



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SOYA UNUNDA AFLATOKSİN TAYİNİ,
METOT VALİDASYONU VE ÖLÇÜM
BELİRSİZLİĞİNİN SAPTANMASI**

HACER YELİZ OLPAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

DOÇ.DR. BAHATTİN YALÇIN

İSTANBUL, 2012



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SOYA UNUNDA AFLATOKSİN TAYİNİ,
METOT VALİDASYONU VE ÖLÇÜM
BELİRSİZLİĞİNİN SAPTANMASI**

HACER YELİZ OLPAK
(520410001)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
DOÇ.DR. BAHATTİN YALÇIN

İSTANBUL, 2012

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bana yol gösteren, araştırmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bahattin YALÇIN'a, lisans ve lisansüstü eğitimim süresince ve sonrasında da desteğini esirgemeyen, çalışma konumun seçilmesinde ve çalışmanın yönlendirilmesinde değerli katkıları olan Sayın Prof. Dr. Adnan AYDIN'a ve diğer tüm hocalarıma, çalışma hayatımın yanında mesleki gelişimim için lisansüstü eğitimime destek veren Kalite Sistem Laboratuvarları Kurucusu Sayın Nerma GÖKÇE'ye, Genel Müdürümüz Sayın Samim SANER'e, Laboratuvar Koordinatörümüz Sayın Gülce DURMAZ'a, çalışmalarımın geliştirilmesi açısından tüm ilgisini ve bilgisini esirgememiş Şefim Sayın Dr. Çelik ERGENE'ye ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma, beni yetiştiren, hayatımın her adımında destek olan babam Sayın Ferit OLPAK ve annem Sayın Zehra OLPAK'a, sabır ve manevi desteğini esirgemeyen ablalarım Sayın Selda TOKSÖZ ve Sayın Yaprak ERESEN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER	viii
KISALTMALAR	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı	2
1.2. Soya Fasulyesi ve Özellikleri	3
1.2.1. Soya Üretim Durumu	5
1.2.1.1. Dünya Üretimi	5
1.2.1.2. Türkiye Üretimi	7
1.2.2. Soya Unu	8
1.2.2.1. Enzim Aktif Soya Unu	8
1.2.2.2. Yağsız Beyaz Soya Unu	9
1.3. Mikotoksinler ve Aflatoksinler	9
1.3.1. Aflatoksinlerin Oluşumu ve Toksik Etkisi	10
1.3.2. Aflatoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	11
1.3.3. Kromatografi İle Gıda Ürünlerinde Aflatoksin Tayini	15
1.3.4. Metot Performans Kriterleri	17
1.3.5. Daha Önce Yapılmış Soya ve Aflatoksin Tayinine Dair Çalışmalar	18
1.4. Validasyon	20
1.4.1. Validasyon Seviyesi	21
1.4.2. Metot Validasyon Parametreleri	21
1.4.2.1. Seçicilik	21
1.4.2.2. Seçimlilik	22
1.4.2.3. Minimum Tayin Limiti (LOD)	22

1.4.2.4. Minimum Ölçüm Limiti (LOQ)	23
1.4.2.5. Ölçüm Aralığı/Doğrusallık	23
1.4.2.6. Doğruluk	24
1.4.2.7. Stabilite/ Sağlamlık	27
1.4.3. Validasyon Araçları	27
1.4.4. Metot Validasyon Parametrelerinin Seçimi	28
1.4.5. Validasyon Deney Deseninin Oluşturulması	30
1.4.5.1. Validasyon Çalışması Yapılacak Matriksin Seçimi	30
1.4.5.2. Validasyon Çalışma Seviyelerinin Belirlenmesi	30
1.5. Ölçüm Belirsizliği	30
1.5.1. Belirsizlik Kaynakları	31
1.5.2. Belirsizlik Bileşenleri	31
1.5.3. Hata ve Belirsizlik	32
1.5.4. Ölçüm Belirsizliği Tayin Süreci	32
1.5.4.1. Ölçüleni Belirleme	32
1.5.4.2. Belirsizlik Kaynaklarının Belirlenmesi	33
1.5.4.3. Belirsizlik Bileşenlerini Ölçmek	33
1.5.4.4. Birleşik Belirsizliğin Hesaplanması	34
2. MATERYAL VE YÖNTEM	39
2.1. Materyal	39
2.2. Geri Kazanımda Kullanılacak Aflatoksin B ₁ , B ₂ , G ₁ ve G ₂ Standartlarının Hazırlanması ve Kontrolü	39
2.2.1. Gerekenler	39
2.2.1.1. Reaktifler	39
2.2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	39
2.2.1.3. Cihaz Kalibrasyonunda Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanışı	40
2.2.1.4. Cihaz Kalibrasyonunun Yapılışı	40
2.2.1.5. Aflatoksin Standartlarının Hazırlanışı	41
2.3. Çalışılacak Metodun Belirlenmesi	41
2.4. Metot	42
2.4.1. Gerekenler	42

2.4.1.1. Reaktifler	42
2.4.1.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	43
2.4.2. Cihaz Çalışma Şartları	43
2.4.3. Standartların Hazırlanması	44
2.4.4. Deneyin Yapılışı	45
2.4.5. Hesaplama	46
2.5. Metot Validasyonu	46
2.5.1. Minimum Tayin Limiti (LOD)/ Minimum Ölçüm Limiti (LOQ)	47
2.5.2. Lineer Ölçüm Aralığı	47
2.5.3. Geri Kazanım	47
2.5.4. Kesinlik	48
2.5.4.1. Tekrarlanabilirlik	48
2.5.4.2. Tekrarüretilebilirlik	49
2.6. Ölçüm Belirsizliği	50
2.6.1. Numune Hazırlamadan Gelen Belirsizlik	50
2.6.2. Cihaz Belirsizliği	50
2.6.3. Kesinlikten Gelen Belirsizlik	51
2.6.3.1. Tekrarlanabilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması	51
2.6.3.2. Tekrarüretilebilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması	51
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
3.1. Aflatoksin Standart Konsantrasyonları	53
3.2. Metot Validasyonu	53
3.2.1. Minimum Tayin/ Minimum Ölçüm Limiti (LOD/LOQ) Değerleri	53
3.2.2. Geri Kazanım	54
3.2.3. Tekrarlanabilirlik Limiti	54
3.2.4. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	54
3.2.5. Tekrarüretilebilirlik Limiti	58
3.2.6. Tekrarüretilebilirlik Çalışmaları	58
3.3. Ölçüm Belirsizliği	61
3.3.1. Numune Hazırlamadan Gelen Belirsizlik	61
3.3.2. Cihaz Belirsizliği	62
3.3.2.1. Aflatoksin B ₁ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği	63

3.3.2.2. Aflatoksin G ₂ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği	64
3.3.2.3. Aflatoksin G ₁ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği	64
3.3.2.4. Aflatoksin B ₂ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği	65
3.3.3. Kesinlikten Gelen Belirsizlik	65
3.3.3.1. Tekrarlanabilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması	65
3.3.3.2. Tekrarüretilebilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması	66
3.3.4. Birleşik Belirsizliğin Hesaplanması	67
3.3.5. Genişletilmiş Belirsizliğin Hesaplanması	68
3.4. Tartışma	69
4. SONUÇLAR	71
KAYNAKLAR	73
EKLER	77
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

SOYA UNUNDA AFLATOKSİN TAYİNİ, METOT VALİDASYONU VE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN SAPTANMASI

Soya bitkisi, tanesindeki ortalama %18-20 yağ, %40 protein, %30 karbonhidrat, %5 mineral madde ve çok sayıdaki vitamin ile protein yapısında zengin ve değerli amino asitler bulundurması sebebiyle canlıların beslenmesinde son derece önemlidir. Soyanın en önemli özelliği, diğer bitki ve hayvan yem kaynaklarına göre, birim alandan daha fazla ve ucuz protein sağlamasıdır.

Bu çalışmada amacımız, soya ununda aflatoksin analizi için bir metot önermek, metodu geçerli kılmak ve ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasıdır.

Kullanılan metotta aflatoksinler önerilen çözücüde çözülüp, immuno affinite kolonda tutularak HPLC cihazına enjekte edilmiştir. HPLC kolonunda kobra cell ile kolon sonrası elektrokimyasal olarak bromlandırılıp floresans dedektörle saptanarak analizleri yapılmıştır.

Soya unu için verilmiş yasal limitler, aflatoksin B₁ için 5 ppb ve toplam aflatoksin için 10 ppb'dir. Validasyon çalışmaları için; bu limitlere uygun olarak soya ununa 0,3 ppb, 2,5 ppb, 5 ppb ve 7,5 ppb seviyelerinde aflatoksin G₂, G₁, B₂, B₁ karışımı ilave edilmiştir. Çalışmalar sonucunda 2,5 ppb, 5 ppb ve 7,5 ppb seviyelerindeki geri kazanımların %70-110 aralığında ve 0,3 ppb seviyesinde ise %50-120 aralığında olduğu görülmüştür.

Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik için relatif standart sapma aralığının; aflatoksin B₁ için %2,2-4,8 ve %4,6-6; toplam aflatoksin için %1,9-4,1 ve %2,6-5,6 olduğu belirlenmiştir. Genişletilmiş belirsizlik ise aflatoksin B₁ için 0,172 ve toplam aflatoksin için 0,182 olarak saptanmıştır.

Çalışma sonucunda önerilen çözücü karışımında aflatoksin matriksten ekstrakte edilmiş ve yasal limitler içinde geri kazanımları başarılmıştır. Bu metot ile kısa sürede analiz yapılabilmiş ve aynı zamanda daha az toksik kimyasallar kullanılmıştır.

Aralık, 2012

Hacer Yeliz, OLPAK

ABSTRACT

DETERMINATION OF AFLATOXINS IN SOYBEAN FLOUR, METHOD VALIDATION AND DETERMINATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY

Soybean plant is extremely important because of the average content of %18-20 fat, %40 protein, %30 carbohydrate, %5 mineral matter, a large number of vitamins and amino acids which are in protein structure. The most important feature of soybean according to other plants and animal feed sources is to provide per unit area much more and cheap protein.

Our aim is to propose a method for the analysis of soybean aflatoxins, validate the proposed method and to determine measurement uncertainty.

Aflatoxins are dissolved in proposed solvent mixture, and the method is based on immunaffinity column cleanup with liquid chromatography using post column bromination for determination of aflatoxins in soybean flour.

In soybean flour, legal limits for aflatoxin B₁ is 5 ppb and for total aflatoxin is 10 ppb. In accordance with these limits soybean flour is spiked, with an aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁ mixture, concentration levels of 0,3 ppb, 2,5 ppb, 5 ppb and 7,5 ppb for validation studies. In this study we found that the recoveries were %70-110 for spiked levels of 2,5, 5 and 7,5ppb; and %50-120 for the spiked level of 0,3ppb.

The relative standard deviation, for repeatability and for reproducibility is; for aflatoxin B₁ %2,2-4,8 and %4,6-6, for total aflatoxin %1,9-4,1 and %2,6-5,6. This method's expanded uncertainty is found that; for aflatoxin B₁ 0,172 and for total aflatoxin 0,182.

As a result of this research aflatoxins extracted from the matrix in the proposed solvent mixture and the recoveries achieved within the legal limits. Analysis have been done in shorter time and also less toxic chemicals have been used.

December, 2012

Hacer Yeliz, OLPAK

SEMBOLLER

A	: Absorbans
B1	: Eğim
c	: Farklı Kalibrasyon Standartlarının Ortalaması ($\mu\text{g/mL}$)
c₀	: Tayin Edilen Çözelti Derişimi ($\mu\text{g/mL}$)
CF	: Düzeltme Faktörü
c_i	: Kalibrasyon Eğrisinden Hesaplanan Ölçüm Sonucu ($\mu\text{g/mL}$)
CV_r	: Tekrarlanabilirlik Standart Belirsizliğı
CV_R	: Tekrarüretilebilirlik Standart Belirsizliğı
k	: Kapsam Faktörü
n	: Yapılan Ölçüm Sayısı
p	: Örnek Ölçümü İçin Tekrar Sayısı
r	: Tekrarlanabilirlik Limiti
R	: Tekrarüretilebilirlik Limiti
Rf	: Kağıt ve ince tabaka kromatografisinde mevcut bileşen için yürüme sabiti (cm)
RSD	: Relatif Standart Sapma
RSD_r	: Tekrarlanabilirlik Relatif Standart Sapması
RSD_R	: Tekrarüretilebilirlik Relatif Standart Sapması
s	: Standart Sapma
s_{bl}	: Kör Örnek Ölçümlerinin Standart Sapması
s_r	: Tekrarlanabilirlik Standart Sapması
s_R	: Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması
Sxx	: Konsantrasyonlar arasındaki sapmaların toplamı
t_{0min}	: Başlangıç zamanı (dakika)
t_{xmin}	: x zamanı (dakika)
U	: Genişletilmiş Belirsizlik
u_c	: Birleşik Standart Belirsizlik
x	: Ölçüm Sonuçlarının Ortalaması ($\mu\text{g/mL}$)
x_{bl}	: Kör Örnek Ortalaması ($\mu\text{g/mL}$)
x_i	: İlk Ölçüm Sonucu ($\mu\text{g/mL}$)

- x_{ii} : İkinci Ölçüm Sonucu ($\mu\text{g/mL}$)
 ϵ : Molar Absorptivite (L/mol.cm)
 λ : Dalga Boyu (cm^{-1})

KISALTMALAR

CRM	: Certificated Referance Material
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GK	: Geri Kazanım
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
LD₅₀	: Letal Dose (%50)
LOD	: Limit Of Detection
LOQ	: Limit Of Quantification
MA	: Molekül Ağırlığı
NMKL	: Nordisk Metodikkomite for Livsmedel - Nordic Committee on Food Analysis (EAIO)
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDI	: Protein Dispersibility Index
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SOP	: Standard Operating Procedure
SPME	: Solid Phase Microextraction
Spp.	: Species
Std.	: Standart
TFA	: Trifloro Asetik Asit
TLC	: Thin Layer Chromatography
UV	: Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1.1. Bazı Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları	12
Şekil 1.2. Aflatoksin K�r �rnek Kromatogramı	22
Şekil 1.3. Doğruluk ve Kesinlik	25
Şekil 1.4. Validasyon �eşidinin Belirlenmesi	29
Şekil 1.5. Balık Kılçığı �rneği	33
Şekil 1.6. Ölüm Belirsizliği Hesaplanması Aşamaları	37
Şekil 2.1. Aflatoksin Standartları Kromatogramı	45
Şekil 2.2. Kimyasal Akış Diyagramı	46
Şekil 2.3. Aflatoksin İlave Edilmiş Soya Unu Kromatogramı	48
Şekil 3.1. Aflatoksin B ₁ Kalibrasyon Eğrisi	63
Şekil 3.2. Aflatoksin G ₂ Kalibrasyon Eğrisi	64
Şekil 3.3. Aflatoksin G ₁ Kalibrasyon Eğrisi	64
Şekil 3.4. Aflatoksin B ₂ Kalibrasyon Eğrisi	65

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 1.1. 100 Gram Soya Fasulyesinde Bulunan Besin Değeri ile Özel Mineral ve Vitaminler	5
Tablo 1.2. Dünya Soya Ekim Alanı, Üretim ve Verim Durumu	6
Tablo 1.3. Önemli Üretici Ülkelerin Soya Üretimi (Bin Ton)	7
Tablo 1.4. Türkiye Soya Ekim Alanı, Üretim ve Verim Durumu	8
Tablo 1.5. Türkiye İçin Aflatoksin Limitleri	14
Tablo 1.6. Aflatoksin İçin Performans Kriterleri	17
Tablo 1.7. Rastgele ve Sistematik Hata Karşılaştırılması	24
Tablo 2.1. Standartların Hazırlanış Şekli	44
Tablo 2.2. Kalibrasyon Standartları ve Konsantrasyonları	47
Tablo 3.1. Tartım Belirsizliği	61
Tablo 3.2. Hacim Belirsizliği	61
Tablo 3.3. Standart Hazırlamadan Gelen Belirsizlik	62
Tablo 3.4. Birleşik Belirsizliğin Hesaplanması	67
Tablo 3.5. Kullanılacak Birleşik Belirsizlik Miktarı	68

1. GİRİŞ

Mikotoksinler, küflerin gelişimi sırasında normal metabolizması için önemli bir role sahip olmayan, ancak insan ve hayvanlarda kanserojen, mutajen, teratojen ve östrojenik etkiler gibi akut veya kronik etkilere neden olabilen ikincil toksik metabolitlerdir. Mikotoksinlerin neden olduğu hastalığa ise mikotoksikozis denilmektedir [1] .

Aflatoksinler *Aspergillus* cinsine ait küf türleri tarafından üretilen toksik sekonder metabolitlerdir ve “kuvetli hepatotoksik ve karsinojen” maddeler olarak tanımlanmaktadır. Bilinen mikotoksinler içinde en fazla toksik etkiye sahiptir ve birbirine yakın bileşimde 18 kadar mikotoksine verilen genel isimdir [2] .

Kromotografik çalışmalar sonucunda bu toksin hayvan yeminden saf olarak elde edilmiş ve bu maddenin renksiz ve kristalleşme özelliğinde olduğu, UV ışığında tutulduğunda parlak renk verdiği saptanmıştır [3] .

Aflatoksinlerin en önemli formu B₁, G₁, B₂ ve G₂ olup gıdalarda en çok bu aflatoksinler aranmaktadır. Aflatoksin içeren yemlerle beslenen süt sığırlarında aflatoksinler M₁ ve M₂ şeklinde iki farklı yapıya dönüşürler [4] . Aflatoksin M₁ ; B₁’den daha küçük Rf’e sahiptir ve UV altında mavi-menekşe renk veren bu toksine süt toksini adı verilmiştir [5,6] .

Aflatoksin sorunu insan sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmasının yanı sıra, birçok ülke için ekonomik yönden de önem taşımaktadır. Aflatoksinle kontamine olan gıdaları ihraç etmek mümkün olmamakta ve çoğu kez ürün imha edilmek zorunda kalınmakta veya denetim mekanizması yetersiz ülkelerde iç pazarda tüketime sunulmaktadır [7] .

Aflatoksin kontaminasyonu tarımsal üretim sırasında kötü koşullarda başlamakta ve ürünün hatalı veya yetersiz kurutulması ile önemli ölçüde artmaktadır. Bunun dışında nemli ürünün depolanması veya ürünün depoda nemlenmesi ile de aflatoksin oluşumu başlayabileceği gibi, imalat sırasında ürünün nemlenmesi ve bir süre bu şekilde bekletilmesi de aflatoksin oluşumuna neden olmaktadır. Tahıl (pirinç, soya fasulyesi, yer fıstığı, ayçiçeği), baharat (kırmızı biber, karabiber, kişniş, zerdeçal, zencefil) ve kuruyemiş (badem, Antep fıstığı, ceviz, Hindistan cevizi, Brezilya cevizi) sıklıkla etkilenen besin maddeleridir [7] .

Soya fasulyesi son derece besleyici olması, çok çeşitli kullanım alanı ve özelliklerinin bulunması gibi avantajları ile günümüz tarımında giderek önemi artan bir bitkidir. Soya fasulyesinin kavrulup öğütülmesiyle elde edilen soya unu, yüksek nitelikli protein açısından zengin olmakla birlikte; mükemmel bir demir, kalsiyum ve B vitaminleri kaynağıdır [8] .

1.1. Tezin Amacı

Soya fasulyesinin ürünlerinden olan soya ununda da aflatoksin bulunmaktadır. Soya içerisindeki mevcut aflatoksinin tayini için varolan metotlar çoğunlukla ince tabaka kromatografisine (TLC) dayalıdır. Günümüzde gıda maddelerinde yapılacak analizlerde kullanım kolaylığı ve analiz hızı açısından ince tabaka kromatografisi yerine yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanımına dayalı metotlar tercih edilmektedir.

Bu doğrultuda yapacağımız çalışmada amacımız HPLC kullanımına dayalı bir metot ile soya ununda aflatoksin tayinini gerçekleştirmektir. Çalışmalarda aflatoksin standartı örneklere ilave edilerek geri kazanım çalışmaları yapılacaktır. Çalışmada kullanılan aflatoksin standartlarının spektrofotometrede AOAC'de belirtilen şekilde değerlendirilmeleri yapılarak konsantrasyonları belirlenecektir. Metodun geçerliliği Türk Gıda Kodeksi'nde "Gıdalardaki mikotoksin limitlerinin resmi kontrolü için numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri (2011/32) tebliği"nde belirtilen aflatoksin için performans kriterleri göz önünde bulundurularak yapılacaktır [9] .

Çalışma süresince kullanılacak her cam malzeme A sınıfı olup, her cihazın kalibrasyonu belirlenen periyotlarla yapılacaktır. Çalışmalarının yapıldığı HPLC'nin performansı her tayin öncesinde hazırlanan aflatoksin standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisi ile kontrol edilecektir.

Soya ununda yapılacak geri kazanım seviyelerinin seçilmesi Türk Gıda Kodeksi'nde Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirtilmiş olan maksimum aflatoksin limitleri göz önüne alınarak gerçekleştirilecektir. Metodun minimum tayin ve minimum ölçüm limitini belirlemek için yapılacak geri kazanım seviyesi dışında, kodekste belirtilen limit seviyesinin 0.5, 1 ve 1.5 katı miktarlarında olmak üzere 3 seviyede geri kazanım

çalışmaları yapılarak metodun validasyonu gerçekleştirilecek ve ölçüm belirsizliği saptanacaktır.

1.2. Soya Fasulyesi ve Özellikleri

Soya fasulyesi binlerce yıldır Asya ülkelerinin en değerli besin kaynağı olmuştur. Besin değeri, mineraller ve vitaminler açısından oldukça zengin bir bitki olan soyanın gerek insan sağlığına bilimsel olarak kanıtlanmış yararları gerekse 400'den fazla endüstriyel ürün yapımında kullanılması soyayı tarımsal ürünler arasında önemli bir yere getirmektedir [10].

Soya fasulyesinin genetik orijin merkezi Çin ve Mançurya'dır. 11. ve 17. yüzyılda Çin'in doğusunda gıda ürünü olarak yetiştirilmeye başlanan soya bitkisi, zamanla Japonya, Vietnam, Filipinler, Tayland, Malezya, Nepal ve Hindistan'a yayılmıştır. 17. yüzyılın başında Avrupa'ya getirilen soya, iklim ve toprak koşullarının yeterli olmaması sebebiyle verimli olarak yetiştirilememiştir [10] .

Amerika Birleşik Devletleri sınırlarında soya ilk kez 1804'de Orta ve Batı Amerika'da yetiştirilmeye başlanmıştır. Soya tarımı, çeşitlerin ve tarımda makineleşmenin artmasıyla zenginleşmiş, soya sanayinin kurulmasıyla zamanla yaygınlaşmış ve ülke genelindeki 26 eyalete yayılmıştır. Amerika'daki soya fasulyesi yetiştiriciliği daha çok Meksika Kanalı'ndaki büyük limanlara yapılacak nakliyatı kolaylaştırmak amacı ile Mississippi Nehri etrafındaki eyaletlerde gelişmiştir. ABD'de soyanın önem kazanmasının başlıca nedeni 20. yüzyılda ikinci dünya savaşı sonrasında protein ve yağ teminindeki yetersizlikler nedeniyle besin değeri yüksek bu insan gıdasına ihtiyaç duyulmasıdır. Günümüzde soya tarımı en çok ABD'de gelişmiş olup soya fasulyesi dünyada en çok yetiştirilen ürünlerden biridir [10] .

Soya fasulyesi, besin değeri ile içerdiği mineral ve vitaminler açısından oldukça zengindir. İçeriğinde yüksek miktardaki protein yanında lif, kalsiyum ve magnezyum bolca bulunmaktadır. Tohumlarında %18-24 yağ, %35-45 protein, %30 karbonhidrat ve %5 oranında da mineral, çok sayıda vitamin ve değerli aminoasitler içeren ve toprağa organik madde ile azot sağlayan bir bitki olan soya fasulyesi baklagiller içinde yer alan bitki türü olmasına rağmen, bünyesinde yağ oluşu sebebiyle sınıflandırmada yağlı tohumlu bitkiler arasında yer almaktadır [10] .

Kolestrol içermeyen yapısı, yüksek kaliteli protein içeriği ve baklagiller içinde en kolay sindirilen ürün olma özelliği ile soya fasulyesi çok çeşitli kullanım alanları bulunan bitkisel bir gıda maddesidir. Soya taneleri çimlendirilip filizleri sebze olarak yenebileceği gibi, işlenerek soya yağı ve unu elde edilir. Soya dünyada bitkisel yağların ve yüksek proteinli hayvan yemlerinin başlıca kaynağıdır [10] .

Soya köklerinde toprağın serbest azotunu bağlayabilen *Rhizobium japonicum* bulunması sebebiyle hem kendi besin ihtiyacını karşılamakta hem de toprağı bir sonraki ürün ekimi için hazır hale getirerek tarımsal açıdan büyük fayda sağlamaktadır. Çevre kirliliğinin arttığı günümüzde önemi daha da artan soya toprak yapısını iyileştirmektedir [10] .

Soya fasulyesi ve soya fasulyesine dayalı ürünler insan beslenmesi ve sağlığı açısından oldukça önemlidir. Özellikle soya fasulyesi üretiminde dünya lideri olan Amerika Birleşik Devletleri ve gelişmiş ülkelerde soya fasulyesinden elde edilen süt, yoğurt, peynir, kemiksiz et, dondurma, dondurma külahı, pasta, kahve, salça, yağ, margarin, alkol, soya unu, ekmek, makarna, çocuk maması, hayvan yemi, yeşil gübre, plastik maddeler vb. ürünler bu bitkinin ne kadar önemli ve ne kadar çeşitli alanlarda kullanılabildiğinin en açık göstergesidir. Ayrıca, içerdiği yüksek protein oranı nedeniyle ete benzer ve yerine geçen ürünlerin yapımında kullanılan soya fasulyesinden elde edilen 453 gramlık soya ununda 31 yumurtanın, 6 büyük şişe sütün ve 900 gramlık kemiksiz etin ihtiva ettiği kadar protein bulunduğu laboratuvar deneyleriyle ispat edilmiştir. Bununla birlikte soya fasulyesi ve türev ürünlerin kolesterolü düşürdüğü, meme ve prostat kanserine karşı koruyucu etkisinin olduğu, kemik sağlığına iyi geldiği, hafızaya olumlu etkide bulunduğu, kadınlarda menopoz sırasında hormonal denge açısından olumlu etki yaptığı, şeker hastalığı ve böbrek rahatsızlığına da iyi geldiği bilinmektedir [8] .

