A.J., 1989. Hydrocolloid Stabilisation and Heat Treatment for Prolonging Shelf Life of Drinking Yoghurt and Cultured Butter milk, Irish Journal of Food Science and Technology, 13, 1, 43-50.
- Food Chemicals Codex, 1981. 3rd Edn, National Academy Press, Washington, D. C.
- Fox, J. E., 1992. Seed Gums, In Thickening and Gelling Agents For Food. Ch. 7. , Imeson A. (Ed.), Blackie A & P, Glasgow, pp.153-170.

- Glicksman, M., 1969. Gum Technology in the Food Industry, Academic Press, New York.
- Glicksman, M., 1980. Food Hydrocolloids. Vol.1-3, CRC Press, Boca Raton.F.L.
- Greminger, G.K. ve Krumel, K.L., 1980. Alkyl and Hydroxy Alkyl Celulose, in Handbook of Water-Soluble Gums and Resins, ch.3, R.L., Davidson(ed.) MacGrew- Hill, New York.
- GTHB, 2018. Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara.
- Gülmez, M. ve Güven, A., 2003. Survival of *Escherichiacoli* O157:H7, *Listeria Monocytogenes* 4b and *Yersinia Enterocolitica* O3 in Ayran and Modified Kefir as Pre- and Post fermentation Contaminant. Vet. Med.-Czech, 48, 5, 126-132.
- Gülümser, N.,1986. Karboksimetil Selüloz ile Ayranın Dayanıklı Hale Getirilmesi Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 48s.
- Gündüz, T., 2001. İnstrümental Analiz, Gazi Kitabevi, ISBN: 978-975-7313-43-4, Ankara, 1357s.
- Güven, M.,1998. Stabilizör Kullanımının Yoğurtların Bazı Kalite Kriterleri Üzerine Etkileri, Gıda, 23, 2, 133-139.
- Güven, M. ve Hayaloğlu, A.A.,2001. Hidrokolloidler ve Süt Teknolojisinde Kullanımları, Gıda, 7, 72-79.
- Helm, D., Labischinski, H.,Schallehn, G ve Naumann, D., 1991. Classification and Identification of Bacteria by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, J. Gen Microiol. 137, 1 , 69-79.
- Herald, C.T., 1986. Locust/carob Bean Gum, in Food Hydrocolloids, Vol.3, Glicksman, M. (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL., pp.161-70.
- ICH, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2(R1), ICH Harmonised Tripartite Guideline.
- Imeson, A.P., 1992. Exudate Gums, in Thickening and Gelling Agents for Food Imeson, A.P. (ed.), Blackie A. and P., Glasgow, pp.66-97.
- Juneja, H. D., Joshi, M. ve Kanfode J. P. 2013. Synthesis and Characterization of Metallic Gel Complexes Derived from Carboxymethyl Cellulose, Journal of Chemistry. 2013, 1-6.
- ISO 11095, 1996. Linear Calibration Using Reference Materials, International Organization of Standarts, Geneva.
- IUPAC, 2001. Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC recommendations 2001), Pure Appl. Chem., 73 ,8,1381-1386.

