

Kuru İncirde
Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ ve Toplam Aflatoxin

UME CRM 1302

Raporu Hazırlayanlar

Doç. Dr. Nilgün TOKMAN

Dr. Alper İŞLEYEN

Dr. Burcu BİNİCİ

Nihal ZORLU

Elif TURAN

Hasibe YILMAZ

Dr. Ali E. SADAK

Taner GÖKÇEN

Adnan ŞİMŞEK

Mine BİLSEL

Dr. İlker ÜN

Gökhan AKTAŞ

Dr. Fatma AKÇADAĞ

Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ

Doç. Dr. Ahmet C. GÖREN

Murat TUNÇ

Zehra ÇAKILBAHÇE

Hatice ALTUNTAŞ

Seda D. HATİPOĞLU

Dr. Kevser TOPAL

Sema AKYÜREK

Tarih
25/11/2019



Dr. Mustafa ÇETİNTAŞ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	2
KISALTMALAR	3
ÖZET	5
GİRİŞ	5
KATILIMCILAR.....	7
MALZEME İŞLEME.....	7
HOMOJENLİK.....	9
KARARLILIK	10
Kısa Dönem Kararlılık Çalışması	11
Uzun Dönem Kararlılık Çalışması	12
KARAKTERİZASYON	13
ÖZELLİK DEĞERLERİNİN VE BELİRSİZLİKLERİNİN ATANMASI	13
TEŞEKKÜR.....	15
İZLENEBİLİRLİK	15
KULLANIM TALİMATI	15
KAYNAKLAR.....	16
REVİZYON TARİHÇESİ.....	16
Ek 1. UME CRM 1302 için Homojenlik Verileri	17
Ek 2. Homojenlik Grafikleri	18
Ek 3. UME CRM 1302 Kısa Dönem Kararlılık (KDK) Verileri	20
Ek 4. UME CRM 1302 +4 °C ve -20 °C için KDK Grafikleri	23
Ek 5. UME CRM 1302 için Uzun Dönem Kararlılık (UDK) Verileri.....	25
Ek 6. UME CRM 1302 UDK Grafikleri.....	28
Ek 7. UME CRM 1302 Karakterizasyon Verileri	30
Ek 8. CCQM-K138 Uluslararası Karşılaştırma Grafikleri	32

KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
AF	Aflatoksin
AFB ₁	Aflatoksin B ₁
AFB ₂	Aflatoksin B ₂
AFG ₁	Aflatoksin G ₁
AFG ₂	Aflatoksin G ₂
ANOVA	Varyans Analizi
CRM	Sertifikalı Referans Malzeme
FLD	Floresan Dedektörü
HDPE	Yüksek Yođunluklu Polietilen
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografi
HRLC-MS	Yüksek Çözünürlüklü Sıvı Kromatografi Kütle Spektroskopisi
IAC	İmmüno Afinite Kolonu
IDMS	İzotop Seyreltme Kütle Spektroskopisi
ISO	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
KDK	Kısa Dönem Kararlılık
LC	Sıvı Kromatografi
MS _{between}	ANOVA'da üniteler arası karelerinin ortalaması
MS _{within}	ANOVA'da ünite içi karelerinin ortalaması
MRL	Maksimum Kalıntı Limiti
Q-NMR	Kuantitatif Nükleer Manyetik Rezonans
PSTF	Proje Süreç Takip Formu
Rel	Rölatif (Bağıl ?)
RSD	Rölatif (Bağıl kullanılamaz mı ?) Standart Sapma
SI	Uluslararası Birimler Sistemi
TRaNS	Tabakalı Rastgele Numune Seçimi Yazılımı
UDK	Uzun Dönem Kararlılık

SEMBOLLER

α	Anlamlılık seviyesi
N	Ünite başına tekrar sayısı
s	Standard sapma
S _{bb}	Üniteler arası standart sapma
S _{bb,rel}	Üniteler arası bağıl standart sapma
S _{wb}	Ünite içi standart sapma
S _{wb,rel}	Ünite içi bağıl standart sapma
U _{bb}	Üniteler arası heterojenliğe bağıl standart belirsizlik
U _{bb,rel}	Üniteler arası heterojenliğe bağıl bağıl standart belirsizlik
U [*] _{bb}	Metot tekrarlanabilirliğince gizlenmiş heterojenliğe bağıl standart belirsizlik
U [*] _{bb,rel}	Metot tekrarlanabilirliğince gizlenmiş heterojenliğe bağıl bağıl standart belirsizlik
U _{char}	Karakterizasyona bağıl standart belirsizlik
U _{lts}	Uzun dönem kararlılığa bağıl standart belirsizlik
U _{sts}	Kısa dönem kararlılığa bağıl standart belirsizlik
\bar{t}	Bütün zaman noktalarının ortalaması
t _{α}	Çift kuyruklu kritik t değeri (t testi)
t _i	Her bir paralel için zaman noktası

Sayfa 5 / 34	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1302
--------------	---	-------------------------

ÖZET

Aflatoksinler insanlar için kanserojendir ve gıdalardaki maksimum kalıntı limitleri (MRL) birtakım (bazı olamaz mı ?) yönetmeliklerle belirlenmiştir. MRL seviyeleri 29/12/2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi’nde, Aflatoksin B₁ için 8 µg/kg ve AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ (toplam aflatoksin) için 10 µg/kg, AB yönetmeliklerinde ise B₁ için 6 µg/kg ve toplam aflatoksin için 10 µg/kg olarak belirlenmiştir [1]. Ayrıca AB Yönetmeliği ile (EU 884/2014) Türkiye’den ithal edilen kuru incirlerde aflatoksin için fiziksel ve kimlik kontrolleri oranı % 20’ye yükseltilmiştir. Kuru incirde aflatoksin analizler sonuçlarının doğruluklarından emin olmak ve izlenebilirliklerinin sağlanması, ölçüm kalitesinin artırılması, ve analitik metotların geçerli kılınması için sertifikalı referans malzeme üretimi kaçınılmazdır. Bu rapor kuru incirde aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin B₂ (AFB₂), aflatoksin G₁ (AFG₁), aflatoksin G₂ (AFG₂) ve toplam aflatoxin (AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ toplamı) için sertifikalı referans malzeme üretiminin ve sertifikalandırmanın değişik aşamalarını açıklamaktadır. Bu malzemelerin üretimi ISO Guide 34:2009 rehber dokümanı gereklilikleri yerine getirilerek gerçekleştirilmiştir [2]. Ayrıca TÜRKAK akreditasyon denetimi ile malzemenin ISO 17034:2016 standardına uygunluğu onaylanmıştır [3]. Ham madde olarak Türkiye’nin Aydın ilinde yetiştirilen sarı lop (Calimyrna) türü kuru incirler kullanılmıştır.

Üniteler arası homojenlik ve kararlılık testleri ISO Guide 35:2006 rehber dokümanının gereklilikleri yerine getirilerek gerçekleştirilmiştir [4]. Ayrıca TÜRKAK akreditasyon denetimi ile malzemenin sertifikalandırılma süreçlerinin ISO Guide 35:2017 klavuz dokümanına uygunluğu onaylanmıştır [5]. Karakterizasyon çalışması için ekstraksiyon aşamasında BS EN 14123:2007 metodundan 6 g minimum örnek alınmasına göre modifiye edilen ve TÜBİTAK UME Kimya laboratuvarları tarafından geliştirilen HPLC-FLD ve LC-IDMS metotları kullanılmıştır.

GİRİŞ

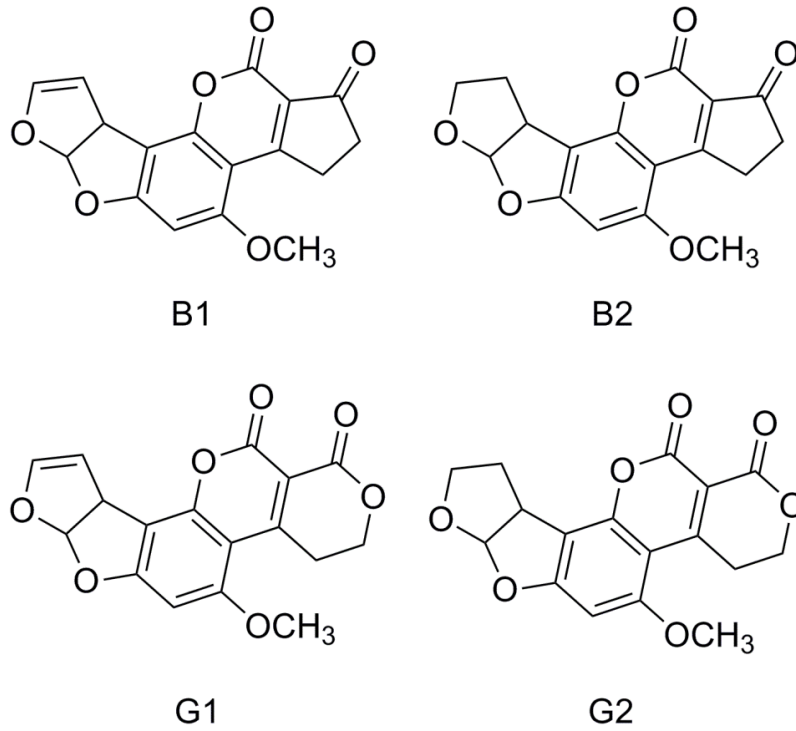
Ficus carica L., Moraceae ailesinden yapraklarını döken bir ağaç türü olup, insanlar tarafından ilk işlenen meyve ağaçlarından [6]. Carica ismi Türkiye’nin batısında bulunan Caria bölgesinden gelmektedir. İncirler genellikle ılık ve kuru iklimlerde yetişen geniş bir alana yayılmış türlerdir [7]. İncirler koyu eflatundan yeşile kadar değişik renk türlerinde bulunurlar [8]. Yaprakları kozmetik ve ilaç endüstrisinde; erkekleri dişilerin döllenmesi ve reçel yapımında; taze meyveleri sofrada tüketim veya reçel ve marmelat yapımında; kurutulmuş meyveleri ise sofrada tüketim ve gıda endüstrisinde birçok farklı şekilde kullanılmaktadır [8]. Kurutma işlemi saklama sürelerini uzattığından kuru incir olarak tüketimi yaygındır.

Kuru incir sağlığı yüksek oranda destekleyen bir tarım ürünüdür ve sodyum, kolesterol ve yağ içeriği düşüktür. Yüksek oranda ham lif içerir ve bunun % 28’i kolesterolü ve kan şekerinin kontrolünü destekleyen çözünebilir türdedir [9]. Genel olarak tüketilen meyveler ve içecekler arasındaki en yüksek polifenol oranlarından birine sahip olup 17 adet amino asit içermektedir [8].

Türkiye’de değişik incir türleri yetiştirilmekle birlikte genel olarak Bursa Siyahı ve Sarı Lop (Calimyrna) türleri yetiştirilmektedir. Sarı Lop büyüklüğü, tadı, etli olması, açık renkli ve yumuşak kabuğu, yüksek şeker ve düşük asit içeriği nedeniyle kurutma için en uygun olanlarından. Bu tür için en uygun olan yetiştirme alanı Ege Bölgesi ve özellikle bölgede bulunan Aydın ve İzmir şehirleridir. Aydın ekolojik

olarak uygun olması dolayısı ile tek başına kuru incir üretiminin % 70-75'ini sağlamaktadır [10]. Taze toplanmış incirler 2-4 gün boyunca tahta veya plastik tepsiler içerisinde güneş altında kurutulurlar.