İnsan beslenmesindeki öneminin yanı sıra hayvan beslemesinde de yüksek yağ ve protein içeriği ve kolay sindirilebilirliği nedeniyle büyükbaş, kanatlı ve su ürünlerinde rasyonlarda en çok tercih edilen yem hammaddesidir. Tam yağlı soya, dengeli amino asit yapısı, enerji, temel yağ asitleri, vitamin ve mineral içeriği ile hayvan beslemede devrim sayılabilecek ölçüde en iyi besi kombinasyonlarını beraberinde getirmektedir. Ülkemiz gibi hayvansal ürünler üretiminde kendine yeterlilik anlamında sıkıntılar

yaşayan ülkeler için tüm besi türlerinde vazgeçilmez olan soya fasulyesi bu sorunun çözümünde çok etkili bir alternatif olabilir [8] .

Tablo 1.1. 100 gram Soya Fasulyesinde Bulunan Besin Değeri ile Özel Mineral ve Vitaminler

Su	8,59 gr
Enerji (kcal)	416 kcal
Protein	36,5 gr
Toplam yağ	19,9 gr
Doymuş yağ asitleri	2,9 gr
Mono-doymamış yağ asitleri	4,4 gr
Poli-doymamış yağ asitleri	11,3 gr
Karbonhidrat	30,2 gr
Lif	9,3 gr
Kül	4,9 gr
İzoflavonlar	200 mg
Kalsiyum	277 mg
Demir	15,7 mg
Magnezyum	280 mg
Fosfor	704 mg
Potasyum	1797 mg
Sodyum	2,0 mg
Çinko	4,9 mg
Bakır	1,7 mg
Manganez	2,52 mg
Selenyum	17,8 µg
C Vitamini (askorbik asit)	6,0 mg
Thiamin (B1 Vitamini)	0,874 mg
Riboflavin (B2 Vitamini)	0,87 mg
Niacin (B3 Vitamini)	1,62 mg
Pantothenic asit (B5 Vitamini)	0,79 mg
B6 Vitamini	0,38 mg
Folikasit	375 µg
A Vitamini	2,0 µg
E Vitamini	1,95 mg

Kaynak : USDA Nutrient Database for Standart Reference

1.2.1. Soya Üretim Durumu

1.2.1.1. Dünya Üretimi

1940'da II. Dünya Savaşı sırasında 10 milyon metrik ton olan soya üretimi, 1980'de 81 milyon ton, 1990'da 110 milyon tona ulaşmıştır. 2000 yılında dünya genelinde yaklaşık olarak 160 milyon ton olan soya üretim miktarı 2008 yılında %44 oranında artarak 230 milyon tona ulaşmıştır [10] .

Tablo 1.2. Dünya Soya Ekim Alanı, Üretim Ve Verim Durumu

Yıllar	Ekim Alanı	Üretim	Verim
	(Milyon Hektar)	(Milyon Hektar)	(Ton/Ha)
1961	23,82	26,88	1,13
1970	29,53	43,7	1,48
1980	50,65	81,04	1,6
1990	57,19	108,46	1,9
2000	74,37	161,29	2,17
2001	76,8	178,24	2,32
2002	78,96	181,68	2,3
2003	83,66	190,68	2,28
2004	91,6	205,53	2,24
2005	92,51	214,46	2,32
2006	95,25	221,89	2,33
2007	90,08	219,58	2,44
2008	96,18	230,58	2,4
2009	98,83	222,27	2,25

Soyanın kullanım alanlarının genişlemesi, insan beslenmesindeki önemi ve azalan enerji kaynaklarına alternatif olabilecek biyodizel üretiminin artırılması ile birlikte dünya soya ekim alanları ve üretim miktarları artmıştır [10] .

Dünyada soya üretim miktarlarındaki artış, ekim alanı artışından daha fazla gerçekleşmekte olup, Dünya Tarım Örgütünün verilerine göre, 2009 yılında yaklaşık 100 milyon hektar alanda soya fasulyesi ekimi gerçekleştirilmekte olup, dünya soya üretimi yaklaşık 220 milyon ton seviyelerindedir [10] .

Dünyada soya üretimi bir kaç ülkenin tekelindedir. Dünya soya üretiminin yaklaşık %90'nı ABD, Brezilya, Arjantin ve Çin tarafından gerçekleştirilmektedir. Soyanın anavatanı Uzakdoğu ülkeleri olmasına karşın, ABD ve Latin Amerika ülkelerindeki üretim bu ülkelere oldukça fazladır [10] .

Tablo 1.3. Önemli Üretici Ülkelerin Soya Üretimi (Bin Ton)

ÜLKE ADI	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
ABD	85013	83504	86998	72857	80748	91417	91854
Brezilya	49549	51182	52464	57857	59242	56960	67500
Arjantin	31576	38290	40537	47483	46238	30993	52000
Çin	17404	16350	15500	12725	15545	14500	14400
Hindistan	6876	8273	8857	10968	9905	10217	9600
Paraguay	3583	3988	3800	6000	6311	3855	6500
Kanada	3043	3156	3465	2696	3336	3504	4345
AB	2479	3064	3610	2583	2742	3353	
Bolivya	1586	1693	1619	1596	1260	1500	
TOPLAM	205530	214462	221897	219583	230581	222268	257777

ABD'nin 2010/2011 döneminde gerçekleşen 95 milyon metrik tonluk üretimini 65 milyon metrik ton ile Brezilya, 50 milyon metrik ton ile Arjantin takip etmektedir. Çin ise 14 milyon metrik ton üretim hacmi ile dünyanın dördüncü en büyük soya üreticisi konumundadır [10] .

1.2.1.2. Türkiye Üretimi

Ülkemizin soya ile tanışması I. Dünya Savaşı sonrasında olmuştur. İlk zamanlar “Çorum Fasulyesi” olarak yayılmaya başlayan soyanın ekimi I. Ürün olarak Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde yaygınlaşarak, Samsun ve Ordu illerinde 1980 yılına kadar üretilmiştir. 1981 sonrasında soya fasulyesi yerini mısır, çay, tütün gibi daha yüksek gelir getiren ürünlere bırakmış olup bu bölgede soyanın ekim alanları giderek azalmıştır. Zamanla soya fasulyesi ekimi II. Ürün Projesi kapsamında Çukurova Bölgesine kaydırılmıştır. Bu projenin uygulamaya konmasından sonra soya ekim alanlarında 1988 yılına kadar istikrarlı bir artış sağlanmıştır. 1987 yılında 112.000 hektar ekim alanı ve 250.000 ton üretimle en yüksek seviyeye ulaşmıştır [10] .

Soya üretimi Türkiye’de Trakya, Marmara, Karadeniz ve Akdeniz Bölgelerinde ana ürün olarak, Ege, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinin sulanır tarım alanlarında ise ikinci ürün olarak yapılmaktadır [10] .

Tablo 1.4. Türkiye Soya Ekim Alanı, Üretim ve Verim Durumu

YILLAR	Çiftçi Sayısı	Ekim Alanı (Ha)	Üretim (Ton)	Verim (Kg/Da)
1987		112000	250000	223
2001		17000	50000	294
2002		25500	75000	294
2003	3612	27000	85000	315
2004	1689	14000	50000	357
2005	1787	8600	29000	337
2006	2546	11919	47300	397
2007	1422	8675	30666	354
2008	1864	9444	34461	365
2009	2412	10521	38442	366
2010		14775	55000	400

Ülkemiz soya üretimi açısından yeterli kapasiteye sahip olmasına rağmen, soya üretimi istenilen düzeye ulaşamamıştır. Buna sebep olan en önemli faktör, üreticinin yeterli desteği alamaması ve dolayısıyla katma değeri yüksek ürünler yerine, buğday gibi düşük maliyetli ürünlere yönelmesidir. Potansiyelimizi yeterince kullanamamızın diğer sebepleri ise soyanın üretim ve değerlendirilmesine yönelik yeterli altyapının bulunmaması ve araştırma faaliyetlerimizin yeterli düzeyde olmamasıdır [10].

1.2.2. Soya Unu

Soya fasulyesinin kavrulup öğütülmesiyle elde edilen soya unu, yüksek nitelikli protein açısından zengin olmakla birlikte mükemmel bir demir, kalsiyum ve B vitaminleri kaynağıdır. Ekmek üretiminde ve tüm unlu mamullerde kullanılan soya unu sayesinde hem ürünün maliyeti düşmekte hem de kalitesi artmaktadır [11].

1.2.2.1. Enzim Aktif Soya Unu

Soya fasulyesinin kabukları ayrıldıktan sonra hiçbir ısı işlem görmeden öğütülmüş halidir. Herhangi bir ısıya maruz kalmadığı için enzimlerin tamamı aktif haldedir. Yağı ayrılmamıştır, dolayısıyla bünyesinde %18 oranında yağ ve %36 protein içerir. Özellikle aktif halde bulunan ve ekmeğin beyazlamasını sağlayan Lipoksijenaz enzimi ve soya yağının hamurda gevrekleştirici etki yapması nedeniyle ekmeğe katkı maddeleri içerisinde kullanılabilen bir soya unu tipidir [11].

1.2.2.2. Yağsız Beyaz Soya Unu

Ekmekçilik ve unlu mamullerde en çok kullanılan soya unu çeşididir. Yağı %1 seviyesine indirilerek hafif bir ısıtma işlemi görmüştür ve protein çözülebilirlik oranı (PDI) 70 seviyesindedir. Enzim aktif soya ununa göre daha beyazdır ve %50 protein içerir. Sağlık Bakanlığı'nın açıklamasına göre Türkiye'de yıllık 44 milyar adet ekmek üretilmekte ve bunun 4 milyarı israf edilmektedir. Günlük olarak arz edilen ekmeğe %5 oranında katılacak soya unu ile hem protein ihtiyacı karşılanacak hem de soyanın bayatlamayı geciktirici özelliği sayesinde ekmek israfı önlenerek yılda milyarlarca dolar tasarruf edilmiş olacaktır [11] .

1.3. Mikotoksinler ve Aflatoksinler

Küfler genellikle üstün antibiyotik kaynakları olarak tanınmakta, insan ve hayvanlarda toksik etki gösteren metabolitler ürettikleri daha az bilinmektedir. Antibiyotikler gibi küflerin ikincil metabolizmaları sonucu sentezlenen toksik maddelere genel olarak "mikotoksin" denilmektedir. 1930 ve 1940'lı yıllarda küf kaynaklı antibiyotik olarak çalışılan birçok madde, bugün yüksek canlılara gösterdikleri toksik etkiler nedeniyle mikotoksin olarak sınıflandırılmıştır [7] .

Mikotoksinler, esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri ve birçok gıda ve yem maddesinde gelişerek toksinleri oluşturabilmeleri nedeniyle, mikotoksinler çok önemli doğal toksinler olarak kabul edilmektedir [7] .

Mikotoksinlerin üzerinde durulduğu ve dönüm noktası olarak kabul edildiği tarih 1960'lı yıllardır. O tarihe değin tarımsal ürünlerin küflenmesi sadece ekonomik yönden problem yaratırken 1960 sonrası yüksek canlılarda meydana getirdiği hastalıklar nedeniyle ilgi odağı olmuştur. *Basidiomycota* içinde yer alan şapkalı mantarların, ölümcül toksinlerin bilinmesine karşın filamentli fungusların toksinleri üzerinde fazlaca bilgi toplanmamıştır. Ancak 1960 yılında; oral alımlarla canlılarda çok kuvvetli toksik etki gösteren, aynı zamanda kanserojen özellikte, aflatoksin adında bir metabolitin keşfinden sonra mikotoksinler yoğun araştırılan bir konu olmuştur [12] .

1960 yılında İngiltere’de 100,000 hindi ve sülün palazının, ABD’de 1,000,000 yavru balığın ani ölümü şaşkınlık yaratmış, hastalığa “Turkey X hastalığı” ismi verilerek nedenleri araştırılmıştır. Daha sonra hindi palazlarının beslenmesinde kullanılan Brezilya kökenli yer fıstığı küspesinden *Aspergillus flavus* izole edilmiş ve onun metaboliti olan difuranokumarin yapının ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Araştırmalar kapsamında bu küfün geliştiği yem maddeleri tavuk, hindi ve sülün palazlarına yedirilmiş, aynı hastalık semptomları izlenmiş ve hastalık kısa sürede ölümle sonuçlanmıştır. Bu metabolite kökenini belirtmek için Aflatoksin adı verilmiştir [13] . İlginçtir ki, 1910 yılında bir araştırmacı küflenmiş Brezilya cevizinden *Aspergillus flavus*’u izole ettiği ve bu küfün toksisiteden sorumlu tuttuğu halde bunun üzerinde fazla durulmamış ve 1980 yılında yapılan bir çalışmada ilk veriler doğrulanmıştır [1] .

1.3.1. Aflatoksinlerin Oluşumu ve Toksik Etkisi

Mikotoksinler ve dolayısıyla aflatoksinler bitki gelişme döneminde meydana gelebildiği gibi, hasatta veya hasattan sonra depolama döneminde de meydana gelebilmektedir. Bunların oluşumuna nem, kuruma hızı, sıcaklık, üründeki mekanik zedelenmeler, kızışma, depo atmosferi CO₂ ve O₂ miktarı, ürünün doğal yapısı, mineraller, kimyasal uygulamalar, böcek ve diğer küflerin faaliyeti gibi birçok faktör etkilemektedir [14] .

Aspergillus flavus 6-8 °C’den 44-45 °C’ye kadar geniş bir sıcaklık aralığında gelişmesine karşılık daha dar bir sıcaklık aralığında aflatoksin (11-37 °C) oluşabilmektedir. Özellikle tarlada gelişmekte olan üründe oluşan mekanik hasarların *Aspergillus flavus* enfeksiyonuna ve bunun sonucu olarak aflatoksin oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. Depoda kızışma meydana geldiğinde üründe aflatoksin miktarı çok fazla yükselmektedir. Depo havasında CO₂’nin %60’a yükseltilmesi aflatoksin oluşumunu durdurmaktadır. Böcek zararları ve onların neden olduğu kontaminasyonlar bitkiyi zayıf düşürerek üründe aflatoksin oluşmasına neden olmaktadır. Bitkilerin *Aspergillus flavus* enfeksiyonuna karşı dirençlerinin farklılığı üründe oluşabilecek aflatoksin düzeyini etkileyebilmektedir. Benzer şekilde enfeksiyon yapan her *Aspergillus flavus* türü de aynı miktarda aflatoksin meydana getirmemektedir [14] .

Bulaşık yem ve besinlerle alınan aflatoksinler sindirim kanalında emilerek karaciğer ve yumuşak dokularda dağılırlar. Kısmen makromoleküllere bağlanırlar ve önemli bir bölümü de suda ve yağda çözünen metabolitlere çevrilirler. Bir defada alınan

aflatoksinlerin %85-90'ı ilk 5-24 saatte dışkı, idrar ve sütle dışarı atılır. Aflatoksin B₁ maddesinin kendisi etkisizken karaciğerde mikrozomal enzim sistemi ile epoksit türevlerine çevrilerek toksik etki kazanmaktadır. Bunun sonucunda DNA ve RNA polimeraz enzimleri hızla inhibe olurlar. RNA polimeraz sentezindeki değişiklikler sonucunda protein sentezi ciddi bir şekilde bozulur [15] .

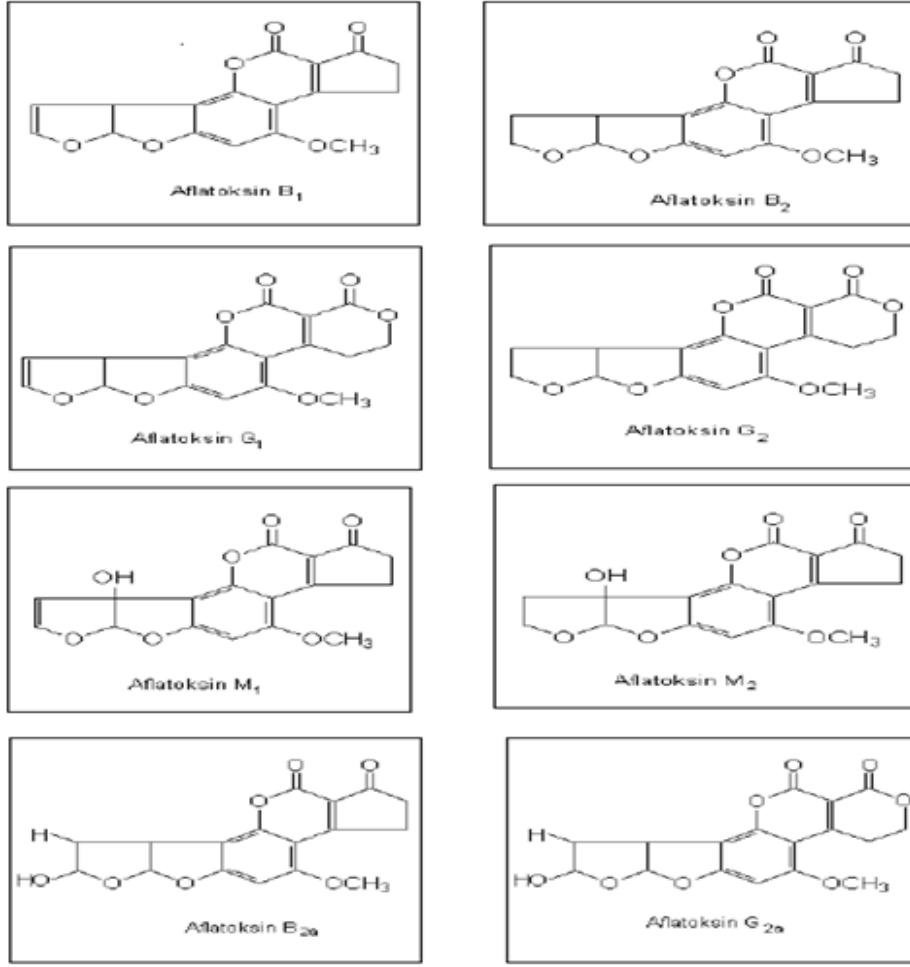
Aflatoksinlerin toksik etkileri canlının türüne, yaşına, cinsiyetine ve alınan doza göre değişiklik göstermektedir. Aflatoksinlerin mutajenik, karsinojenik, teratojenik ve diğer akut toksisite etkileri deneysel olarak, ayrıca evcil hayvanlarda gözlemlenmiştir. En çok etkili olduğu organ karaciğer olup, karaciğer hücre çekirdeğindeki DNA ve RNA sentezleme olaylarını, dolayısıyla birçok metabolik sistemleri etkilemektedir. Diğer bazı organlarda da çeşitli lezyonlara rastlanmaktadır [16] .

Betina, aflatoksinlerin içinde en yüksek akut toksisiteye sahip olanlarının aflatoksin B₁ olduğunu, bunu B₂, G₁, ve G₂'nin takip ettiğini, tek doz aflatoksin verildiğinde LD₅₀ değerinin ördek yavruları için 0.3-0.6, domuz için 0.6, alabalık için 0.8, koyun için 2, maymun için 2.2, tavşan için 5.5, piliç için 6.3 ve fare için 9 µg/kg vücut ağırlığı olduğunu, hedef organın karaciğer olduğunu, tavşanlarda 1 µg/kg'lık bir dozun bile karaciğerde tümör oluşturduğunu, aflatoksin G₁ ve B₂'nin de tümöre neden olduğunu, ancak G₂'nin tümör oluşturması ile ilgili bir bilginin bulunmadığını belirtmektedir [14] .

1.3.2. Aflatoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmıştır [17] . Aflatoksinlerin, aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B₁ ve B₂'nin mavi, aflatoksin G₁ ve G₂'nin ise yeşil floresans vermesiyle ilişkilidir [18,19] .

B toksinleri kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentanın halkası, G toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedir.



Şekil 1.1. Bazı Aflatoksinlerin Kimyasal Yapıları

Toksijenik *Aspergillus flavus* kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden aflatoksin B₁ ve daha az olarak da aflatoksin G₁ sorumludur. Bu durum her iki toksinin terminal furan halkasının 8,9 karbon pozisyonunda bir doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir [19]. Aflatoxin B₂, B₁'in; aflatoksin G₂ de G₁'in dihidro türevleridir [17] ve “in vivo” koşullarda metabolik olarak B₁ ve G₁'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler [19]. Bu dört aflatoksin dışında aflatoksin M₁ ve aflatoksin M₂ olarak isimlendirilen iki önemli aflatoksin türevi daha bulunmaktadır. M toksinleri aflatoksinli yemle beslenen laktasyon devresindeki memeli hayvanların sütlerinden ve idrarlarından izole edilmiştir. Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında mavi floresans verirler ve B toksinlerinden daha düşük R_f değerlerine sahip olmalarıyla ayrılırlar [17,18].

Aflatoksinler başta dimetilsülfoksit olmak üzere orta dereceli polar çözücülerde (örn. kloroform, metanol) kolaylıkla çözünürler. Sudaki çözünürlükleri ise azdır (yaklaşık 10-20 µg/mL) [20] . Toksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorplarlar ve aflatoksin B₁ ve B₂ için 425 nm’de, aflatoksin G₁ ve G₂ için ise 450 nm’de floresans emisyonu oluştururlar. Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde çok stabildir, ancak çok düşük veya yüksek pH’larda (3’den az ve 10’dan büyük), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler [19] .

Aflatoksinler uzun dalga boylu UV ışığına maruz kaldığında floresans veren maddelerdir. Bu çok düşük seviyelerdeki aflatoksin bileşiklerinin tayinini mümkün kılar ve aflatoksinlerin tespiti ve miktarlarının tayininde kullanılan tüm fizikokimyasal metotların temelini oluşturur [12] .

Aflatoksinler saf halde, ısıtılmış hava içerisinde ve yüksek sıcaklıklarda oldukça kararlıdır. Ancak ışığa, UV radyasyonuna, TLC plaka üzerindeyken havaya maruz kaldıklarında veya yüksek polar çözücülerde çözüldüklerinde kararsızlardır. Kloroform ve benzen çözeltileri içerisinde ise karanlıkta ve soğukta yıllarca saklanabilirler [12] .

Aflatoksinler “kaçınılmaz bulaşanlar” olarak kabul edilmektedir ve bu sebeple birçok ülkede düşük seviyelerde bulunmalarına izin verilmiştir [21] . Her ülke için belirlenen limitler farklı olmakla birlikte ülkemizdeki aflatoksin limitleri tabloda görülmektedir [22] .

Tablo 1.5. Türkiye İçin Aflatoksin Limitleri

Gıda		Maksimum Limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
2.1.	AFLATOKSİN	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
2.1.1.	Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar hariç	8,0	15,0	—
2.1.2.	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	12,0	15,0	—
2.1.3.	Fındık ve Brezilya fıncığı (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan) Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	8,0	15,0	—
2.1.4.	Sert kabuklu meyveler (Bölüm 2.1.2 ve 2.1.3’de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0	15,0	—
2.1.5.	Yerfıstığı, diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine edilecek bitkisel ham yağ ve rafine bitkisel yağ hariç	5,0	10,0	—
2.1.6.	Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
2.1.7.	Fındık ve Brezilya fıncığı (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan) — Rafine bitkisel yağ üretiminde kullanılan fındık hariç	5,0	10,0	—
2.1.8.	Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.6 ve 2.1.7’de belirtilenler hariç) (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	5,0	10,0	—

Tablo.1.5. (Devamı)

2.1.	Gıda	Maksimum Limit (µg/kg)		
		B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
2.1.9.	Kurutulmuş meyveler (doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	8,0	10,0	—
2.1.10.	Tahıllar, bunlardan elde edilen ürünler ve bunların işlenmiş ürünleri (Bölüm 2.1.11, 2.1.14 ve 2.1.16'de belirtilenler hariç)	2,0	4,0	—
2.1.11.	Mısır ve pirinç (doğrudan insan tüketimine sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce ayıklama veya diğer fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	—
2.1.12.	Çiğ süt , ısıl işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	—	—	0,050
2.1.13.	Baharatın aşağıdaki türleri için; — Kırmızıbiber (<i>Capsicum spp.</i>) (bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil) — Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) — Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) — Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) — Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>) — Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat	5,0	10,0	—
2.1.14.	Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,10	—	—
2.1.15.	Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	—	—	0,025
2.1.16.	Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar	0,10	—	0,025

1.3.3. Kromatografi ile Gıda Ürünlerinde Aflatoksin Tayini

Tarım ve yiyecek ürünleri için çeşitli kromatografik metotlar bulunmaktadır. İnce tabaka kromatografisi geçmiş yıllarda tanı ve tayinde en çok kullanılan yöntemdi. Ancak artık floresans dedektörlü HPLC, aflatoksin tanı ve tayininde daha çok tercih edilmektedir. HPLC'nin TLC yerine tercih edilme sebepleri arasında daha geniş bileşik

analiz etme çeşitliliğine sahip olması, ısı, ışık veya hava ile bozulan bileşiklerin de analiz edilebilmesi ve otomasyona sahip olması sayılabilir [23] .

Aflatoksinlerin analizi için ilk yöntem TLC ile geliştirilmiştir. Ancak 1980'lerin başında gelişmiş ülkelerde yerini HPLC ve florometrik teknikler almıştır. Bu modern metotlar TLC üzerine birçok avantajlara sahiptir, ancak analizde enstrümantel gereklilikde de artışa neden olmuşlardır [2] .

Floresans dedektörlü HPLC yöntemi, aflatoksin tayininde en çok kabul gören metot olmuştur. Dört aflatoksinin doğal floresansları $\lambda_{ex}=360\text{nm}$; aflatoksin B₁ ve B₂ için $\lambda_{em}=440\text{nm}$ ve aflatoksin G₁ ve G₂ için $\lambda_{em}=470\text{nm}$ 'dir. HPLC nitel analizlerde hızlı bir metot olması sebebiyle tercih edilmektedir [23] .

Hem normal hem de ters-faz HPLC kullanılabilir. Normal-faz metotlar 254 ve 365 nm UV izleme, floresans ve silika adsorban kullanırlar. Ters-faz metotlar UV ve floresans dedektörlerin her ikisini de kullanır. Son zamanlarda aflatoksin tayini için ters-faz HPLC metotları daha fazla dikkate alınmaktadır [23] .