- IUPAC, 2012. Compendium of Chemical Terminology, Gold Book.
- Iwaki, M., Cotton, P.J., Quirk, P.G., Rich, P.R. ve Jackson, J.B., 2005. Molecular Recognition between Protein and Nicotinamide Dinucleotide in Intact, Proton-Translocating Trans hydrogenase Studied by ATR-FTIR Spectroscopy, JACS Articles, 128, 8, 2621-2629, Published on Web 02/04/2006.
- Izzo, M., Stahl, C. ve Tuazon, M., 1995. Using Cellulose Gel and Carrageenan to Lower Fat and Calories in Confections, Food Technol, 49, 7, 45-49.
- JCGM, 2012. International vocabulary of metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), [www.bipm.org](http://www.bipm.org). A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva.
- Kane, S.R., Ashby, P.D., Pruitt, L.A., 2008. ATR-FTIR as a Thickness Measurement Technique For Hydrated Polymer-on-Polymer Coatings, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 9, 2, 613–620
- Köksoy, A. ve Kılıç, M., 2003. Effects of Water and Salt Level on Rheological Properties of Ayran, a Turkish Yoghurt Drink, International Dairy Journal, 13, 10, 835-839.
- Köksoy, A. ve Kılıç, M., 2004. Use of Hydrocolloids in Textural Stabilization of a Yoghurt Drink, Ayran. Food Hydrocolloids, 18, 4, 593-600.
- Lin, S.Y., Wang, S.L., 2011. Advances in Simultaneous DSC–FTIR Microspectroscopy for Rapid Solid-State Chemical Stability Studies: Some Dipeptide Drugs as Examples, Adv. Drug Delivery Rev., 64, 5, 461-478.
- Liu X., Lin B., Zhang, Z., Lei, H. ve Li, Y., 2016. Copper(II) Carboxymethyl cellulose (CMCCuII) As an Efficient Catalyst for Aldehyde–Alkyne–Amine coupling Under Solvent –Free Conditions, Royal Society of Chemistry Advances, 6, 94399–94407.
- Mabeau, S. ve Fleurence, J., 1993. Seaweed in Food Products: Biochemical and Nutritional aspects, Trends Food Sci. Technol, 4, 4, 103-107.
- Maestroni, M.B., 2005. Uncertainty of Laboratory Operations. In Lectures Database / Uncertainty of analytical Results/Principles of Estimation of Uncertainty. FAO/IAEA Training Workshop on Introduction to QC/QA in Pesticide Analytical Laboratories, Training and Reference Center for Food and Pesticide Control, Seibersdorf, Vienna, Austria.
- Magnusson, B. ve Örnemark U., 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide To Method Validation And Related Topics, ISBN 978-91-87461-59-0, 70p.
- Matson P.L., Myssowski K., Yovich, S., Morrison, L., Irving, J. ve Bakos, H.W., 2010. The Density of Human Semen and the Validation of Weight as an Indicator of Volume: A Multicentre Study, Reproduct Biol., 10, 2, 141- 153.
- MEB., 2012. Kimya Teknolojisi: Spektrofotometre, Ankara.

- Naga, D.P.V., Putta R.K., Salahuddin M. ve Shanta K.S.M., 2012. Candestartancilexetil analytical method development and validation studies by reverse phase HPLC technique, International Journal of Pharmaceutical Frontier Research, 2, 3, 36-43.
- Nishide, E., Mishima, A., Anzai, H. ve Uchida, N. (1992) Properties of alginic acid from sulfated polysaccharides extracted from residual algae by the hot water method. Bull. College Agric. Vet. Med., 49, 140–2.
- NMKL, 2007. Evaluation of Results from Qualitative Methods. Procedure No. 20.
- Nussinovitch, A., 1993. Gum-Based Texturized Products, In Year Book of Science and Techonology, McGraw-Hill, New York, pp.138-140.
- Nussinovitch, A., 1997. Hydrocolloid Applications: Gum Techonology in the Food and Other Industries, Blackie Akademik and Professional UK.
- Ono, D., Bamba, T., Oku, Y., Yonetani, T. veeFukusaki, E., 2011. Application of Fourier Transform Near-infrared Spectroscopyto Optimization of Gren Tea Steaming Process Conditions, J. Biosci Bioeng, 112, 3, 247-251.
- Özer, B., 2006. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi, Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, 488s.
- Papadopoulou, O., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. ve Nychas, G.J.E. 2011. Contribution of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Data on the Quantitative Determination of Minced Pork Meat Spoilage, Food Res. Int., 44,10, 3264–3271.
- Poppe, J., 1995. New Approach esto Gelling Agents in Confectionery, Manufacturing-Confectioner, 75, 5, 119-126.
- Ramli, S., Ja’afar, S.M., Sisak, M.A.A., Zainuddin, N. ve Rahman, I.A., 2015. Formulation and Physical Characterization of Micro emulsions Based, Carboxymethyl Cellulose as Vitamin C Carrier, Malaysian Journal of Analytical Sciences, 19, 1, 275 – 283.
- Rasic, J., Kurman, J., 1978. Yoghurt. Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations, Technical Dairy Publishing House, Denmark, 466p.
- Reidel, H., 1983. TheUse of Gums in Confectionery, Confect. Prod., 49, 12, 612-613.
- Reidel, H., 1986. Confections Based on Gum Arabic, Confect. Prod., 52, 7, 433- 437.
- Reis, N., Franca, A.S. ve Oliveira, L.S., 2013.Performance of Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy and Chemometrics for Detection of Multiple Adulterants in Roasted and Ground Coffee, LWT –Food Sci. Technol., 53,2,395-401.
- Ripp, J., 1996. Analytical Detection Limit Guidance and Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits, Wisconsin Department of Natural Resources Laboratory Certification Program, PUBL-TS-056-96, 67p.