Uygun olmayan koşullarda saklama ve kurutma sonucu, incirlerin tadında ve bileşiminde değişikliğe yol açan ve ayrıca mikotoksin olarak adlandırılan ikincil metabolitler oluşturan mikroorganizmalar ortaya çıkmaktadır. Mikotoksinler arasında en önemli olanları aflatoksinlerdir. Genel olarak karşılaşılan aflatoksinler *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* veya *Aspergillus nomius* küfleri tarafından üretilen AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ olarak isimlendirilen aflatoksinlerdir. İsimlendirilmeleri UV ışığı altında yaptıkları ışımalarından dolayıdır, mavi renkli ışımaya yapanları B tipi (blue) ve yeşil renkli ışımaya yapanları G tipi (green).



Şekil 1. Aflatoksin bileşiklerinin molekül yapısı

Aflatoksinler insanlar için kanserojendir. İnsan ve hayvan sağlığı için genlerde mutasyona yol açma, bağışıklık sistemi için toksik etkilere sahip olma, teratojenite ve bağışıklık sisteminin baskılanması gibi birçok toksik etkiye sebep olmaktadır [11]. Avrupa Birliği tarafından kuru incir için maksimum kalıntı seviyesi AFB₁ için 5 µg/kg ve AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ toplamı (toplam aflatoksin) için 10 µg/kg olarak belirlenmiştir.

Türkiye dünyadaki en büyük taze incir üreticisi ve bir numaralı kuru incir ithalatçısıdır, tek başına neredeyse dünya üretiminin % 50-60 miktarını karşılamaktadır. İncirler zaman zaman yüksek aflatoksin içeriği dolayısı ile gümrüklerden geri dönmektedir. Kuru incirde aflatoksin için şimdiye kadar üretilmiş bir matriks sertifikalı referans malzeme (CRM) bulunmamaktadır. Piyasadaki matriks sertifikalı referans malzemeler analitik metotların geçerli kılınması ve ölçüm sonuçlarının doğruluğunun ve izlenebilirliğinin sağlanması için başlangıç noktasıdır.

Sayfa 7 / 34	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1302
--------------	---	-------------------------

Bu raporda TÜBİTAK UME tarafından üretimi gerçekleştirilen UME CRM 1302'nin üretim aşamaları anlatılmıştır ve laboratuvarlar tarafından özellikle de ilgili gıda yönetmeliklerince yasal denetleme yapan laboratuvarlar tarafından, ölçümlerde kalitenin sağlanması ve kalite kontrol aracı olarak kullanılması hedeflenmiştir.

KATILIMCILAR

Tüm üretim ve sertifikalandırma aşamaları ağırlıklı olarak TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü (UME) ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Gıda Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Ham madde ve şişelenmiş son ürün Çerkezkoy, Tekirdağ'da bulunan GAMMA-PAK firmasında gama ışınlamasına maruz bırakılmıştır. Ürünün liyofilizasyonu Pendik, İstanbul'da bulunan İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

Faaliyet	Laboratuvarlar
Proje Yönetimi ve Veri Değerlendirme	TÜBİTAK UME, Ulusal Metroloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye
Numune Alma ve İşleme	TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Pendik, İstanbul, Türkiye GAMMA-PAK Sterilizasyon San. Ve Tic. A.Ş., Çerkezköy, Tekirdağ, Türkiye
Homojenlik Çalışması	TÜBİTAK UME, Ulusal Metroloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye
Kararlılık Çalışması	TÜBİTAK UME, Ulusal Metroloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye
Karakterizasyon Çalışması	TÜBİTAK UME, Ulusal Metroloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye

MALZEME İŞLEME

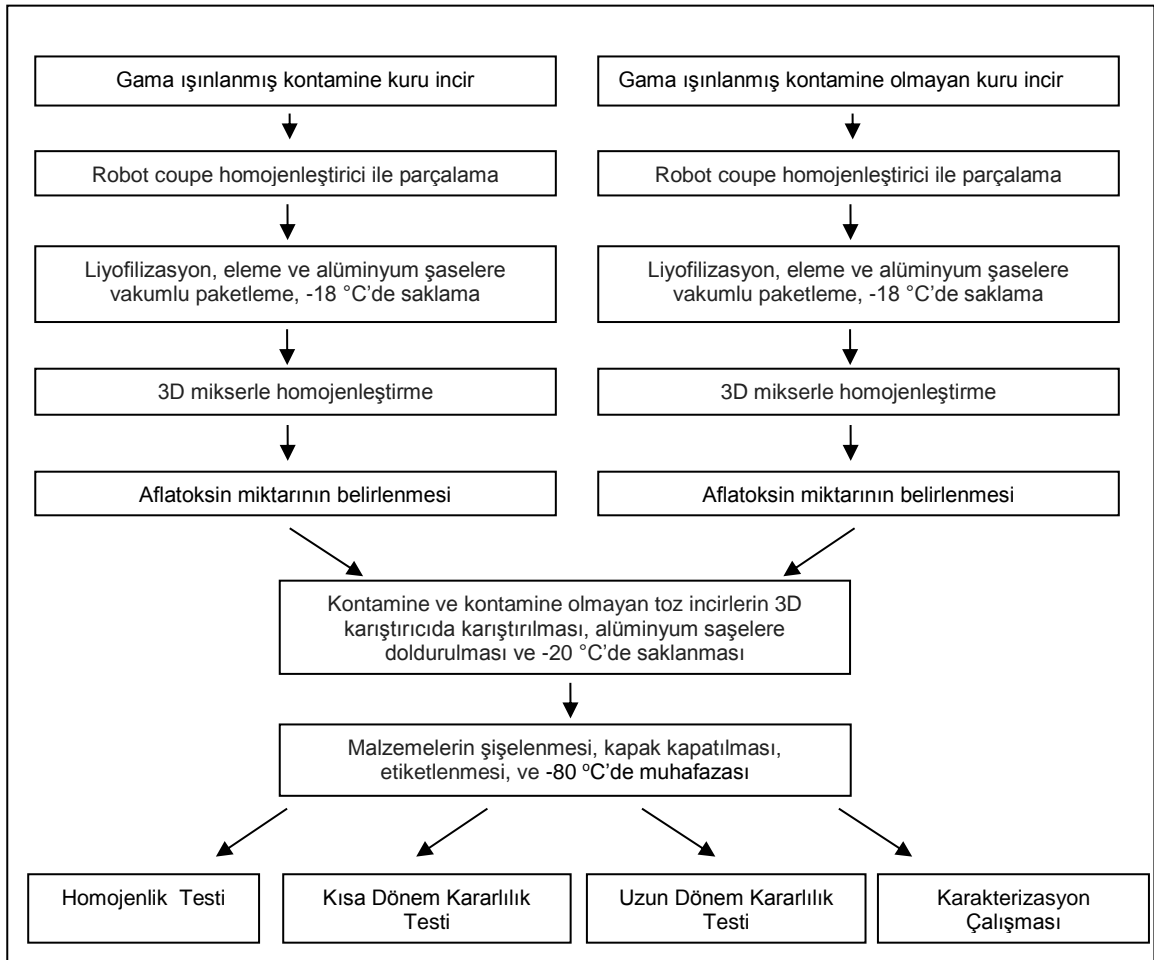
UME CRM 1302 malzeme işleme kısmı için ön çalışmaları iki ana başlık altında toplayabiliriz. İlk aşamada istenen özellikleri içeren toz ürün elde etmek için çalışılmıştır, bu amaç için laboratuvar ve pilot ölçekte fizibilite çalışmaları yapılmıştır. En uygun yöntem, değişik malzeme işleme teknikleri kullanılarak laboratuvar ölçeğinde belirlenmiştir. İkinci aşamada ise, şişelenmiş ürünlerin homojenlik ve kısa dönem kararlılık testleri yapılarak büyük ölçekte üretim için izlenecek yola ait son kararlar verilmiştir.

Üretimde kullanılan kuru incir ham maddesi, tek başına Türkiye üretiminin % 70-75'ini karşılayan Aydın ilinden temin edilmiştir. Kuru incirde aflatoxin sertifikalı referans malzemesinin üretimi için, 300 kg kontamine olmayan ve 25 kg kontamine kuru incir Aydın ilinde bulunan bir ihracat firmasından temin edilmiştir. Başlangıç maddesi işleme aşamasına geçilmeden UV ışını ile incelenmiştir. Tüm ham

madde ilerleyen aşamalarda herhangi bir mikrobiyolojik aktiviteyi önlemek için yaklaşık 5,3 kGy oranında gama ışınına maruz bırakılmıştır. Başlangıç maddesinin aflatoxin içeriğinin kuru, karanlık ve soğuk ortamda kararlı olduğu bilindiğinden malzeme işleme aşamasına kadar -18 °C sıcaklığa sahip depoda muhafaza edilmiştir.

Malzeme işleme kısmının en önemli aşamalarından bir tanesi liyofilizasyon aşaması olmuştur, bu aşama malzemedeki su miktarını düşürerek biyolojik aktiviteyi en aza indirmekte ve malzemenin uzun dönem kararlılığını artırmaktadır. Bıçaklı homojenleştirici (Robot Coupe, Blixer 23, USA) kullanılarak ve içerisine yaklaşık % 13 nem tutucu malzeme eklenerek elde edilen toz kuru incirin liyofilizasyon aşaması optimize edilmiştir. Üretim aşamasının akış şeması Şekil 2’de verilmiştir.

Liyofilizasyon aşamasından sonra (kütle kaybı yaklaşık olarak % 14), tüm malzeme 500 µm elekten geçirilmiştir. 3-D karıştırıcı (3-D MegaMix, HKTM, Türkiye) ile homojenleştirme işlemi sonrası, malzeme yarı-otomatik dolum makinesi (Augapack, Vectofill, Belçika) kullanılarak (her şişede 160 g toz kuru incir olacak şekilde) koyu renkli HDPE şişelere doldurularak kapakları kapatılmış ve -80 °C’de depolanmadan önce ikinci gama ışınlanmasına maruz bırakılmıştır.



Şekil 2. Kuru incir malzeme işleme akış şeması

Işık ve hava geçirmeyen ve dolum sırasına göre numaralandırılarak etiketlenen şişeler numaraları TÜBİTAK UME Bilgi İşlem Birimi tarafından geliştirilen Tabakalı Rastgele Numune Seçimi TRaNS

yazılımı ile belirlenerek homojenlik, kısa ve uzun dönem kararlılık ve karakterizasyon testlerine tabi tutulmuştur. Testler sonucunda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

HOMOJENLİK

Atanmış değerin belirlenen belirsizlik değeri içerisinde olduğunu göstermek için şişeler arası homojenlik çalışması yapılır. Homojenlik çalışması tüm partiyi temsil eden sayıda şişe ile yapılır. Bu çalışmada 20 adet şişe (10 adet yedek) TRaNS ile seçilmiş ve homojenlik çalışması için ayrılmıştır. Homojenlik çalışması tüm analitler için tekrarlanabilirlik koşulları altında her şişeden 3 bağımsız alt örnek çalışılarak yapılmıştır. Ölçümlerde geçerli kılınmış metot kullanılmış olup, örnekler analitik ölçüm sırası ve dolun sırasındaki olası eğilimleri ortaya çıkarmak için karışık (rastgele) olarak cihaza sunulmuştur. Tüm homojenlik çalışması ölçümleri HPLC-FLD metodu kullanılarak yapılmıştır. Tüm homojenlik verileri Ek 1'de ve grafikleri Ek 2'de verilmiştir.

Elde edilen tüm veriler, ünitelerin analiz sırasına göre ve dolun sırasına göre herhangi bir eğilim olup olmadığını tespiti için istatistiksel olarak regresyon analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre yapılan değerlendirmeler sonucunda, % 95 aralığında herhangi bir eğilim gözlenmemiştir.