Aflatoksin tayininde floresans dedektörlü HPLC analizleri, sonuçlarının doğruluğu sebebiyle daha çok tercih edilmektedir, aflatoksin B₁ ve G₁ sulu çözeltilerde floresans söndürmesine uğrarlar. Ancak aflatoksin B₁ ve G₁'in kuvvetli asitler veya oksidanlar, kloramin T, brom veya iyot gibi çeşitli reaktiflerle reaksiyonları sonucunda floresans yoğunluğunda önemli bir artış gözlenir [23] . Ters-faz kromatografisi için aflatoksin B₁ ve G₁'in tayinini kolaylaştırmak üzere 3 metot genellikle kullanılır: kuvvetli bir asit ile kolon öncesi türevlendirme (TFA), iyot veya brom ile kolon sonrası türevlendirme [24].

Kolon sonrası türevlendirme metodunun TFA metoduna göre daha çok tavsiye edilmesinin sebebi, TFA türevlerinin sınırlı kararlılığa sahip olmasıdır. Bu kararsızlık otomatik kromatografik ekipmanlarla fazla sayıda örneğin analizinde sorun yaratmaktadır [24] .

Brom sisteminin iyot sisteminden üstünlükleri ise:

- Ekipmanlar daha ucuzdur, sadece bir pompa gerekir.
- Kurulum, işletme ve bakım daha kolaydır, doymuş iyot çözeltisinin günlük olarak hazırlanmasından kaçınılır.
- Narenciye içeren örneklerde yöntem daha seçicidir, narenciye ürünlerinden gelen pikler yoktur veya yoğunluğu daha azdır [24] .

1.3.4. Metot Performans Kriterleri

Gıdalarda mikotoksin limitlerinin belirlenmesi için, özel bir metodun bulunmadığı durumlarda; laboratuvar aşağıdaki kriterlere uygun herhangi bir metot seçebilir [9] .

Tablo 1.6. Aflatoksin için Performans Kriterleri

Kriter	Konsantrasyon	Tavsiye edilen	İzin verilen
	Oranı (µg/kg)	Değer (%)	Maksimum Değer
Kör	Hepsi	Önemsiz	–
Geri alma – Aflatoksin M1	0,01 – 0,05	60 – 120	
	>0,05	70 – 110	
Geri alma – Aflatoksin B1, B2, G1,G2	<1,0	50 – 120	
	1 – 10	70 – 110	
	>10	80 – 110	
Kesinlik RSDR	Hepsi	Horwitz eşitliğinden	2 x Horwitz eşitliğinden
		elde edilen değer	elde edilen değer
Kesinlik RSDr, aynı konsantrasyondaki kesinlik RSDR nin 0,66 katı olarak hesaplanabilir.			

Kesinlik değerleri Horwitz denkleminde hesaplanmalıdır:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (1.1)$$

RSD_R; Tekrarüretilebilirlik koşulları altında elde edilen sonuçlardan hesaplanan nispi standart sapmadır.

C; konsantrasyon oranıdır (örneğin 1=100 g/100 g, 0,001 =1000 mg/kg).

Horwitz eşitliği; analite ve matrikse bağlı olmayan, yalnızca analit konsantrasyonuna bağlı olarak değişen ve birçok rutin analiz metodu için geçerli olan genel bir kesinlik denklemdir [9] .

1.3.5. Daha Önce Yapılmış Soya ve Aflatoksin Tayinine Dair Çalışmalar

1972 yılında yapılan bir çalışmada fıstık ve fıstık ürünlerinde aflatoksin tayini için geliştirilmiş bir metodun, 15 laboratuvarın ortak çalışması ile mısır ve soya fasulyesinde de uygulanabilirliği test edilmiştir. Çalışmaya katılan 15 laboratuvardan 9 tanesi TLC plakalarındaki aflatoksinleri dansitometrik olarak ölçmüş, 7 katılımcı ise TLC standartlarını kullanarak molar absorptivite ile aflatoksin konsantrasyonlarını tayin etmiştir. Çalışma sonucunda metodun raporda belirtildiği gibi modifiye edilerek, 20 ppb veya fazlası aflatoksin içeren örneklerde daha doğru sonuç vermek üzere, mısır ve soya fasulyesinde aflatoksin tayininde kullanılabileceği belirtilmiştir [25] .

1972 yılında yapılan bir başka çalışmada soya fasulyesindeki aflatoksin oluşumu ve *Aspergillus* türlerinin aflatoksin üreten suşları incelenmiştir. Soya fasulyesinde *Aspergillus flavus*'a karşı direnç gösteren birçok neden gösterilmiştir. Bunların arasında soya fasulyesinin olgunlaşması sürecindeki küfler için olumsuz nem koşulları, tohumların gelişiminin kapalı pod içerisinde gerçekleşmesi, veya soya fasulyesi tohumu içerisindeki küf oluşumunu engelleyen olası bir inhibitörün bulunması sayılabilir. Maryland'de 1971'de olağandışı nemli mevsim, yüksek küflü soya fasulyeleri oluşmasına neden olmuş, bunun üzerine soya fasulyeleri aflatoksin oluşumuna veya *Aspergillus* türlerinin aflatoksin üreten suşlarının olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmalar, soya fasulyesinin *Aspergillus* türlerinin aflatoksin üreten suşları için uygun bir substrat olduğunu göstermiştir [26] .

1978 yılında yapılan bir çalışmada 16 çeşit soya fasulyesi üzerinde aflatoksin oluşumu incelenmiştir. 16 ticari aflatoksin çeşidinin her biri *Aspergillus flavus* serisinin 5 farklı küf izolatu ile aşılmıştır. İzolatlar, *Aspergillus parasiticus*'un 2 suşu, *Aspergillus flavus*'un 2 suşu ve yeni bir çeşit *Aspergillus flavus*'un 1 suşundan oluşmaktadır. 25 g küflenmiş soya fasulyesi örnekleri American Association of Cereal Chemists'in resmi metoduna göre, 250 mL kloroform, 25 mL su ve 25 g diatome toprağı ile 5 dakika karıştırılarak ekstrakte edilmiştir. Aflatoksin miktarları dansitometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar başlangıç substrat temelinde hesaplanmış, nem için düzeltme yapılmış ve fermantasyon sırasında oluşturulmuştur [27] .

1986 yılında yapılan bir çalışmada soya fasulyesindeki aflatoksin kontaminasyonunda proteinaz inhibitörlerinin, çinko durumunun ve tohum kabul bütünlüğünün etkileri araştırılmıştır. Soya fasulyesi tripsin inhibitörlerinin patojenlere karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un aflatoksijenik suşları ile çalışmalar, tripsin inhibitörlerinin bu küflerin büyümesini ve aflatoksin oluşumunu etkilemediğini göstermiştir. Çinko aflatoksin sentezi için gerekli bir mineraldir. Çinko içeriğinin, ham soya fasulyesine göre, pişmiş olanındaki aflatoksin artışından sorumlu gösterilebileceği düşünülmüş, ancak çalışmalar aflatoksin içeriğinin pişme ile azaldığını göstermiştir. Ayrıca tohum kabuk bütünlüğü ile sınırlı erişim sağlaması ve düşük nem içeriği sebebiyle, *Aspergillus flavus*'un tohumda yavaş kolonizasyonundan sorumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır [28] .

AOAC resmi metoduna göre (1972-1988) soyada aflatoksin tayini için örnek önce belirtilen eleklerden geçecek şekilde öğütülür. Daha sonra 50 g numune üzerine, 25 mL su, 25 g diatome toprağı ve 250 mL kloroform eklenerek 500 mL'lik erlen içerisinde 30 dakika çalkalanır ve filtre kağıdından süzülerek filtrat elde edilir . Kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi ile analiz gerçekleştirilir [29] .

VICAM tarafından (1999) önerilen soya ve soya karışımında florometre ile aflatoksin tayininde, 50 g örnek üzerine 5 g tuz ilavesiyle kavanozda üzerine 100 mL metanol:su (80:20) eklenir. 1 dakika mikser ile karıştırılarak ekstrakte edilir. Filtre kağıdından süzülür, 10 mL filtrat 20 mL saf su ile seyreltilir, iyice karıştırılır ve cam filtre kağıdından süzülür. Aflatoksin kolonundan önce 1 mL filtrat, sonra 1 mL su geçirilir ve 1 mL daha su geçirildikten sonra 1 mL metanol ile elue edilir. VICAM'ın 1 mL özel solüsyonundan ilave edilerek florometrede ölçümü gerçekleştirilir [30] .

2009 yılında yapılan bir çalışmada soya fasulyesi uçucu bileşiklerinin *Aspergillus flavus* çoğalması ve aflatoksin oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Soya homojenatları lipaz enzimine maruz kalınca uçucu bileşikleri oluştururlar. Bu indüklenmiş uçucu bileşikler SPME ile tanımlanır. SPME ile tanımlanmış 17 uçucu bileşen, *Aspergillus flavus* çoğalmasını engelleme ve aflatoksin oluşumu üzerine etkilerini tayin etmek üzere test edilmiştir. Bu uçucular aldehitler, alkoller, ketonlar ve furanları içerir. Test edilen bileşikler içerisinde aldehitlerin, küf artışını ve aflatoksin B₁ oluşumunu en iyi şekilde engellediği belirlenmiştir [31] .

1.4. Validasyon

Validasyon, bir ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Validasyonu tamamlanmış, kalite kontrol parametreleri ile düzenli olarak kontrol edilen her metot, bu metotla verilmiş analiz sonuçlarına güvenilirliğini sağlar [32] .

Geçerli kılma yani validasyon, metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Tek bir (internal validasyon) veya pek çok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir [33] .

Doğrulama yani verifikasyon, laboratuvarlar arası çalışmalarla performans kriterleri belirlenmiş olan bir metodun laboratuvar şartlarında teyididir [33] .

Bir metotla yapılan ölçümün sonuçları birçok faktöre bağlıdır (Laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasal madde, standart, operatör deneyimi). Bu nedenle metodun ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek ölçülerek ölçüm sonucuna etkileri belirlenmeli ve ölçülmelidir [33] .

Metot validasyonu şu durumlarda yapılır:

- Herhangi bir metot bir laboratuvarda ilk defa kullanılacağı zaman,
- Bir analiz için yeni metot geliştirildiği zaman,
- Kullanılmakta olan metotta değişiklik yapıldığı zaman,
- Valide edilmiş bir metot başka bir laboratuvarda kullanılacağı zaman veya farklı bir kişi veya farklı bir cihazla kullanılacağı zaman,
- İki metodu karşılaştırmak için,
- Kalite kontrol testleri sonunda metodun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında.

1.4.1. Validasyon Seviyesi

Metotların validasyon seviyesi, belirlenmiş performans kriterlerine göre değişiklik gösterir.

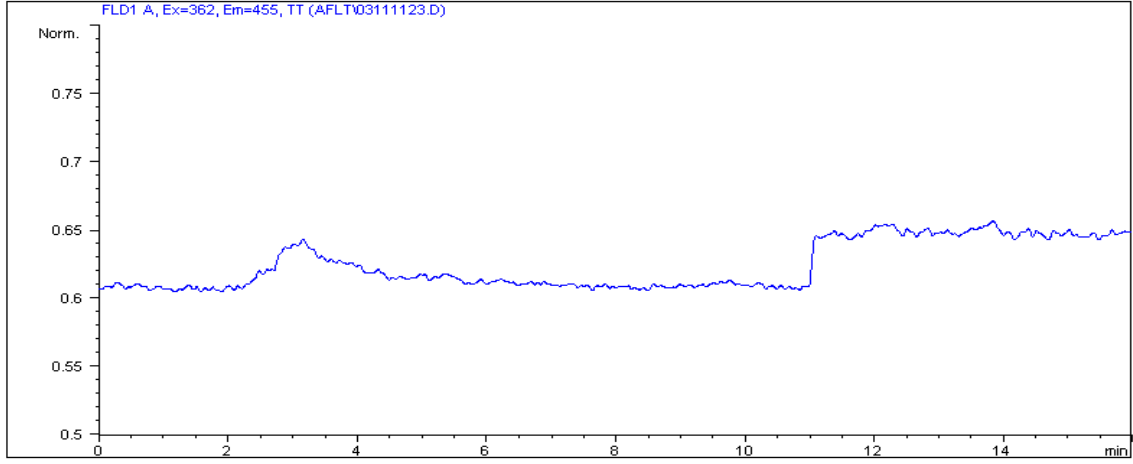
- Bir metot laboratuvarlar arası bir çalışma ile geçerli kılınmış ise verifikasyon yeterlidir.
- Bir metot laboratuvarlar arası bir çalışma ile geçerli kılınmış ancak farklı yapıda bir örnek ile çalışılacaksa doğruluk, kesinlik, tespit limiti ve tayin limiti verifikasyona yeni matris de ilave edilerek gerçekleştirilmelidir.
- Bir metot laboratuvarlar arası bir çalışma ile değil laboratuvar içi çalışma ile valide edilmiş ise, verifikasyon parametrelerine mümkün olduğu kadar validasyon parametreleri de eklenmelidir.
- Bir metot bilimsel bir dergide yayınlanmış ve belirli performans parametreleri incelenmiş ise, verifikasyon parametrelerine mümkün olduğu kadar validasyon parametreleri de eklenmelidir.
- Bir metot bilimsel bir dergide yayınlanmış ancak hiçbir performans parametresi incelenmemiş ise tam iç validasyon yapılmalıdır.
- Bir metoda ait herhangi bir performans kriteri bulunmadığı veya laboratuvar içi geliştirilmiş ise tam iç validasyon yapılmalıdır.

Metotların verifikasyonu için doğruluk, kesinlik, tayin ve tespit limitlerinin laboratuvar da teyit edilmesi yeterlidir. NMKL No:4 rehberinde verifikasyon için tayin limiti ilave edilmemiş olsa da AOAC'nin rehberinde yer almaktadır [34] .

1.4.2. Metot Validasyon Parametreleri

1.4.2.1. Seçicilik

Seçicilik, ölçülmesi hedeflenen bileşiğin analiz edileceği matrisde doğru olarak tespit edilmesidir. Aranılan analitle aynı özellikleri gösteren (aynı dalga boyu, aynı alıkonma zamanı vb.) bileşenlerin olmadığı kanıtlanmaya çalışılır. Bu amaçla analiti içermeyen kör örnekler hazırlanarak analiz edilir [35] .



Şekil 1.2. Aflatoksin K r  rnek Kromatogramı

1.4.2.2. Seçimlilik

Metodun tayin edilmek istenen analiti matriksten ayırt edebilme özelliğidir. Örneğın kromatografik bir yöntemde, analiz edilecek analitin verdiği pik ile bu pikin alıkonma zamanına en yakın zamanda çıkan piki birbirinden ayırabilme kapasitesiyle ölçülebilir [35] .

1.4.2.3. Minimum Tayin Limiti (LOD)

Analitin ayırt edilebildiği en düşük konsantrasyondur. Örneğın kromatografik bir metotta analit sinyalinin gürültüden ayrılabilmesi için gereken minimum analit miktarıdır. LOD alışması ile; validasyonu yapılan metot ve belirlenen matrikste ölçülebilir ancak miktarı kesin olarak tayin edilemeyen konsantrasyon bulunmaktadır [35] .

$X_L = X_{b1} + k s_{b1}$ X_{b1} k r örnek ortalaması, s_{b1} k r örnek ölçümlerinin standart sapması, k ise çarpan faktörüdür ve genellikle 3 olarak alınır.

LOD hesaplaması için kullanılan farklı metotlar bulunmaktadır:

- Tayin limiti genellikle sinyal/gürültü oranınının 3 katı olarak alınır.
- K r  rnek 10 kere ölçülür veya k r örneğe tayin limitine yakın derişimde örnek ilave edilir ve 10 ölçüme yapılır.  l m değerlerinin standart sapması (s) hesaplanır. Tayin limiti $0 + 3s$ veya k r örneğe ilave edilen derişim $+ 3s$ olarak hesaplanır.

1.4.2.4. Minimum Ölçüm Limiti (LOQ)

Ölçüm limiti; analitin güvenilir bir şekilde ölçülebildiği, kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlik değerlerindeki en düşük konsantrasyon seviyesidir [35] .

LOQ hesaplaması için kullanılan farklı metotlar bulunmaktadır:

- Kör örnek ölçüm değerlerinin standart sapmasının 5, 6 veya 10 katı alınarak hesaplanır.
- Kör örnek 10 kere ölçülür veya kör örneğe tayin limitine yakın derişimde örnek ilave edilir ve 10 ölçme yapılır. Ölçüm değerlerinin standart sapması hesaplanır. Standart sapmanın 5, 6 veya 10 katı alınarak hesaplanır.
- Sinyal/ gürültü oranının 10 katı alınarak da LOQ hesaplanabilir.

1.4.2.5. Ölçüm Aralığı/Doğrusallık

Metodun kesinlik, gerçeklik gibi kriterleri kabul edilebilir düzeylerde karşılayabildiği analit konsantrasyonu aralığıdır [35] . Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Kalibrasyon eğrisinde ölçülen analit miktarı ve dedektör yanıtının doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Metot geçerli kılma çalışmalarında analit konsantrasyonları bu aralık dikkate alınarak planlanır [34] .

Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnek veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Her bir ölçüm noktasında en az iki ölçüm yapılır [34] .

Kalibrasyon eğrisinin analiz edilen örnek yapısının farklılığına göre değişebileceği göz ardı edilmemelidir. Elde edilen yanıtla çizilen eğride üst ve alt sınırlar belirlenmelidir [34] . Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “lineer regresyon formülü” ile korelasyon katsayısı belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı >0,99 olmalıdır [34] . Ölçüm aralığının alt sınırı Minimum Ölçüm Limiti (LOQ) dir [35] .

1.4.2.6. Doğruluk

Doğruluk bir ölçüm sonucunun gerçek değere ve birbirlerine yakınlığını ifade etmek için kullanılır. Doğruluğun kesinlik ve gerçeklik olmak üzere iki bileşeni vardır [35] .

Hata çeşitleri sistematik ve rastgele hata olmak üzere ikiye ayrılır.

Rastgele Hata, miktarları etkileyen ve öngörülemeyen varyasyonlardan doğar. Bu rastgele etkiler, bir ölçülenin tekrarlanan gözlemlerinde varyasyonda artışa neden olur. Bir analitik sonucun rastgele hatası telafi edilemez, fakat gözlem sayısı arttırılarak azaltılabilir.

Sistematik Hata, bir ölçülenin bir seri analizinde sabit kalan veya tahmin edilebilir şekilde değişen hatadır [35] .

Tablo 1.7. Rastgele ve Sistematik Hata Karşılaştırılması

<u>Rastgele Hata</u>	<u>Sistematik Hata</u>
Kesinliği etkiler. (Tekrarlanabilirlik ve Tekrarüretilebilirlik)	Sapmayı (bias) oluşturur Rastgele hatanın düşük olduğu durumlarda gerçek değerden sapmayı gösterir
Tekrarların ortalamadan sapmasına neden olur.	Tüm sonuçların çok yüksek veya çok düşük olmasına neden olur.
Tekrar ölçümleri ile belirlenebilir.	Tekrar ölçümleri ile belirlenemez.
İyi çalışma teknikleri ile minimize edilebilir; ancak tamamen elimine edilemez	Standart metot ve materyaller ile düzeltilebilir.
Çalışanlar ve ekipmanlardan kaynaklanır.	Çalışanlar ve ekipmanlardan kaynaklanır.

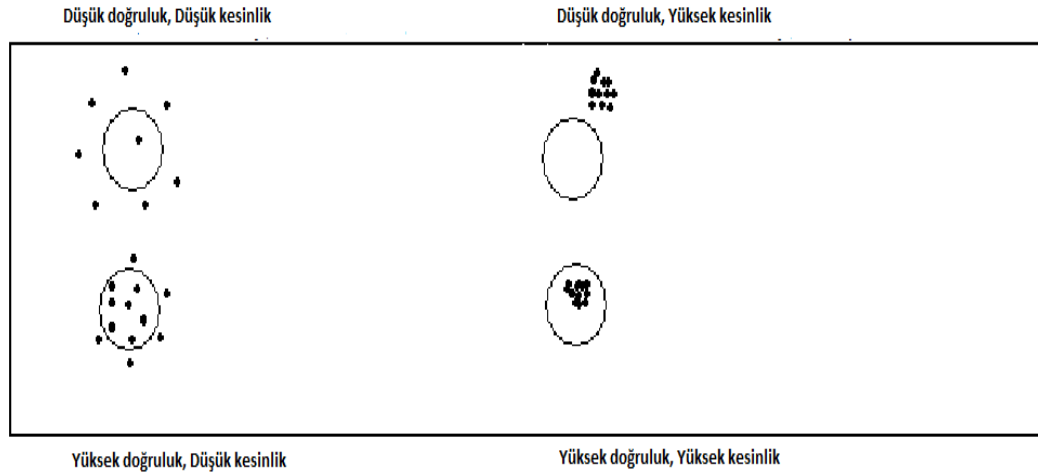
✓ **Kesinlik**: Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Kesinlik doğruluğun gerçeklik dışındaki diğer bir bileşeni olup rastgele hataların dağılımını gösterir [34] .

Kesinlik ölçümünü 4 faktör etkilemektedir. Bunlar zaman (kısa ve uzun zaman aralığı), kalibrasyon (aynı ekipmanda dahi ölçümler arasında yeniden kalibrasyon yapıp yapılmadığı) , operatör (aynı veya değişik operatörler) ve ekipman (ölçümlerde aynı

veya farklı ekipmanların kullanılıp kullanılmadığı) olup bunların değişkenliğine göre kesinlik değişmektedir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik olarak iki genel kesinlik ölçümü bulunmaktadır [34] .

Tekrarlanabilirlik, aynı laboratuvarında, aynı metot, aynı örnek, aynı cihaz ve aynı analist ile kısa zaman aralığında yapılan ölçüm sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığının ölçüsüdür. Tekrarlanabilirlik çalışmaları analit miktarı bilinen sertifikalı bir örnek ile veya örneğe bilinen miktarlarda analizi yapılacak madde ilavesi ile yapılabilir [35] .

Tekrarüretilebilirlik, aynı metodun, aynı örnek ile farklı laboratuvarlarda, farklı analist ve farklı ekipmanlarla, farklı günlerde yaptıkları ölçüm sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığının ölçüsüdür. Tekrarüretilebilirlik, laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik olarak da uygulanabilmektedir. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik, aynı metot ile aynı laboratuvarında aynı cihazla farklı kişiler tarafından geniş zaman aralığında yaptığı ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. [35] .



Şekil 1.3. Doğruluk ve Kesinlik [32]

Dışlanan Değer Tespiti: Bir metodun kesinlik ve doğruluğu değerlendirilirken, yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerler arasında dışlanan bir değer olup olmadığı test edilmelidir. Bunun için Dixon's test veya Grubbs' test kullanılır [36] .

Dixon's Test: Testin basit olması sebebiyle dışlanan değer saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bazen Q-test olarak da adlandırılır. Q değerinin hesaplanması:

$$Q = \frac{|\text{şüphelenilen değer} - \text{en yakın değer}|}{(\text{en büyük değer} - \text{en küçük değer})} \quad (1.2)$$

Bu test örnek sayısı 3 ile 7 arasında olduğunda kullanılır. Q için %95 güven aralığındaki kritik değerleri belirlidir. Eğer hesaplanan Q değeri, kritik Q değerinden büyük ise o şüphelenilen değer atılmalıdır [36].

Grubbs' Test: Diğer yaygın olarak kullanılan test olan Grubbs' Testi örnek ortalamasından şüphelenilen değer sapması ile örneğin standart sapmasını karşılaştırır. Bu test ISO tarafından Dixon's testine tercih edilir.

Grubbs' testini kullanabilmek için tüm ölçülen değerlerin aynı popülasyondan gelmesi gerekmektedir. G değerinin hesaplanması:

$$G = \frac{|\text{şüphelenilen değer} - \bar{x}|}{s} \quad (1.3)$$

s standart sapma değeridir ve şüphelenilen değeri içererek hesaplanır. \bar{x} tüm ölçüm sonuçlarının ortalamasıdır. G için %95 güven aralığındaki kritik değerleri belirlidir. Eğer hesaplanan G değeri, kritik G değerinden büyükse, şüphelenilen değer atılmaz [36].

✓ **Gerçeklik**: Gerçeklik ölçüm sonuçlarının ortalaması ile gerçek değer (referans değer) arasındaki farktır. Bu fark ölçümün sistematik hatasıdır. Sistematik hata gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Bir laboratuvarın toplam sistematik hatası sapma (bias) olarak tanımlanır. Sapma gerçekliğin değerlendirilmesinde kullanılır. Gerçeklik çalışmaları, sertifikalı referans malzeme (CRM) veya geri kazanım çalışması ile yapılır. Ayrıca belli bir süreci kapsayan yeterlilik testi (proficiency testing) sonuçları da laboratuvar sapması için kullanılabilir. Gerçeklik çalışmasında tercih edilen araç CRM'dir [35].

Gerçekliğin tespiti için sertifikalı referans materyal, referans metot ve yeterlilik testinin bulunmadığı durumlarda geri kazanım çalışması yapılır. Geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı orijinal matrikste çalışma yapılabilmesidir. Çalışma için orijinal matriks, yani validasyon çalışmasının yapıldığı matriks istenen analit ile zenginleştirilir. Bunun yanında dezavantajı, orijinal örneklerde aranan analitlerin örnekle olan fiziksel ve

kimyasal bağlarının çok güçlü olmasına rağmen, zenginleştirilen örneklerde dışarıdan katıldığı için bu şekilde bir bağ oluşmamasıdır. Bunun sonucunda geri kazanım çalışmasında her zaman daha başarılı sonuçlar elde edilebilir. Eurochem rehberinde geri kazanım çalışmasının en az 6 tekrarla yapılması önerilmiştir. Çalışmaların ölçüm aralığına göre birkaç konsantrasyonda yapılması gerekir [34] .

1.4.2.7. Stabilité/Sağlamlık: Metodun deney koşullarındaki sapmalara karşı hassasiyet derecesini gösterir. Genelde test edilen parametreler matriks kompozisyonunda değişiklik olması, kimyasal maddenin değiştirilmesi, ekstraksiyon, sıcaklık, pH, akış hızı vb. koşullardaki değişikliklerdir. Metot koşullarında değişiklik yapılmayacaksa bu parametreyi test etmeye gerek yoktur [35] .

1.4.3. Validasyon Araçları:

Kör Örnek: Çeşitli örnekler kullanılarak analitte ne kadar sinyalin ölçülebildiği değerlendirilir. Kör örnek, analite dair hiçbir matriks içermez.

Örnekler/ Test Materyalleri: Gerçek örneklerden alınan test materyalleri interferanslara dair bilgiyi sağladıkları için kullanışlıdır.