- Rol, F., 1973. Locust Bean Gum. In Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives. Whistler, R.L. and BeMiller, J.N (eds.), Academic Press, New York, pp.323-337.
- Ryu, H.S., Park, N.E. ve Lee, K.H., 1992. Effect of Dietary Fiber on the In-vitro Digestibility of Fish Protein, J. Korean. Soc. Food. Nutr., 21, 3,255-262.
- Sanderson, G.R., 1990. Gellan Gum, in Food Gels. Harris, P. (ed.), Elsevier Applied Science, London, pp. 210-232.
- Sırımoğlu, N., Talay A., Öziş, A. ve Dr. İşler R., 2001. Plastik Ambalaj Malzemeleri İçin Uygulanan Kalite Kontrol Testleri, Petkim Petrokimya Holding A.Ş. Aliğa.<http://www.petkim.com.tr/Userfiles/File/uretim/kalitekontrol-teknikservis/Plastik>.
- Stanley, N. F., 1987. Production, Properties and Use of Carrageenans, in Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. McHugh, D.J.(ed.). FAOUN, Rome, pp.97-147.
- Stelzer, G.I. ve Klug, E.D., 1980. Carboxymethylcellulose, in Handbook of Water-soluble Gums and Resins, ch.4. Davidson, R.L.(ed.), McGraw-Hill, New York, pp.421-428.
- Şimşek, O., 1995. Ayran Yapımında Farklı Stabilizatör Kullanımı ve Etkileri, Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayın No: 229, Araştırma No:89, Tekirdağ.
- Tekinşen, O.C., 2000. Süt Ürünleri Teknolojisi, Selçuk Üniversitesi, Basımevi, Konya.
- TGK 2001/21, 2001. Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği.
- TGK 2009/25, 2009. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği.
- TGK 2016/4, 2016. Türk Gıda Kodeksi Belirli Gıdalarda Erusik Asit Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Gıdalardan Numune Alma Ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği.
- Tonya, Y., 2011. Varyans Analizi (ANOVA) ve Faktöriyel ANOVA: [yunus.hacettepe.edu.tr/~tonta/courses/.../bby208-10-varyans-analizi.ppt](http://yunus.hacettepe.edu.tr/~tonta/courses/.../bby208-10-varyans-analizi.ppt) (Erişim Tarihi. 20 Temmuz 2013).
- Towle, G. A., 1973. In Industrial Gums. Whistler, R.L. and BeMiller, J.N. (eds.), Academic Press, New York, pp. 83-114.
- Trullols, E., Ruisanchez, I ve Rius, F.X., 2004. Validation of qualitative analytical methods, Trends in Analytical Chemistry, 23, 2, 137-145.
- TS EN ISO 712, 2012. Tahıl ve Tahıl Ürünleri-Rutubet Muhtevası Tayini-Referans Yöntem, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS EN ISO/IEC 17025, 2017. Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yetkinliği İçin Genel Gereklilikler, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS 1019, 1988. Pastörize Süt, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

- TS 11044, 1993. Süt-Koyun-Çiğ, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS 11046, 1993. Süt-Keçi-Çiğ, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS 10935, 1993. Yoğurt Yapım Kuralları, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS 1018, 1994. İnek Sütü-Çiğ, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS 1330, 1999. Yoğurt Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS 11045, 2002. Manda Sütü- Çiğ, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TS 1329, 2005. Süt Tozu, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TÜRKAK R20.02, 2015. Deney/Analiz Sonuçlarındaki Ölçüm Belirsizliği Tahmini İçin TÜRKAK Prensipleri
- TÜRKAK, 2019. Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması için Bilgilendirme Klavuzu
- Urlacher, B. ve Dalbe, B., 1992. XanthanGum, in Thickening and Gelling Agents for Food. Imeson, A.(ed.), Blackie , London, pp. 206-226
- URL-1, <https://www.standartmerkezi.com/standartmerkezi-forum/gidalarda-kullanilan-katki-maddeleri/597-kivam-arttiricilar-selulozlar-karboksimetil-seluloz-cmc.html>. 05 Kasım 2019.
- URL-2, <https://akbelkimya.com.tr/cmc-karboksimetil-seluloz-196-urun>. 05 Kasım 2019.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., Barceló, D. et al., 2002. Metrology of Qualitative Chemical Analysis, Report EUR 20605 EN, European Commission, ISBN 92-894-5194-7.
- Ward, F.M. ve Andon, S.A., 1993. Water-soluble Gums Used in Snack Foods and Cereal Products, Cereal Foods World, 38, 10, 748-752.
- Ward, F.M., Andon, S.A. ve Ranhotra, G., 1993. TheUse of Gums in Bakery Foods, AIB Tech. Bull., 15:4.
- Yaygın, H., 1999. Yoğurt Teknolojisi, Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya, 331s.
- Yılmaz, A., 2013. Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu. Turklab Kalibrasyon ve Deney Laboratuvar Derneği, TÜRKLAB Rehber, 1.
- Yilmaztekin, M. ve Cabaroglu, T., 2011. Confirmatory Method For The Determination Of Volatile Congeners And Methanol in Turkish Rakı Accordingto European Union Regulation (EEC) No. 2000R2870: Single-laboratory validation. Journal of AOAC International, 94, 2, 611-617.
- Yöney, Z., 1967. Yoğurt Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:289, Ders Kitabı No:103, Ankara Üniv. Basımevi, Ankara.
- Youden, W. J. ve Steiner, E. H., 1975. Statistical Manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry, Washington: AOAC, 88 p