Tüm verilere Grubbs testi uygulanarak % 95 güven aralığında aykırı değer olup olmadığı incelenmiştir. Buna göre CRM içindeki her bir analit için veriler tek tek incelendiğinde dağılımın normal olduğu görülmüş ve herhangi bir aykırı değer tespit edilmemiştir (Tablo 1).

Tablo 1. CRM 1302 için Homojenlik Verilerinin İstatistiksel Değerlendirmesi

Analit	Eğilim Var mı?		Aykırı Değer Var mı?		Dağılım
	Analitik Sırası	Dolum Sırası	Tüm Veriler	Ünitelerin Ortalamaları	Tüm Veriler
AFB ₁	Yok	Yok	Yok	Yok	Normal/Tek Tepeli
AFB ₂	Yok	Yok	Yok	Yok	Normal/Tek Tepeli
AFG ₁	Yok	Yok	Yok	Yok	Normal/Tek Tepeli
AFG ₂	Yok	Yok	Yok	Yok	Normal/Tek Tepeli
Toplam AF	Yok	Yok	Yok	Yok	Normal/Tek Tepeli

Varyans analizi (ANOVA) malzemelerin homojenliklerinden gelen belirsizlik katkılarını hesaplamak için istatistiksel araç olarak kullanılır. Tüm veriler tek yönlü ANOVA uygulanmadan önce normal olasılık dağılım eğrileri, Shapiro-Wilk testi ve histogram diyagramları kullanılarak tek tepeli (normal) dağılım bakımından incelenmiş olup, tüm analitler için (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve toplam AF) verilerin normal dağılım gösterdiği görülmüştür. Denklem (1) metot tekrarlanabilirliğinin (s_{wb}), denklem (2) ise üniteler arası standart sapmanın (s_{bb}) hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$s_{wb} = \sqrt{MS_{within}} \quad (1)$$

Burada, MS_{within} ünite içi varyans karelerinin ortalamasını göstermektedir ve s_{wb} ise -altörnekler tüm üniteyi temsil ettiği sürece- metodun "s" sine eşittir.

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{between} - MS_{within}}{n}} \quad (2)$$

Bu denklemde, $MS_{between}$ üniteler arası varyans karelerinin ortalamasını ifade ederken n ünite başına tekrar sayısını göstermektedir.

Metot tekrarlanabilirliğinin malzemenin homojenliğini tespit edebilecek kadar iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olmadığı durumlar veya ölçüm esnasında rastgele meydana gelmiş olabilecek dalgalanmalardan dolayı $MS_{between}$ MS_{within} 'den küçük olarak bulunabilmektedir. Bu durumlarda s_{bb} hesaplanamayacağından, metot tekrarlanabilirliğini de kapsayan heterojenliğin belirsizliğe katkısı olarak u^*_{bb} denklem (3) kullanılarak hesaplanır.

$$u^*_{bb} = \frac{s_{wb}}{\sqrt{n}} \sqrt{4 \frac{2}{v_{MS_{within}}}} \quad (3)$$

Bu denklemde, $v_{MS_{within}}$ MS_{within} 'in serbestlik derecesi ifade etmektedir.

Homojenlik çalışmasından elde edilen belirsizlik değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. UME CRM 1302 Homojenlik Çalışması Sonuçları

Analit	Ortalama Değer (ng/g)	$s_{bb,rel}$ (%)	$u^*_{bb,rel}$ (%)	$u_{bb,rel}$ (%)
AFB ₁	5,38	2,27	2,29	2,29
AFB ₂	0,60	$MS_{between} < MS_{within}$	4,05	4,05
AFG ₁	2,21	7,46	4,30	7,46
AFG ₂	0,18	4,77	4,57	4,77
Toplam AF	8,37	1,52	2,05	2,05

AFB₂ için $MS_{between}$ değeri MS_{within} değerinden düşük bulunmuştur. Bundan dolayı homojenlikten gelen belirsizlik katkısı için u^*_{bb} değeri hesaplanmış ve kullanılmıştır. Hem s_{bb} hem de u^*_{bb} hesaplandığı durumlarda homojenlikten gelen belirsizlik katkısı için büyük olan değer dikkate alınır.

KARARLILIK

Kararlılık çalışmaları, sertifikalı referans malzemenin kullanıcıya gönderilmesi sırasında meydana gelebilecek çevresel şartların (kısa dönem kararlılık) ve depolama koşullarının (uzun dönem kararlılık) laboratuvarında benzer koşullar yaratılması ile gerçekleştirilmiştir.

Kısa Dönem Kararlılık Çalışması

Kararlılık çalışmaları ISO Guide 35’de belirtilen eşzamanlı ölçüm tasarımı (isochronous design) ile gerçekleştirilmiştir [4]. Kısa Dönem Kararlılık (KDK) testleri için iki farklı sıcaklık (-20 °C ve 4 °C) seçilmiş ve 4 zaman noktasında (1, 2, 3 ve 4 hafta) test edilmiştir. TRaNS ile 10 adet numune seçilmiştir. 8 adet numune belirlenen sıcaklık ve zaman süresince test edilmiştir.

Numuneler testin tamamlanmasından sonra -80 °C’ye (referans sıcaklık) geri konulmuştur. Tüm örnekler aynı anda analiz edilmişlerdir. Her üniteden iki bağımsız alt örnek, tekrarlanabilirlik koşulları altında çalışılarak HPLC-FLD metoduyla AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve toplam AF için kütle kesri belirlenmiştir.

Her bir sıcaklıktaki değerler, tek yönlü Grubbs testi uygulanarak hem % 95 hem de % 99 güven aralığında aykırı değerler açısından incelenmiştir. Tüm analitler için tespit edilmiş aykırı değer sayısı Tablo 3’te verilmiştir. Söz konusu aykırı değerler için herhangi bir teknik gerekçe tespit edilemediğinden KDK değerlendirmesine dahil edilmiştir.

Kısa dönem kararlılık verilerinin değerlendirilmesinde her bir zaman noktası için hesaplanan değerlerin zamana karşı grafiği çizilmiştir. Zamana karşı değerlerinde herhangi anlamlı bir değişim olup olmadığının belirlenmesi için değişkenler arasındaki ilişki incelenmiştir (*regresyon analizi*). Her bir analit için çizilen eğim çizgileri için %95 güven aralığında uygulanan istatistiki değerlendirme sonucu eğimin sıfırdan anlamlı derecede farklı olmadığı tespit edilmiştir. Kısa dönem kararlılık testi ile ilgili tüm veriler Ek 3’te, grafikler ise Ek 4’te verilmiştir.

Kısa dönem kararlılığa ilişkin olarak belirsizlik hesaplamaları denklem (4) kullanılarak hesaplanmıştır. Malzemenin transferi için seçilen en uzun süre 2 haftadır.

$$u_{sts} = \frac{RSD}{\sqrt{\sum(t_i - \bar{t})^2}} t \quad (4)$$

Burada,

- RSD* : Kısa dönem kararlılık verilerinden elde edilen bağıl standart sapma,
t_i : Her bir tekrar için zaman noktası,
 \bar{t} : Tüm zaman noktalarının ortalaması,
t : Transfer için önerilen maksimum süreyi (2 hafta) ifade etmektedir.

Kısa dönem kararlılık çalışmasından elde edilen sonuçlar Tablo 3’te verilmiştir.

Table 3. Kısa Dönem Kararlılık Testi Sonuçları

Analit	U _{sts,rel} (%, 2 hafta için)		%95 Güven Aralığındaki Aykırı Değer Sayısı*		%99 Güven Aralığındaki Aykırı Değer Sayısı*		%95 güven aralığında anlamlı bir eğilim var mı?		%99 güven aralığında anlamlı bir eğilim var mı?	
	-20 °C	4 °C	-20 °C	4 °C	-20 °C	4 °C	-20 °C	4 °C	-20 °C	4 °C
AFB ₁	2,41	2,42	1	-	1	-	Yok	Yok	Yok	Yok
AFB ₂	2,42	2,76	-	-	-	-	Yok	Yok	Yok	Yok
AFG ₁	6,38	4,81	-	-	-	-	Yok	Yok	Yok	Yok
AFG ₂	5,25	4,34	-	-	-	-	Yok	Yok	Yok	Yok
Toplam AF	3,06	2,58	1	-	-	-	Yok	Yok	Yok	Yok

* Tekli Grubbs Testi

Kısa dönem kararlılık testi çalışmalarına göre CRM'nin nakliyesi aşamasında 2 haftayı geçmeyecek sürede sıcaklığın (+)4 °C'yi geçmeyeceği koşullarda gönderilmesi uygun bulunmuştur.

Uzun Dönem Kararlılık Çalışması

Üretilen SRM'nin raf ömrü, uzun dönem kararlılık çalışmaları ile belirlenir. Uzun dönem Kararlılık (UDK) testleri için +4 °C sıcaklık seçilmiş ve toplam 20 (10 yedek) ünite analiz için ayrılmıştır. Bu ünitelerin TRaNS ile belirlenmiş ve en uzun 9 ay süresince +4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Her bir zaman noktası için iki ünite (0, 2, 4, 6 ve 9 ay) +4 °C sıcaklıkta muhafaza edilerek test süresi bitiminde - 80 °C (referans sıcaklık) sıcaklığa geri konulmuştur. Her bir üniteden 2 paralel olacak şekilde hazırlanan örnekler tekrarlanabilirlik koşulları altında HPLC-FLD ile analiz edilerek AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve toplam AF için kütle kesirleri belirlenmiştir.

Elde edilen veriler içerisinde, tek yönlü Grubbs testi uygulanarak % 95 ve % 99 güven aralıklarında aykırı değer olup olmadığı incelenmiştir. Tespit edilen aykırı değerlerin sayısı Tablo 4'te verilmiştir. Tespit edilen aykırı değerler için geçerli teknik gerekçe bulunamadığından bu değerler uzun dönem kararlılık verilerinin değerlendirilmesi sırasında veri setine dahil edilmiştir. Uzun dönem kararlılık çalışmaları ile ilgili tüm veriler Ek 5'te, grafikler ise Ek 6'da verilmiştir.

UDK değerlendirmesinde her bir zaman noktası için hesaplanan ortalama değerlere karşı zaman grafiği çizilmiştir. Test süresince analitlerin kütle kesri değerleri arasında anlamlı bir değişim olup olmadığını anlamak için değişkenler arasındaki ilişki incelenmiştir (regresyon analizi). Yapılan değerlendirme sonunda tüm analitler için % 95 güven aralığında eğimin, sıfırdan anlamlı şekilde farklı olmadığı belirlenmiştir. UDK'nın +4 °C'de bir yıl için belirsizliğe katkısı, u_{IIS} , denklem (5) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$u_{IIS} = \frac{RSD}{\sqrt{\sum (t_i - \bar{t})^2}} \times t \quad (5)$$

Burada,

RSD : Kararlılık çalışmasında elde edilen bütün sonuçların bağıl standart sapması,

t_i : Her bir paralel için zaman noktası,

\bar{t} : Bütün zaman noktalarının ortalaması,

t : +4 °C'de önerilen raf ömrünü (6 ay) ifade etmektedir.

CRM raf ömrü satış sonrası 6 ay olarak belirlenmiştir. Daha uzun süreçte sertifika değerlerinin geçerliliğini kontrol etmek için sürekli sertifika sonrası izleme çalışmaları yapılacaktır.

