



Özgün Araştırma/Original Article

Glüten Analizinde HPLC, LC-MS/MS Yöntemlerinin ELISA ile Karşılaştırılması

Comparison of HPLC, LC-MS / MS Methods with ELISA in Gluten Analysis

Ali ÖZCAN¹, İsmail AZAR², Arzu YAVUZ³, Hakan YAVAŞ⁴, Emre TOKAT⁵, Vesile ÇETİN⁶

¹ Vet.Hek. Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bursa, TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0002-1338-7852

² Ziraat Yük. Müh. Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bursa, TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0003-4424-208X

³ Gıda Yük. Müh. Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bursa, TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0002-2526-4761

⁴ Ziraat Müh. Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bursa, TÜRKİYE-ORCID ID:000-0002-9670-9078

⁵ Veteriner Hek. Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bursa, TÜRKİYE-ORCID ID: 0000-0003-1975-9706

⁶ Dr. Ziraat Yük. Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bursa, TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0002-6962-8440

*:Yazışmalardan sorumlu yazar /Corresponding author, ali.ozcan@tarimorman.gov.tr.

Geliş Tarihi : 07.04.2020

Kabul Tarihi : 13.08.2020

Öz

Amaç: Tahıl ve ürünleri içerdikleri Glüten nedeni ile bazı insanlarda rahatsızlıklara neden olabilmektedirler. Bu hastalıklardan biri olan çölyak, buğday, çavdar, arpa ve bazen de yulaf ürünlerinin tüketimi sonucu bağırsakta ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalığın nedenini oluşturan temel etken glüten proteininin gliadin adlı alt fraksiyonudur. Hastalığa sebep olan glüten fraksiyonları glütenin ve gliadinlerdir. Glütenin kendi içerisinde ω 5, LMW ve HMW olmak üzere üç alt fraksiyona ayrılmaktadır. Gliadinler ise α (Alfa), ω (Omega), β (Beta) ve γ (Gamma) olmak üzere dört fraksiyondan oluşmaktadır.

Materyal ve Yöntem: Bu çalışmada çölyak hastalarına özel olarak üretilen gıdaların analizlerinde kullanılabilecek ve yasal limitler olan 0-20 mg/kg ile 20-80 mg/kg aralıklarında LOD değerine sahip kromatografik bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır.

Bulgular ve Sonuç: Yapılan HPLC çalışmalarında LOD değeri 31,94mg/kg, LOQ değeri ise 106,47mg/kg düzeylerinde metot performansları elde edilmiştir. LC MS/MS çalışmalarında elde edilen LOD değeri 19,24 mg/kg, LOQ değeri ise 64,13 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çölyak Hastalığı, ELISA, Glüten, HPLC, LC-MS/MS

Abstract

Objective: Cereals and products may cause disorder in some people due to the Gluten they contain. Celiac, one of these diseases, is a disease that occurs in the intestine as a result of consumption of wheat, rye, barley and sometimes oat products. The main cause of the disease is the sub-fraction of gluten protein called gliadin. The gluten fractions that cause disease are glüten and gliadins. Gluten is divided into three sub-fractions: ω 5, LMW and HMW. Gliadins consist of four fractions: α (Alpha), ω (Omega), β (Beta) and γ (Gamma).

Materials and Methods: In this study, it was tried to develop a chromatographic method that can be used in the analysis of foods specially produced for celiac patients and has an LOD value between 0-20 mg / kg and 20-80 mg / kg, which are legal limits.

Result and Conclusion: In the HPLC studies, the method performances were obtained at the LOD value of 31,94 mg/kg and the LOQ value at 106,47 mg/kg. LOD value obtained in LC MS/MS studies was determined 19,24mg / kg and LOQ value 64,13mg / kg.