- Zecher, D. ve Van Collie, R., 1992. Cellulose Derivatives, in Thickening and Gelling Agents for Food. Imeson, A. (ed.), Blackie A and P Glasgow, pp. 40-65.
- Zorba, M., 2001. Gamlar, Gıda Katkı Maddeleri, Altuğ, T. (ed.), Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir. s.79-105.
- Zorba, M. ve Ova, G. 1999. An improved method for the quantitative determination of carboxymethyl cellulose in food products, Food Hydrocolloids. 13, 73-76.

## **6. EKLER**

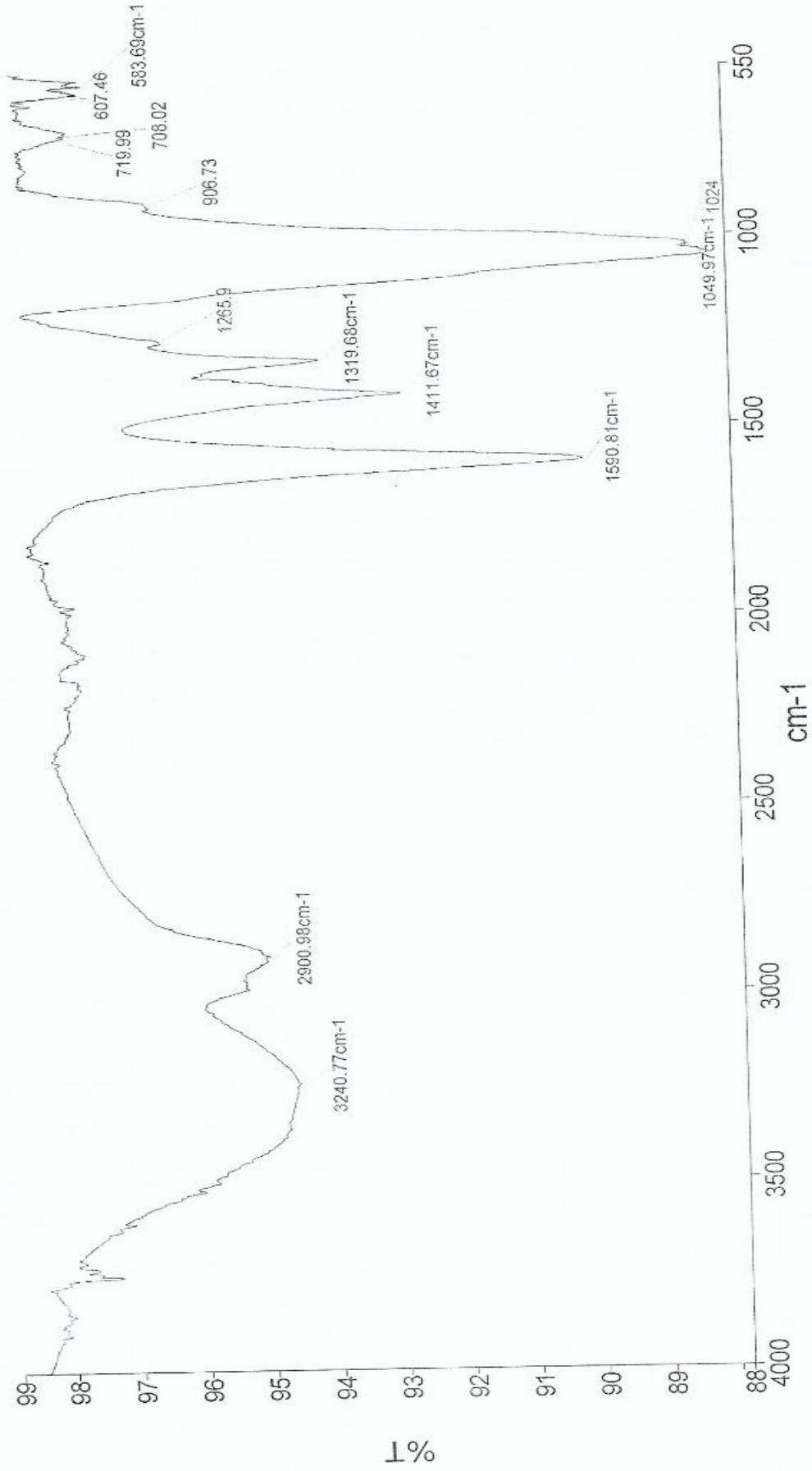
PerkinElmer Spectrum Version: 10.03.06

Friday, November 22, 2019 3:28 PM

PEService