Tablo 4. CRM 1302 Uzun Dönem Kararlılık Testi Sonuçları

Analyte	$u_{IIS,rel}$ (% , 6 ay) +4 °C	%95 Güven Aralığındaki Aykırı Değer Sayısı*	%99 Güven Aralığındaki Aykırı Değer Sayısı*	%95 güven aralığında anlamlı bir eğilim var mı?	%99 güven aralığında anlamlı bir eğilim var mı?
AFB ₁	5,36	-	-	Yok	Yok
AFB ₂	6,66	1	-	Yok	Yok
AFG ₁	6,38	1	1	Yok	Yok
AFG ₂	6,30	-	-	Yok	Yok
Total AF	4,93	-	-	Yok	Yok

* Tekli Grubbs Testi

KARAKTERİZASYON

ISO Guide 34 gerekliliklerini yerine getirerek karakterizasyon ve değer atanması 4 farklı şekilde yapılabilir [1]. Bu projede, ISO Guide 34 gerekliliklerini yerine getirerek tek bir laboratuvar tarafından doğrulukları kanıtlanabilir 2 farklı metot kullanımı yolu seçilmiştir. Karakterizasyon için enstitü içerisinde geliştirilen ekstraksiyon kısmı BS EN 14123:2007 metodunun ekstraksiyon kısmının 6 g malzeme için ölçeklendirilmesi ile, temizlik aşamasında IAC kolon kullanılarak kolon sonrası türevlendirmenin yapıldığı ters faz HPLC ile analitlerin ayırım yapıldığı floresan dedektörünün kullanıldığı HPLC-FLD metodu ve özütleme kısmında aynı yolun izlendiği sadece özüt miktarı ve buna bağlı IAC kolonun değiştiği ve dedektör olarak kütle dedektörünün kullanıldığı yüksek çözünürlüklü HPLC-MS cihazı ile analizlerin yapıldığı IDMS metodu kullanılmıştır. Metotların kalibrasyonunda kullanılan standartlar ticari firmalardan yüksek saflıkta alınmış ve TÜBİTAK UME Laboratuvarları tarafından Q-NMR ile UME CRM 1301 üzerinde SI izlenebilirliği sağlanarak saflık değerleri belirlenmiştir.

Karakterizasyon çalışmasında kullanılacak şişelerin numaraları TRaNS ile tüm parti içerisinden rastgele olacak şekilde belirlenmiştir.

Karakterizasyon çalışmalarında elde edilen verilerin normal dağılım gösterdiği görülmüş ve ölçümlerin belirsizlikleri “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements (GUM)” ve “EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement” dokümanlarına uygun olarak, M. S. Lenson ve ark. tarafından literatürde belirtilen (6) – (8) nolu denklemler kullanılarak hesaplanmıştır [12].

$$u(B) = \frac{|X_{HPLC} - X_{LC ID MS}|}{2\sqrt{3}} \quad (6)$$

$$u(X) = \sqrt{\left(\frac{1}{2}\right)^2 u^2(HPLC) + \left(\frac{1}{2}\right)^2 u^2(LC IDMS)} \quad (7)$$

$$u_{char} = \sqrt{u^2(X) + u^2(B)} \quad (8)$$

Burada,

$u(B)$: İki metodun sonuçlarının farkı üzerinden standart belirsizlik,

$u(X)$: İki metodun belirsizliğinin birleştirilmesinden elde edilen standart belirsizlik,

u_{char} : İki metot tarafından karakterizasyonun standart belirsizliği ifade etmektedir.

Malzemenin değer atanması iki metodun sonuçlarının ortalaması alınarak yapılmıştır. Karakterizasyon çalışması ile ilgili tüm veriler Ek 7’de verilmiştir.

ÖZELLİK DEĞERLERİNİN VE BELİRSİZLİKLERİNİN ATANMASI

SRM değerlerinin ve belirsizliklerinin atanması karakterizasyonda elde edilen veriler ve bununla beraber değer belirsizliğine katkısı olan homojenlik ve kararlılık çalışmalarının verileri değerlendirilerek birleştirme yaklaşımı ile gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon çalışmalarında elde edilen veriler normal dağılım ve aykırı değer tespiti için incelenmiştir. Yapılan istatistik testleri sonucunda değerlerin doğal dağılım gösterdiği ve aykırı değer olmadığı görülmüştür.

Karakterizasyon çalışmasından elde edilen ortalama değer referans malzemenin atanmış değeri olarak belirlenmiştir. Karakterizasyon için kullanılan iki yöntemde aynı ekstraksiyon yöntemine bağlı

olarak atanan değer için yanlılığın (bias) olmaması, Kimya ve Biyolojide Metroloji (CCQM) Madde Miktarı Danışma Komitesi Organik Analiz Çalışma Grubu (OAWG) bünyesinde TÜBİTAK UME tarafından düzenlenen "CCQM-K138 Determination of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ and Total AFs) in Dried Fig" uluslararası karşılaştırma çalışmasından elde edilen veri setiyle karşılaştırma yapılarak doğrulanmıştır [13]. Katılımcı laboratuvarlar tarafından karşılaştırma çalışmasına rapor edilen sonuçların grafikleri Ek 8'de verilmiştir.

Denklem (9), referans malzemenin birleştirilmiş genişletilmiş belirsizlik hesaplamasında kullanılmıştır.

$$U_{CRM} = k \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{Its}^2 + u_{sts}^2} \quad (9)$$

Sertifika değerleri üzerindeki belirsizlik karakterizasyon çalışmasından kaynaklanan belirsizliği (u_{char}), homojenlikten kaynaklanan belirsizliği (u_{bb}), kısa dönem kararlılıktan kaynaklanan belirsizliği (u_{sts}) ve uzun dönem kararlılıktan kaynaklanan belirsizliği (u_{Its}) içerir. Sertifika değeri üzerindeki genişletilmiş belirsizlik değeri yaklaşık %95 güvenilirlik seviyesini temsil eden kapsam faktörü, $k = 2$ temel alınarak hesaplanmıştır. Sertifika değerleri ve belirsizlikleri Tablo 5'te, her bir parametrenin sertifika değeri üzerindeki toplam belirsizliğe yapmış olduğu yüzde katkısı ise Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. Sertifika Değerleri ve Belirsizlik Bileşenleri

Analit	Sertifikalandırılan Değer (µg/kg)	U_{CRM} (µg/kg, $k = 2$)	$U_{CRM,rel}$ (% , $k = 2$)	$u_{char,rel}$ (%)	$u_{bb,rel}$ (%)	$u_{Its,rel}$ (%)	$u_{sts,rel}$ (%)
AFB ₁	5,5	0,8	14,22	3,28	2,29	5,36	2,42
AFB ₂	0,61	0,12	18,74	4,42	4,05	6,66	2,76
AFG ₁	2,19	0,52	23,72	4,61	7,46	6,38	4,81
AFG ₂	0,19	0,04	21,28	5,65	4,77	6,30	4,34
Toplam AF	8,5	1,1	12,73	2,32	2,05	4,93	2,58

Tablo 6. Herbir Parametrenin U_{CRM} Değerine Yüzde Katkısı

Analit	$u_{char,rel}$ (%)	$u_{bb,rel}$ (%)	$u_{Its,rel}$ (%)	$u_{sts,rel}$ (%)
AFB ₁	21	10	57	12
AFB ₂	22	19	50	9
AFG ₁	15	40	29	16
AFG ₂	28	20	35	17
Toplam AF	13	10	60	17

EK BİLGİLER

CRM numunesindeki su miktarı Kulometrik Karl Fischer ve Vakumlu Fırın olmak üzere iki farklı metot kullanılarak belirlenmiştir. 10 farklı üniteden iki bağımsız alt örnek çalışılarak testler yapılmıştır. CRM'deki su miktarı ortalama % 6,73 olarak belirlenmiştir.

Analitlere ait verilen sertifika değerleri için herhangi bir kuru kütle düzeltmesi yapılmamış olup CRM içerisindeki su miktarı bilgi amaçlı verilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü'nden Hayrettin ÖZER, H. İmge OKTAY, Nihat ÖZCAN, Arif SELÇUK, Basri ÇIRAK, Nabi UYGUN, Ömer Ethem ÖZSOY'a ve TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü'ne fizibilite çalışmaları ve üretim çalışmaları sırasında yaptıkları değerli bilgi transferi ile gayretleri, malzeme işleme aşamasındaki yardımları ve projenin başında yapmış oldukları ölçümler için teşekkürlerini sunmaktadır. Sayın Ayhan BAKLAN ve İSTANBUL PENDİK VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ'ne liyofilizasyon çalışmalarındaki yardımları için teşekkür ederiz. Projenin ISO Guide 34 akreditasyon denetimi sırasındaki değerli görüşleri ve müzakereleri için sayın Leslie COVENEY, Ruth HEARN, M. Saim SOYSAL ve Didem Hilkat AKSAKAL'a teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca Dr. Steven WESTWOOD'a ISO Guide 34'den ISO 17034'e geçiş denetimi sırasındaki değerli görüşleri ve önerileri için teşekkürlerimizi sunarız.

İZLENEBİLİRLİK

Kullanılan tüm stok ve kalibrasyon çözeltileri saflıkları TÜBİTAK UME tarafından Q-NMR ölçümleri ile belirlenmiş ve ticari olarak satılmakta olan yüksek saflıktaki katılardan çözerek hazırlanmıştır. Kullanılan teraziler kütle setleri ile günlük olarak kontrol edilmektedir ve TÜBİTAK UME'deki ulusal kütle standardına izlenebilir. Kullanılan standartların SI izlenebilirlikleri Q-NMR ölçümleri ile UME CRM 1301 üzerinden sağlanmıştır.

KULLANIM TALİMATI**Saklama Koşulları**

UME CRM 1302 +4 °C veya daha düşük sıcaklıklarda saklanmalıdır. CRM'nin şişe açılır açılmaz kullanılması tavsiye edilir. Şişe açıldıktan sonra saklanacaksa -20 °C veya daha düşük sıcaklıklarda saklanması ve dondur-çöz döngülerini minimize edecek şekilde alt örneklere bölünerek saklanması önerilir. Alt örneklere bölme işlemi sırasında numunenin ışık ve havadaki rutubete uzun süre maruz kalmamasına dikkat edilmelidir. TÜBİTAK UME, malzeme ile ilgili bildirdiği saklama koşulları ve kullanım talimatına uyulmaması nedeniyle malzemede meydana gelebilecek değişikliklerden sorumlu tutulamaz. Malzeme transfer süresinin 2 haftayı sıcaklığın +4 °C'yi geçmediği koşullarda güvenle transfer edilebilir.

Sayfa 16 / 34	TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ	UME CRM 1302
---------------	---	-------------------------

Minimum Örnek Alımı

Tavsiye edilen minimum örnek alımı 6 g'dır, homojenlik çalışmaları 6 g örnek kullanılarak yapılmıştır.

Güvenlik Uyarıları

Genel laboratuvar güvenlik tedbirleri geçerlidir. Yerel kurallara göre malzemelerin kullanımı ve atılması tavsiye edilir. Toz filtreli yüz maskesi kullanımı ve iyi havalandırması olan laboratuvarında çalışılması tavsiye edilmektedir. Kullanmadan önce UME CRM 1302'ye ait Güvenlik Bilgi Formu'nun okunması tavsiye edilir.