Key words: Deliac Disease, Gluten, HPLC, ELISA, LC-MS/MS

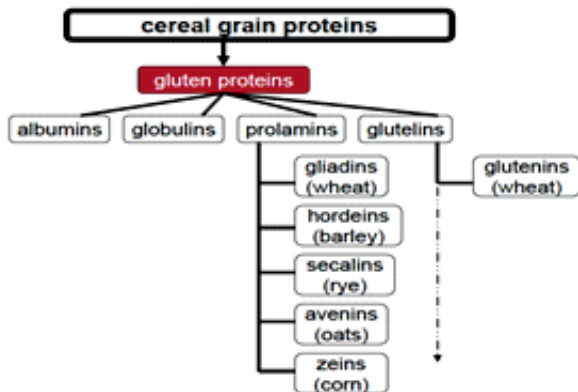
1. Giriş

Beslenmemizde önemli bir yer tutan tahıl ve ürünleri bazı insanlarda rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Tahıl kaynaklı hastalıklardan biri olan çölyak, buğday, çavdar, arpa ve bazen de yulaf ürünlerinin tüketimi sonucu bağırsakta ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalığın nedenini oluşturan temel etken glüten proteininin gliadin adlı alt fraksiyon olup, risk grubunda yer alan çölyak hastalarının tükettikleri ürünlerde bu proteinlerin uygun limitler içerisinde olup olmadığı büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle glüten analizleri için hassas bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) metodunun hassasiyeti ve ölçüm sonuçlarının salınım göstermesi gibi dezavantajları ortadan kaldıracak kromatografik bir yöntem arayışına girilmiş ve HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve LC MS/MS (Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) metotları ile kıyaslaması ihtiyacı doğmuştur. Bu amaç için ELISA-HPLC ve LC-MS/MS metotlarının validasyonları tamamlanmış ve metotlar arası performans kıyaslamaları oluşturulan bu metotlar üzerinden yapılmıştır. Gerek HPLC gerekse de LC-MS/MS metotları için yapılan çalışmalardan sonra TGK 2012/04'e göre glüten içeriği yönünden sınırlandırılmış olan çok düşük glütenli ve glütensiz ürünlerin analizleri için numune hazırlama aşamasında iyileştirme yapılması gerekli görülmüştür.

2. Glüten Proteinini

2.1. Glüten Proteinini ve Toksikitesi

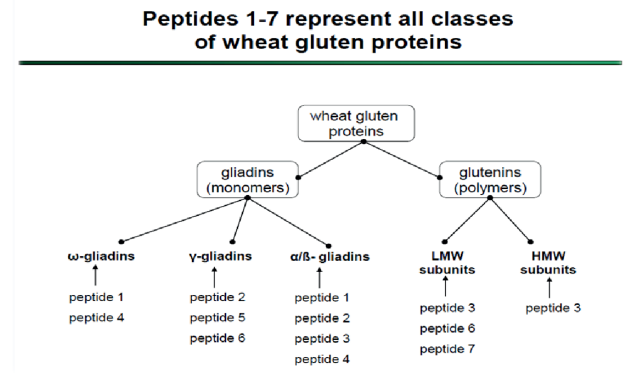
Tahıl depo proteinleri etanolde çözünebilir prolaminler ve polimerik glüteninler olmak üzere başlıca iki gruptan oluşmaktadır. Prolaminler buğdayda gliadinler, çavdarda sekalinler, arpada hordeinler, yulafta aveninler olarak adlandırılmaktadır. Mısırdaki ise bu fraksiyon zeinler olarak ifade edilmektedir ve çölyak hastaları için toksik değildir (Ciclitira ve ark. 2005). Ürünlere göre glüten proteini ve alt fraksiyonları Şekil 1'de yer almaktadır.



Şekil 1. Glüten proteini ve alt fraksiyonları (Sealey-Voysner ve ark. 2010, Niewinski 2008)

Buğdayda depo proteinlerinin büyük bir kısmını glüten proteinleri oluşturmaktadır (toplam proteinin %80–85'i). Glüten proteinleri ise tahıl tanesindeki depo proteinlerinin prolaminler alt sınıfına dahildir. Endospermde bulunan Glüten proteinleri nişasta granüllerinin etrafında sürekli bir matris oluşturur. Glüten proteinleri su veya tuzlu suda çözünmez nitelikte olup, monomerik gliadinler ve polimerik glüteninler olmak üzere iki fraksiyondan oluşmaktadır. Bu iki fraksiyon tanede hemen hemen eşit oranlarda bulunmaktadır (Goesaert ve ark. 2005). Ayrıca gliadinler; α , β , γ ve ω olarak alt fraksiyonlara da ayrılmaktadır (Ciclitira ve ark. 2005).

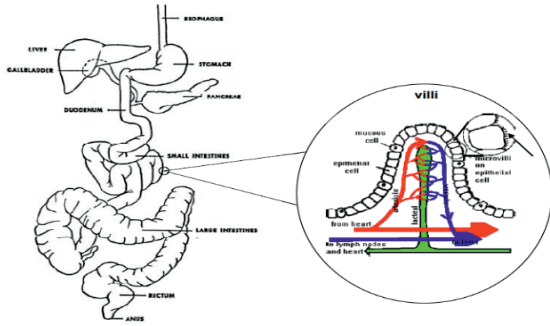
Yapılan çalışmalar sonucunda gliadin fraksiyonunun çölyak hastaları için toksik, Glütenin fraksiyonunun ise daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Gliadinlerden de α -gliadinler en toksik olanıdır. β ve γ -gliadinler biraz daha düşük toksisiteye sahip iken, ω -gliadinler en düşük toksisiteye sahip gliadin fraksiyonudur (Özkaya 1999). Bu fraksiyonlar Şekil 2'de yer almaktadır.