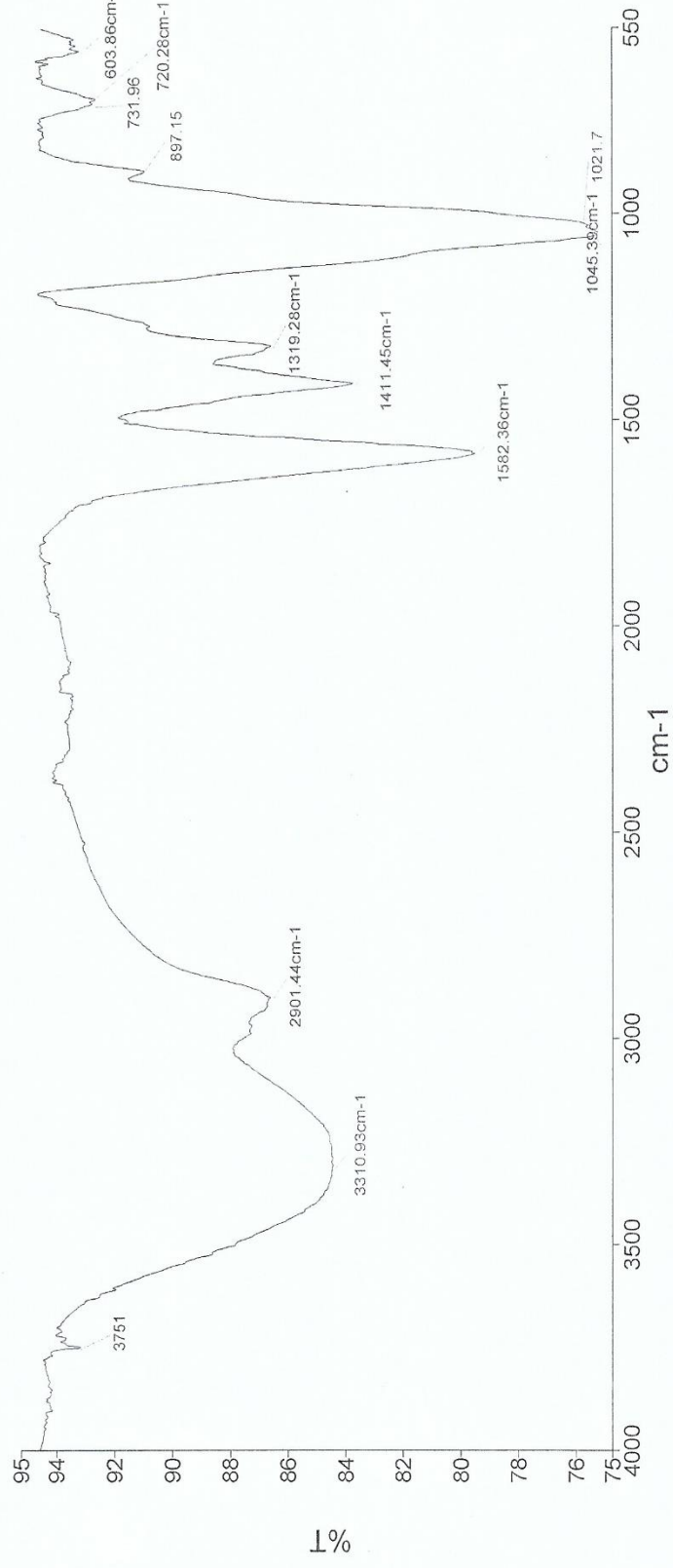
Friday, November 22, 2019 3:28 PM

Analyst  
Date



Ek Şekil 1.1. Saf CMC FI-TR spektrumu

Analyst  
Date  
PEService  
Friday, November 22, 2019 3:39 PM



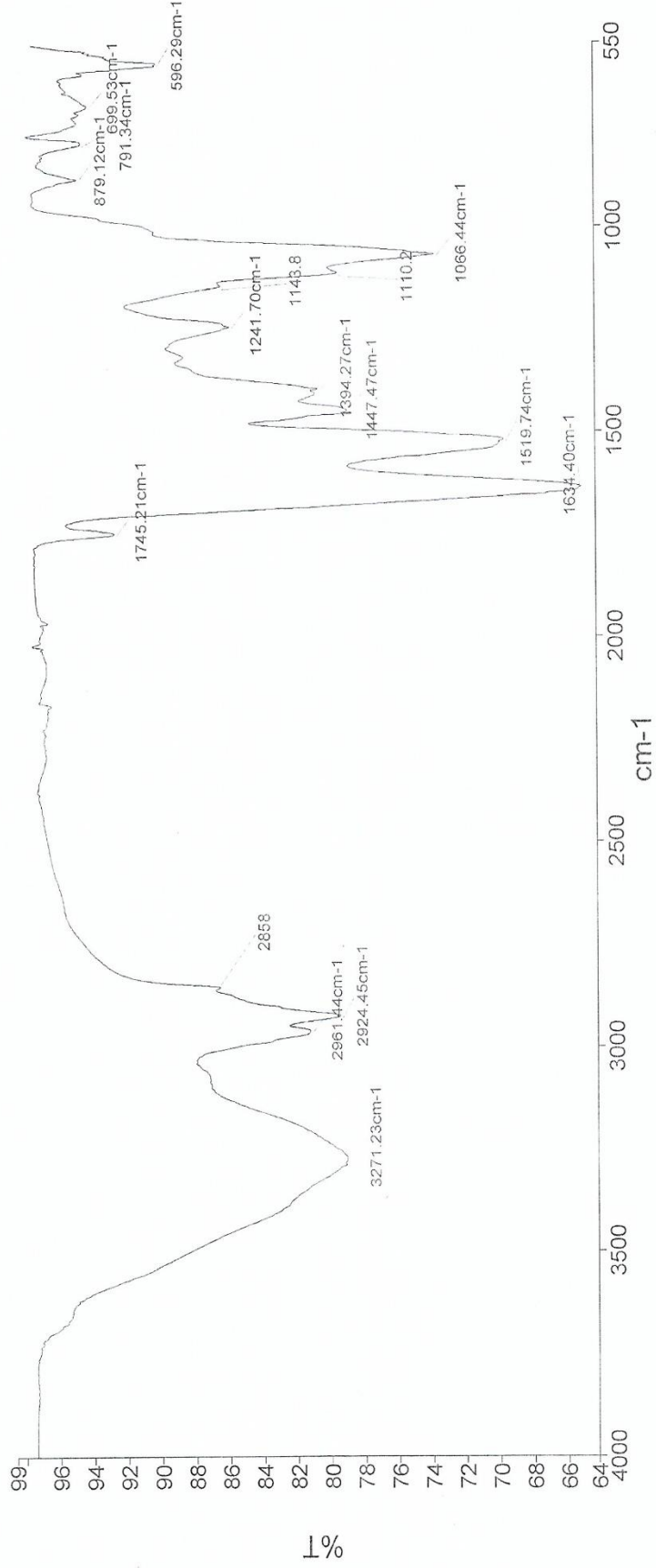
2\_1 Sample 021 By PEService Date Friday, November 22 2019