KAYNAKLAR

- [1] Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, Tebliğ No: 2012/58, 29 Aralık 2011 tarih, 28157 sayılı Resmî Gazete.
- [2] ISO Guide 34:2009. General requirements for the competence of reference materials producers
- [3] ISO 17034:2016. General requirements for the competence of reference materials producers
- [4] ISO Guide 35:2006. Reference materials – General and statistical principles for certification
- [5] ISO Guide 35:2017. Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability
- [6] Turan, A.; Celik, I. Antioxidant and hepatoprotective properties of dried fig against oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 554-559.
- [7] Tawfik, M. S.; Alhejy, M. Antioxidants in Fig (*Ficus carica* L.) and their effects in the prevention of atherosclerosis in hamsters. *J. Food Nutr. Sci.* **2014**, *2(4)*, 138-145.
- [8] Solomon, A.; Golubowicz, S; Yablowicz, Z.; Grossman, S.; Bergman, M.; Gottlieb, H. E.; Altman, A.; Kerem, Z.; Flaishman, M. A. Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 7717-7723.
- [9] Karbancıoğlu-Güler, F.; Heperkan, D. Natural Occurrence of Fumonisin B1 in Dried Figs as an Unexpected Hazard. *Food Chem. Tox.* **2009**, *47*, 289-292.
- [10] Çobanoğlu, F.; Armağan, G.; Kocataş, H.; Şahin, B.; Ertan, B.; Özen, M. Aydın İlinde İncir Üretiminin Önemi ve Kuru İncir Üretim Faaliyetinin Ekonomik Analizi. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **2005**, *2(2)*, 35-42.
- [11] Kabak, B. Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment. *Food Chem.* **2016**, *211*, 8-16.
- [12] Lenson, M.S. An Approach to Combining Results From Multiple Methods Motivated by the ISO GUM, *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **2000**, *105*, 577
- [13] Bilsel, M. et al; Report on key comparison CCQM-K138: Determination of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ and total AFs) in dried fig, *Metrologia* **2019**, *56*, 1A

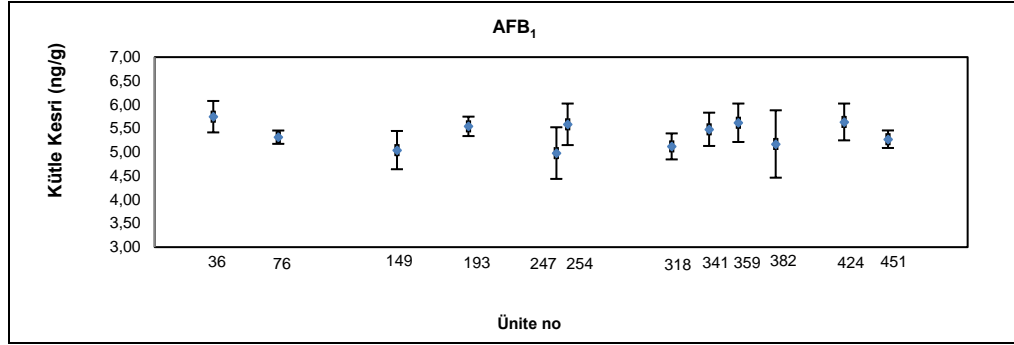
REVİZYON TARİHÇESİ

Tarih	Açıklama
31.08.2016	İlk Yayın
25.11.2019	Belirsizlik değerleri yeni tahmin formülüne ve 6 ay raf ömrüne göre yeniden hesaplanarak revize edilmiştir. CCQM karşılaştırması bilgileri ve malzemenin ISO 17034:2016 standardına ve ISO Guide 35:2017 klavuz dökümanına uygunluk bilgileri eklendi.

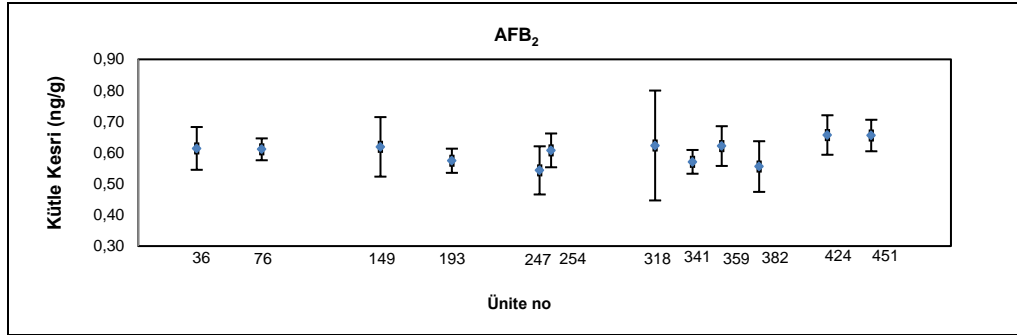
Ek 1. UME CRM 1302 için Homojenlik Verileri**Tablo A1.1. UME CRM 1302 Homojenlik Ham Verileri**

Ünite No	Ünite Tekrarları	Sonuçlar, ng/g				Toplam AF
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	
149	149,1	5,28	0,55	2,70	0,20	8,72
	149,2	5,27	0,73	2,83	0,22	9,05
	149,3	4,58	0,58	2,05	0,21	7,42
254	254,1	5,49	0,56	2,16	0,16	8,37
	254,2	5,21	0,59	2,32	0,19	8,30
	254,3	6,06	0,67	1,64	0,14	8,50
382	382,1	4,45	0,48	1,79	0,15	6,87
	382,2	5,86	0,64	2,30	0,20	9,01
	382,3	5,21	0,55	1,94	0,15	7,84
341	341,1	5,74	0,61	1,92	0,16	8,43
	341,2	5,63	0,57	2,07	0,22	8,49
	341,3	5,08	0,53	1,82	0,15	7,58
36	36,1	5,62	0,55	1,84	0,18	8,19
	36,2	5,50	0,68	2,27	0,23	8,69
	36,3	6,12	0,61	2,04	0,16	8,92
424	424,1	5,79	0,60	2,07	0,17	8,62
	424,2	5,93	0,72	2,08	0,20	8,93
	424,3	5,20	0,65	2,74	0,24	8,82
359	359,1	5,90	0,65	2,15	0,18	8,88
	359,2	5,15	0,55	2,09	0,16	7,95
	359,3	5,80	0,67	2,05	0,17	8,68
76	76,1	5,45	0,58	2,24	0,16	8,42
	76,2	5,32	0,60	2,04	0,16	8,13
	76,3	5,17	0,65	3,03	0,23	9,08
247	247,1	4,59	0,48	1,96	0,16	7,19
	247,2	4,75	0,52	1,88	0,16	7,31
	247,3	5,60	0,63	1,79	0,12	8,14
193	193,1	5,31	0,53	1,82	0,15	7,81
	193,2	5,63	0,60	2,54	0,18	8,96
	193,3	5,69	0,59	2,48	0,18	8,94
318	318,1	4,82	0,44	2,74	0,17	8,17
	318,2	5,20	0,79	2,76	0,19	8,95
	318,3	5,35	0,63	2,27	0,17	8,42
451	451,1	5,08	0,64	2,60	0,19	8,52
	451,2	5,29	0,71	2,25	0,18	8,43
	451,3	5,45	0,61	2,41	0,18	8,65

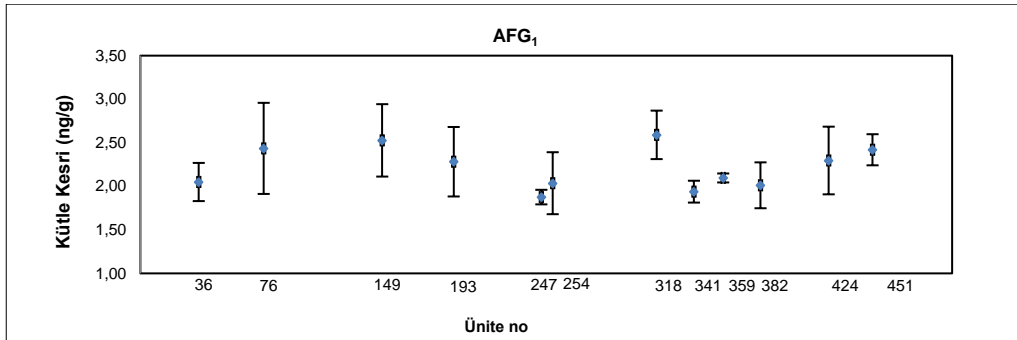
Ek 2. Homojenlik Grafikleri



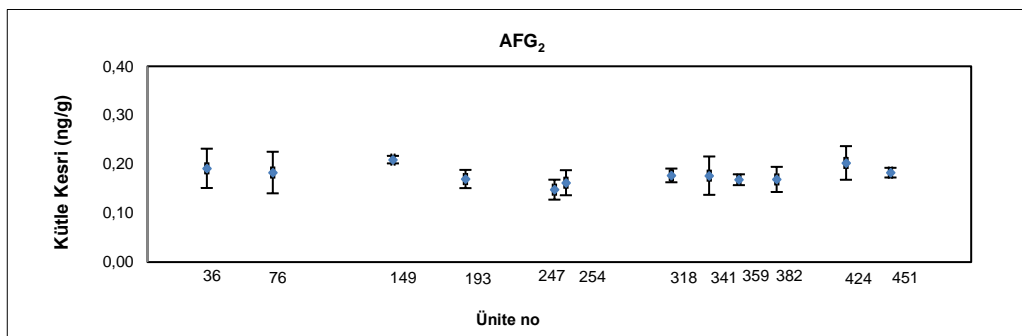
Şekil A2.1. AFB₁, Homojenlik Grafiği



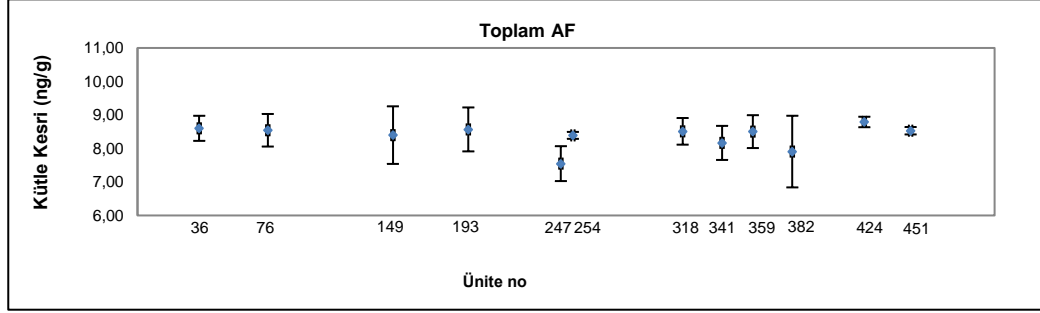
Şekil A2.2. AFB₂, Homojenlik Grafiği



Şekil A2.3. AFG₁, Homojenlik Grafiği



Şekil A2.4. AFG₂, Homojenlik Grafiği

**Şekil A2.5.** Toplam AF, Homojenlik Grafiği

Ek 3. UME CRM 1302 Kısa Dönem Kararlılık (KDK) Verileri**Tablo A3.1. UME CRM 1302, AFB₁ için +4 °C ve -20 °C KDK Verileri**

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)	Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)
12	108	0	-80	5,46	12	108	0	-80	5,46
10	311	0	-80	5,46	10	311	0	-80	5,46
15	108	0	-80	4,97	15	108	0	-80	4,97
23	311	0	-80	5,44	23	311	0	-80	5,44
22	22	1	-20	5,69	16	7	1	4	6,24
13	388	1	-20	6,71	2	262	1	4	5,17
32	22	1	-20	5,36	25	7	1	4	5,88
9	388	1	-20	5,20	34	262	1	4	5,75
18	33	2	-20	5,25	17	44	2	4	4,75
5	415	2	-20	5,37	33	297	2	4	5,01
35	33	2	-20	5,09	24	44	2	4	5,78
11	415	2	-20	5,62	4	297	2	4	5,23
20	86	3	-20	5,67	3	63	3	4	5,21
27	206	3	-20	5,80	19	319	3	4	5,65
26	86	3	-20	5,08	6	63	3	4	5,56
7	206	3	-20	5,79	1	319	3	4	5,59
36	121	4	-20	5,01	29	104	4	4	4,75
21	361	4	-20	5,26	30	495	4	4	5,15
28	121	4	-20	5,82	31	104	4	4	5,94
14	361	4	-20	5,06	8	495	4	4	5,73