Zenginleştirilmiş Materyaller/ Çözeltiler: Bu çözelti veya materyaller ilgilenilen analit/analitlerle zenginleştirilmiştir. Zenginleştirme genellikle ilgilenilen analitin ilave edilmesi ile yapılır.

İlave Yapılmış Materyaller: Bunlar zenginleştirilmiş materyallere benzer, ancak bazı şartlar değiştirilebilir. Yapılan ilavenin ilgilenilen analitle sınırlı olması gerekmez. Eklemenin etkisini ölçmek amacıyla, herhangi bir şey içerebilir. Örneğin aflatoksin analizi yapılan bir örneğe başka bir toksin ilave edilir.

Oluşturulan Materyaller: Bu materyaller aslında ilgilenilen analiti içermeyen, fakat örneklendirilmeden önce kendisine katılarak oluşturulmuş materyallerdir. Örneğin, tahılın büyümesi sırasında herbisit spreylenerek elde edilen herbisit içeren un materyali.

Bağımsız Olarak Karakterize Edilmiş Materyaller: Bir test materyalinin gerçek analit içeriğini bilmeden bir metodun sapmasını değerlendirmek zordur. Eğer bir materyal sapması önemsiz olan bir metot ile incelenmişse, bu referans materyal olarak kullanılabilir, karşılaştırma yapılabilir.

Ölçüm Standartları: Kalibrasyon veya tanımlama amacıyla kullanılır.

Referans Materyal: Çoğunlukla sertifikalı referans materyal ile karıştırılır. Referans materyal, referans için bir temel olarak, bilinen saflıkta laboratuvar reaktiflerini veya endüstriyel kimyasalları içerebilir. Özelliği veya ilgilenilen analit, kararlı ve homojen olmalıdır.

Sertifikalı Referans Materyaller: Sertifikalı referans materyallerin karakteristiklerine dair parametreleri, referans materyallere oranla çok daha sıkı kontrol edilir ve ayrıca belirlenen değer belirsizliği ile birlikte tanınmış bir kurum tarafından sertifikalandırılır.

İstatistik: Analitik ölçümlerin yapısındaki değişkenliği ölçmede kullanışlıdır [35] .

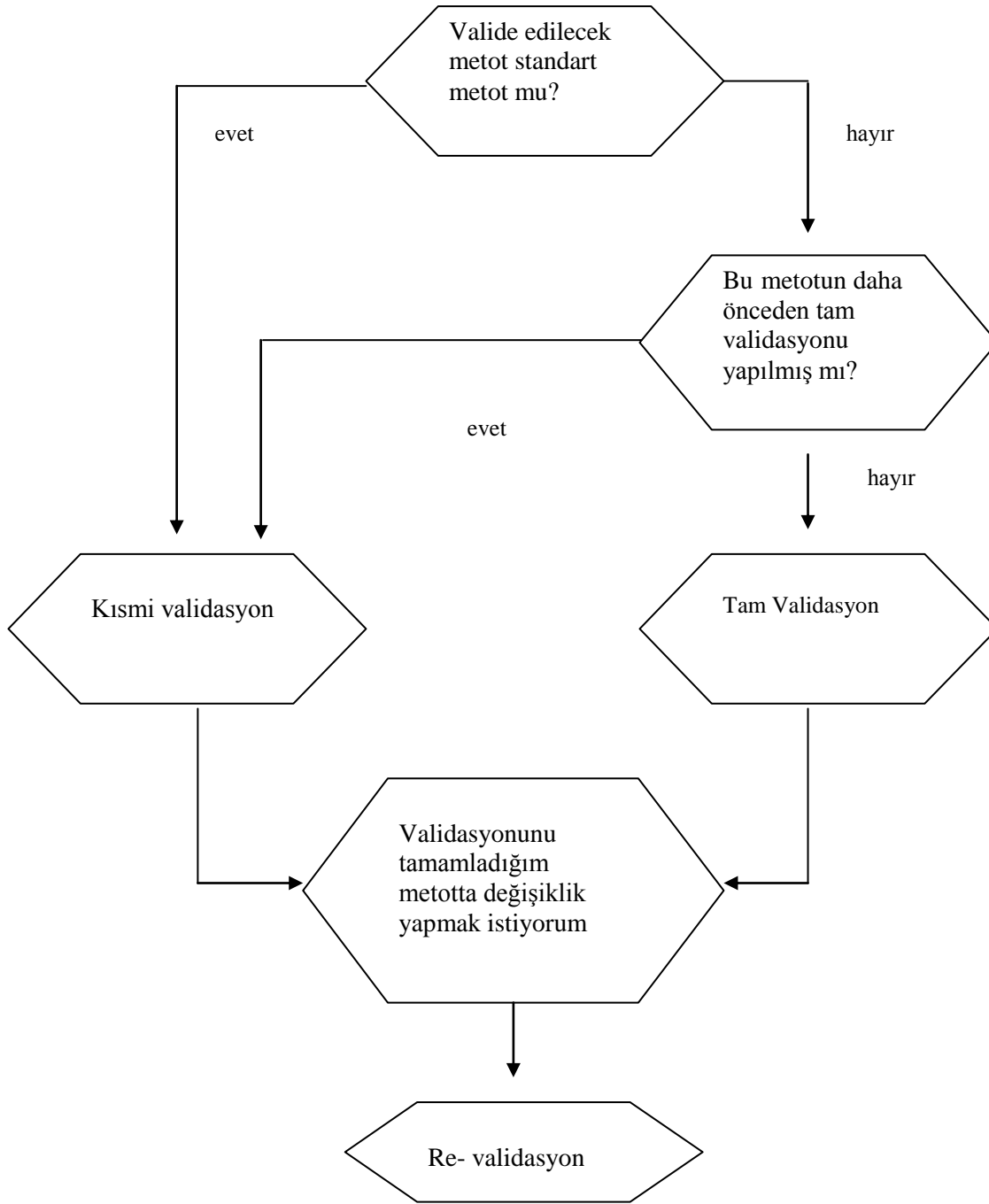
1.4.4. Metot Validasyon Parametrelerinin Seçimi

Metot validasyon parametrelerinin belirlenebilmesi için öncelikle validasyon çeşidinin belirlenmesi gerekmektedir. Belirlenen validasyon çeşidine göre hangi validasyon parametrelerinin kullanılacağı netleştirilir. Validasyon çeşitleri şunlardır:

Tam Validasyon : Laboratuvar tarafından yeni bir metot oluşturulduğunda veya tam validasyonu yapılmamış bir metodun laboratuvarda uygulamaya alınması durumunda aşağıdaki validasyon parametrelerinin uygulandığı validasyondur.

Kısmi Validasyon : Eğer laboratuvarda kullanılacak metot referans metot veya başka bir laboratuvar tarafından valide edilmiş bir metot ise aşağıdaki parametreler uygulanır. Kısmi validasyon laboratuvarda daha önceden validasyonu yapılmış bir metoda alternatif bir metot uygulanacağı zaman da kullanılabilir.

Re-Validasyon : Laboratuvar tarafından daha önce valide edilmiş bir metotta performans, personel, cihaz, metot içeriği, laboratuvar koşulları vb. durumlarda değişiklik olması durumunda ilgili parametreler tekrar edilip validasyon değerlendirilmesi yapılır. Yapılan değişikliğin etkili olduğu parametre üzerinden kontrol edilir [35] .



Şekil 1.4. Validasyon Çeşidinin Belirlenmesi

1.4.5. Validasyon Deney Deseninin Oluşturulması

1.4.5.1. Validasyon Çalışması Yapılacak Matriksin Seçimi

Validasyon çalışması yapılacak metot için hangi matrikslerle çalışılacağı belirlenmelidir. Metotta yer alan matriks göz önünde bulundurularak çalışılmak istenen matriksler seçilir [35] .

- Seçilen metot bir tek gıda ürünü için hazırlanmış ve genişletilmek isteniyorsa:

Bu durumda genişletmek için hedeflenen gıda grubunun tümünü temsil edebilecek bir veya birkaç gıda ürünü seçilerek validasyonu yapılır.

- Seçilen metot tüm gıdalar için hazırlanmışsa:

Metotta tayin edilen analitin çoğunlukla bulunduğu (muhtemel çalışılacak) matriks/matriksler fiziksel özellikleri ve bileşimlerine göre sınıflandırılır ve bu matrikslerde metot validasyonu yapılır.

- Metot laboratuvar tarafından geliştirilecek bir metotsa

Hedef ürün gruplarına göre matriks belirlenir.

1.4.5.2. Validasyon Çalışma Seviyelerinin Belirlenmesi

Metot validasyonu yapılırken farklı seviyelerde çalışmalar yapılmalıdır. Bu seviyeler düşük, orta ve yüksek seviyelerde olmalıdır. Orta seviye, çalışılan matrikse ve analize göre belirlenen yasal limit ya da muhtemel kabul edilen seviyedir. Örneğin; aflatoksin analizi için yasal limitin 0.5, 1 ve 1.5 katı çalışılır [35] .

1.5. Ölçüm Belirsizliği

“Belirsizlik” sözcüğü tek başına alındığında “kesin olmayış”, “güvenilir olmayış” gibi olumsuz anlamlar çağrıştırır. Oysa, “ölçüm belirsizliği” ya da “bir test sonucunun belirsizliği” gibi teknik deyim biçiminde kullanıldığında, daha özgül bir anlama bürünür. Ölçüm belirsizliği, elde edilen herhangi bir ölçüm sonucuyla birlikte yer alması gereken bir parametredir [37] .

Ölçülen miktar ile bağıntılı olarak karşılaşılabilecek değerler aralığını tanımlar. Dolayısıyla, ölçüm belirsizliği saptanıp ölçümle birlikte verildiğinde, elde edilen ölçüm değerinin hangi sınırlar içinde yer alacağını ve güven düzeyini yansıtır [37] .

Belirsizlik, ölçüm sonucu ile ilişkili, ölçülenin değer dağılımını karakterize eden bir parametredir. Parametre örneğin standart sapma veya bir güven aralığı genişliği olabilir.

Ölçüm belirsizliği genel olarak birçok bileşenden oluşur. Bu bileşenlerden bazıları, ölçüm sonuçlarının istatistiksel dağılımından değerlendirilir ve standart sapma ile karakterize edilir. Standart sapma ile de karakterize edilebilecek diğer bileşenler, tecrübe ve diğer bilgilere göre varsayımsal olasılık dağılımları ile değerlendirilir.

Genel kullanımda belirsizlik kelimesi “şüphe” ile ilgilidir. Ölçüm belirsizliği bir ölçüm sonucunun geçerliliği hakkında şüphe ifade etmez, aksine belirsizliğin bilinmesi bir ölçüm sonucunun geçerliliğine olan güvenin artmasını sağlar [38] .

1.5.1. Belirsizlik Kaynakları

Uygulamada bir sonucun belirsizliği; tamamlanmamış çözümlenme, örnekleme, matris etkileri ve girişimler, çevre koşulları, kütlelerin ve hacimsel aletlerin belirsizlikleri, referans değerler, ölçüm metodu ve prosedüründe yaklaşımlar, varsayımlar ve rastgele değişim gibi birçok olası kaynaktan ortaya çıkabilir [38] .

1.5.2. Belirsizlik Bileşenleri

Toplam belirsizliğin tayin edilebilmesi için, her belirsizlik kaynağının ayrı ayrı değerlendirilerek katkılarının belirlenmesi gerekir. Katkıların her biri, bir belirsizlik bileşeni olarak değerlendirilir. Standart sapma ifade edildiğinde, belirsizlik bileşeni “standart belirsizlik” olarak bilinir. Eğer bileşenler arasında korelasyon varsa, o zaman bu hesaba kovaryansın belirlenmesiyle alınmalıdır. Bununla birlikte, bazı bileşenlerin birleşik etkisini değerlendirmek de mümkündür [38] .

Bir ölçüm sonucu y için, toplam belirsizlik, birleşik standart belirsizlik olarak adlandırılır ve $u_c(y)$ ile ifade edilir. Tüm belirsizlik bileşenlerinden elde edilen toplam varyansın pozitif kareköküne eşit olan tahmini bir standart sapmadır ve belirsizlikte yayılma kanunu kullanılarak değerlendirilir [38] .

Analitik kimyada birçok amaç için genişletilmiş belirsizlik U kullanılmalıdır. Genişletilmiş belirsizlik, ölçülenin değerinin daha geniş bir güven aralığında bulunmasını sağlar. Genişletilmiş belirsizlik (U) , $u_c(y)$ ile kapsam faktörü k'nın çarpımı ile hesaplanır. k faktörünün seçimi istenilen güven aralığına bağlıdır. %95 güven aralığı için $k=2$ 'dir [38] .

1.5.3. Hata ve Belirsizlik

Hata ve belirsizliği ayırmak önemlidir. Hata bireysel bir sonuç ve gerçek değer arasındaki fark olarak tanımlanır. Hata, tek bir değerdir. Prensip olarak bilinen bir hata değeri sonucu düzeltmek için kullanılabilir.

Diğer yandan belirsizlik, bir dizi şeklinde olur. Eğer bir analitik prosedür için tayin edilmişse ve örnek tipi tanımlanmışsa, tüm tespitler için geçerli olabilir. Genel olarak bir belirsizlik değeri, bir ölçüm sonucunu düzeltmek için kullanılamaz.

Bir ölçüm sonucunun belirsizliği hiçbir zaman kendi hatasını temsil eden veya düzeltme sonrası kalan hata olarak yorumlanmamalıdır.

Hata, rastgele ve sistematik olmak üzere iki bileşenden oluşur [38] .

1.5.4. Ölçüm Belirsizliği Tayin Süreci

Belirsizlik hesaplaması prensip olarak basittir. Aşağıda bir analiz sonucu ile ilgili ölçüm belirsizliğinin tayini için yapılması gerekenler özetlenmiştir [38] .

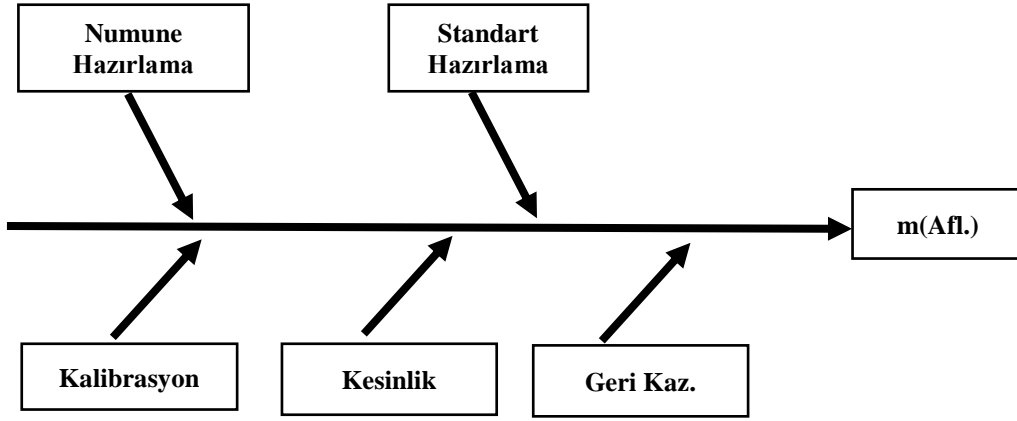
1.5.4.1. Ölçüleni Belirleme

Ölçülen ne ise, ilave edilen ve ilişkili diğer eklenenler ile birlikte açık bir şekilde yazılır. Örneğin, ölçülen miktarlar, sabitler, kalibrasyon standartları değerleri vb. Eğer mümkünse bilinen sistematik etkiler için düzeltmeler ilave edilir. Özellik bilgileri SOP veya başka bilinen bir yöntemle mutlaka verilmelidir. Çalışma yapılacak seviyeler, çalışacak kişiler, çalışma aralığı, çalışılacak kimyasallar ve cihazlar belirlenmelidir [38]

1.5.4.2. Belirsizlik Kaynaklarının Belirlenmesi

Olası belirsizlik kaynakları listelenir. Bu, birinci basamakta tanımlanan ve belirsizliğe katkıda bulunan kaynakları içerebilir. Diğer kaynakları da içerebilir, ancak kimyasal varsayımlardan doğan kaynakları mutlaka içermelidir.

Hesaplamaya bağlı olarak gelebilecek belirsizlik kaynakları balık kılıçığı diyagramında gösterilir. Bileşenin alt bileşenleri ayrıca belirtilmelidir [38] .



Şekil 1.5. Balık Kılıçığı Örneği

1.5.4.3. Belirsizlik Bileşenlerini Ölçmek

Tanımlanan potansiyel belirsizlik kaynaklarının her birinin belirsizlik boyutu tayin edilir. Bir dizi ayrı kaynakla ilişkili, belirsizliğe katkısı bulunan tek bir kaynağı tanımlamak ve belirlemek çoğunlukla mümkündür. Mevcut veri hesaplarının tüm belirsizlik kaynakları için yeterli olup olmadığı ve tüm belirsizlik kaynaklarının hesaplanması için ek deneyler ve çalışmaların planlanması oldukça önemlidir.

İkinci adım belirtilen kaynakların (örneğin, balonjoje bir ana bileşen, balonjoje için sıcaklık, kalibrasyon, tekrarlanabilirlik alt bileşenleridir) bir grup olarak değerlendirilmesidir [38] .

Bu belirsizlikler veya daha önceki elde edilen tüm veriler kullanılabilir (doğrulama değerleri, kalibrasyon değerleri, validasyon çalışmasından elde edilen tekrarüretilebilirlik, sapma, valide edilmiş metotla karşılaştırma değerleri) .

Tüm bu grupların belirsizlikleri; standart sapmaları, üçgensel, dikdörtgensel dağılım olup olmamasına, analizde kullanım tekrarına, kullanan personelin tekrarlanabilirlik değerlerine göre alt bileşenleriyle bir araya getirilir. Bunların dışında kalan belirsizlik kaynağı olarak görülen tüm kaynaklar eklenir. Grupların standart sapmaları veya belirsizlikleri hesaplanır “u” [38] .

İstatiksel Dağılım Tipleri

- ✓ Normal Dağılım: Ölçüm sonucu $\pm a$ %95 olarak verilmişse standart belirsizlik $a/2$ olarak hesaplanır.
- ✓ Dikdörtgen Dağılım: Sertifika veya ürün spesifikasyonu güvenilirlik yüzdesi olmadan verilmişse (örneğin $25\text{mL} \pm 0,05\text{mL}$) standart belirsizlik $u(x) = a/\sqrt{3}$ olarak hesaplanır.
- ✓ Üçgen Dağılım: Verilen değerlerin uç değerlerde olma olasılığı az ve ortalama değerde olma olasılığı yüksek olduğu belirtilmişse üçgen dağılım kullanılır. Standart belirsizlik $u(x) = a/\sqrt{6}$ olarak hesaplanır .

1.5.4.4. Birleşik Belirsizliğin Hesaplanması

Birleşik belirsizlik hesabı, belirsizliği oluşturan parametrelerin bir araya getirilmesinden oluşturulur. Üçüncü basamakta elde edilen bilgiler bireysel kaynaklar veya farklı kaynakların kombine etkisi ile ilişkili olup, toplam belirsizlik üzerine bir dizi sayısal katkı oluşturacaktır. Katkılar standart sapma olarak ifade edilmelidir ve uygun kurallar ile birleştirilerek birleşik standart sapma elde edilmelidir. Genişletilmiş belirsizlik değerini elde etmek için uygun kapsam faktörü kullanılmalıdır [38] .

Birleşik belirsizlik hesabı için 2 yöntemden biri kullanılabilir.

- Belirsizlik Kaynaklarının Her Birinin Belirsizlik Değerlerinden Belirsizliği Hesaplama Yöntemi:

Tüm belirsizlik bileşenlerinin tek tek ele alınıp, her bir bileşen belirsizlik değerinin birleştirilmesinden ulaşılan belirsizlik değeridir .

- Validasyon Çalışma Sonuçlarının Kullanılarak Belirsizliği Hesaplama Yöntemi:

Validasyon çalışması yapılmış metodun tekrarüretilebilirlik, sapma ve bu bileşenlere katılamayan metod performansını etkileyecek bileşenler yardımıyla belirsizlik

değerlendirilir. Değerlendirmede kullanılacak parametreler formülleri ve tanımları ile aşağıda belirtilmiştir.

Tekrarlanabilirlik : Aynı laboratuvarında, aynı metot, aynı örnek, aynı cihaz ve aynı analist ile kısa zaman aralığında yapılan ölçüm sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığının ölçüsüdür [34] .

$$s = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n (x - x_i)^2}{n - 1} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (1.4)$$

x: Ölçüm sonuçlarının ortalaması ; x_i : Çalışmanın ölçüm sonucu ve n: Yapılan ölçüm sayısıdır.

$$\text{Standart Belirsizlik} = CV_r = \left\{ \frac{\text{Std.Sapma}}{\text{Ortalama}} \right\} \quad (1.5)$$

Tekrarlanabilirlik Limiti : Tekrarlanabilirlik koşulları altında 2 paralel sonuç arasında çıkabilecek %95 ihtimalle maksimum farkın değeridir [38] .

$$r = 2.83 \times s_r \quad (1.6)$$

$$s_r = (CV_r \times \text{Konsantrasyon})/100 \quad (1.7)$$

r: Tekrarlanabilirlik limiti ve s_r : Tekrarlanabilirlik standart sapmasıdır.

Tekrarüretilebilirlik : Bir zaman periyodu içinde yapılmış, farklı analist, kullanılma ihtimali olan farklı cihazlar ile çalışılmış, analizi etkileyebilecek ve karşılaşılabilecek tüm şartları da içeren sonuçlardır. Çalışma yapılan her seviye göz önüne alınmalıdır.

İlk olarak yapılan çalışmalar ile sonuçların standart sapması hesaplanır [34] .

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

xi: İlk çalışmanın ölçüm sonucu

xii: İkinci çalışmanın ölçüm sonucu

n: Yapılan ölçüm sayısı

$$\text{Standart Belirsizlik} = \text{CVR} = \left\{ \frac{\text{Std. Sapma}}{\text{Ortalama}} \right\} \quad (1.9)$$

Tekrarüretilebilirlik Limiti : Tekrarüretilebilirlik koşulları altında 2 sonuç arasında çıkabilecek %95 ihtimalle maksimum farkın değeridir [38] .

$$R = 2.83 \times s_R \quad (1.10)$$

$$s_R = (\text{CVR} \times \text{Konsantrasyon})/100 \quad (1.11)$$

R: Tekrarüretilebilirlik limiti ve s_R : Tekrarüretilebilirlik standart sapmasıdır.

Sapma: CRM veya ilgilenilen analitin eklendiği numune üzerinden elde edilen geri kazanım değerlerinden saptanır [38] .

$$\text{Mutlak Hata \%} = \frac{|\text{Gerçek değer} - \text{Ortalama ölçüm sonucu}|}{\text{Gerçek değer}} \times 100 \quad (1.12)$$

$$\text{Düzeltilme Faktörü} = \text{Ortalama ölçüm sonucu} / \text{Gerçek değer} \quad (1.13)$$

Birleşik Belirsizliğin Hesaplanması

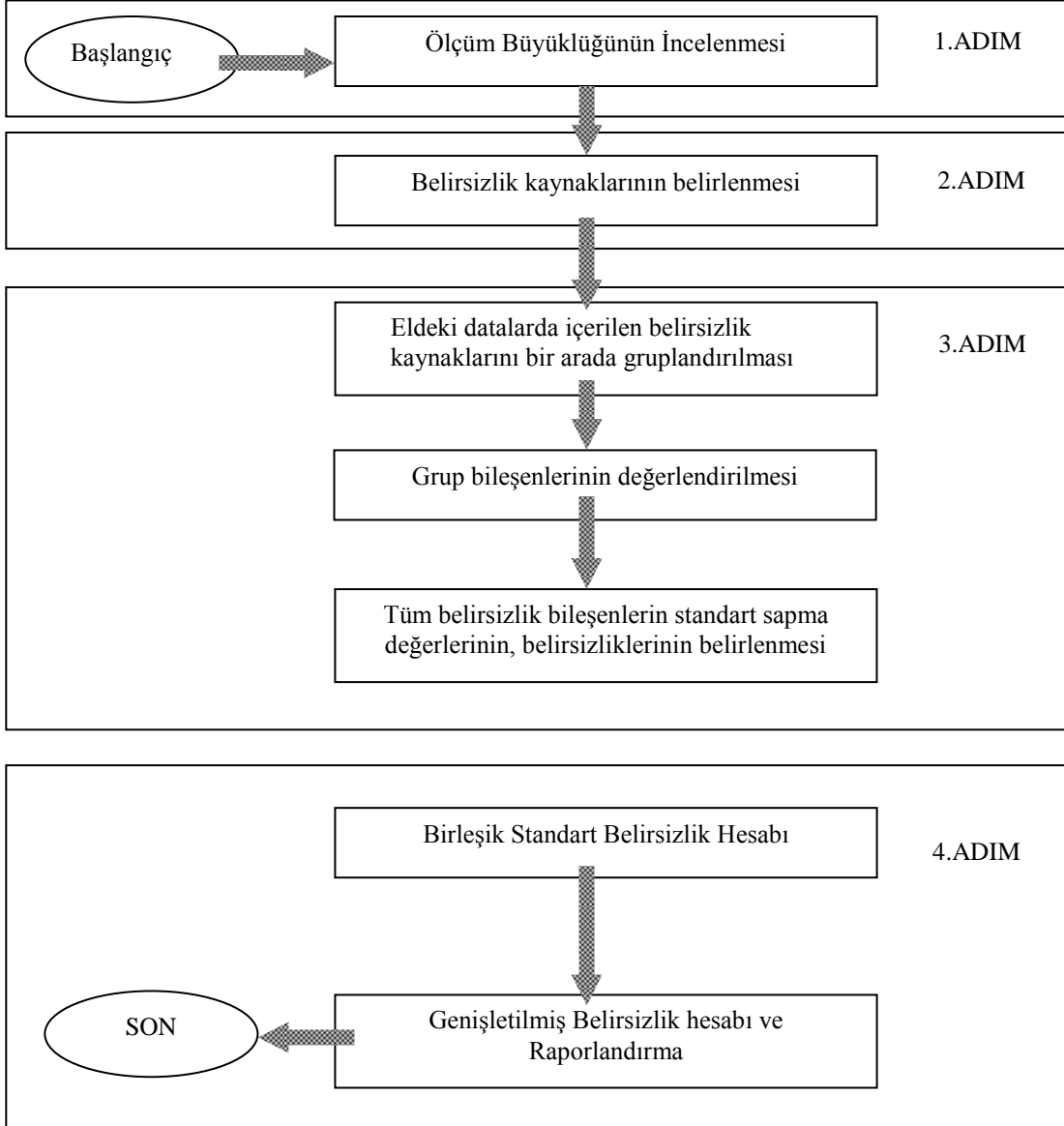
Belirsizlik kaynaklarının her birinin hesaplanan standart belirsizlikleri kullanılarak aşağıdaki formülasyona göre birleşik belirsizlik hesaplaması yapılır.