Şekil 2. Buğday glütenini ve alt fraksiyonları (Sealey-Voysner ve ark. 2010, Niewinski 2008)

Her geçen gün değişen beslenme alışkanlıklarına rağmen tahıl ve ürünleri dünya nüfusunun beslenmesinde halen önemini korumaktadır. Beslenmemizde önemli bir yer tutan tahıl ve ürünleri bazı insanlarda rahatsızlıklara neden olabilmektedirler. Çölyak hastalığı; glüten ve diğer tahıllardaki benzer proteinlerin tüketilmesi sonucunda ortaya çıkan ve "glütene hassas bağırsak sistemi" olarak da bilinen bir gıda intoleransıdır (Özkaya 1999), (Sollid ve Jabri 2005). Buğday, çavdar, arpa ve bazen de yulaf ürünlerinin tüketimi sonucu bağırsakta ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalığın nedenini oluşturan temel etken glüten proteininin gliadin adlı alt fraksiyonu olup, glüten içeren gıdaların tüketilmesi sonucunda başta vitaminler ve mineraller olmak üzere vücudun gereksinim duyduğu çeşitli besin maddelerinin emilimi azalmaktadır (Özkaya 1999, Battais ve ark. 2005). Glütensiz diyet ile birlikte eksikliği olan vitamin B₁₂, folat, demir, kalsiyum, D vitamini besinsel destek tedavisi olarak verilmelidir (Hopper ve ark. 2007). Ancak çölyak hastaları, gliadinlerin

homoloğu olan prolaminleri de içeren tritikale, çavdar ve arpa ürünlerinin tüketiminden de sakınmak zorundadır. Çölyak hastalarında Glütene etkisi ince bağırsak üzerinde olmaktadır. Şekil 3’de görüldüğü gibi absorpsiyonun yapıldığı yüzey azalıp besin alımı zorlaşmaktadır (Özkaya 1999).



Şekil 3. Sindirim sistemi diyagramı (Niewinski 2008)

Tek tedavi yöntemi ömür boyu sürdürülmesi gereken Glütensiz diyet uygulamasıdır. Bununla beraber çölyak hastalarının gıdalardaki Glütene hassasiyet düzeyleri de farklılık göstermektedir. Bazı hastalar iz miktardaki glütene tolere edemezken, diğerleri daha büyük miktarlarda Glütene tolere edebilmektedirler. Mısır ve pirinç ise toksik olmayıp diğerlerinin yerine kullanılabilir (Urgancı 2005, Ciclitira ve ark. 2005).

Önceleri nadir ve kuzey-batı Avrupa’nın hastalığı olduğu düşünülen çölyak hastalığının, yapılan çalışmalarla bugün bütün dünyada çok yaygın olduğu, farklı toplumlarda ortalama %0,3-1 civarında görüldüğü bilinmektedir (Maki ve Lohi 2004, Farrell ve Kelly 2002).

Çizelge 1. ELISA test kiti ile yapılan FAPAS analiz sonuçları

Materyal	Ürün Çeşidi	FAPAS Kodu	Kalitatif Sonuç (%)		Kantitatif sonuç (mg/kg)		
			Doğru	Yanlış	Ortalama	Aralık	Sapma (%)
Glüten negatif	Kek	T27109AQC	93	7	-	-	-
	Soya	T2792B	91	9	-	-	-
Glüten pozitif	Kek	T27109BQC	98	2	72,6	38,1-114,3	36
	Soya	T27106B	99	1	59	26,5-79,5	18

Kullanılan metotlardaki çalışmaların temeli glüten proteinini, fraksiyonları üzerinden karakterize etmektir. Bunun için kromatografik ve jel elektroforez gibi teknikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada diğer ekstraksiyon yöntemlerinden farklı olarak protein ekstraksiyonunda enzim protein oranı ve enzim muamele süresi optimize edilmiştir. Literatürlerde belirtilen metotlar ile glüten fraksiyonlarının yapısal

2.2. Ticari Analiz Kitleri ve Yeterlilik Test Sonuçları:

Piyasada ticari olarak bulunan bir ELISA test kiti ile Fapas T27109AQC nolu negatif glüten test materyalinde yapılan analizde teste katılan laboratuvarların %93’ü doğru sonuç bulurken, %7’si yanlış sonuç bulmuştur. Yine Fapas T2792B nolu negatif glüten test materyalinde yapılan analizde teste katılan laboratuvarların %91’i doğru sonuç bulurken %9’u yanlış sonuç bulmuştur (Mowat 2003).