Tablo A3.2. UME CRM 1302, AFB₂ için +4 °C ve -20 °C KDK Verileri

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)	Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)
12	108	0	-80	0,64	12	108	0	-80	0,64
10	311	0	-80	0,76	10	311	0	-80	0,76
15	108	0	-80	0,72	15	108	0	-80	0,72
23	311	0	-80	0,76	23	311	0	-80	0,76
22	22	1	-20	0,70	16	7	1	4	0,86
13	388	1	-20	0,86	2	262	1	4	0,77
32	22	1	-20	0,68	25	7	1	4	0,70
9	388	1	-20	0,74	34	262	1	4	0,75
18	33	2	-20	0,75	17	44	2	4	0,65
5	415	2	-20	0,72	33	297	2	4	0,69
35	33	2	-20	0,69	24	44	2	4	0,73
11	415	2	-20	0,71	4	297	2	4	0,76
20	86	3	-20	0,80	3	63	3	4	0,71
27	206	3	-20	0,79	19	319	3	4	0,84
26	86	3	-20	0,68	6	63	3	4	0,73
7	206	3	-20	0,84	1	319	3	4	0,82
36	121	4	-20	0,67	29	104	4	4	0,64
21	361	4	-20	0,76	30	495	4	4	0,68
28	121	4	-20	0,75	31	104	4	4	0,74
14	361	4	-20	0,77	8	495	4	4	0,80

Table A3.3. UME CRM 1302, AFG₁ için +4 °C ve -20 °C KDK Verileri

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)	Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)
12	108	0	-80	1,29	12	108	0	-80	1,29
10	311	0	-80	1,53	10	311	0	-80	1,53
15	108	0	-80	1,76	15	108	0	-80	1,76
23	311	0	-80	1,40	23	311	0	-80	1,40
22	22	1	-20	2,18	16	7	1	4	1,83
13	388	1	-20	2,14	2	262	1	4	1,36
32	22	1	-20	2,03	25	7	1	4	2,11
9	388	1	-20	1,15	34	262	1	4	1,79
18	33	2	-20	2,02	17	44	2	4	1,28
5	415	2	-20	1,54	33	297	2	4	1,34
35	33	2	-20	1,34	24	44	2	4	1,54
11	415	2	-20	1,89	4	297	2	4	1,27
20	86	3	-20	1,74	3	63	3	4	1,71
27	206	3	-20	1,70	19	319	3	4	1,18
26	86	3	-20	1,21	6	63	3	4	1,58
7	206	3	-20	1,51	1	319	3	4	1,37
36	121	4	-20	1,88	29	104	4	4	1,46
21	361	4	-20	1,22	30	495	4	4	1,53
28	121	4	-20	1,90	31	104	4	4	1,61
14	361	4	-20	1,44	8	495	4	4	1,55

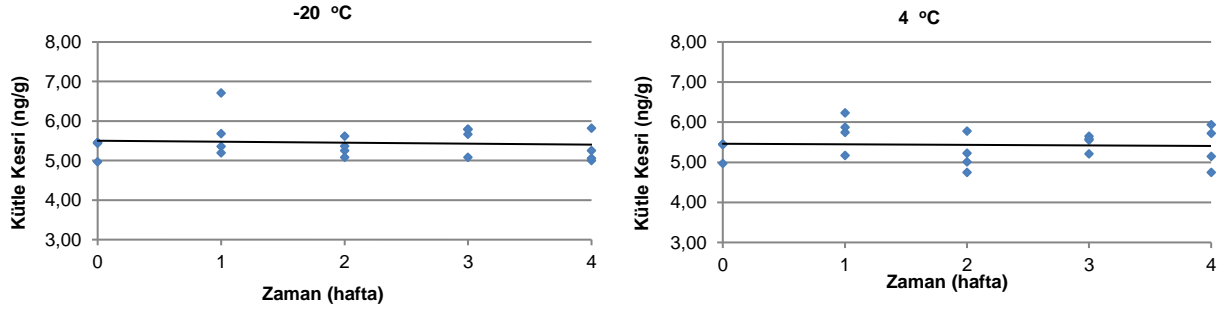
Tablo A3.4. UME CRM 1302, AFG₂ için +4 °C ve -20 °C KDK Verileri

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)	Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)
12	108	0	-80	0,13	12	108	0	-80	0,13
10	311	0	-80	0,18	10	311	0	-80	0,18
15	108	0	-80	0,20	15	108	0	-80	0,20
23	311	0	-80	0,15	23	311	0	-80	0,15
22	22	1	-20	0,23	16	7	1	4	0,20
13	388	1	-20	0,23	2	262	1	4	0,17
32	22	1	-20	0,15	25	7	1	4	0,23
9	388	1	-20	0,15	34	262	1	4	0,20
18	33	2	-20	0,22	17	44	2	4	0,16
5	415	2	-20	0,18	33	297	2	4	0,14
35	33	2	-20	0,15	24	44	2	4	0,17
11	415	2	-20	0,22	4	297	2	4	0,16
20	86	3	-20	0,20	3	63	3	4	0,20
27	206	3	-20	0,19	19	319	3	4	0,14
26	86	3	-20	0,14	6	63	3	4	0,17
7	206	3	-20	0,17	1	319	3	4	0,15
36	121	4	-20	0,19	29	104	4	4	0,16
21	361	4	-20	0,14	30	495	4	4	0,17
28	121	4	-20	0,19	31	104	4	4	0,17
14	361	4	-20	0,17	8	495	4	4	0,18

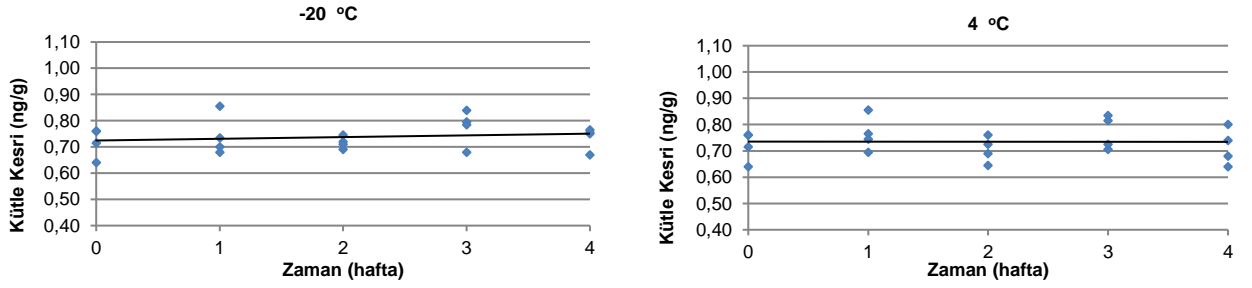
Table A3.5. UME CRM 1302, Toplam AF için +4 °C ve -20 °C KDK Verileri

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)	Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuç (ng/g)
12	108	0	-80	7,51	12	108	0	-80	7,51
10	311	0	-80	7,92	10	311	0	-80	7,92
15	108	0	-80	7,64	15	108	0	-80	7,64
23	311	0	-80	7,75	23	311	0	-80	7,75
22	22	1	-20	8,79	16	7	1	4	9,12
13	388	1	-20	9,94	2	262	1	4	7,46
32	22	1	-20	8,22	25	7	1	4	8,90
9	388	1	-20	7,23	34	262	1	4	8,48
18	33	2	-20	8,23	17	44	2	4	6,83
5	415	2	-20	7,80	33	297	2	4	7,18
35	33	2	-20	7,26	24	44	2	4	8,21
11	415	2	-20	8,44	4	297	2	4	7,42
20	86	3	-20	8,40	3	63	3	4	7,82
27	206	3	-20	8,46	19	319	3	4	7,80
26	86	3	-20	7,10	6	63	3	4	8,03
7	206	3	-20	8,30	1	319	3	4	7,92
36	121	4	-20	7,74	29	104	4	4	7,01
21	361	4	-20	7,37	30	495	4	4	7,52
28	121	4	-20	8,66	31	104	4	4	8,46
14	361	4	-20	7,43	8	495	4	4	8,25

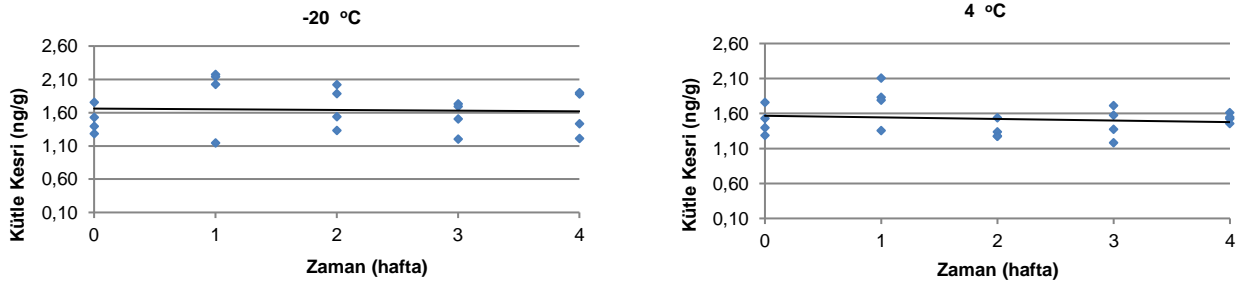
Ek 4. UME CRM 1302 +4 °C ve -20 °C için KDK Grafikleri



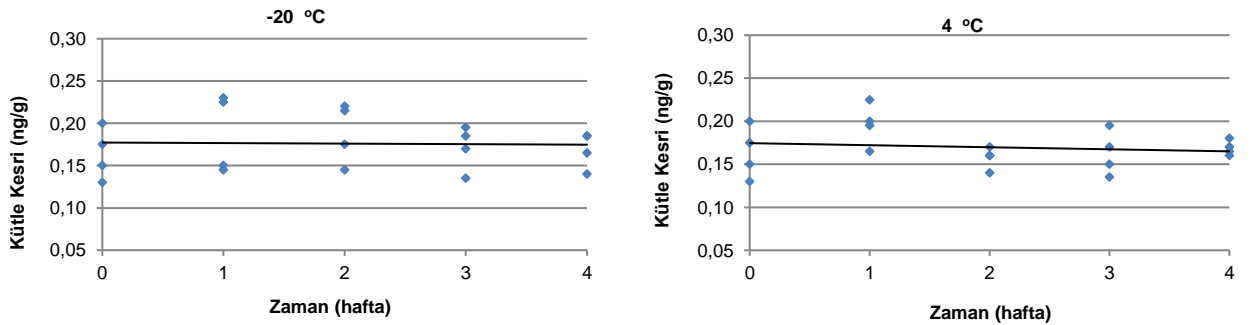
Şekil A4.1. UME CRM 1302, AFB₁ için Kısa Dönem Kararlılık Grafiği



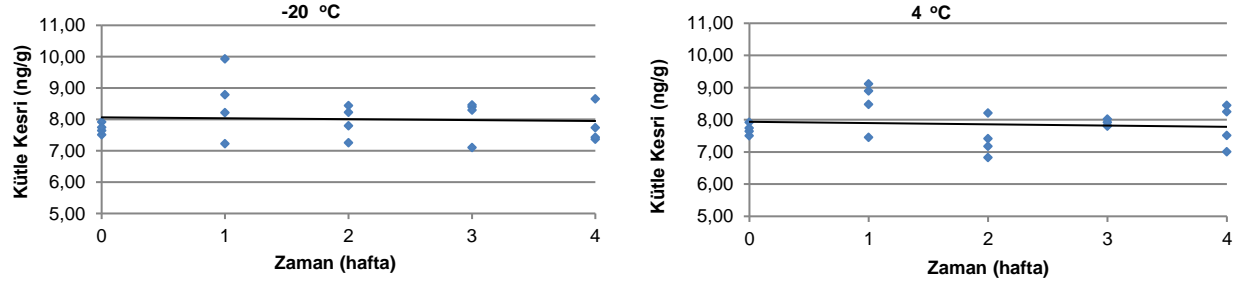
Şekil A4.2. UME CRM 1302, AFB₂ için Kısa Dönem Kararlılık Grafiği