Formülde toplama olarak yer alanların belirsizliklerinin karelerinin toplamı alınır ve karekökü hesaplanır [38] .

$$u_c = \sqrt{(u_{s\ tan\ dart})^2 + (u_{numune})^2 + (u_{kesinlik})^2 + (u_{kalibrasyon})^2} \quad (1.14)$$

$$U = \text{Standart belirsizlik}(u_c) \times k \quad (\%95 \text{ güven aralığı } k= 2 \text{ dir }) \quad (1.15)$$

U: Genişletilmiş belirsizlik



Şekil 1.6. Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Aşamaları

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan soya unu marketlerden temin edildi. İçerisinde aflatoksin bulunması nedeniyle, elde edilen kromatogramlarda numunede çıkan aflatoksin alan değerleri, geri kazanım çalışmalarında aflatoksin eklenmesi sonrası elde edilen alan değerlerinden düşülerek gerekli hesaplamalar yapıldı.

Standartların hazırlanmasında kullanılan aflatoksin (G₁, G₂, B₁, B₂) R-Biopharm markadır.

Geri kazanım çalışmalarında kullanılan aflatoksin standartları ise Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'ndan temin edilmiştir.

2.2. Geri Kazanımda Kullanılacak Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ Standartlarının Hazırlanması ve Kontrolü

2.2.1. Gerekenler

2.2.1.1. Reaktifler

Sülfürik Asit	Merck 1.00748
Potasyum bikromat	Merck 1.02403
Toluen	Merck 1.08327
Asetonitril	JTB 9012
Asetik asit	Fisher Scientific A/0406/PB15
Aflatoksin standartı	

2.2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Spektrofotometre: UV/Visible ,200-500 nm arası tarama yapabilen, 1 cm kuvarts küvet

Desikatör

50 ve 1000 mL'lik balonjoje, A sınıf

25 mL'lik pipet, A sınıf

20-200/100-1000 Eppendorf Mikropipet

Spektrofotometre Çalışma Şartları

Scan Type: Intelliscan, Speed: Normal, Data Int: 1.0 nm, Baseline: User,
Bandwidth: 2.0 nm, Lamb Change:325 nm, Peaks

2.2.1.3. Cihaz Kalibrasyonunda Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanışı

0.25 mM Potasyum Bikromat Çözeltisi Hazırlanışı: Potasyum bikromat 2 saat boyunca 110 °C'lik etüvde tutuldu ve daha sonra desikatöre alınarak oda sıcaklığına soğutuldu. 78 mg Potasyum bikromat primer standardı tartılıp, 0.009 Molar Sülfürik asitte çözülerek balonjojede litreye bu asitle tamamlandı.

0.125 mM Potasyum Bikromat Çözeltisi Hazırlanışı: 25 mL 0.25 mM Potasyum bikromat çözeltisi 50 mL'lik balonjojede asit ile hacme tamamlandı.

0.0625 mM Potasyum Bikromat Çözeltisi Hazırlanışı: 25 mL 0.125 mM Potasyum bikromat çözeltisi 50 mL'lik balonjojede asit ile hacme tamamlandı [39] .

Potasyum bikromat Mol Tartısı: 294 g/mol

2.2.1.4. Cihaz Kalibrasyonunun Yapılışı

- ✓ 0.009 M Sülfürik asit çözeltisi hazırlandı. (1 mL Sülfürik asit 2 litrelik balonjojede saf su ile hacme tamamlanır.)
- ✓ 0.25, 0.125 ve 0.0625 mM Potasyum bikromat asitli çözeltileri hazırlandı.
- ✓ 0.009 M asit çözeltisi kör örnek olarak kullanılarak 350 nm'de Potasyum bikromat çözeltilerinin absorpsanları tayin edildi.

$$\epsilon = A \times 1000 / \text{Potasyum Bikromat konsantrasyonu (mmol)} \quad (2.1)$$

ϵ : Molar Absorptivite ve A: Absorbans değeridir. Formülden, 3 konsantrasyon için ϵ değeri hesaplandı.

Bu değerlerden 3 konsantrasyon değeri için ortalama hesaplanmıştır.

$$CF = 3160 / \epsilon \quad (2.2)$$

CF: Düzeltme Faktörüdür ve 3160: Potasyum bikromat için molar absorptivitedir.

Saptanan CF değeri 0.95'den küçük veya 1.05'den büyük ise çözeltiler veya cihaz gözden geçirilmelidir [39] .

2.2.1.5. Aflatoksin Standartlarının Hazırlanışı

Aflatoksin standartları 8-10 mikrogram/mL olacak şekilde Toluen-Asetonitril (9+1)'de çözüldü.

Hazırlanan aflatoksin standartlarının konsantrasyonun belirlenmesi için spektrofotometrede 200-500 nm aralığı taranarak absorbanslar tespit edildi. (Kör örnek kullanılan çözücüdür.)

$$C (\mu\text{g aflatoksin/mL}) = A \times \text{Mol Tartısı} \times 1000 \times \text{CF} / \epsilon \quad (2.3)$$

C: konsantrasyon, A: absorbans değeridir.

Formülden toksinlerin konsantrasyonları hesaplandı [40] .

(Bu şekilde hazırlanan standartlar -18 °C'de minimum 4 yıl sonra bozunur.)

Aflatoksinler için moleküler ağırlıklar ve molar soğurmalar;

Aflatoksin	MA	Çözücü	ϵ
B ₁	312	Toluen-Asetonitril (9+1)	1930
B ₂	314	Toluen-Asetonitril (9+1)	21000
G ₁	328	Toluen-Asetonitril (9+1)	16400
G ₂	330	Toluen-Asetonitril (9+1)	18300

2.3. Çalışılacak Metodun Belirlenmesi

- Çalışma başlangıcında öncelikle VICAM'da belirtilen ekstraksiyon yöntemi denendi [30] . 50 gram soya unu üzerine 5 gram sodyum klorür ilavesiyle 80 mL metanol + 20 mL su eklenerek 1 dakika mikserle karıştırıldı. Ancak soya unu tüm çözücüyü içine çektiği için çalışma başarısızlıkla sonuçlandı.
- Daha sonra ekstraksiyonda "R-Biopharm, Aflatoxins in Wheat 1998, IAC HPLC"de belirtilen yöntem denendi [41] . 50 gram soya unu üzerine 120 mL asetonitril + 80 mL su ilave edilerek 2 dakika mikserle karıştırıldı. Karışım Whatman 113/4 filtre

kağıdından süzülerek elde edilen filtrattan 2 mL alınıp 48 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile seyreltilerek immuno affinite kolondan geçirildi. Kolon 15 mL su ile yıkandı ve aflatoksinler 1 mL metanol daha sonra 1 mL su geçirilerek elue edildi. Eluat 0.20 mikron filtreden geçirilerek vialer alınıp ve HPLC’de ölçümleri yapıldı. Ancak geri kazanım değerleri yasal limitler içerisinde [9] olmadığı için bu metot çalışmak için tercih edilmedi.

- Soya unundan aflatoksini ekstrakte etmek için bir diğer metot olarak AOAC Official Method 999.07 denendi [42]. Bu metodun kuru incir için ekstraksiyon kısmı kullanılarak yapılan denemeler sonucunda elde edilen geri kazanım değerleri yasal limitler içerisinde olduğu için çalışılacak metot olarak seçildi. Metodun yapılışına dair bilgiler aşağıda bulunmaktadır.

2.4. Metot

2.4.1. Gerekenler

2.4.1.1. Reaktifler

Tüm reaktifler analitik ve HPLC kalite olarak seçildi.

Phosphate Buffered Saline (PBS)	pH: 7.4, BR0014 G (OXOİD)
Metanol	JTB 8045
Metanol	JTB 8402
Su	055µS/cm
Ekstraksiyon Çözeltisi	Metanol-Su çözeltisi (8+2 v/v)
KBr	Merck 4907
HNO ₃ %65’lik	JT Baker 6080
NaCl	Merck 6400

PBS Çözeltisi: 1 adet PBS tablet 100 mL’lik balonjojede demineralize su ile çözülerek hazırlandı.

2.4.1.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Mikser

100 mL'lik beher

1000 mL cam kavanoz

Plastik huni, büyük boy

Filtre kağıdı: Whatman 1820-150

Cam kolon: 75 mL hacimli affinite kolonun üst kısmına uyacak şekilde, altı ince.

2 mL'lik plastik şırınga

Agilent 1100 Series HPLC- Floresans Dedektör

Otosampler

Kolon: Waters Spherisorb 5 µm ODS2 4.6 x 250 mm

Kobra Cell (Kolon sonrası türevlendirme sistemi)

Tek kullanımlık filtre: chromafil polyester filtre 0,20 mikron

10mL'lik bullu pipet, A sınıfı

Analitik terazi: Sartorius marka, 0.1mg hassasiyetli maksimum 220 g

Laboratuvar terazisi: Sartorius marka, 0.1g hassasiyetli maksimum 1200 g

Mikrolitre pipetler: Eppendorf marka, 20-200 ve 100-1000 µL

İmmuno affinite kolon, R-Biopharm marka

Mezür 100-250 ve 1000 mL, A sınıfı

Balonjoje 5 ve 100 mL, A sınıfı

Kronometre

2.4.2. Cihaz Çalışma Şartları

Mobil faz akış hızı: 0,9 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Kolon fırını: 40 °C

Mobil faz: Su+Metanol (52+48) Her bir litre mobil faz için 120 mg KBr ve 350 µL 4

Molar HNO₃ ilave edilmiştir.

Floresans Dedektör Zaman Programlaması

t_0 min $\lambda_{ex}=362nm$ $\lambda_{em}=455nm$

t_x min $\lambda_{ex}=362nm$ $\lambda_{em}=425nm$ $t_x \sim 12'$

Kobra Cell: 100 μ amp.

Reaksiyon Kapileri: 34cm x 0,5mm Φ

2.4.3. Standartların Hazırlanması

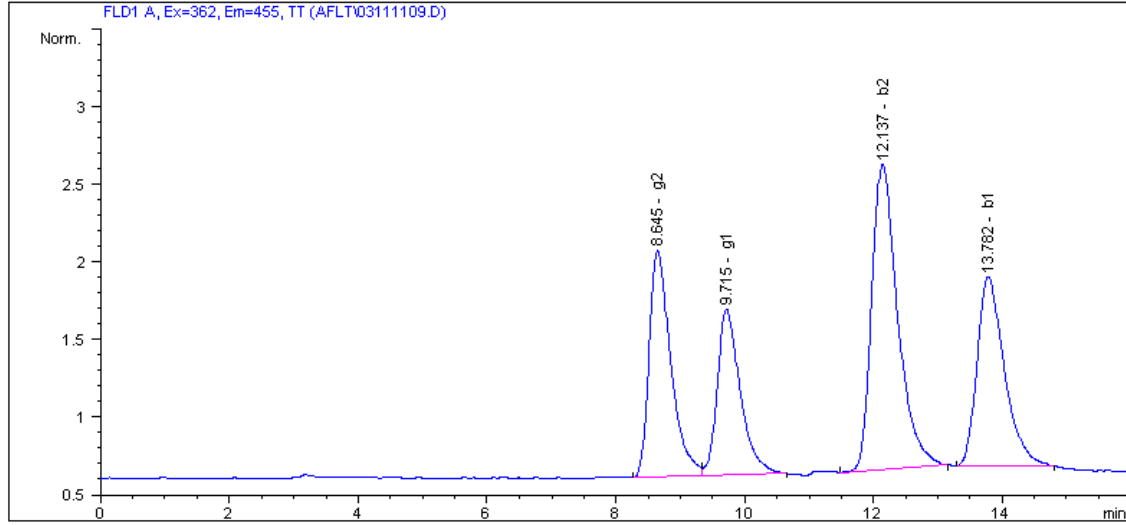
Aflatoksin stok çözeltisinin toplam konsantrasyonu 1000 ng/mL'dir. Stok çözelti 2-8 °C'de buzdolabında muhafaza edilir. Bu koşullarda 3 ay sonra bozunur.

Aflatoksin stok çözeltisinden 250 μ L alınıp 5 mL'ye metanolle tamamlanarak 50 ng/mL'lik ara stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti her çalışma için günlük olarak hazırlanmıştır.

Kalibrasyon çözeltilerinin seyreltilmesi için metanol+su (4+6; v+v) seyreltme çözeltisi hazırlanıp, hacim seyreltme çözeltisi ile her standart 5 mL'ye tamamlandı. Bunlar cihaza ikişer defa enjekte edildi. Standartların hazırlanış şekli tabloda bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Standartların Hazırlanış Şekli

Çalışma Standartı	Stok Çözeltisinden alınan (μ L)	Aflatoksin Standart Çözeltilerinin Son Konsantrasyonu (ng/mL Toplam Aflatoksin)	Herbir toksin (ng/mL)
1	25	0,25	0,0625
2	50	0,5	0,125
3	150	1,5	0,375
4	300	3	0,75
5	500	5	1,25
6	750	7,5	1,875
7	1000	10	2,5



Şekil 2.1. Aflatoksin Standartları Kromatogramı

2.4.4. Deneyin Yapılışı

- ✓ 50 g soya unu ve 5 g sodyum klorür 1000 mL lik ağzı geniş cam kavanoz içine ilave edildi.
- ✓ Üzerine 300 mL metanol+su (8+2) eklenerek 3 dakika yüksek devirde mikser ile karıştırıldı.
- ✓ Karışım Whatman 1820-150 filtre kağıdından süzüldü.
- ✓ İmmuno affinite kolondan 10 mL PBS çözeltisi ile 2-3 mL/dk hız ile geçirildi.
- ✓ 10 mL filtrat, 60 mL PBS çözeltisi ile karıştırılarak seyreltildi ve seyreltilmiş filtrat immuno affinite kolondan geçirildi. (Filtrasyon hızı 2-3 mL/dk olacak ve 5 mL/dk'yı geçmeyecek şekilde ayarlandı.)
- ✓ Bu işlemde sonra 15 mL su ile kolon yıkandı ve yıkama işlemi bittikten sonra kolona hava basılarak kuruması sağlandı. (maksimum 10 sn)
- ✓ 500 µL metanol ile aflatoksinler ekstrakte edildi ve bir dakika beklenerek 750 µL metanol daha ilave edilerek geri kalan aflatoksinler alındı.
- ✓ Kolon üzerinden hava basılıp kolonun içindekilerin tamamı alınarak toplam filtrat 5 mL'lik balonjojede hacme su ile tamamlandı. Filtrat 0,20 mikron filtreden süzülerek vialde alındı ve cihaza enjekte edildi.

2.4.5. Hesaplama

Numunedeki her bir aflatoksin aşağıda belirtildiği gibi hesaplandı.

Aflatoksin konsantrasyonları ng/mL y ekseninde, bunlara karşı gelen pik alan değerleri x ekseninde olacak şekilde lineer regresyon kullanılarak $y=ax+b$ denklemi elde edildi.

Bu denklem yardımı ile numunedeki mevcut aflatoksinlerin konsantrasyonları hesaplandı.

$$y = 3 (ax+b) \quad (2.4)$$

y: Aflatoksin konsantrasyonu

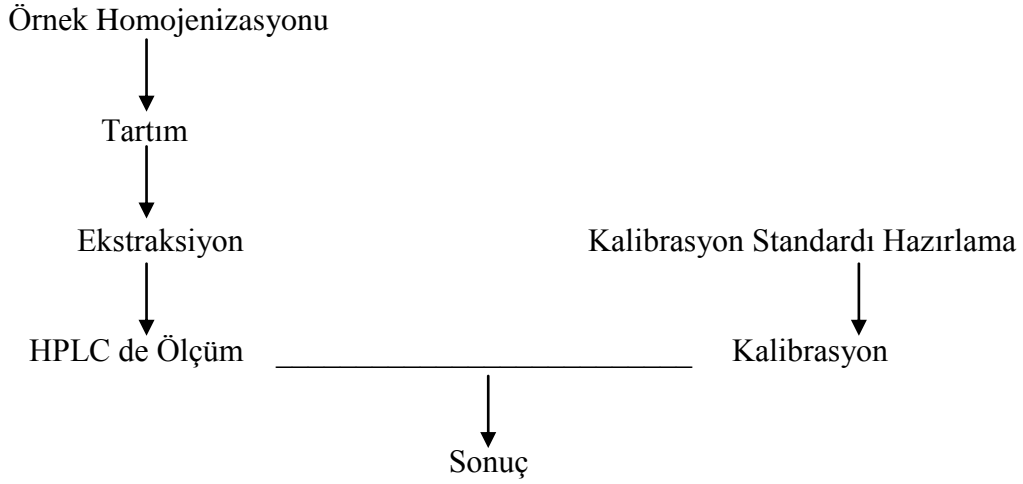
x: Dedektörün algılaması

a: Sabit eğim

b: kalibrasyon eğrisinin y eksenini kestiği değer

Numune hazırlama sonrasında elde edilen çarpan 3'tür.

2.5. Metot Validasyonu



Şekil 2.2. Kimyasal Akış Diyagramı

Metot validasyon parametreleri ve ilgili çalışmalar aşağıda bulunmaktadır.

2.5.1. Minimum Tayin Limiti (LOD) / Minimum Ölçüm Limiti (LOQ)

Bu çalışma için soya unu örneklerine 0,3 ppb seviyesinde aflatoksin ilave edilerek 10 tekrarlı çalışıldı.

LOD Hesaplaması için: Standart Sapma x 3 (2.5)

LOQ Hesaplaması için: Standart Sapma x 10 (2.6)

Formülasyonu ile hesaplama gerçekleştirildi.

2.5.2. Lineer Ölçüm Aralığı

Aşağıdaki tabloda kalibrasyon konsantrasyonları verilmiştir. Lineer ölçüm aralığı 0,2 ppb – 7,5 ppb aralığındadır. Bu aralığın dışında çıkan ölçümlerde numune seyreltilerek kalibrasyon aralığı içine getirilerek ölçüm yapılır.

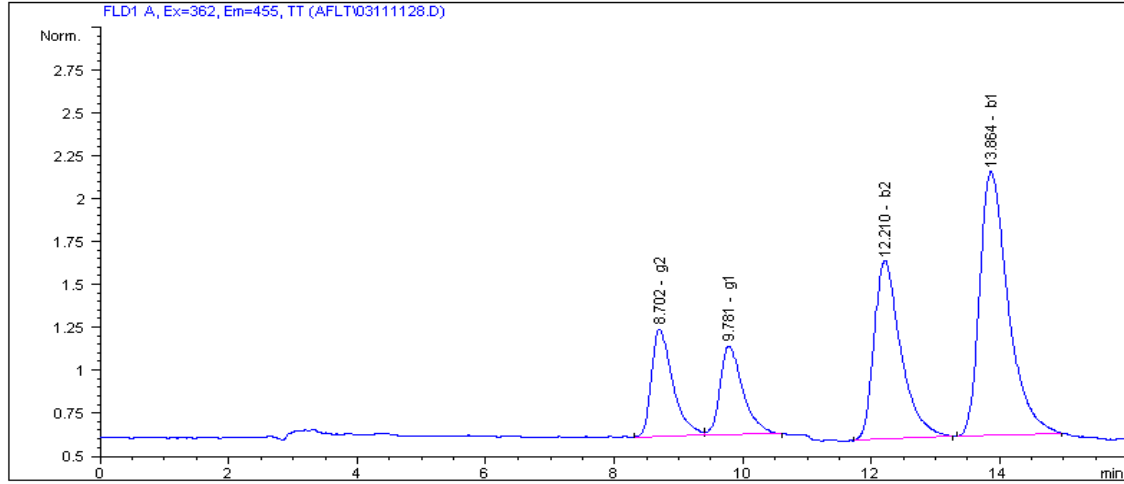
Tablo 2.2. Kalibrasyon Standartları ve Konsantrasyonları

Çalışma Standartı	Aflatoksin B ₁ ng/mL (ppb)
1	0,0625
2	0,125
3	0,375
4	0,75
5	1,25
6	1,875
7	2,5

2.5.3. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması için 3 farklı seviyede aflatoksin ilaveleri yapıldı ve her iki analist için de 10'ar çalışma gerçekleştirildi. Yapılan çalışmaların geri kazanım değerleri hesaplandı.

	Aflatoksin B ₁	Aflatoksin B ₂ , G ₁ , G ₂	Toplam Aflatoksin
1. Seviye :	2,5 ppb	1 ppb	5,5 ppb
2. Seviye :	5 ppb	2 ppb	11 ppb
3. Seviye :	7,5 ppb	2,5 ppb	15 ppb



Şekil 2.3. Aflatoksin İlave Edilmiş Soya Unu Kromatogramı

2.5.4. Kesinlik

2.5.4.1. Tekrarlanabilirlik

Soya ununda aflatoksin tayini için 3 farklı seviyede aflatoksin ilaveleri yapıldı.

	Aflatoksin B ₁	Aflatoksin B ₂ , G ₁ , G ₂	Toplam Aflatoksin
1. Seviye :	2,5 ppb	1 ppb	5,5 ppb
2. Seviye :	5 ppb	2 ppb	11 ppb
3. Seviye :	7,5 ppb	2,5 ppb	15 ppb

Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrarlanabilirlik limiti hesaplamaları için her 2 analist tarafından, her seviye için 2 ayrı seri olacak şekilde 10 ayrı tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. 2 ayrı seride elde edilen geri kazanım değerlerinin farkları saptandı ve bu farkların mutlak değerlerinin tekrarlanabilirlik standart sapmasının 2,83 katından küçük veya eşit olmasına göre uygun olup olmadığı değerlendirildi.

Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

Soya unu matriksinde 3 seviyede tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Standart sapma değerinin ortalama değere oranından RSD ve %RSD değerleri belirlendi. Her seviye için %RSD değerleri, tekrarlanabilirlik için Horwitz değerinden küçük veya eşit olmasına göre uygun olup olmadığı değerlendirildi.

$$\text{Horwitz formülü: } RSD_r = 2^{(1-0,5\log C)} * 0,66 \quad (2.7)$$

Elde edilen geri kazanım değerleri arasında sapan değer olup olmadığını kontrol etmek amacıyla Grubbs' testi uygulandı. Şüpheli değer olarak, çalışan 2 analist için, her çalışma seviyelerindeki en büyük ve en küçük değerler seçildi. Örnek sayısı 10 olduğunda %95 güven aralığında kritik G değeri 2,290'dır. İlgili veriler her seviyedeki çalışmaların altında bulunmaktadır.

2.5.4.2. Tekrarüretilebilirlik

Soya ununda aflatoksin tayini için 3 farklı seviyede aflatoksin ilaveleri yapıldı.

	Aflatoksin B ₁	Aflatoksin B ₂ , G ₁ , G ₂	Toplam Aflatoksin
1. Seviye :	2,5 ppb	1 ppb	5,5 ppb
2. Seviye :	5 ppb	2 ppb	11 ppb
3. Seviye :	7,5 ppb	2,5 ppb	15 ppb

Tekrarüretilebilirlik hesaplamalarını yapabilmek için 10 tekrarlı çalışma yapıldı.

Tekrarüretilebilirlik Limiti

Tekrarüretilebilirlik limiti hesaplamaları için, her seviyede 2 analist tarafından 10 ayrı tekrarüretilebilirlik çalışması yapıldı. 2 analist tarafından elde edilen geri kazanım değerlerinin farkları saptandı ve bu farkların mutlak değerlerinin tekrarüretilebilirlik standart sapmasının 2,83 katından küçük veya eşit olmasına göre uygun olup olmadığı değerlendirildi.

Tekrarüretilebilirlik Çalışmaları

Soya unu matriksinde 3 seviyede tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapıldı. Elde edilen verilerden 2 analistin geri kazanım değerleri arasındaki farkların karelerinin toplamı, çalışma sayısının 2 katına bölünerek karekökü alınıp standart sapma değeri saptandı. Standart sapma değerleri, çalışmaların geri kazanım değerleri ortalamasına bölünerek her seviye için RSD değerleri elde edildi. %RSD değerlerinin tekrarüretilebilirlik için Horwitz değerinden küçük veya eşit olmasına göre uygun olup olmadığı değerlendirildi.

$$\text{Horwitz formülü: } RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (2.8)$$

Elde edilen geri kazanım değerleri arasında sapan değer olup olmadığını kontrol etmek amacıyla Grubbs' testi uygulandı. Şüpheli değer olarak çalışan her bir birey için, her çalışma seviyelerindeki en büyük ve en küçük değerler seçildi. Örnek sayısı 10 olduğunda %95 güven aralığında kritik G değeri 2,290'dır.

2.6. Ölçüm Belirsizliği

2.6.1. Numune Hazırlamadan Gelen Belirsizlik

Numune hazırlama aşamasında tartımdan gelen belirsizlik, kullanılan ölçüm araçlarından kaynaklanan hacim belirsizlikleri ve aflatoksin standartlarının hazırlanması aşamasından gelen belirsizlikler saptandı.

2.6.2. Cihaz Belirsizliği

Cihaz belirsizliğinin tayininde aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ kalibrasyon eğrilerinden yararlanıldı. Kalibrasyon eğrisi 7 seviyede her standartın 3'er defa cihazda analizi ile elde edildi.

2.6.3. Kesinlikten Gelen Belirsizlik

2.6.3.1. Tekrarlanabilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması

Soya unu matriksinde 3 seviyede tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı.

	Aflatoksin B ₁	Aflatoksin B ₂ , G ₁ , G ₂	Toplam Aflatoksin
1. Seviye :	2,5 ppb	1 ppb	5,5 ppb
2. Seviye :	5 ppb	2 ppb	11 ppb
3. Seviye :	7,5 ppb	2,5 ppb	15 ppb

Elde edilen verilerden ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı, standart sapma değerinin ortalama değere oranından RSD değerleri saptandı ve her 2 analist için yapılan çalışma seviyelerindeki tekrarlanabilirlik belirsizlik değerleri hesaplandı.

2.6.3.2. Tekrarüretilebilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması

Soya unu matriksinde 3 seviyede tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapıldı.