Aynı ELISA test kiti Fapas T27106B nolu pozitif glüten test materyalinde yapılan analizde, teste katılan laboratuvarların %99’u doğru sonuç bulurken %1’i yanlış sonuç elde etmiştir. 59 mg/kg olan test materyalinde laboratuvarlar 26,5-79,5 mg/kg aralığında değişen miktarlarda değerler elde etmişlerdir. Yine Fapas T27109BQC nolu pozitif glüten test materyalinde yapılan analizde, teste katılan laboratuvarların %98’i doğru sonuç bulurken %2’si yanlış sonuç elde etmiştir. 72,6 mg/kg olan test materyalinde laboratuvarlar 38,1-114,3 mg/kg aralığında değişen miktarlarda değerler elde etmişlerdir (Anonim 2012b).

Kullanılan ticari ELISA test kiti; negatif var/yok Fapas test materyalindeki analizlerde yaklaşık %8 yanlış sonuç vermiştir. Yine bu test kitinde yapılan miktar analizlerinde ürüne göre %18 ile %36 arasında bir sapma görülmektedir (Mowat 2003).

Bu sapma yüzdelerinin TGK 2012/04’e göre glüten içeriği yönünden sınırlandırılmış olan çok düşük glütenli ve glütensiz gıda numunelerinin değerlendirilmesinde yanlış yorumlara neden olabileceği göz ardı edilmemelidir. FAPAS testlerinden elde edilen sonuçların sapmalarına göre ELISA metodunun daha hassas bir metot ile doğrulanması gerekliliği öne çıkmaktadır. (Çizelge 1).

özellikleri, toplam glüten içerisindeki her bir fraksiyonun yüzdece oranı, bazı uygulamaların (ısı, emülsüfyer vb) etkileri gibi konular incelenmiştir. Çalışmada gliadin ve glütene alt fraksiyonları niceliksel olarak analizleri yapılarak toplam fraksiyon miktarından glüten miktarına ulaşılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Glütten analizinde uygulanan yöntemler ve çalışma ile ilişkisi

Literatür	Kullanılan yöntem	Çalışmanın amacı	Çalışma ile ilişkisi
Van Eckert ve ark. 2006	RP-HPLC, SE-HPLC, RP-HPLC-ESI-MS, MALDI-TOF,	Farklı unlardaki glütten fraksiyonlarını farklı yöntemler ile inceleyerek çeşitler üzerine etkilerini belirlemek	Çalışmalarda glütten fraksiyonlarının tespitinde kullanılan metot, araştırmada seçilen metot ile paralellik göstermektedir.
Kieffer ve ark. 2012	RP-HPLC, SDS-PAGE	Farklı buğday unlarında basınç ve sıcaklık uygulamalarının glütten üzerine etkisi gözlemlenmek	
Gómez ve ark. 2012	RP-HPLC, SDS-PAGE	Farklı buğday unlarında emülsüfilyerlerle çözünebilir proteinlerini analiz etmek	

3. Materyal ve Metot**3.1. Materyal**

Çalışmalarda kullanılmak üzere Biyomatik (<http://www.biomatik.com>) firmasından temin edilen Çizelge 3’de yer alan sentetik peptitler seçilmiştir.

Çizelge 4’te belirtilen limitler içerisindeki örnekleri analiz edebilecek şekilde metotlar valide edilmiştir.

Çizelge 3. Çalışmada kullanılacak sertifikalı referans maddeler (Sealey-Voyksner ve ark. 2010, Niewinski 2008).