Ek Şekil 1.2. Saf Cu-CMC FT-TR spektrumu

PerkinElmer Spectrum Version 10.03.06  
Friday, December 06, 2019 4:08 PM

PEService  
Friday, December 06, 2019 4:08 PM

Analyst  
Date



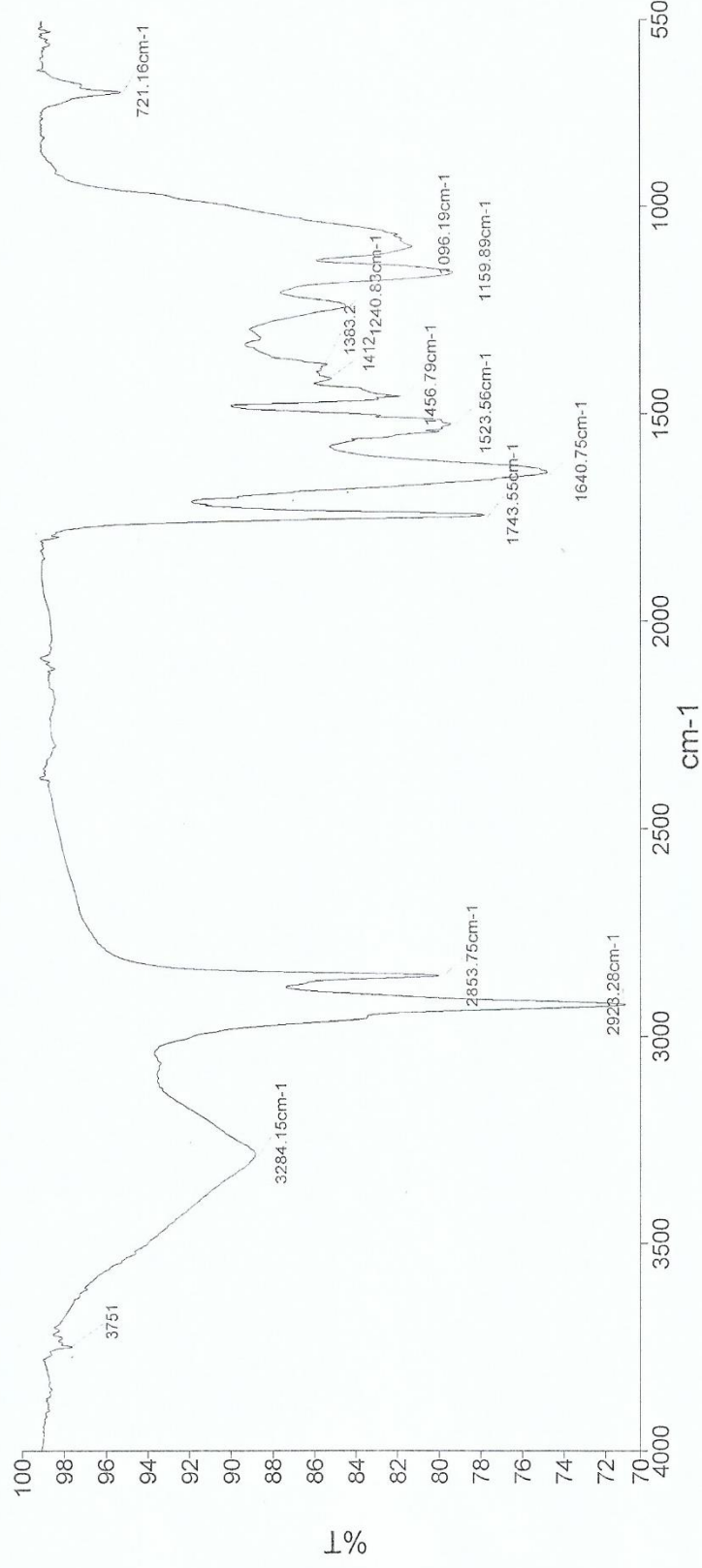
14\_1 Sample 060 By PEsService Date Friday, December 06 2019