	Aflatoksin B ₁	Aflatoksin B ₂ , G ₁ , G ₂	Toplam Aflatoksin
1. Seviye :	2,5 ppb	1 ppb	5,5 ppb
2. Seviye :	5 ppb	2 ppb	11 ppb
3. Seviye :	7,5 ppb	2,5 ppb	15 ppb

Elde edilen verilerden 2 analistin geri kazanım değerleri arasındaki farkların karelerinin toplamı, çalışma sayısının 2 katına bölünerek karekökü alınıp standart sapma değeri saptandı. Standart sapma değerleri çalışmaların geri kazanım değerleri ortalamasına bölünerek her seviye için RSD değerleri elde edildi. Elde edilen RSD değerlerinden tekrarüretilebilirlik için belirsizlik değeri saptandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Aflatoksin Standart Konsantrasyonları

Tarama sonucunda elde edilen absorbands ve konsantrasyon değerleri şöyledir:

K₂Cr₂O₇	A	ε	CF
0,25 mM	0,82	3280	0,963415
0,125 mM	0,406	3248	0,9729906
0,0625 mM	0,202	3232	0,977723
		Ortalama	0,971348

	A	C (µg/mL)
Aflatoksin B₁	0,738	11,58853
Aflatoksin B₂	0,787	11,43036
Aflatoksin G₁	0,554	10,76254
Aflatoksin G₂	0,777	13,61002

3.2. Metot Validasyonu

3.2.1. Minimum Tayin/ Minimum Ölçüm Limiti (LOD/LOQ) Değerleri

Çalışmalar sonucunda tespit edilen LOD ve LOQ değerleri şunlardır:

- ✓ Aflatoksin B₁ için: LOD: 0,07 ppb LOQ: 0,2 ppb (EK 1-Tablo 1)
- ✓ Aflatoksin G₂ için: LOD: 0,05 ppb LOQ: 0,2 ppb (EK 1-Tablo 2)
- ✓ Aflatoksin G₁ için: LOD: 0,07 ppb LOQ: 0,2 ppb (EK 1-Tablo 3)
- ✓ Aflatoksin B₂ için: LOD: 0,07 ppb LOQ: 0,2 ppb (EK 1-Tablo 4)

3.2.2. Geri Kazanım

Yapılan çalışmalar sonucunda her bir çalışma için bulunan ortalama geri kazanım değerleri şöyledir :

- 1. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 5)
 - 1. Analist %GK: 86,3
 - 2. Analist %GK: 90,3
- 1. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 6)
 - 1. Analist %GK: 86,5
 - 2. Analist %GK: 87,1
- 2. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 7)
 - 1. Analist %GK: 83,5
 - 2. Analist %GK: 84,1
- 2. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 8)
 - 1. Analist %GK: 83,5
 - 2. Analist %GK: 84,6
- 3. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 9)
 - 1. Analist %GK: 88,4
 - 2. Analist %GK: 91,7
- 3. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 10)
 - 1. Analist %GK: 87,5
 - 2. Analist %GK: 89,3

3.2.3. Tekrarlanabilirlik Limiti

Değerlendirme sonucunda elde edilen tüm sonuçların uygun olduğu saptandı.

(EK 1,Tablo 11-22)

3.2.4. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

Horwitz testinde çalışma sonuçlarının uygun olduğu görüldü.

Grubbs' testinde hesaplamalar sonucunda elde edilen Gtest değerleri, Gkritik değerinden küçük olduğu için atılması gereken bir değer olmadığı anlaşıldı.

Her çalışma seviyesinde yapılan çalışmalar ve uygulanan testlerin sonuçları aşağıda bulunmaktadır.

- Soya unu Aflatoksin B₁ 2,5 ppb konsantrasyonu tekrarlanabilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 23)

	1. Analist	2. Analist
Ortalama :	2,1573	2,25833
Std Sapma :	0,06582	0,09349
%RSD :	3,05115	4,13997

2,5 ppb için Horwitz değeri: %26,0'dır. Bu sonuca göre tekrarlanabilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	2,2632 – 2,0565
Gtest değerleri :	1,6087 - 1,5308
2. Analist için şüphe edilen değerler :	2,4280 – 2,1198
Gtest değerleri :	1,8144 – 1,4819

- Soya unu Toplam Aflatoksin 5,5 ppb konsantrasyonu tekrarlanabilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 24)

	1. Analist	2. Analist
Ortalama :	4,75752	4,79002
Std Sapma :	0,12961	0,163
%RSD :	2,72429	3,40296

5,5 ppb için Horwitz değeri: %23,1'dir. Bu sonuca göre tekrarlanabilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	4,9436 – 4,5096
Gtest değerleri :	1,4360 - 1,9132
2. Analist için şüphe edilen değerler :	5,0787 – 4,5652
Gtest değerleri :	1,7708 – 1,3796

- Soya unu Aflatoksin B₁ 5 ppb konsantrasyonu tekrarlanabilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 25)

	1. Analist	2. Analist
Ortalama :	4,17289	4,19979
Std Sapma :	0,11435	0,12089
%RSD :	2,74028	2,87844

5 ppb için Horwitz değeri: %23,4'tür. Bu sonuca göre tekrarlanabilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	4,3795 - 4,0156
Gtest değerleri :	1,8072 - 1,3759
2. Analist için şüphe edilen değerler :	4,4160 - 4,0370
Gtest değerleri :	1,7878 - 1,3468

- Soya unu Toplam Aflatoksin 11 ppb konsantrasyonu tekrarlanabilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 26)

	1. Analist	2. Analist
Ortalama :	9,18342	9,31149
Std Sapma :	0,21944	0,20985
%RSD :	2,38954	2,25367

11 ppb için Horwitz değeri: %20,8'dir. Bu sonuca göre tekrarlanabilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	9,6165 - 8,8675
Gtest değerleri :	1,9734 - 1,4398
2. Analist için şüphe edilen değerler :	9,6371 - 8,9913
Gtest değerleri :	1,5516 - 1,5258

- Soya unu Aflatoksin B₁ 7,5 ppb konsantrasyonu tekrarlanabilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 27)

	1. Analist	2. Analist
Ortalama :	6,62841	6,87974
Std Sapma :	0,31498	0,14856
%RSD :	4,75196	2,15934

7,5 ppb için Horwitz değeri: %22,1'dir. Bu sonuca göre tekrarlanabilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	7,0991 – 6,1704
Gtest değerleri :	1,4944 - 1,4540
2. Analist için şüphe edilen değerler :	7,0683 – 6,6209
Gtest değerleri :	1,2695– 1,7426

- Soya unu Toplam Aflatoksin 15 ppb konsantrasyonu tekrarlanabilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 28)

	1. Analist	2. Analist
Ortalama :	13,11988	13,39282
Std Sapma :	0,53258	0,25449
%RSD :	4,05936	1,90023

15 ppb için Horwitz değeri: %19,7'dir. Bu sonuca göre tekrarlanabilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	13,9185 – 12,3308
Gtest değerleri :	1,4996 - 1,4816
2. Analist için şüphe edilen değerler :	13,8337 – 13,0442
Gtest değerleri :	1,7322– 1,3699

3.2.5. Tekrarüretilebilirlik Limiti

Değerlendirme sonucunda elde edilen tüm sonuçların uygun olduğu saptandı.
(EK 1,Tablo 29-34)

3.2.6. Tekrarüretilebilirlik Çalışmaları

Horwitz testinde çalışma sonuçlarının uygun olduğu görüldü.

Grubbs' testinde hesaplamalar sonucunda elde edilen Gtest değerleri Gkritik değerinden küçük olduğu için atılması gereken bir değer olmadığı anlaşıldı.

- Aflatoksin B₁ 2,5 ppb konsantrasyonu tekrarüretilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 35)

Ortalama :	2,28038
Std Sapma :	0,13598
%RSD :	5,96326

2,5 ppb için Horwitz değeri: %39,4'tür. Bu sonuca göre tekrarüretilebilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	2,4302 – 2,1102
Gtest değerleri :	1,9177 - 1,1116
2. Analist için şüphe edilen değerler :	2,5815 – 2,0875
Gtest değerleri :	1,4055– 1,3901

- Toplam Aflatoksin 5,5 ppb konsantrasyonu tekrarüretilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 36)

Ortalama :	4,95441
Std Sapma :	0,27989
%RSD :	5,63095

5,5 ppb için Horwitz değeri: %35,0'dir. Bu sonuca göre tekrarüretilebilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	5,3050 – 4,5964
Gtest değerleri :	2,0028 - 1,1804
2. Analist için şüphe edilen değerler :	5,7908 – 4,5959
Gtest değerleri :	2,0331– 1,2448

- Aflatoxin B₁ 5 ppb konsantrasyonu tekrarüretilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 37)

Ortalama :	4,41029
Std Sapma :	0,20474
%RSD :	4,64232

5 ppb için Horwitz değeri: %35,5'dir. Bu sonuca göre tekrarüretilebilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	5,2169 – 3,9801
Gtest değerleri :	2,0216 - 1,1496
2. Analist için şüphe edilen değerler :	4,7710 – 3,9646
Gtest değerleri :	1,4393– 1,6247

- Toplam Aflatoxin 11 ppb konsantrasyonu tekrarüretilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1-Tablo 38)

Ortalama :	9,60037
Std Sapma :	0,30758
%RSD :	3,20380

11 ppb için Horwitz değeri: %31,5'dir. Bu sonuca göre tekrarüretilebilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler :	10,7103 – 8,9834
Gtest değerleri :	2,0129 - 1,0220
2. Analist için şüphe edilen değerler :	10,1345 – 9,0817
Gtest değerleri :	1,3809– 1,5347

- Aflatoksin B₁ 7,5 ppb konsantrasyonu tekrarüretilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (Ek 1-Tablo 39)

Ortalama : 6,99965
Std Sapma : 0,33484
%RSD : 4,78370

7,5 ppb için Horwitz değeri: %33,4'tür. Bu sonuca göre tekrarüretilebilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler : 7,4212 – 6,4810
Gtest değerleri : 2,1034 - 1,3148
2. Analist için şüphe edilen değerler : 7,4396 – 6,9065
Gtest değerleri : 1,5210– 1,3447

- Toplam Aflatoksin 15 ppb konsantrasyonu tekrarüretilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen değerler : (EK 1 , Tablo 40)

Ortalama : 13,62146
Std Sapma : 0,35795
%RSD : 2,62783

15 ppb için Horwitz değeri: %30,1'dir. Bu sonuca göre tekrarüretilebilirlik sonuçları uygundur.

Grubbs' Testi:

1. Analist için şüphe edilen değerler : 14,3394 – 12,9154
Gtest değerleri : 1,8146 - 1,2162
2. Analist için şüphe edilen değerler : 14,0390 – 13,4175
Gtest değerleri : 1,0229 – 1,2244

3.3. Ölçüm Belirsizliği

3.3.1. Numune Hazırlamadan Gelen Belirsizlik

Tablo 3.1. Tartım belirsizliği

Tartım Belirsizliği				
Belirsizlik bileşeni	Değer(X)	Dağılım	Faktör	u(X)
Kalibrasyon (mg)	0,1	Normal	2	0,05

Tablo 3.2. Hacim Belirsizliği

100 mL mezür				
Belirsizlik bileşeni	Değer(X)	Dağılım	Faktör	u(X)
Sertifika (+/-0.5 mL)	0,5	Normal	2,00	0,250

250 mL mezür				
Belirsizlik bileşeni	Değer(X)	Dağılım	Faktör	u(X)
Sertifika (+/-1 mL)	1	Normal	2,00	0,50

10 mL pipet				
Belirsizlik bileşeni	Değer(X)	Dağılım	Faktör	u(X)
Sertifika (+/-0.015 mL)	0,02	Normal	2,00	0,010

5 mL Balonjoje				
Belirsizlik bileşeni	Değer(X)	Dağılım	Faktör	u(X)
Sertifika (+/-0.025 mL)	0,025	Normal	2,00	0,013

Tablo 3.3. Standart Hazırlamadan Gelen Belirsizlik

5 mL Balonjoje		Sıcaklık oynama aralığı		5 °C
Belirsizlik bileşeni	Değer(X)	Dağılım	Faktör	u(X)
Sertifika (+/-0.025 mL)	0,025	Normal	2,00	0,013

B1 Standartı	
Belirsizlik bileşeni	u(X)
Standart Sertifika	0,024

B2 Standartı	
Belirsizlik bileşeni	u(X)
Standart Sertifika	0,016

G1 Standartı	
Belirsizlik bileşeni	u(X)
Standart Sertifika	0,032

G2 Standartı	
Belirsizlik bileşeni	u(X)
Standart Sertifika	0,020

1 mL Mikropipet		Sıcaklık oynama aralığı		5 °C
Belirsizlik bileşeni	Değer(X)	Dağılım	Faktör	u(X)
Kalibrasyon (+/-0.06 mL)	0,06	Normal	2,00	0,03

3.3.2. Cihaz Belirsizliği

Cihaz belirsizliğinin tayininde aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ kalibrasyon eğrilerinden yararlanıldı. Aşağıdaki denklemden yararlanılarak hesaplamalar yapıldı ve her bir kalibrasyon eğrisinden kaynaklı belirsizlik değerleri elde edildi.

$$U(c_0) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}} \quad (3.1)$$

- s : Standart Sapma
B₁ : Eğim
p : Örnek ölçümü için tekrar sayısı
n : Kalibrasyon için yapılan ölçüm sayısı

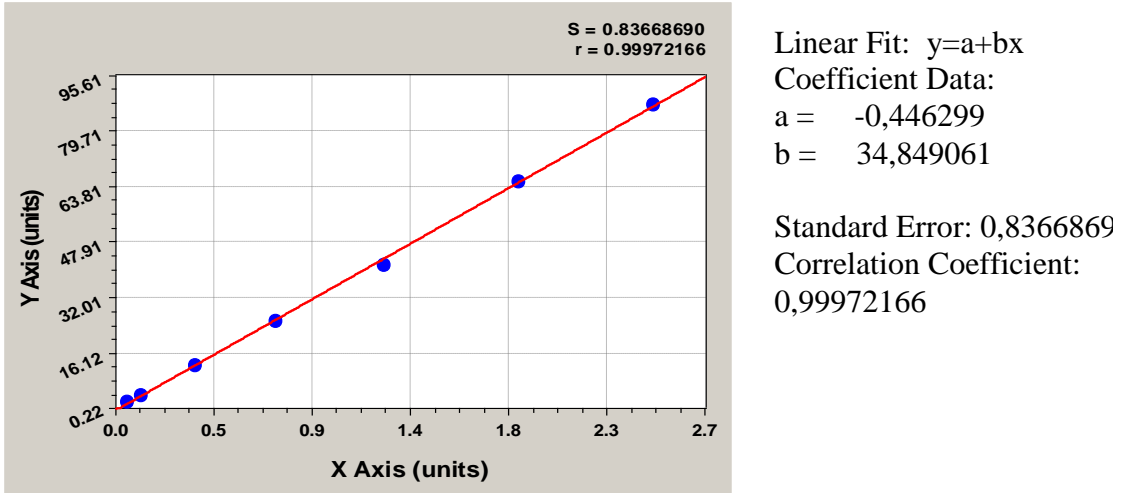
- c_0 :Tayin edilen çözelti derişimi (0,75 ppb)
 c :Farklı kalibrasyon standartlarının ortalaması

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 \quad (3.2)$$

- S_{xx} : Konsantrasyonlar arasındaki sapmaların toplamı
 i : Kalibrasyon standartını gösteren indis
 c_i : Kalibrasyon eğrisinden hesaplanan ölçüm sonucu

3.3.2.1. Aflatoksin B₁ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği

Aflatoksin B₁ için kalibrasyon eğrisi aşağıdaki şekilde görülebilir, hesaplamada kullanılan değerler aşağıda verilmiştir.

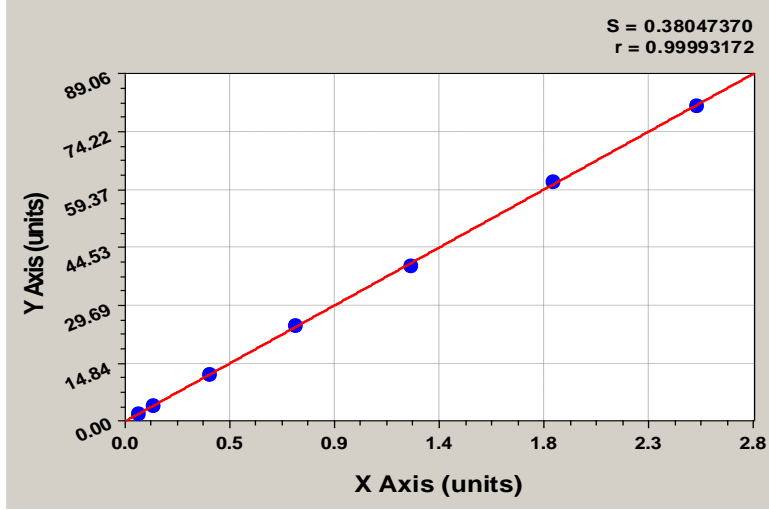


Şekil 3.1. Aflatoksin B₁ Kalibrasyon Eğrisi

Aflatoksin B₁ Kalibrasyon Belirsizliği= 0,0093 (Ek 1,Tablo 46-47)

3.3.2.2. Aflatoksin G₂ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği

Aflatoksin G₂ için kalibrasyon eğrisi aşağıdaki şekilde görülebilir, hesaplamada kullanılan değerler aşağıda verilmiştir.



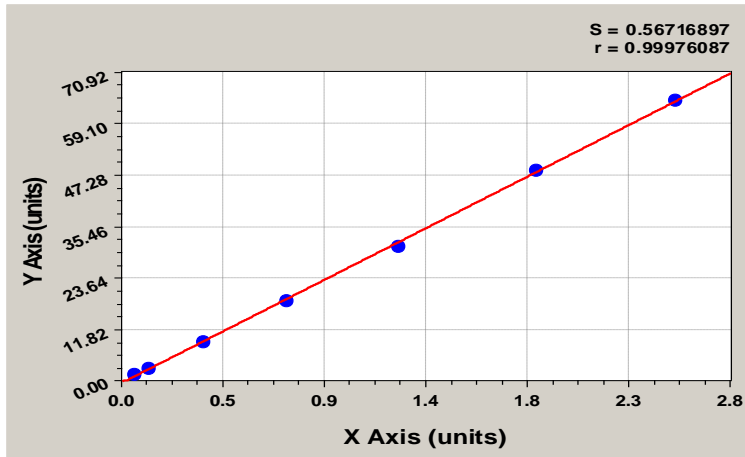
Linear Fit: $y=a+bx$
Coefficient Data:
a = -
0.046055917
b = 32.462183
Standard Error:
0,38047370
Correlation Coefficient:
0,99993172

Şekil 3.2. Aflatoksin G₂ Kalibrasyon Eğrisi

Aflatoksin G₂ Kalibrasyon Belirsizliği= 0,0046 (Ek 1,Tablo 48-49)

3.3.2.3. Aflatoksin G₁ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği

Aflatoksin G₁ için kalibrasyon eğrisi aşağıdaki şekilde görülebilir, hesaplamada kullanılan değerler aşağıda verilmiştir.



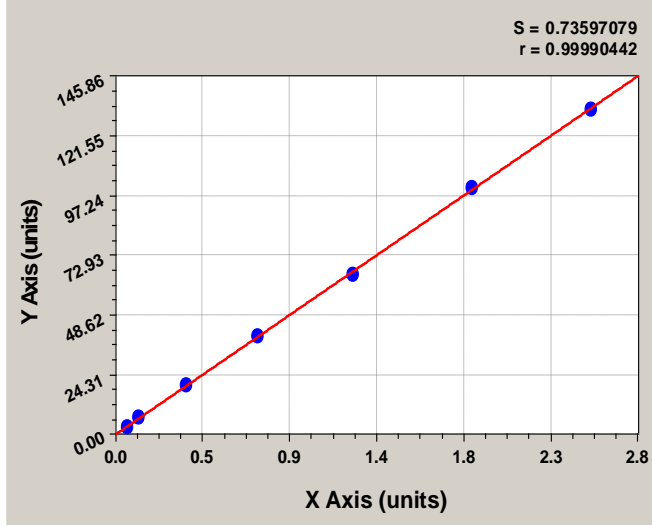
Linear Fit: $y=a+bx$
Coefficient Data:
a = -0.48523665
b = 25.855333
Standard Error:
0,56716816897
Correlation Coefficient:
0,99976087

Şekil 3.3. Aflatoksin G₁ Kalibrasyon Eğrisi

Aflatoksin G₁ Kalibrasyon Belirsizliği= 0,0085 (EK 1,Tablo 50-51)

3.3.2.4. Aflatoksin B₂ Kalibrasyon Eğrisi Belirsizliği

Aflatoksin B₂ için kalibrasyon eğrisi aşağıdaki şekilde görülebilir, hesaplamada kullanılan değerler aşağıda verilmiştir.



Linear Fit: $y=a+bx$

Coefficient Data:

a = 0.054636176

b = 53.07292

Standard Error:

0,73597079

Correlation Coefficient:

0,99990442

Şekil 3.4. Aflatoksin B₂ Kalibrasyon Eğrisi

Aflatoksin B₂ Kalibrasyon Belirsizliği= 0,0054 (EK 1,Tablo 52-53)

3.3.3. Kesinlikten Gelen Belirsizlik

3.3.3.1. Tekrarlanabilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması

- 1. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 23)
 1. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,031
 2. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,041
- 1. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 24)
 1. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,027
 2. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,034
- 2. Seviye Aflatoksin B₁ : (Ek 1-Tablo 25)
 1. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,027
 2. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,029

2. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 26)

1. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,024

2. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,022

• 3. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 27)

1. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,048

2. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,022

3. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 28)

1. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,041

2. Analistin tekrarlanabilirlik belirsizliği: 0,019

3.3.3.2. Tekrarüretilebilirlikten Gelen Belirsizliğin Hesaplanması

• 1. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 35)

Tekrarüretilebilirlik belirsizliği: 0,060

1. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 36)

Tekrarüretilebilirlik belirsizliği: 0,056

• 2. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 37)

Tekrarüretilebilirlik belirsizliği: 0,046

2. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 38)

Tekrarüretilebilirlik belirsizliği: 0,032

• 3. Seviye Aflatoksin B₁ : (EK 1-Tablo 39)

Tekrarüretilebilirlik belirsizliği: 0,048

3. Seviye Toplam Aflatoksin : (EK 1-Tablo 40)

Tekrarüretilebilirlik belirsizliği: 0,026

3.3.4. Birleşik Belirsizliğin Hesaplanması

Tablo 3.4. Birleşik Belirsizliğin Hesaplanması

Bileşen		Değer	Std. Belirsizlik	Relatif Std. Belirsizlik
Numune Hazırlama	Tartım	50	0,05	0,001
	10 mL Pipet	10	0,01	0,001
	5 mL Balonjoje	5	0,013	0,003
	100 mL mezür	100	0,250	0,003
	250 mL mezür	250	0,5	0,002
Standart Hazırlama	B1 standartı	1	0,024	0,024
	B2 standartı	1	0,016	0,016
	G1 standartı	1	0,032	0,032
	G2 standartı	1	0,02	0,02
	Toplam standart	1	0,047	0,047
	5 mL Balonjoje	5	0,013	0,003
	1 mL mikropipet	1	0,03	0,03
Kalibrasyon	G2	1	0,0046	0,0046
	G1	1	0,0085	0,0085
	B2	1	0,0054	0,0054
	B1	1	0,0093	0,0093
	G2+G1+B2+B1	1	0,0145	0,0145
Tekrarlanabilirlik B1	1. Analist	1	0,0475	0,0475
	2. Analist	1	0,0414	0,0414
Tekrarlanabilirlik (Toplam)	1. Analist	1	0,0406	0,0406
	2. Analist	1	0,034	0,034
Tekrarüretilebilirlik	B1	1	0,060	0,060
	Toplam	1	0,056	0,056
Toplam Belirsizlik B1	1. Analist	1	0,086	0,086
	2. Analist	1	0,083	0,083
Toplam Belirsizlik (Toplam Aflatoksin)	1. Analist	1	0,091	0,091
	2. Analist	1	0,088	0,088

Tablo 3.5. Kullanılacak Birleşik Belirsizlik miktarı

B₁	1. Analist	2. Analist	Alınacak Belirsizlik Miktarı
Soya Unu	0,086	0,083	0,086

Toplam Aflatoksin	1. Analist	2. Analist	Alınacak Belirsizlik Miktarı
Soya Unu	0,091	0,088	0,091

3.3.5. Genişletilmiş Belirsizliğin Hesaplanması

Genişletilmiş belirsizlik (U_{top}) = Toplam standart belirsizlik (u_{top}) x k (3.3)

- Aflatoksin B₁ için alınacak genişletilmiş belirsizlik k=2 (%95 güvenilirlik sınırı için)

$$0,086 \times 2 = \mathbf{0,172}$$
 dir.

Örneğin soya unu numunesinde analiz sonucunda aflatoksin B₁ miktarı 5 ppb bulunmuş ise buradan genişletilmiş belirsizlik;

Aflatoksin B₁ belirsizliği = 5 x 0,172= 0,86'dır. Bu sonuç raporlanırken genişletilmiş ölçüm belirsizliği şeklinde verilir; Aflatoksin B₁ = 5 ± 0,86 ppb (%95 güven aralığında k=2)

- Toplam aflatoksin için alınacak genişletilmiş belirsizlik k=2 (%95 güvenilirlik sınırı için)

$$0,091 \times 2 = \mathbf{0,182}$$
 dir.

Örneğin soya unu numunesinde analiz sonucunda toplam aflatoksin miktarı 5 ppb bulunmuş ise buradan genişletilmiş belirsizlik;

Toplam aflatoksin belirsizliği= 5 x 0,182= 0,91'dir. Bu sonuç raporlanırken genişletilmiş ölçüm belirsizliği şeklinde verilir; Toplam aflatoksin= 5 ± 0,91 ppb (%95 güven aralığında k=2)

3.4. Tartışma

Soya ununda aflatoksin tayinine dair daha evvel HPLC kullanımına dayalı resmi bir başka metot bulunmadı. Önceki çalışmalar incelendiğinde, kullanılan metotların çoğunlukla TLC kullanımına dayalı olduğu ve ekstraksiyonda kloroformun tercih edildiği görüldü. Kloroformun kanserojen bir çözücü olması ve ayrıca geliştirilmek istenen metodun HPLC kullanımına yönelik olması istendiğinden dolayı, ekstraksiyon çözültüsü kloroform olmayan ve ayrıca tayinde TLC kullanımına dayalı olmayan bir metot geliştirilmek istendi.