Peptid	Dizilim	Lot numarası	Moleküler Formül	Saflik %	Moleküler ağırlık
P1	LQPQNPSQQQPQEQVPL	P160121-WF348380	C ₈₄ H ₁₃₅ N ₂₅ O ₂₉	98.26	1959.16
P2	TQQPQQFPQQPQQFPQ	P160121-WF348381	C ₉₇ H ₁₄₁ N ₂₇ O ₂₉	98.24	2149.37
P3	VPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL	P160121-WF208016	C ₁₀₉ H ₁₇₅ N ₃₁ O ₃₅	98.19	2479.80
P4	RPQQPYPQPQPQY	P160121-MX304197	C ₇₄ H ₁₀₇ N ₂₁ O ₂₁	98.13	1626.81
P5	QPQQPFPQTQQPQQFPQ	P160121-MX348382	C ₉₇ H ₁₄₁ N ₂₇ O ₂₉	98.89	2149.37
P6	PQQSFP	P160121-MX493719	C ₃₂ H ₄₆ N ₈ O ₁₀	98.87	702.77
P7	QPQQPLPQPQQPF	P160121-MX348384	C ₇₀ H ₁₀₅ N ₁₉ O ₂₀	98.53	1532.73

Çizelge 4. TGK 2012/4 Tebliğinde belirtilen “çok düşük glüttenli” ve “glütensiz” ürünler için sınır değerler

Ana Ürün Gurubu	Sınır değer
Glütensiz	<20 mg/kg
Çok Düşük Glüttenli	20-80 mg/kg

3.2. Metot**3.2.1. ELISA Metodu**

Çalışmada ELISA metodu için kullanılacak validasyon parametreleri ISO 5725 (Accuracy of Measurement Methods and Results Package) ve 21748 (Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation) standartları ile

Eurachem (2012) talimatlarına göre seçilmiştir. ELISA yönteminin validasyonunda test edilen parametreler Çizelge 5’de verilmiştir. Metot validasyonu çalışmaları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5. ELISA yöntemi için metot validasyon parametreleri

ELISA Validasyon Parametreleri	Açıklama	
Limit Belirleme	Ölçüm Limiti (LOD)	3 x SD
	Tespit Limiti (LOQ)	10 x SD
Kesinlik	Tekrarlanabilirlik	12 çalışma
	Tekrarüretilebilirlik	3 gün 6’şar çalışma

3.2.1.1. Numunenin Hazırlanması ve Ekstraksiyon

Homojenize edilmiş örnekten 0,25 g tartılır, üzerine 2,5 mL ticari kit ekstraksiyon solüsyonu eklenir. Tüpün kapağı kapatılarak iyice karıştırılır. Tüm gıda örneklerinde ortak olarak ekstraksiyona aşağıdaki şekilde devam edilir: 60°C'deki su banyosunda 15 dk inkübe edilir. Örneklerin soğuması beklenir. %68'lik 2-propanolden 7,5 ml eklenir ve iyice karıştırılır. 60°C'deki su banyosunda 10 dk inkübe edilir. 2500 g-force'de 10 dk santrifüj edilir. Üstteki süpernatant alınarak başka bir vialle aktarılır. Bu süpernatant, başka bir kaba alınıp ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra 25°C'de karanlıkta 8 hafta boyunca saklanabilir. Örnek, 1:12,5 oranında (1+11,5/80 µl +920 µl) örnek dilüsyonu ile seyreltilir ve son seyreltme faktörü 500 olmaktadır. Hazırlanan son üründen her bir kuyucuk için 100'er µl kullanılır. Bu amaçla yapılacak olan metot validasyonunda test edilecek parametreler Çizelge 7'de verilmiştir.

3.2.1.2. ELISA Kit Prosedürü

3.2.1.2.1. Örnek Dilüsyon Çözeltisinin Hazırlanması

Örnek dilüsyon çözeltisi konsantre olarak bulunmaktadır. Gerekli olduğu kadarıyla 1:5 (1+4) oranında distile su ile seyreltilir (örneğin, 3 mL konsantrat+12 mL distile su).

3.2.1.2.2. Antikor Enzim Konjugatının Hazırlanması

Konsantrat olarak bulunmaktadır. Seyreltilmiş enzim konjugat çözeltisinin stabilitesinin düşük olması nedeniyle sadece ihtiyaç duyulan kadarı seyreltilmelidir. Pipetleme işleminden önce, konjugat konsantrasi dikkatli bir şekilde çalkalanmalıdır. Konjugat konsantratu distile su ile 1:11 (1+10) oranında seyreltilmelidir. Kullanılan suyun, gliadin ile kontamine olmadığından emin olunmalıdır.

3.2.1.2.3. Yıkama Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Kullanımdan önce, tampon, distile su ile 1:10 (1+9) oranında seyreltilir (örneğin, 100 mL tampon konsantratu + 900 mL distile su). Seyreltme öncesinde, tamponda oluşan kristaller 37°C'lik su banyosunda çözündürülür. Çözündürülmüş tampon, 2-8°C'de 4 hafta boyunca stabil olarak kalabilir.