Şekil A4.3. UME CRM 1302, AFG₁ için KDK Grafikleri



Şekil A4.4. UME CRM 1302, AFG₂ için KDK Grafikleri



Şekil A4.5. UME CRM 1302, Toplam AF için KDK Grafiği

Ek 5. UME CRM 1302 için Uzun Dönem Kararlılık (UDK) Verileri**Tablo A5.1. UME CRM 1302, AFB₁ için UDK Verileri**

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuçlar (ng/g)
8	24	0	-80	5,48
17	439	0	-80	5,64
29	24	0	-80	4,64
19	439	0	-80	5,19
26	128	2	4	6,92
27	397	2	4	4,95
36	128	2	4	5,19
10	397	2	4	6,47
35	166	4	4	6,75
1	423	4	4	5,39
6	166	4	4	6,54
32	423	4	4	5,39
11	70	6	4	6,76
14	323	6	4	5,78
22	70	6	4	6,03
9	323	6	4	5,42
20	240	9	4	5,38
24	469	9	4	5,66
5	240	9	4	5,30
31	469	9	4	7,28

Tablo A5.2. UME CRM 1302, AFB₂ için UDK Verileri

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuçlar (ng/g)
8	24	0	-80	0,54
17	439	0	-80	0,55
29	24	0	-80	0,52
19	439	0	-80	0,57
26	128	2	4	0,72
27	397	2	4	0,55
36	128	2	4	0,56
10	397	2	4	0,67
35	166	4	4	0,88
1	423	4	4	0,59
6	166	4	4	0,78
32	423	4	4	0,61
11	70	6	4	0,62
14	323	6	4	0,61
22	70	6	4	0,62
9	323	6	4	0,58
20	240	9	4	0,61
24	469	9	4	0,54
5	240	9	4	0,57
31	469	9	4	0,78

Tablo A5.3. UME CRM 1302, AFG₁ için UDK Verileri

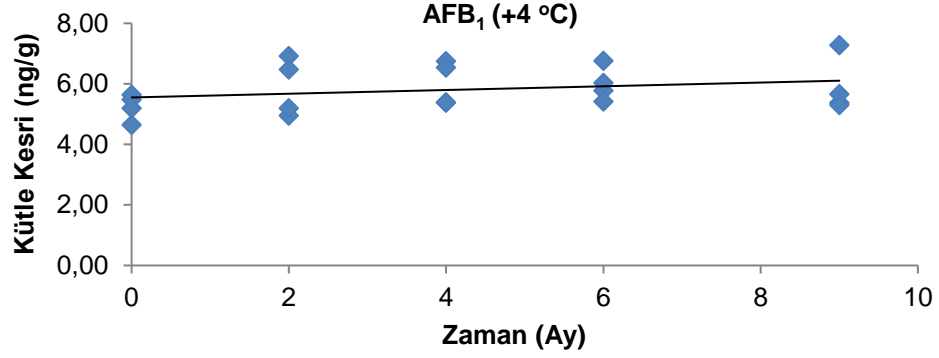
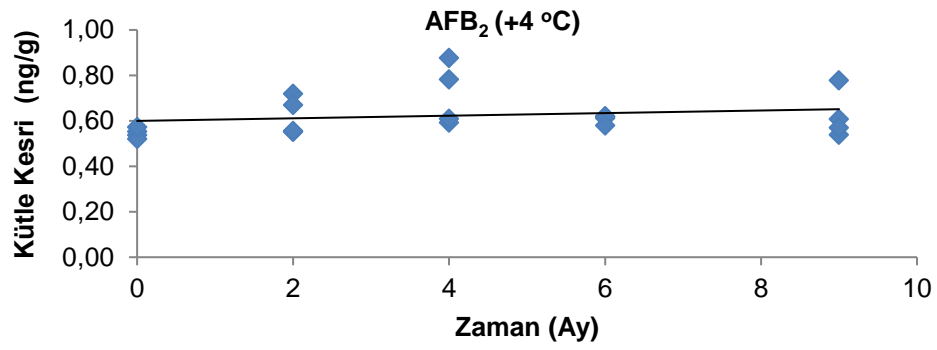
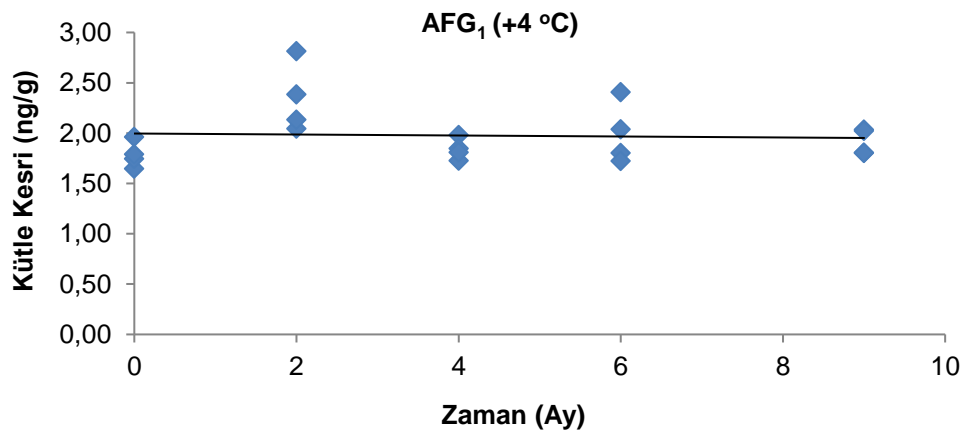
Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuçlar (ng/g)
8	24	0	-86	1,96
17	439	0	-86	1,64
29	24	0	-86	1,74
19	439	0	-86	1,79
26	128	2	4	2,81
27	397	2	4	2,38
36	128	2	4	2,04
10	397	2	4	2,13
35	166	4	4	1,98
1	423	4	4	1,73
6	166	4	4	1,85
32	423	4	4	1,81
11	70	6	4	2,41
14	323	6	4	2,04
22	70	6	4	1,80
9	323	6	4	1,72
20	240	9	4	1,80
24	469	9	4	1,80
5	240	9	4	2,04
31	469	9	4	2,02

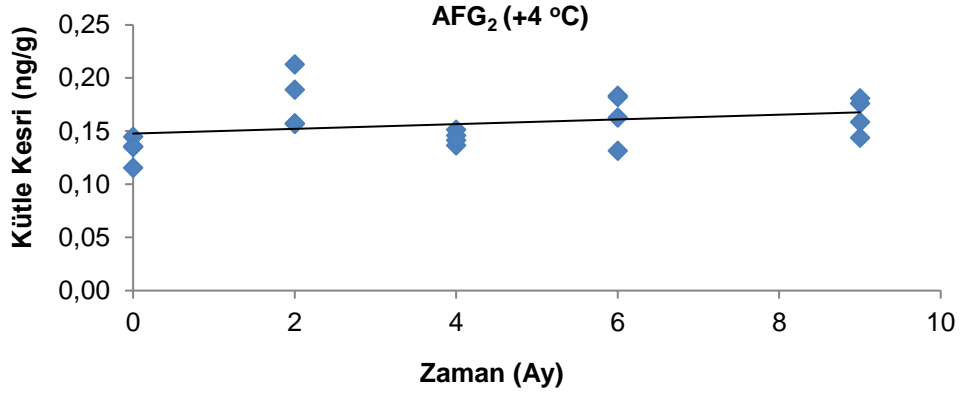
Table A5.4. UME CRM 1302, AFG₂ için UDK Verileri

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuçlar (ng/g)
8	24	0	-80	0,13
17	439	0	-80	0,12
29	24	0	-80	0,14
19	439	0	-80	0,14
26	128	2	4	0,19
27	397	2	4	0,21
36	128	2	4	0,16
10	397	2	4	0,16
35	166	4	4	0,15
1	423	4	4	0,15
6	166	4	4	0,14
32	423	4	4	0,14
11	70	6	4	0,18
14	323	6	4	0,18
22	70	6	4	0,13
9	323	6	4	0,16
20	240	9	4	0,16
24	469	9	4	0,14
5	240	9	4	0,18
31	469	9	4	0,18

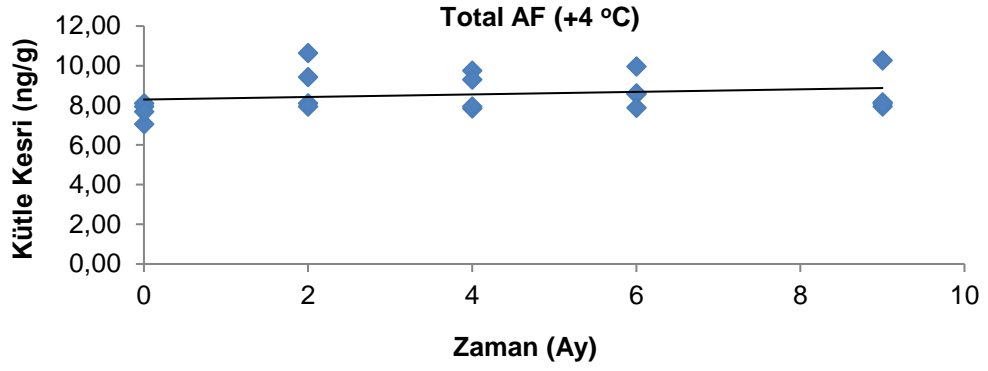
Table A5.5. UME CRM 1302, Toplam AF için UDK Verileri

Enjeksiyon no	Ünite No	Zaman (hafta)	Sıcaklık (°C)	Sonuçlar (ng/g)
8	24	0	-80	8,11
17	439	0	-80	7,95
29	24	0	-80	7,05
19	439	0	-80	7,69
26	128	2	4	10,64
27	397	2	4	8,10
36	128	2	4	7,95
10	397	2	4	9,43
35	166	4	4	9,76
1	423	4	4	7,85
6	166	4	4	9,30
32	423	4	4	7,95
11	70	6	4	9,97
14	323	6	4	8,62
22	70	6	4	8,58
9	323	6	4	7,89
20	240	9	4	7,95
24	469	9	4	8,15
5	240	9	4	8,09
31	469	9	4	10,26

Ek 6. UME CRM 1302 UDK Grafikleri**Şekil A6.1.** UME CRM 1302, AFB₁ için Uzun Dönem Kararlılık Grafiği**Şekil A6.2.** UME CRM 1302, AFB₂ için Uzun Dönem Kararlılık Grafiği**Şekil A6.3.** UME CRM 1302, AFG₁ için Uzun Dönem Kararlılık Grafiği