Ek Şekil 1.3. Kör örnek FI-TR spektrumu

PerkinElmer Spectrum Version 10.03.06  
Friday, November 22, 2019 3:44 PM

PEService  
Friday, November 22, 2019 3:44 PM

Analyst  
Date



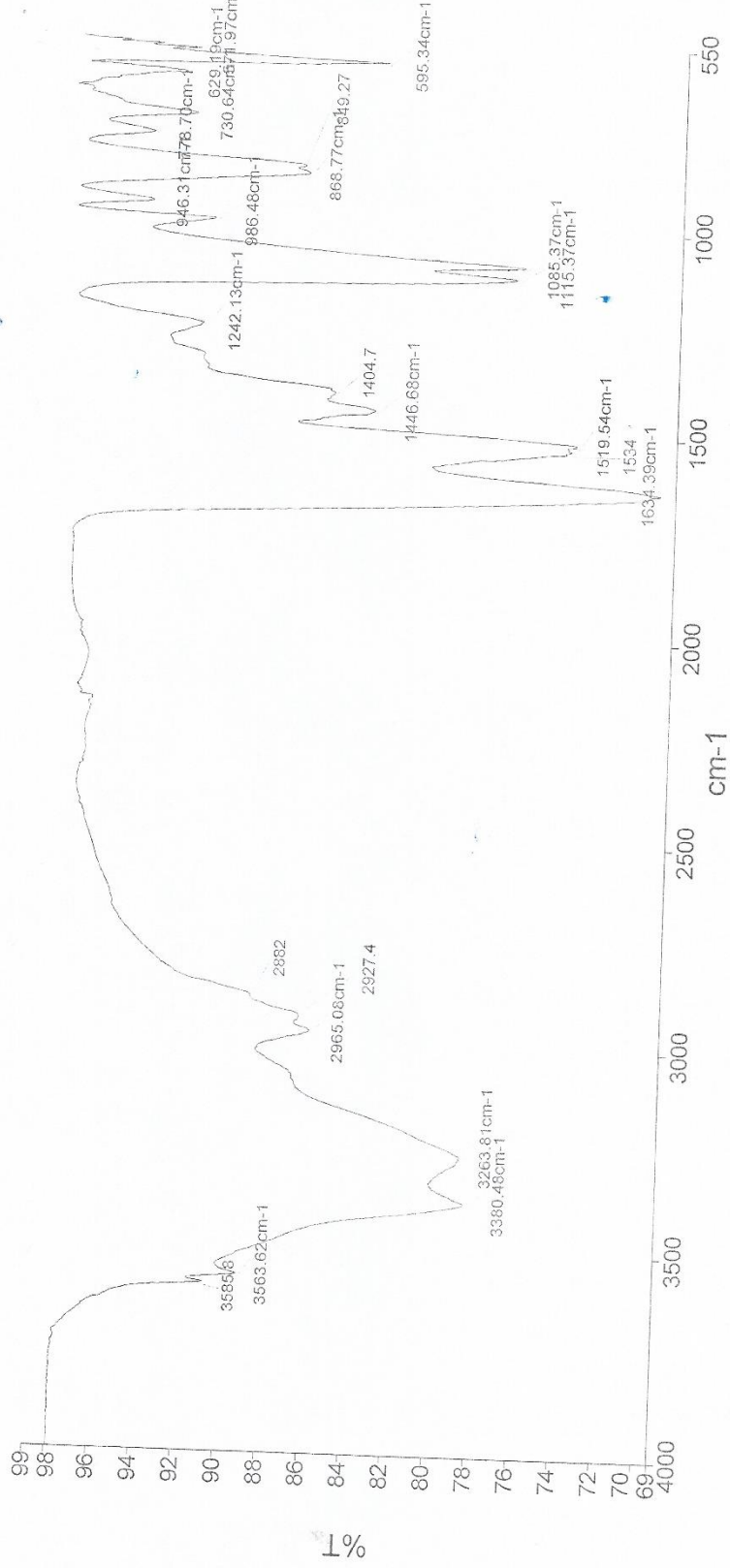
3\_1 Sample 022 By PEsService Date Friday, November 22 2019

Ek Şekil 1.4. Yoğurt Numune+ CMC FI-TR spektrumu



PerkinElmer Spectrum Version 10.03.06  
Monday, December 30, 2019 8:41 AM

PEService  
Monday, December 30, 2019 8:41 AM



5\_1 Sample 011 By PEsService Date Monday, December 30 2019

Ek Şekil 1.5. Ayran Numune+ CMC FI-TR spektrumu

## ÖZGEÇMİŞ

Gülşen ERGÜNEY, 14.09.1988 yılında Rize'nin Pazar İlçesi'nde doğdu. 2002 yılında Gürsu Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda ilköğretimini, 2006 yılında Bursa Çelebi Mehmet Lisesi'nde Lise öğrenimini tamamladı. 2006'da Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nü kazandı ve 2011 yılında mezun oldu. 2014 yılında Sivas'ın Altınyayla İlçesinde Tarım ve Orman Müdürlüğünde göreve başladı. 2014 Ağustos ayında Trabzon Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne atandı. 2018 yılında Artvin Arhavi İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü'ne tayin oldu.

17.08.2015 Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Yüksek Lisans eğitime halen devam etmektedir.