3.2.1.2.4. Test Prosedürü

Standartlar ve örnekler için yeterli sayıda mikrotiter kuyucuğu plakaya yerleştirilir (Standart ve örnek pozisyonları, bir kenara not edilmelidir). Belirlenmiş kuyucuklara her bir standart çözeltisinden veya hazırlanmış örnekten 100'er µl eklenir ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilir (20-25°C). Kuyucuk

içerisindeki sıvı dökülerek, absorban kağıdı kullanılarak, mikrokuyucuk plakası dikkatli bir biçimde ters düz edilir (her defasında 3 kez). Böylece, mikrokuyucuklar içerisinde sıvı kalmadığından emin olunur. Mikrokuyucukların tamamı 250 µl seyreltilmiş tampon çözeltisi ile doldurulur ve sıvı tekrar boşaltılır. Aynı işlem iki kez daha tekrarlanır. Her kuyuya 100 µl dilüe edilmiş (1:11=1+10) enzim konjugat konulur ve oda koşullarında 10 dk inkübe edilir (20-25°C). Kuyucuk içerisindeki sıvı dökülerek, absorban kağıdı kullanılarak, mikrokuyucuk plakası dikkatli bir biçimde ters düz edilir (her defasında 3 kez). Böylece, mikrokuyucuklar içerisinde sıvı kalmadığından emin olunur. Mikrokuyucukların tamamı 250 µl seyreltilmiş tampon çözeltisi ile doldurulur ve sıvı tekrar boşaltılır. Aynı işlem iki kez daha tekrarlanır. Her bir kuyucuğa 50 µl substrat ve 50 µl kromojen eklenir. Plaka, dikkatli bir şekilde çalkalanarak, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 10 dk boyunca inkübe edilir (20-25°C). Her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu konularak iyice karıştırılır ve absorbansı 450 nm'de ölçülür. Bu işlem 30 dk içinde yapılmalıdır.

3.2.1.2.5. Sonuç Hesaplama

Ticari ELISA kitine uygun yazılım kullanılarak hesaplanmaktadır. Kalibrasyon grafiğinden okunan gliadin konsantrasyonu µg/kg (ppb), 500 katsayısı ile çarpılır. Elde edilen sonuç gliadin değerini vermektedir. Glüten değerine geçmek için sonucun 2 ile çarpılmasıyla % olarak hesaplanır.

3.2.2. Kromatografik Yöntemler

Glütenin kromatografik yöntemler ile tespiti protein yapısının gastrik enzimler ile parçalanarak peptidlere ayrılması ve elde edilen peptidlerin tespiti ilkesine dayanmaktadır. Bu çalışmada buğdayda bulunan glütenin pepsin (P), tripsin (T) ve kimotripsin (C) enzimleri ile parçalanması sonucunda oluşan peptidlerin HPLC-DAD ve LC-MS/MS ile tanımlanması ve miktar tayini yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla kullanılan metot için cihaz şartları Çizelge 7'de verilmiştir.

Metot validasyonu çalışmaları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada HPLC ve LC-MS/MS metodu için kullanılacak validasyon parametreleri ISO 5725 (Accuracy of Measurement Methods and Results Package) ve 21748 (Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation) standartları ile Eurachem (2012) talimatlarına göre seçilerek Çizelge 6'da belirtilmiştir (Anonim 2012a, Anonim 2017, Anonim 2019).

Çizelge 6. Validasyon parametreleri

HPLC ve LC-MS/MS Validasyon Parametreleri		Açıklama
Limit Belirleme	Ölçüm Limiti (LOD)	3 x SD
	Tespit Limiti (LOQ)	10 x SD
Doğrusallık	$R^2 > 0.99$	4 seviye standart
Kesinlik	Tekrarlanabilirlik	12 çalışma
	Tekrarüretilebilirlik	3 gün 6'şar çalışma
Gerçeklik Kontrolü	Geri Kazanım	12 çalışma

LC-MS/MS ve HPLC analizleri için numune hazırlarken için homojenize örnekten 1,5 mL tüplere 30 mg tartım yapıldı. pH 7,4 olan fosfat bufer (FB) içerisinde T:C oranı 50:50 olan 1000 ppm'lik enzim karışımından 1:10 enzim:protein oranlarına göre uygun miktarlarda eklendi. FB ile 1 ml'ye tamamlandı. 38°C'de 2 saat süresince çalkalamalı blok ısıtıcıda inkübasyona tabi tutuldu. 10 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst fazdan yeterli miktarda alınarak LC-MS/MS'e 10µl, HPLC'ye 100µl enjeksiyonları gerçekleştirildi.