Şekil A6.4. UME CRM 1302, AFG₂ için Uzun Dönem Kararlılık Grafiği



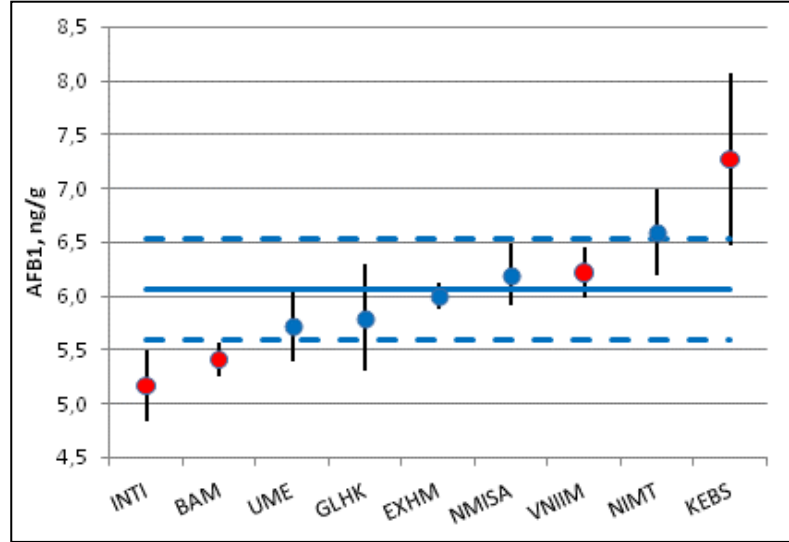
Şekil A6.5. UME CRM 1302, Toplam AF için Uzun Dönem Kararlılık Grafiği

Ek 7. UME CRM 1302 Karakterizasyon Verileri**Tablo A.7.1. UME CRM 1302, LC-IDMS Metodu Karakterizasyon Verileri**

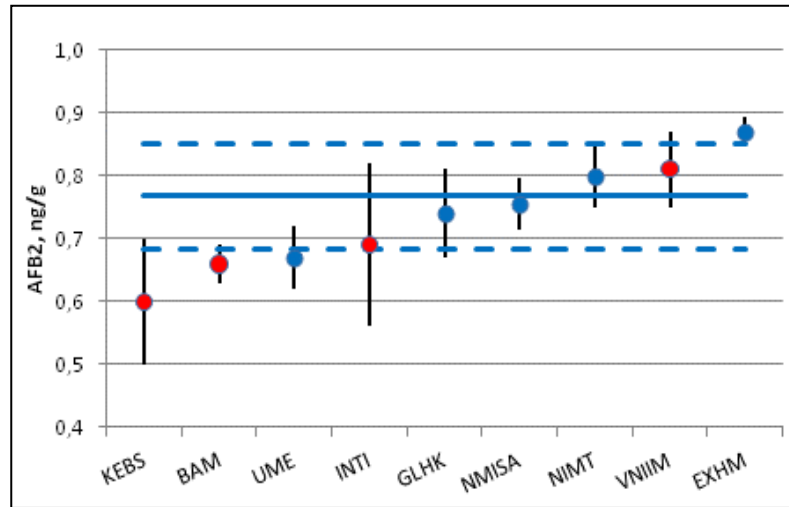
Ünite-Tekrar No	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Toplam AF
141-1	5,37	0,70	1,98	0,17	8,23
141-2	5,03	0,62	2,07	0,17	7,90
141-3	5,92	0,61	1,95	0,20	8,67
359-1	5,06	0,60	2,15	0,21	8,02
359-2	5,05	0,59	2,44	0,24	8,41
359-3	5,69	0,68	2,27	0,22	8,86
359-4	5,74	0,58	2,44	0,20	8,96
141-1	5,36	0,62	2,26	0,21	8,45
141-2	5,28	0,55	1,87	0,17	7,87
141-3	5,63	0,62	1,99	0,18	8,42
141-4	5,55	0,65	2,08	0,21	8,48
359-1	6,01	0,71	2,42	0,23	9,38
359-2	5,41	0,63	2,13	0,24	8,40
359-3	5,03	0,56	2,07	0,20	7,85
359-4	5,15	0,70	2,27	0,21	8,32

Tablo A.7.2. UME CRM 1302, HPLC-FLD Metodu Karakterizasyon Verileri

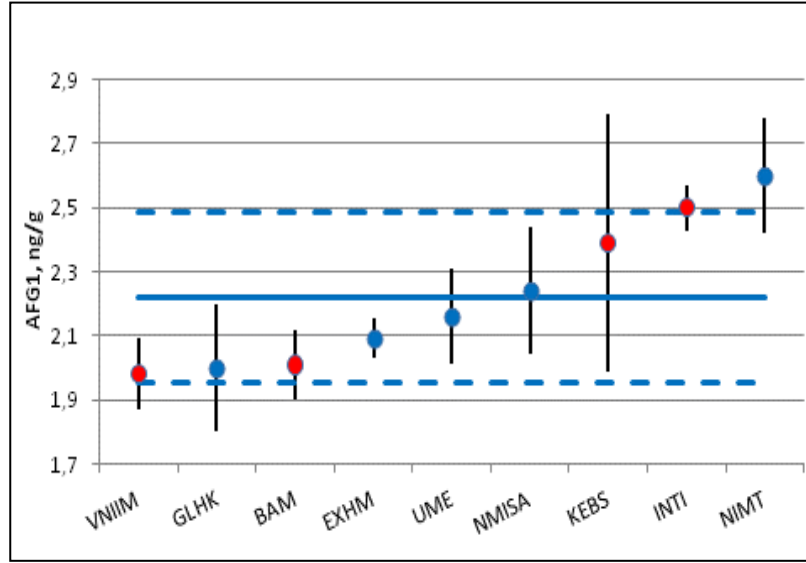
Ünite-Tekrar No	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Toplam AF
149-1	5,54	0,57	2,77	0,21	9,25
149-2	5,46	0,61	2,90	0,20	8,66
149-3	4,85	0,60	2,13	0,22	7,80
254-1	5,73	0,58	2,23	0,17	8,72
254-2	5,46	0,61	2,39	0,20	8,66
254-3	6,31	0,69	1,73	0,15	8,87
382-1	4,72	0,50	1,87	0,16	7,26
382-2	5,71	0,59	2,11	0,19	8,60
382-3	5,29	0,55	2,02	0,17	8,12
341-1	6,37	0,61	1,92	0,16	9,05
341-2	5,31	0,56	2,28	0,19	8,35
341-3	5,07	0,53	1,81	0,15	7,56
36-1	5,61	0,55	1,83	0,18	8,17
36-2	5,64	0,61	2,36	0,16	8,31
36-3	6,11	0,61	2,03	0,15	8,91
424-1	5,78	0,60	2,06	0,17	8,61
424-2	5,98	0,61	2,12	0,20	8,91
424-3	5,88	0,65	2,05	0,23	8,81
359-1	5,47	0,61	2,51	0,18	8,77
359-2	5,25	0,55	2,09	0,15	8,04
359-3	5,89	0,66	2,05	0,16	8,77
76-1	5,61	0,61	2,35	0,15	8,72
76-2	5,42	0,60	2,04	0,16	8,22
76-3	5,44	0,65	2,38	0,17	8,64
247-1	4,68	0,47	2,28	0,16	7,60
247-2	5,28	0,52	2,56	0,18	8,53
247-3	5,70	0,63	1,79	0,18	8,29
193-1	5,29	0,53	1,95	0,21	8,52
193-2	5,61	0,60	2,53	0,19	8,93
193-3	5,94	0,59	2,47	0,18	9,18
318-1	5,07	0,50	2,66	0,16	8,39
318-2	5,37	0,58	2,75	0,19	8,89
318-3	5,33	0,63	2,26	0,17	8,39
451-1	5,23	0,61	2,14	0,20	8,18
451-2	5,95	0,58	2,24	0,18	8,95
451-3	5,43	0,61	2,40	0,18	8,61

Ek 8. CCQM-K138 Uluslararası Karşılaştırma Grafikleri

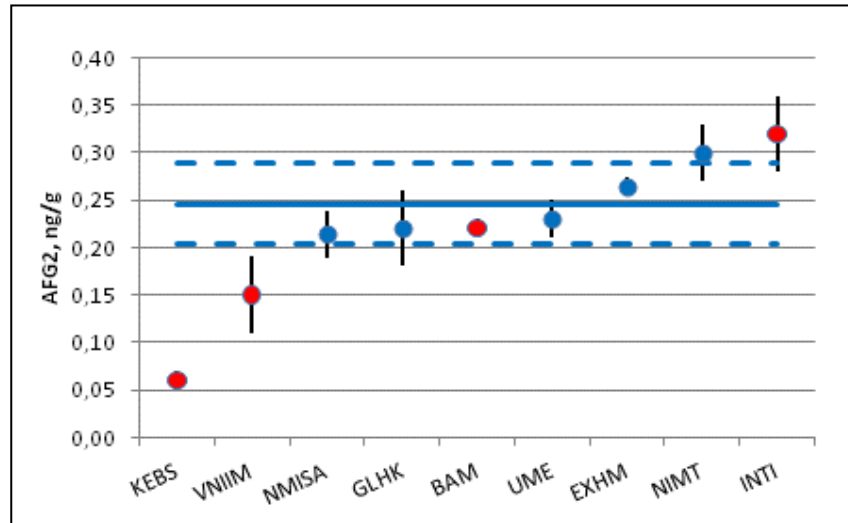
Şekil A.8.1. AFB1 sonuçları. Referans değer 6,06 ng/g (düz mavi çizgi), standart belirsizlik $\pm 0,47$ ng/g (aralıklı mavi çizgi). Kırmızı ile gösterilen sonuçlar değerlendirmeye dahil edilmemiştir.



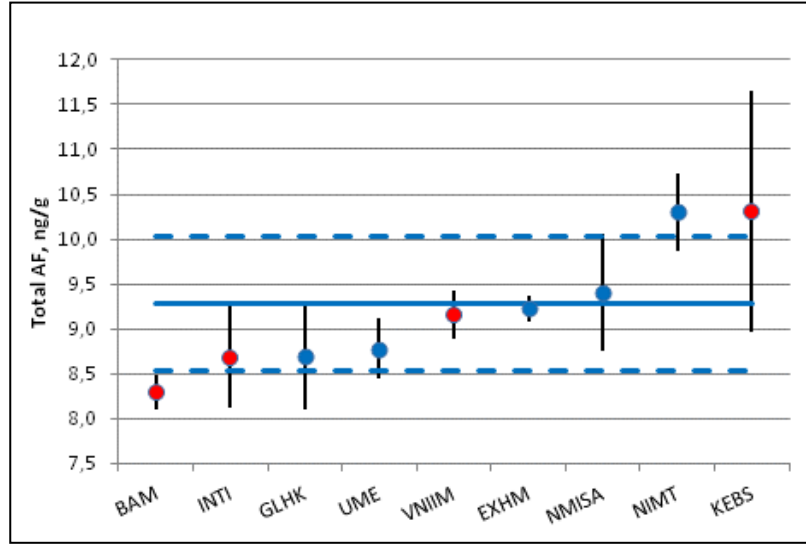
Şekil A.8.2. AFB2 sonuçları. Referans değer 0,766 ng/g (düz mavi çizgi), standart belirsizlik $\pm 0,083$ ng/g (aralıklı mavi çizgi). Kırmızı ile gösterilen sonuçlar değerlendirmeye dahil edilmemiştir.



Şekil A.8.3. AFG₁ sonuçları. Referans değer 2,22 ng/g (düz mavi çizgi), standart belirsizlik ± 0,265 ng/g (aralıklı mavi çizgi). Kırmızı ile gösterilen sonuçlar değerlendirmeye dahil edilmemiştir.



Şekil A.8.4. AFG₂ sonuçları. Referans değer 0,246 ng/g (düz mavi çizgi), standart belirsizlik ± 0,042 ng/g (aralıklı mavi çizgi). Kırmızı ile gösterilen sonuçlar değerlendirmeye dahil edilmemiştir.



Şekil A.8.5. Toplam AF sonuçları. Referans değer 9,28 ng/g (düz mavi çizgi), standart belirsizlik $\pm 0,742$ ng/g (aralıklı mavi çizgi). Kırmızı ile gösterilen sonuçlar değerlendirmeye dahil edilmemiştir.