Bu amaçla resmi metotlardan soyada aflatoksin tayini olarak verilen VICAM'ın metodunda belirtilmiş ekstraksiyon yöntemi denendi. Ancak üzerinde çalışma yapılan soya unu tüm çözültüyü içine çektiğinden dolayı ekstraksiyon gerçekleştirilemedi ve metot geçersiz kılındı.

R-Biopharm'ın immuno affinite kolon kullanımına dayalı, buğdayda aflatoksin tayini için olan metodu soya unundan aflatoksini ekstrakte edebilmek için denendi ancak geri kazanım oranları Türk Gıda Kodeksi Mevzuatı'nda belirtilen resmi limitler içerisinde olmadığından dolayı bu metot yapılacak çalışmaya uygun bulunmadı.

Daha sonraki çalışmada AOAC Official Method 999.07'de belirtilen kuru incir için ekstraksiyon yöntemi denendi. Belirtilen 3 seviyede geri kazanım çalışmaları yapıldı ve elde edilen geri kazanım sonuçlarının resmi limitler içerisinde olduğu saptanınca geliştirilecek metot olarak seçildi.

Metodun validasyon ve ölçüm belirsizliğinin saptanmasında soya ununa dair piyasada CRM numunesi bulunmadığından dolayı, çalışmalar geri kazanım ile gerçekleştirildi.

Metodun minimum tayin limiti ve minimum ölçüm limitlerinin saptanması için çeşitli seviyelerde geri kazanım çalışmaları yapıldı. Çalışmalarda tebliğde izin verilen limitlere uygun geri kazanımın sağlandığı seviye (geri kazanım oranı aflatoksin ilave miktarı 1 ppb'den küçükse %50-120 aralığında olmalıdır esasını sağlayan seviye) LOD/LOQ hesaplamalarında kullanıldı.

Validasyon çalışmalarında geri kazanım seviyelerinde yine resmi limitin 0.5, 1 ve 1.5 katı olacak şekilde 3 seviyede çalışmalar gerçekleştirildi. Elde edilen geri kazanım sonuçları arasında atılacak bir değer bulunup bulunmadığı Grubbs' testi ile denendi,

Çalışma sonuçları Horwitz testi ile kontrol edildi, validasyona dair tüm parametreler hesaplandı ve metot validasyonu gerçekleştirildi.

Metodun lm belirsizliği hesaplanmasında ise standart hazırlamadan gelen belirsizlik, numune hazırlamadan gelen belirsizlik, kalibrasyondan gelen belirsizlik, tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik, tekrarretilirlikten gelen belirsizlik saptanarak aflatoksin B₁ ve toplam aflatoksin için ölüm belirsizliği saptandı, sonrasında genişletilmiş belirsizlik tayin edildi.

4. SONUÇLAR

Soya ununda aflatoksin tayini için HPLC kullanımına dayalı bir metot geliştirildi. Metotta ekstraksiyon için kullanılan çözelti metanol+su (8+2) olarak seçildi. Özel sektörde TLC yerine kullanımı daha çok tercih edilen HPLC kullanımına dayalı bu metot sayesinde analizler daha hızlı ve kolay şekilde gerçekleştirilebilecektir.

Metodun minimum tayin limiti ve minimum ölçüm limiti değerlerini saptamak için 0,3 ppb seviyesinde geri kazanım çalışmaları yapıldı ve elde edilen geri kazanım değerleri %50-120 aralığında bulundu. Bu geri kazanım sonuçlarından yararlanılarak aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ için minimum tayin limiti 0,1 ppb ve minimum ölçüm limiti 0,2 ppb olarak saptandı.

Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmalarında elde edilen geri kazanım değerleri tebliğde belirtilen resmi limitler içerisinde elde edildi. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik için yapılan her bir geri kazanım çalışmasının uygunluğu çalışmaların standart sapmalarından hesaplanan tekrarlanabilirlik limitleri ve tekrarüretilebilirlik limitlerine göre değerlendirildi.

Tekrarlanabilirlik için %RSD aralığı; aflatoksin B₁ için %2,2-4,8 ve toplam aflatoksin için %1,9-4,1 olarak belirlendi. Tekrarüretilebilirlik için ise %RSD aralığı aflatoksin B₁ için %4,6-6,0 ve toplam aflatoksin için %2,6-5,6 olarak belirlendi.

Grubbs testi ile geri kazanım sonuçları arasında dışlanan değer olmadığı belirlendi ve Horwitz testi ile de tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmalarının uygun olduğu görüldü. Bu çalışmalar sonucunda metodun validasyonu tamamlandı.

Ölçüm belirsizliği hesaplamalarında belirsizliğe katkısı olan tüm parametreler dikkate alınarak birleşik belirsizlik hesaplandı ve aflatoksin B₁ için 0,086 ppb, toplam aflatoksin için 0,091 ppb olarak bulundu. Bu değerlerin 2 katı alınarak genişletilmiş belirsizlik hesaplandı ve aflatoksin B₁ için 0,172 ppb ve toplam aflatoksin için 0,182 ppb olarak tayin edildi.

Çalışmalar sonucunda soya ununda aflatoksin tayini, metot validasyonu ve ölçüm belirsizliğinin saptanması gerçekleştirildi.

KAYNAKLAR

- [1] Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B. (1996) Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens, International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1st Edition., London, England, 511
- [2] Stroka, J.; Anklam, E. (2002) New Strategies for the Screening and Determination of Aflatoxins and the Detection of Aflatoxin-Producing Moulds in Food and Feed, Trends in Analytical Chemistry, 21(2), 90-94
- [3] Bakırcı, İ. (1995) Sütlerde Aflatoksin M1 Oluşumu ve Ürünlere Geçiş Üzerinde Bir Araştırma. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye, 2
- [4] Yurdun, T., Keskin, Y., Başkaya, R., Karlı, S., Özyaral, O. (2009) Detection of Aflatoxin in Human Breast Milk and Raw Cow's Milk in İstanbul. Turkey. Journal of Food Protection, 72 (4), 885
- [5] Topal, Ş. (1996) Gıda Güvenliği ve Kalite Yönetim Sistemleri. TÜBİTAK-MAM Matbaası, Gebze, Kocaeli, 225
- [6] Betina, V. (1984) Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification. Elsevier, 528
- [7] Özkaya, Ş. (2001) Ülkemizde Aflatoksin Sorunu Yaşanan Bazı Gıdalarda Aflatoksin B1'in Azaltılması veya Giderilmesinde *Flavobacterium aurantiacum*'un Etkinliğinin Araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 1-10
- [8] Anaç ,H., Ertürk, Y.E. (2003) Soya Fasulyesi. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Bakış, 2 (6) , Ankara, 1-4
- [9] Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma , Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri (2011/32) Tebliği. <http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/2011-32.html> 14 Mart 2012.
- [10] T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Teşkilatlandırma Genel Müdürlüğü, (2011) 2010 yılı Soya Fasulyesi Raporu, Mart Ayı, 2-6
- [11] Öner, T. (2006) Soya Sektör Raporu. İstatistik Şubesi, 8-9
- [12] Duman, A.D. (2001) Kahramanmaraş ve Şanlıurfa Tipi Kırımızı Pul Biber İşleme Tekniklerinin Küf Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumu Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 16-20

- [13] Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A., (1961) Toxicity Associated With Certain Samples of Groundnuts. *Nature* 192, 1096-1097
- [14] Hazır, Z. (1996) Farklı Bölgelerde Yetiştirilen ve Farklı Yöntemlerle Kurutulan Kırmızıbiberlerde Aflatoksin Düzeyinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, Türkiye, 3-4
- [15] Yıldırım, G. (1997) Mikotoksinlerin İnsan ve Hayvan Sağlığına Etkileri. İstanbul İl Kontrol Müdürlüğü Yayınları, İstanbul, Türkiye 6-8
- [16] Erkahveci, A. (1996) Kırmızı Toz Biberlerde Aflatoksin Miktarı Tayininde Kullanılabilecek 3 Farklı Analiz Metodunun Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye 7 -8
- [17] Betina, V. (1989) *Mycotoxins Chemical, Biological and Enviromental Aspects*. Elsevier, 437
- [18] Bullerman, L.B. (1979) Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health. *Journal of Food Protection*, 42 (1) 65-86
- [19] Groopman, J.D., Kensler, T.W. (1988) Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer. *CRC Critical Review in Toxicology*, 19(2), 113-145
- [20] World Health Organization, (1979) *Enviromental Health Criteria 11, Mycotoxins*, Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>, 05 Mayıs 2012.
- [21] Yuan, L., Naoki, H. (2004) Analysis of Aflatoxins by High Performance Liquid Chromatography with Post-Column Bromination. SHIMATZU Application Report, AD-0012-LC
- [22] Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 29.12.2011-28157. http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/kodeks_yonetmelik/bulasanlar_yonetmelik.html, 12 Mayıs 2012.
- [23] Holcomb, M., Wilson, D.M., Trucksess, M.W., Thompson, H.C. (1992) Determination of Aflatoxins in Food Products by Chromatography. *Journal Of Chromatography*, 624, 341-352
- [24] Kok W.Th. (1994) Derivatization Reactions for the Determination of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 127-137

- [25] Shotwell, O.L., Stubblefield, R.D. (1972) Collaborative Study of the Determination of Aflatoxin in Corn and Soybeans. *Journal of The AOAC*, 55(4), 781-788
- [26] Bean, G.A., Schillinger, J.A., Klarman, W.L. (1972) Occurrence of Aflatoxins and Aflatoxin-Producing Strains of *Aspergillus* spp. In Soybeans. *Applied Microbiology*, 24(3), 437-439
- [27] Shotwell, O.L., Vandegrift, E.E., Hesseltine C.W. (1978) Aflatoxin Formation on Sixteen Soybean Varieties. *J. Association of Official Analytical Chemists*, 61(3), 574-577
- [28] Stössel, P., (1986) Aflatoxin Contamination in Soybeans: Role of Proteinase Inhibitors, Zinc Availability, and Seed Coat Integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(1), 68-72
- [29] Latimer, G.W. (2012) "AOAC Official Method 972.27 Aflatoxins in Soybeans" *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 19th Edition, Volume 2, USA, Chapter 49, 30
- [30] VICAM Science Technology, (1999) *Aflatest Instruction Manual*. 36-37
[http://biotic.sg1001.myweb.hinet.net/index.files/GN-MC9508-5%20\(AflaTest\).pdf](http://biotic.sg1001.myweb.hinet.net/index.files/GN-MC9508-5%20(AflaTest).pdf) 03 Aralık 2011.
- [31] Cleveland, T.E., Carter-Wientjes, C.H., De Lucca, A.J., Boue, S.M. (2009) Effect of Soybean Volatile Compounds on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production. *Journal of Food Science- Health*, 74(2), 83-87
- [32] Guidelines for Validation of Analytical Methods for Non-Agricultural Pesticide Active Ingredients and Products. Biocides and Pesticides Unit Room ,Bootle Merseyside, 4. <http://www.hse.gov.uk/biocides/copr/pdfs/validation.pdf> 10 Haziran 2012.
- [33] Akdağ, İ. (2004) *Metot Validasyonu, Ölçüm Belirsizliği ve Önemi*. TÜBİTAK ÜME, ANKARA, 6
- [34] Yılmaz, A. (2007) *Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu ve Verifikasyonu*. *Turklab Rehber* 1, 5-30
- [35] De Bievre, P., Böttger, D., Eastwood, C. et al. (1998) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. *Eurochem Guide*, 10-37 <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>

10 Nisan 2012.

[36] Miller, J.N., Miller, J.C. (2000) Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry., Forth Edition, Lab Quality, England, 54-60

[37] Yücel, D. (2005) Ölçüm Belirsizliği ve Laboratuvar. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ANKARA, 1.

<http://tr.scribd.com/doc/75951845/OlcumBelirsizligi> 5 Ocak 2012.

[38] Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A. (2000) Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM / CITAC Guide CG 4, Second Edition, 4-28

<http://www.measurementuncertainty.org/mu/QUAM2000-1.pdf> 20 Ocak 2012.

[39] Latimer, G.W. (2012) “AOAC Official Method 970.44 Preparation of Standarts of Aflatoxins” Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Edition, Volume 2, USA, Chapter 49, 3-4

[40] Latimer, G.W. (2012) “AOAC Official Method 971.22 Standarts for Aflatoxins” Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Edition, Volume 2, USA, Chapter 49, 4-5

[41] R-Biopharm, (1998) “Wheat Extraction Method For Aflatoxin, Zearalenone And Ochratoxin A” Ref No: A1.V1

[42] Latimer, G.W. (2012) “AOAC Official Method 999.07 Aflatoxin B₁ And Total Aflatoxin in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder” Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Edition, Volume 2, USA, Chapter 49, 34-37

EKLER

EK 1

EK 1-Tablo 1 1. Analist ve 2. Analistin Aflatoksin B₁ LOD / LOQ Çalışma Sonuçları

0,3 ppb	Soya Unu			
Tekrar Sayısı	1. Analist	%GK	2. Analist	%GK
1	0,31905	106,4	0,33152	110,5
2	0,30498	101,7	0,30816	102,7
3	0,27088	90,3	0,33365	111,2
4	0,26877	89,6	0,31552	105,2
5	0,27746	92,5	0,30328	101,1
6	0,32220	107,4	0,33770	112,6
7	0,29179	97,3	0,33430	111,4
8	0,28496	95,0	0,30954	103,2
9	0,30663	102,2	0,32511	108,4
10	0,32866	109,6	0,34483	114,9
Ortalama	0,29754		0,32436	
Std.Sapma	0,02188		0,01429	
LOD	0,07		0,04	
LOQ	0,2		0,1	

EK 1-Tablo 2 1. Analist ve 2. Analistin Aflatoksin G₂ LOD / LOQ Çalışma Sonuçları

0,3 ppb	Soya Unu			
Tekrar Sayısı	1. Analist	%GK	2. Analist	%GK
1	0,21261	70,9	0,21896	73,0
2	0,21495	71,7	0,21968	73,2
3	0,16577	55,3	0,23031	76,8
4	0,17639	58,8	0,19650	65,5
5	0,19448	64,8	0,20069	66,9
6	0,19978	66,6	0,22488	75,0
7	0,19470	64,9	0,21343	71,1
8	0,18470	61,6	0,20462	68,2
9	0,19659	65,5	0,23955	79,9
10	0,20812	69,4	0,23820	79,4
Ortalama	0,19481		0,21868	
Std.Sapma	0,01568		0,01503	
LOD	0,05		0,05	
LOQ	0,2		0,2	

EK 1-Tablo 3 1. Analist ve 2. Analistin Aflatoksin G₁ LOD / LOQ Çalışma Sonuçları

0,3 ppb	Soya Unu			
Tekrar Sayısı	1. Analist	%GK	2. Analist	%GK
1	0,34802	116,0	0,33886	113,0
2	0,33195	110,7	0,33661	112,2
3	0,32832	109,4	0,34381	114,6
4	0,26452	88,2	0,33984	113,3
5	0,31496	105,0	0,30504	101,7
6	0,32494	108,3	0,33905	113,0
7	0,31751	105,8	0,33834	112,8
8	0,33085	110,3	0,33699	112,3
9	0,33470	111,6	0,32546	108,5
10	0,34236	114,1	0,30911	103,0
Ortalama	0,32381		0,33131	
Std.Sapma	0,02314		0,01363	
LOD	0,07		0,04	
LOQ	0,2		0,1	

EK 1-Tablo 4 1. Analist ve 2. Analistin Aflatoksin B₂ LOD / LOQ Çalışma Sonuçları

0,3 ppb	Soya Unu			
Tekrar Sayısı	1. Analist	%GK	2. Analist	%GK
1	0,28832	96,1	0,30233	100,8
2	0,29757	99,2	0,34532	115,1
3	0,23840	79,5	0,30358	101,2
4	0,27834	92,8	0,27429	91,4
5	0,25847	86,2	0,27879	92,9
6	0,28138	93,8	0,32939	109,8
7	0,27728	92,4	0,32253	107,5
8	0,26925	89,8	0,32828	109,4
9	0,27966	93,2	0,31927	106,4
10	0,29666	98,9	0,33078	110,3
Ortalama	0,27653		0,31346	
Std.Sapma	0,01782		0,02324	
LOD	0,05		0,07	
LOQ	0,2		0,2	

EK 1-Tablo 5 Aflatoksin B₁ 2,5 ppb Konsantrasyonundaki Geri Kazanım Çalışmaları

Tekrar Sayısı	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	2,11017	84,4	2,30729	92,3
2	2,13588	85,4	2,25536	90,2
3	2,13042	85,2	2,42797	97,1
4	2,11096	84,4	2,30538	92,2
5	2,13582	85,4	2,16144	86,5
6	2,17225	86,9	2,18938	87,6
7	2,25281	90,1	2,35773	94,3
8	2,20496	88,2	2,24349	89,7
9	2,26319	90,5	2,11978	84,8
10	2,05654	82,3	2,21549	88,6
Ortalama		86,3		90,3
Laboratuvar Geri Kazanım Oranı		88,3		

EK 1-Tablo 6 Toplam Aflatoksin 5,5 ppb Konsantrasyonundaki Geri Kazanım Çalışmaları

Tekrar Sayısı	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	4,59642	83,6	4,92260	89,5
2	4,75582	86,5	4,71205	85,7
3	4,69576	85,4	5,07866	92,3
4	4,77149	86,8	4,85912	88,3
5	4,82402	87,7	4,56515	83,0
6	4,77284	86,8	4,76465	86,6
7	4,88652	88,8	4,95031	90,0
8	4,81916	87,6	4,76678	86,7
9	4,94364	89,9	4,58951	83,4
10	4,50956	82,0	4,69135	85,3
Ortalama		86,5		87,1
Laboratuvar Geri Kazanım Oranı		86,8		

EK 1-Tablo 7 Aflatoksin B₁ 5 ppb Konsantrasyonundaki Geri Kazanım Çalışmaları

Tekrar Sayısı	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	4,16727	83,3	4,07500	81,5
2	4,25007	85,0	4,23098	84,6
3	4,01555	80,3	4,30097	86,0
4	4,08390	81,7	4,26762	85,4
5	4,12384	82,5	4,23548	84,7
6	4,37954	87,6	4,06846	81,4
7	4,14858	83,0	4,24589	84,9
8	4,22301	84,5	4,41599	88,3
9	4,04453	80,9	4,03698	80,7
10	4,29258	85,9	4,16600	83,3
Ortalama		83,5		84,1
Laboratuvar Geri Kazanım Oranı		83,8		

EK 1-Tablo 8 Toplam Aflatoksin 11 ppb Konsantrasyonundaki Geri Kazanım Çalışmaları

Tekrar Sayısı	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	9,13617	83,1	9,29930	84,5
2	9,16464	83,3	9,45333	85,9
3	8,86746	80,6	9,55028	86,8
4	9,09909	82,7	9,35853	85,1
5	9,12077	82,9	9,34740	85,0
6	9,61647	87,4	9,07875	82,5
7	9,29855	84,5	9,31721	84,7
8	9,16050	83,3	9,63710	87,6
9	8,94172	81,3	8,99131	81,7
10	9,42879	85,7	9,08170	82,6
Ortalama		83,5		84,6
Laboratuvar Geri Kazanım Oranı		84,1		

EK 1-Tablo 9 Aflatoksin B₁ 7,5 ppb Konsantrasyonundaki Geri Kazanım Çalışmaları

Tekrar Sayısı	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	6,76969	90,3	6,99022	93,2
2	6,67236	89,0	7,03675	93,8
3	6,97523	93,0	7,02224	93,6
4	7,09911	94,7	6,79983	90,7
5	6,77599	90,3	6,77607	90,3
6	6,63186	88,4	6,75923	90,1
7	6,69367	89,2	6,91928	92,3
8	6,20428	82,7	6,80454	90,7
9	6,17045	82,3	6,62087	88,3
10	6,29150	83,9	7,06833	94,2
Ortalama		88,4		91,7
Laboratuvar Geri Kazanım Oranı		90,1		

EK 1-Tablo 10 Toplam Aflatoksin 15 ppb Konsantrasyonundaki Geri Kazanım Çalışmaları

Tekrar Sayısı	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	13,34302	89,0	13,39550	89,3
2	13,02377	86,8	13,60179	90,7
3	13,65966	91,1	13,53942	90,3
4	13,91853	92,8	13,11253	87,4
5	13,65640	91,0	13,16983	87,8
6	13,07181	87,1	13,21676	88,1
7	13,07018	87,1	13,59773	90,7
8	12,44500	83,0	13,41679	89,4
9	12,33082	82,2	13,04418	87,0
10	12,67960	84,5	13,83366	92,2
Ortalama		87,5		89,3
Laboratuvar Geri Kazanım Oranı		88,4		

EK 1-Tablo 11 1. Analistin Aflatoksin B₁ 2,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	$ X_1 - X_2 \leq r$	Değerlendirme
1	2,12012	2,10022	0,01991	0,01991	uygun
2	2,12362	2,14814	-0,02453	0,02453	uygun
3	2,13674	2,12409	0,01265	0,01265	uygun
4	2,10366	2,11827	-0,01460	0,01460	uygun
5	2,13238	2,13927	-0,00689	0,00689	uygun
6	2,21578	2,12872	0,08707	0,08707	uygun
7	2,25582	2,24981	0,00601	0,00601	uygun
8	2,21105	2,19888	0,01217	0,01217	uygun
9	2,28442	2,24195	0,04247	0,04247	uygun
10	2,05815	2,05493	0,00322	0,00322	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,06629				
r=2,83*s	0,18759				

EK 1-Tablo 12 1. Analistin Toplam Aflatoksin 5,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	$ X_1 - X_2 \leq r$	Değerlendirme
1	4,59967	4,59318	0,00649	0,00649	uygun
2	4,72360	4,78805	-0,06446	0,06446	uygun
3	4,69644	4,69508	0,00136	0,00136	uygun
4	4,77925	4,76374	0,01551	0,01551	uygun
5	4,83092	4,81712	0,01380	0,01380	uygun
6	4,80610	4,73958	0,06652	0,06652	uygun
7	4,90625	4,86679	0,03946	0,03946	uygun
8	4,84205	4,79627	0,04577	0,04577	uygun
9	4,92668	4,96060	-0,03392	0,03392	uygun
10	4,53273	4,48639	0,04635	0,04635	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,08776				
r=2,83*s	0,24835				

EK1-Tablo 13 1. Analistin Aflatoksin B₁ 5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	4,19081	4,14373	0,04708	0,04708	uygun
2	4,25876	4,24138	0,01738	0,01738	uygun
3	3,99534	4,03577	-0,04043	0,04043	uygun
4	4,07273	4,09506	-0,02233	0,02233	uygun
5	4,17052	4,07716	0,09336	0,09336	uygun
6	4,36083	4,39825	-0,03742	0,03742	uygun
7	4,18042	4,11673	0,06368	0,06368	uygun
8	4,20021	4,24581	-0,04560	0,04560	uygun
9	4,05343	4,03562	0,01780	0,01780	uygun
10	4,26524	4,31992	-0,05468	0,05468	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,11413				
r=2,83*s	0,32298				

EK 1-Tablo 14 1. Analistin Toplam Aflatoksin 11 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	9,29641	8,97594	0,32047	0,32047	uygun
2	9,18296	9,14632	0,03664	0,03664	uygun
3	8,92826	8,80666	0,12160	0,12160	uygun
4	9,17981	9,01837	0,16144	0,16144	uygun
5	9,16398	9,07756	0,08642	0,08642	uygun
6	9,62131	9,61163	0,00968	0,00968	uygun
7	9,39055	9,20654	0,18400	0,18400	uygun
8	9,08857	9,23243	-0,14386	0,14386	uygun
9	8,95948	8,92396	0,03551	0,03551	uygun
10	9,38386	9,47371	-0,08985	0,08985	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,22652				
r=2,83*s	0,64106				

EK 1-Tablo 15 1. Analistin Aflatoksin B₁ 7,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	6,82036	6,71903	0,10133	0,10133	uygun
2	6,65891	6,68582	-0,02691	0,02691	uygun
3	7,03948	6,91098	0,12850	0,12850	uygun
4	7,16475	7,03346	0,13128	0,13128	uygun
5	6,76461	6,78737	-0,02276	0,02276	uygun
6	6,66172	6,60200	0,05972	0,05972	uygun
7	6,71699	6,67034	0,04665	0,04665	uygun
8	6,24885	6,15970	0,08915	0,08915	uygun
9	6,14417	6,19673	-0,05256	0,05256	uygun
10	6,24465	6,33835	-0,09370	0,09370	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,25960				
r=2,83*s	0,73465				

EK 1-Tablo 16 1. Analistin Toplam Aflatoksin 15 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	13,44961	13,23644	0,21317	0,21317	uygun
2	13,00628	13,04127	-0,03499	0,03499	uygun
3	13,76705	13,55228	0,21477	0,21477	uygun
4	14,01711	13,81994	0,19716	0,19716	uygun
5	13,61227	13,70053	-0,08826	0,08826	uygun
6	13,05399	13,08962	-0,03563	0,03563	uygun
7	13,08567	13,05468	0,03099	0,03099	uygun
8	12,65614	12,23385	0,42229	0,42229	uygun
9	12,31994	12,34170	-0,02176	0,02176	uygun
10	12,42162	12,93758	-0,51596	0,51596	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,46582				
r=2,83*s	1,31828				

EK 1-Tablo 17 2. Analistin Aflatoksin B₁ 2,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	2,33461	2,27997	0,05464	0,05464	uygun
2	2,29725	2,21348	0,08377	0,08377	uygun
3	2,44085	2,41508	0,02577	0,02577	uygun
4	2,28182	2,32893	-0,04711	0,04711	uygun
5	2,15683	2,16606	-0,00923	0,00923	uygun
6	2,19030	2,18845	0,00186	0,00186	uygun
7	2,38659	2,32887	0,05772	0,05772	uygun
8	2,21241	2,27457	-0,06215	0,06215	uygun
9	2,09748	2,14208	-0,04460	0,04460	uygun
10	2,22524	2,20574	0,01950	0,01950	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,08837				
r=2,83*s	0,25008				

EK 1-Tablo 18 2. Analistin Toplam Aflatoksin 5,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	4,96439	4,88080	0,08359	0,08359	uygun
2	4,73925	4,68485	0,05441	0,05441	uygun
3	5,09536	5,06195	0,03341	0,03341	uygun
4	4,80963	4,90861	-0,09898	0,09898	uygun
5	4,56757	4,56272	0,00485	0,00485	uygun
6	4,73362	4,79567	-0,06205	0,06205	uygun
7	4,98155	4,91907	0,06249	0,06249	uygun
8	4,73327	4,80029	-0,06702	0,06702	uygun
9	4,59520	4,58382	0,01138	0,01138	uygun
10	4,69854	4,68417	0,01437	0,01437	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,15760				
r=2,83*s	0,44601				