Hesaplama ve sonuç Çizelge 2'de belirtilen sertifikalı peptid standartları hassas terazide tartılıp 80:20 ACN:Su (%0,025 TFA içeren) içerisinde çözülerek yaklaşık 1000 ppm stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan stok standartlardan 100-10-1 ppm düzeylerinde çalışma miksleri oluşturuldu.

Miktarsal analizde kullanılacak kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için glüten içermeyen pirinç ununa her

bir peptid için 2-5-10-25-50-100ppm konsantrasyonlarında çalışma mikslerinden ilave yapılarak numune hazırlamadaki işlem basamakları aynen uygulanmıştır. Kalibrasyon standartlarının hazırlanmasında numune hazırlama işlem basamakları bire bir uygulandığından sonuç hesaplamada herhangi bir seyreltme faktörü kullanılmamıştır.

Elde edilen standart kromatogramlarında peptidlere ait piklerin oluşturdukları alanlar toplanarak (A_{toplam}) o standart seviyesinin konsantrasyonuna (C_{toplam}) karşılık gelen tek bir veri olarak değerlendirilmiştir. Analizde kullanılan 7 peptid için toplam konsantrasyon 14-35-70-175-350-700ppm olarak gerçekleşmiştir. Bir standarttaki peptidlerin toplam alanları alınarak o standardın mg/kg konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Glüten hesaplama fraksiyonlarının toplamı, analiz edilen örnekteki glüten değerini vermiştir. Çizelge 7'de glüten hesaplanması özetlenmiştir.

Çizelge 7. HPLC glüten fraksiyonları üzerinden toplam glüten analizi

Fraksiyonlar	Fraksiyon Alanı	Toplam Fraksiyon Alan	Standartın Miktarı (mg/kg)
$\omega 5$	$a1$	(A_{toplam}) her bir seviye standarttaki glüten fraksiyonların toplam alanı	(C_{toplam}) her bir seviye standart için karşılık gelen konsantrasyon
$\omega 1,2$	$a2$		
a	$a3$		
γ	$a4$		
ωb	$a5$		
LMW	$a6$		
HMW	$a7$		