EK 1-Tablo 19 2. Analistin Aflatoxin B₁ 5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	X ₁ -X ₂ ≤ r	Değerlendirme
1	4,08967	4,06117	0,02850	0,02850	uygun
2	4,25410	4,20786	0,04624	0,04624	uygun
3	4,33179	4,27015	0,06164	0,06164	uygun
4	4,33584	4,19940	0,13644	0,13644	uygun
5	4,24356	4,22741	0,01615	0,01615	uygun
6	4,12239	4,01452	0,10787	0,10787	uygun
7	4,23744	4,25434	-0,01690	0,01690	uygun
8	4,41131	4,42067	-0,00937	0,00937	uygun
9	4,01677	4,05719	-0,04042	0,04042	uygun
10	4,17902	4,06117	0,11785	0,11785	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,12347				
r=2,83*s	0,34941				

EK 1-Tablo 20 2. Analistin Toplam Aflatoxin 11 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	X ₁ -X ₂ ≤ r	Değerlendirme
1	9,09092	9,07249	0,01843	0,01843	uygun
2	9,37753	9,52913	-0,15160	0,15160	uygun
3	9,52359	9,57698	-0,05339	0,05339	uygun
4	9,42271	9,29436	0,12835	0,12835	uygun
5	9,39599	9,29882	0,09717	0,09717	uygun
6	9,15920	8,99829	0,16091	0,16091	uygun
7	9,27719	9,35722	-0,08003	0,08003	uygun
8	9,61576	9,65844	-0,04269	0,04269	uygun
9	9,00011	8,98250	0,01761	0,01761	uygun
10	9,29819	9,30041	-0,00222	0,00222	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,20975				
r=2,83*s	0,59360				

EK 1-Tablo 21 2. Analistin Aflatoksin B₁ 7,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	6,98137	6,99907	-0,01770	0,01770	uygun
2	7,05795	7,01555	0,04240	0,04240	uygun
3	7,01457	7,02992	-0,01535	0,01535	uygun
4	6,77390	6,82576	-0,05187	0,05187	uygun
5	6,82098	6,73115	0,08983	0,08983	uygun
6	6,75966	6,75881	0,00085	0,00085	uygun
7	6,98571	6,85284	0,13288	0,13288	uygun
8	6,72222	6,88686	-0,16463	0,16463	uygun
9	6,61714	6,62460	-0,00746	0,00746	uygun
10	7,07595	7,06072	0,01523	0,01523	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,14979				
r=2,83*s	0,42391				

EK 1-Tablo 22 2. Analistin Toplam Aflatoksin 15 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrar Sayısı	1.Analiz sonucu:X ₁	2.Analiz Sonucu:X ₂	X ₁ -X ₂	I X ₁ -X ₂ I ≤ r	Değerlendirme
1	13,37346	13,41754	-0,04408	0,04408	uygun
2	13,73610	13,46748	0,26862	0,26862	uygun
3	13,62850	13,45035	0,17815	0,17815	uygun
4	13,08732	13,13773	-0,05042	0,05042	uygun
5	13,11052	13,22914	-0,11862	0,11862	uygun
6	13,29502	13,13851	0,15651	0,15651	uygun
7	13,77454	13,42091	0,35364	0,35364	uygun
8	13,32893	13,50465	-0,17571	0,17571	uygun
9	12,96342	13,12494	-0,16152	0,16152	uygun
10	13,82798	13,83934	-0,01136	0,01136	uygun
Tekrar edilebilirlik Standart sapması:s	0,21344				
r=2,83*s	0,60403				

EK 1-Tablo 23 Aflatoksin B₁ 2,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Çalışması

2.5 ppb	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
Tekrar Sayısı				
1	2,11017	84,4	2,30729	92,3
2	2,13588	85,4	2,25536	90,2
3	2,13042	85,2	2,42797	97,1
4	2,11096	84,4	2,30538	92,2
5	2,13582	85,4	2,16144	86,5
6	2,17225	86,9	2,18938	87,6
7	2,25281	90,1	2,35773	94,3
8	2,20496	88,2	2,24349	89,7
9	2,26319	90,5	2,11978	84,8
10	2,05654	82,3	2,21549	88,6
Ortalama	2,15730		2,25833	
Std.Sapma	0,06582		0,09349	
RSD	0,03051		0,04140	
%RSD	3,05115		4,13997	

EK 1-Tablo 24 Toplam Aflatoksin 5,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Çalışması

5 ppb Toplam Aflatoksin	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
Tekrar Sayısı				
1	4,59642	83,6	4,92260	89,5
2	4,75582	86,5	4,71205	85,7
3	4,69576	85,4	5,07866	92,3
4	4,77149	86,8	4,85912	88,3
5	4,82402	87,7	4,56515	83,0
6	4,77284	86,8	4,76465	86,6
7	4,88652	88,8	4,95031	90,0
8	4,81916	87,6	4,76678	86,7
9	4,94364	89,9	4,58951	83,4
10	4,50956	82,0	4,69135	85,3
Ortalama	4,75752		4,79002	
Std.Sapma	0,12961		0,16300	
RSD	0,02724		0,03403	
%RSD	2,72429		3,40296	

EK 1-Tablo 25 Aflatoksin B₁ 5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Çalışması

5 ppb	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
Tekrar Sayısı				
1	4,16727	83,3	4,07542	81,5
2	4,25007	85,0	4,23098	84,6
3	4,01555	80,3	4,30097	86,0
4	4,08390	81,7	4,26762	85,4
5	4,12384	82,5	4,23548	84,7
6	4,37954	87,6	4,06846	81,4
7	4,14858	83,0	4,24589	84,9
8	4,22301	84,5	4,41599	88,3
9	4,04453	80,9	4,03698	80,7
10	4,29258	85,9	4,12010	82,4
Ortalama	4,17289		4,19979	
Std.Sapma	0,11435		0,12089	
RSD	0,02740		0,02878	
%RSD	2,74028		2,87844	

EK 1-Tablo 26 Toplam Aflatoksin 11 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Çalışması

11 ppb Toplam Aflatoksin	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
Tekrar Sayısı				
1	9,13617	83,1	9,08170	82,6
2	9,16464	83,3	9,45333	85,9
3	8,86746	80,6	9,55028	86,8
4	9,09909	82,7	9,35853	85,1
5	9,12077	82,9	9,34740	85,0
6	9,61647	87,4	9,07875	82,5
7	9,29855	84,5	9,31721	84,7
8	9,16050	83,3	9,63710	87,6
9	8,94172	81,3	8,99131	81,7
10	9,42879	85,7	9,29930	84,5
Ortalama	9,18342		9,31149	
Std.Sapma	0,21944		0,20985	
RSD	0,02390		0,02254	
%RSD	2,38954		2,25367	

EK 1-Tablo 27 Aflatoksin B₁ 7,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Çalışması

7,5 ppb	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	6,76969	90,3	6,99022	93,2
2	6,67236	89,0	7,03675	93,8
3	6,97523	93,0	7,02224	93,6
4	7,09911	94,7	6,79983	90,7
5	6,77599	90,3	6,77607	90,3
6	6,63186	88,4	6,75923	90,1
7	6,69367	89,2	6,91928	92,3
8	6,20428	82,7	6,80454	90,7
9	6,17045	82,3	6,62087	88,3
10	6,29150	83,9	7,06833	94,2
Ortalama	6,62841		6,87974	
Std.Sapma	0,31498		0,14856	
RSD	0,04752		0,02159	
%RSD	4,75196		2,15934	

EK 1-Tablo 28 Toplam Aflatoksin 15 ppb Konsantrasyonu Tekrarlanabilirlik Çalışması

15 ppb Toplam Aflatoksin	Soya Unu			
	1. Analist		2. Analist	
	Bulunan	%GK	Bulunan	%GK
1	13,34302	89,0	13,39550	89,3
2	13,02377	86,8	13,60179	90,7
3	13,65966	91,1	13,53942	90,3
4	13,91853	92,8	13,11253	87,4
5	13,65640	91,0	13,16983	87,8
6	13,07181	87,1	13,21676	88,1
7	13,07018	87,1	13,59773	90,7
8	12,44500	83,0	13,41679	89,4
9	12,33082	82,2	13,04418	87,0
10	12,67960	84,5	13,83366	92,2
Ortalama	13,11988		13,39282	
Std.Sapma	0,53258		0,25449	
RSD	0,04059		0,01900	
%RSD	4,05936		1,90023	

EK 1-Tablo 29 Aflatoksin B₁ 2,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Limiti Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1. Analist	2. Analist	X ₁ -X ₂	X ₁ -X ₂ ≤ R	Değerlendirme
	X1	X2			
1	2,11017	2,30729	-0,19712	0,19712	uygun
2	2,13588	2,25536	-0,11949	0,11949	uygun
3	2,24484	2,49793	-0,25309	0,25309	uygun
4	2,12111	2,45133	-0,33022	0,33022	uygun
5	2,32333	2,22059	0,102736	0,10274	uygun
6	2,19282	2,08753	0,105292	0,10529	uygun
7	2,43019	2,58150	-0,15131	0,15131	uygun
8	2,14295	2,16237	-0,01942	0,01942	uygun
9	2,30833	2,20467	0,103653	0,10365	uygun
10	2,26640	2,56296	-0,29656	0,29656	uygun
Standart Sapma (s)	0,15168298				
R=2,83*s	0,42926283				

EK 1-Tablo 30 Toplam Aflatoksin 5,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Limiti Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1. Analist	2. Analist	X ₁ -X ₂	X ₁ -X ₂ ≤ R	Değerlendirme
	X1	X2			
1	4,59642	4,92260	-0,32617	0,32617	uygun
2	4,75582	4,71205	0,04377	0,04377	uygun
3	4,79396	5,36246	-0,56850	0,56850	uygun
4	4,63273	5,28878	-0,65606	0,65606	uygun
5	5,09488	4,90474	0,19014	0,19014	uygun
6	4,84805	4,73638	0,11168	0,11168	uygun
7	5,30496	5,79077	-0,48581	0,48581	uygun
8	4,69962	4,96306	-0,26343	0,26343	uygun
9	5,03264	4,59590	0,43674	0,43674	uygun
10	4,83262	5,21982	-0,38720	0,38720	uygun
Standart Sapma (s)	0,3097724				
R=2,83*s	0,87665589				

EK 1- Tablo 31 Aflatoksin B₁ 5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Limiti Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1. Analist	2. Analist	$X_1 - X_2$	$ X_1 - X_2 \leq R$	Değerlendirme
	X1	X2			
1	4,16727	4,07542	0,09185	0,09185	uygun
2	4,25007	4,23098	0,01909	0,01909	uygun
3	4,45394	4,53568	-0,08174	0,08174	uygun
4	4,25448	4,38132	-0,12683	0,12683	uygun
5	3,98005	4,20882	-0,22877	0,22877	uygun
6	4,07869	3,96459	0,11410	0,11410	uygun
7	4,93451	4,53252	0,40199	0,40199	uygun
8	5,21686	4,58587	0,63099	0,63099	uygun
9	4,60226	4,63545	-0,03319	0,03319	uygun
10	4,34600	4,77096	-0,42496	0,42496	uygun
Standart Sapma (s)	0,324359044				
R=2,83*s	0,91793609				

EK 1-Tablo 32 Toplam Aflatoksin 11 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Limiti Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1. Analist	2. Analist	$X_1 - X_2$	$ X_1 - X_2 \leq R$	Değerlendirme
	X1	X2			
1	9,13617	9,08170	0,05447	0,05447	uygun
2	9,16464	9,45333	-0,28869	0,28869	uygun
3	9,81407	9,89341	-0,07934	0,07934	uygun
4	9,12891	9,66479	-0,53587	0,53587	uygun
5	8,98335	9,44818	-0,46483	0,46483	uygun
6	9,15561	9,09810	0,05751	0,05751	uygun
7	10,26155	10,01638	0,24517	0,24517	uygun
8	10,71030	9,73882	0,97148	0,97148	uygun
9	9,67452	9,82946	-0,15494	0,15494	uygun
10	9,61968	10,13450	-0,51482	0,51482	uygun
Standart Sapma (s)	0,465260638				
R=2,83*s	1,31668761				

EK 1-Tablo 33 Aflatoksin B₁ 7,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Limiti Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1. Analist	2. Analist	X ₁ -X ₂	X ₁ -X ₂ ≤ R	Değerlendirme
	X1	X2			
1	6,71903	6,99907	-0,28004	0,28004	uygun
2	6,68582	7,01555	-0,32973	0,32973	uygun
3	6,92387	7,29385	-0,36998	0,36998	uygun
4	6,48097	7,17298	-0,69201	0,69201	uygun
5	6,78147	6,91513	-0,13366	0,13366	uygun
6	6,97291	7,26262	-0,28970	0,28970	uygun
7	7,12542	7,23209	-0,10667	0,10667	uygun
8	7,42124	6,90650	0,51474	0,51474	uygun
9	6,65729	7,32904	-0,67175	0,67175	uygun
10	6,65849	7,43957	-0,78109	0,78109	uygun
Standart Sapma (s)	0,27960203				
R=2,83*s	0,79127375				

EK 1-Tablo 34 Toplam Aflatoksin 15 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Limiti Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1. Analist	2. Analist	X ₁ -X ₂	X ₁ -X ₂ ≤ R	Değerlendirme
	X1	X2			
1	13,23644	13,41754	-0,18110	0,18110	uygun
2	13,04127	13,46748	-0,42621	0,42621	uygun
3	12,99492	13,97615	-0,98123	0,98123	uygun
4	13,92362	13,88130	0,04232	0,04232	uygun
5	13,35867	13,38461	-0,02594	0,02594	uygun
6	13,71047	14,05773	-0,34725	0,34725	uygun
7	13,90069	14,05170	-0,15101	0,15101	uygun
8	14,33936	13,68807	0,65129	0,65129	uygun
9	12,91543	13,59747	-0,68204	0,68204	uygun
10	13,44731	14,03897	-0,59167	0,59167	uygun
Standart Sapma (s)	0,39982432				
R=2,83*s	1,13150283				

EK 1-Tablo 35 Aflatoksin B₁ 2,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1.Analist:X ₁	2.Analist:X ₂	(X ₁ - X ₂) ²
1	2,11017	2,30729	0,03886
2	2,13588	2,25536	0,01428
3	2,24484	2,49793	0,06405
4	2,12111	2,45133	0,10904
5	2,32333	2,22059	0,01055
6	2,19282	2,08753	0,01109
7	2,43019	2,58150	0,02290
8	2,14295	2,16237	0,00038
9	2,30833	2,20467	0,01074
10	2,26640	2,56296	0,08795
Toplam			0,36984
$s=\sqrt{\Sigma[(X_1-X_2)]^2/2n}$			0,13598
Ortalama			2,28038
RSD			0,05963
%RSD			5,96326

EK 1-Tablo 36 Toplam Aflatoksin 5,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1.Analist:X ₁	2.Analist:X ₂	(X ₁ - X ₂) ²
1	4,59642	4,92260	0,10639
2	4,75582	4,71205	0,00192
3	4,79396	5,36246	0,32319
4	4,63273	5,28878	0,43041
5	5,09488	4,90474	0,03615
6	4,84805	4,73638	0,01247
7	5,30496	5,79077	0,23601
8	4,69962	4,96306	0,06940
9	5,03264	4,59590	0,19074
10	4,83262	5,21982	0,14992
Toplam			1,55660
$s=\sqrt{\Sigma[(X_1-X_2)]^2/2n}$			0,27898
Ortalama			4,95441
RSD			0,05631
%RSD			5,63095

EK 1-Tablo 37 Aflatoksin B₁ 5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1.Analist:X ₁	2.Analist:X ₂	(X ₁ - X ₂) ²
1	4,16727	4,07542	0,00844
2	4,25007	4,23098	0,00036
3	4,45394	4,53568	0,00668
4	4,25448	4,38132	0,01609
5	3,98005	4,20882	0,05234
6	4,07869	3,96459	0,01302
7	4,93451	4,53252	0,16160
8	5,21686	4,58587	0,39815
9	4,60226	4,63545	0,00110
10	4,34600	4,77096	0,18059
Toplam			0,83837
$s=\sqrt{\Sigma[(X_1-X_2)]^2/2n}$			0,20474
Ortalama			4,41029
RSD			0,04642
%RSD			4,64232

EK 1-Tablo 38 Toplam Aflatoksin 11 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1.Analist:X ₁	2.Analist:X ₂	(X ₁ - X ₂) ²
1	9,13617	9,08170	0,00297
2	9,16464	9,45333	0,08334
3	9,81407	9,89341	0,00629
4	9,12891	9,66479	0,28716
5	8,98335	9,44818	0,21607
6	9,15561	9,09810	0,00331
7	10,26155	10,01638	0,06011
8	10,71030	9,73882	0,94378
9	9,67452	9,82946	0,02401
10	9,61968	10,13450	0,26504
Toplam			1,89207
$s=\sqrt{\Sigma[(X_1-X_2)]^2/2n}$			0,30758
Ortalama			9,60037
RSD			0,03204
%RSD			3,20380

EK 1-Tablo 39 Aflatoksin B₁ 7,5 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1.Analist:X ₁	2.Analist:X ₂	(X ₁ - X ₂) ²
1	6,71903	6,99907	0,07842
2	6,68582	7,01555	0,10872
3	6,92387	7,29385	0,13689
4	6,48097	7,17298	0,47888
5	6,78147	6,91513	0,01787
6	6,97291	7,26262	0,08393
7	7,12542	7,23209	0,01138
8	7,42124	6,90650	0,26496
9	6,65729	7,32904	0,45125
10	6,65849	7,43957	0,61009
Toplam			2,24238
$s=\sqrt{\Sigma[(X_1-X_2)]^2/2n}$			0,33484
Ortalama			6,99965
RSD			0,04784
%RSD			4,78370

EK 1-Tablo 40 Toplam Aflatoksin 15 ppb Konsantrasyonu Tekrarüretilebilirlik Hesaplamaları

Tekrar Sayısı	1.Analist:X ₁	2.Analist:X ₂	(X ₁ - X ₂) ²
1	13,23644	13,41754	0,03280
2	13,04127	13,46748	0,18166
3	12,99492	13,97615	0,96281
4	13,92362	13,88130	0,00179
5	13,35867	13,38461	0,00067
6	13,71047	14,05773	0,12058
7	13,90069	14,05170	0,02280
8	14,33936	13,68807	0,42418
9	12,91543	13,59747	0,46518
10	13,44731	14,03897	0,35007
Toplam			2,56254
$s=\sqrt{\Sigma[(X_1-X_2)]^2/2n}$			0,35795
Ortalama			13,62146
RSD			0,02628
%RSD			2,62783

EK 1-Tablo 46 HPLC Aflatoksin B₁ Değerler Tablosu

Derişim(ppb)	Alan	$x(Ci)$	$(ci-Cort)$
0,0625	2,27981	0,0782	-0,9391
0,0625	1,876270	0,0666	-0,9507
0,0625	2,337810	0,0799	-0,9375
0,125	4,114890	0,1309	-0,8865
0,125	4,286620	0,1358	-0,8815
0,125	4,027180	0,1284	-0,8890
0,375	12,984140	0,3854	-0,6320
0,375	12,837450	0,3812	-0,6362
0,375	12,700080	0,3772	-0,6401
0,75	25,657680	0,7491	-0,2683
0,75	25,352910	0,7403	-0,2770
0,75	25,483620	0,7441	-0,2733
1,25	41,220570	1,1956	0,1783
1,25	41,932440	1,2161	0,1987
1,25	41,249695	1,1965	0,1791
1,875	67,404680	1,9470	0,9296
1,875	64,560260	1,8654	0,8480
1,875	64,273570	1,8571	0,8398
2,5	86,333600	2,4902	1,4728
2,5	89,263700	2,5742	1,5569
2,5	85,746830	2,4733	1,4560
0,991071429		S _{xx}	15,5546

Linear Fit: $y=a+bx$	
Coefficient Data:	
a =	-0,4429900
b =	34,849061

EK 1-Tablo 47 HPLC Aflatoksin B₁ Belirsizlik Hesaplaması

s	0,83669
B1	34,85
p	10
n	21
C₀	0,750
Cort	0,991
Sxx	16
(C₀-Cort)*2	0,0037
1/p	0,1000
1/n	0,0476
1/p+1/n+(C₀-Cort)/Sxx	0,3890
S/B1	0,0240
U(C₀)	0,0093

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [(A_j - (B_0 + B_1 c_j))]^2}{n - 2}}$$

$$U(c_0) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

EK 1-Tablo 48 HPLC Aflatoksin G₂ Değerler tablosu

Derişim(ppb)	Alan	<i>x(Ci)</i>	<i>(ci-Cort)</i>
0,0625	1,96227	0,0619	-1,0944
0,0625	2,10881	0,0664	-1,0899
0,0625	1,94803	0,0614	-1,0948
0,125	4,00626	0,1248	-1,0314
0,125	4,10467	0,1279	-1,0284
0,125	3,98426	0,1242	-1,0321
0,375	12,08030	0,3736	-0,7827
0,375	12,09314	0,3739	-0,7823
0,375	12,16258	0,3761	-0,7802
0,75	24,76563	0,7643	-0,3919
0,75	24,99867	0,7715	-0,3847
0,75	23,66737	0,7305	-0,4258
1,25	39,93301	1,2316	0,0753
1,25	39,77227	1,2266	0,0704
1,25	39,82414	1,2282	0,0720
1,875	61,45124	1,8944	0,7382
1,875	61,44102	1,8941	0,7379
1,875	61,31615	1,8903	0,7340
2,5	80,88090	2,4930	1,3367
2,5	81,05476	2,4983	1,3421
2,5	80,95838	2,4953	1,3391
0,991071429		S _{xx}	15,5376

Linear Fit: $y=a+bx$	
Coefficient Data:	
a =	-0,0460559
b =	32,462183

EK 1-Tablo 49 HPLC Aflatoksin G₂ Belirsizlik Hesaplaması

S	0,38047
B1	32,46
p	10
n	21
C₀	0,750
Cort	0,991
Sxx	16
(C₀-Cort)*2	0,0037
1/p	0,1000
1/n	0,0476
1/p+1/n+(C₀-Cort)/Sxx	0,3890
S/B1	0,0117
U(C₀)	0,0046

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2$$
$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [(A_j - (B_0 + B_1 c_j))]^2}{n - 2}}$$

$$U(c_0) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

EK 1-Tablo 50 HPLC Aflatoksin G₁ Değerler Tablosu

Derişim(ppb)	Alan	<i>x(Ci)</i>	<i>(ci-Cort)</i>
0,0625	1,51501	0,0774	-1,0789
0,0625	1,36378	0,0715	-1,0847
0,0625	1,30897	0,0694	-1,0869
0,125	2,84039	0,1286	-1,0276
0,125	2,96973	0,1336	-1,0226
0,125	2,98395	0,1342	-1,0221
0,375	8,91929	0,3637	-0,7925
0,375	8,82789	0,3602	-0,7960
0,375	8,97107	0,3657	-0,7905
0,75	18,99436	0,7534	-0,4028
0,75	19,11584	0,7581	-0,3981
0,75	17,50819	0,6959	-0,4603
1,25	30,89769	1,2138	0,0575
1,25	30,49601	1,1983	0,0420
1,25	31,01725	1,2184	0,0622
1,875	48,50022	1,8946	0,7383
1,875	48,31351	1,8874	0,7311
1,875	48,50386	1,8947	0,7385
2,5	64,51205	2,5139	1,3576
2,5	64,31937	2,5064	1,3502
2,5	64,59003	2,5169	1,3606
0,991071429		Sxx	15,6477

Linear Fit: $y=a+bx$	
Coefficient Data:	
a =	-0,4852367
b =	25,85533

EK 1-Tablo 51 HPLC Aflatoksin G₁ Belirsizlik Hesaplaması

S	0,56717
B1	25,86
p	10
n	21
C₀	0,750
Cort	0,991
Sxx	16
(C₀-Cort)*2	0,0037
1/p	0,1000
1/n	0,0476
1/p+1/n+(C₀-Cort)/Sxx	0,3890
S/B1	0,0219
U(C₀)	0,0085

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [(A_j - (B_0 + B_1 c_j))]^2}{n - 2}}$$

$$U(c_0) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

EK 1-Tablo 52 HPLC Aflatoksin B₂ Değerler Tablosu

Derişim(ppb)	Alan	<i>x(Ci)</i>	<i>(ci-Cort)</i>
0,0625	3,37207	0,0625	-1,0937
0,0625	3,14617	0,0583	-1,0980
0,0625	3,43860	0,0638	-1,0925
0,125	6,72172	0,1256	-1,0306
0,125	7,65008	0,1431	-1,0131
0,125	6,50236	0,1215	-1,0348
0,375	19,99228	0,3757	-0,7806
0,375	20,21098	0,3798	-0,7765
0,375	19,90200	0,3740	-0,7823
0,75	40,28442	0,7580	-0,3982
0,75	39,99483	0,7526	-0,4037
0,75	40,43259	0,7608	-0,3954
1,25	65,17391	1,2270	0,0707
1,25	64,81499	1,2202	0,0640
1,25	64,87209	1,2213	0,0650
1,875	101,99216	1,9207	0,7645
1,875	99,44773	1,8728	0,7165
1,875	100,14316	1,8859	0,7296
2,5	131,63409	2,4792	1,3230
2,5	134,75519	2,5380	1,3818
2,5	131,40999	2,4750	1,3187
0,991071429		Sxx	15,5271

Linear Fit: $y=a+bx$	
Coefficient Data:	
a =	0,0546362
b =	53,07292

EK 1-Tablo 53 HPLC Aflatoksin B₂ Belirsizlik Hesaplaması

S	0,736
B1	53,07
p	10
n	21
C₀	0,750
Cort	0,991
Sxx	16
(C₀-Cort)*2	0,0037
1/p	0,1000
1/n	0,0476
1/p+1/n+(C₀-Cort)/Sxx	0,3891
S/B1	0,0139
U(C₀)	0,0054

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2 \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [(A_j - (B_0 + B_1 c_j))]^2}{n - 2}}$$

$$U(c_0) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hacer Yeliz OLPAK
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul – 04.04.1985
Yabancı Dili : İngilizce
E-Posta : yelizolpak@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen-Matematik	Pendik Y.D.A Lise	2004
Üniversite	Kimya	Marmara Üniversitesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2009	Sanovel	Tıbbi Satış Temsilcisi
2010	Kalite Sistem Lab.	Uzman Kimyager

Ödüller:

1. Marmara Üniversitesi, Haziran 2008, Kimya Bölümü Birincilik Plaketi