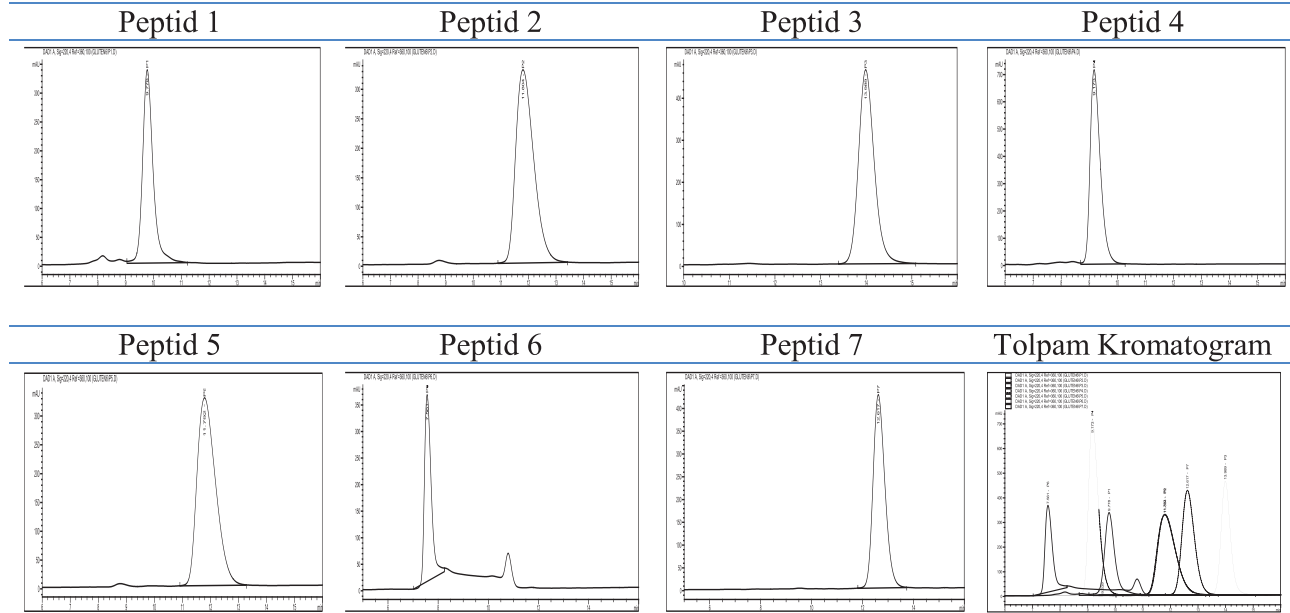
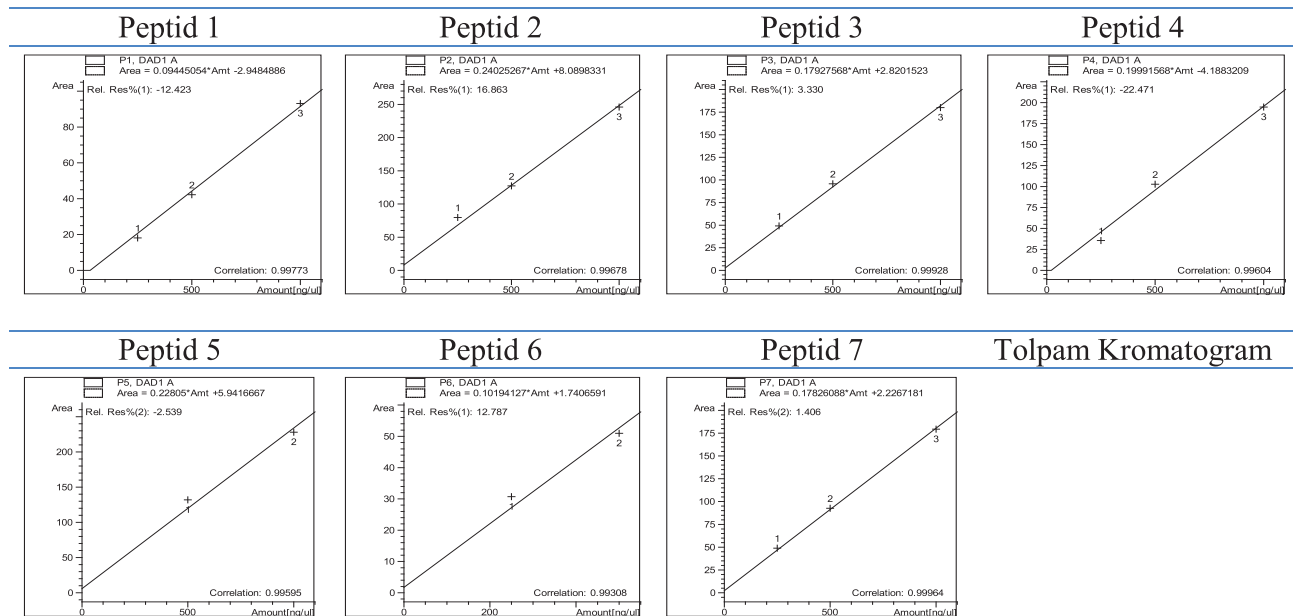
3.2.2.1. HPLC Yöntemi

HPLC yöntemi ile yapılan metot validasyonu ve analiz çalışmalarında (Kieffer ve ark. 2007) kullanılan cihaz parametreleri Çizelge 8'de, analiz

yapılacak olan peptidlerin kromatogramları Şekil 4'de, doğrusallığı gösteren kalibrasyon grafikleri Şekil 5'de, verilmiştir.

Çizelge 8. HPLC analizi için

Cihaz marka/model		Agilent-HP1100		
Kolon		ODS2 C18, 4.6x200 mm		
Dedektör/Dalga Boyu		DAD/220-360 nm		
Kolon Sıcaklığı		50 °C		
Enjeksiyon Hacmi		100 µL		
Kolon temizleme çözeltisi	Her enjeksiyon öncesi	500 µL %0,1'lik (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)		
	Her enjeksiyon öncesi			
Mobil fazlar	A	Su (99.9%, v/v) + TFA(0.1%, v/v),		
	B	Acetonitrile (99.9%, v/v) + TFA (0.1%, v/v);		
Linear Gradient	Zaman	A%	D%	
	0.00	85	15	
	25.00	60	40	
	25.01	0	100	
	29.00	85	15	
Akış hızı		1 mL/dk		

**Şekil 4:** HPLC cihazında elde edilen herbir peptid'e ait kromatogramların görüntüleri**Şekil 5.** HPLC cihazında yapılan doğrusallık çalışması sonrasında herbir peptid'e ait elde edilmiş doğrusallıkları.

3.2.2.2. LC-MS/MS

LC-MS/MS yöntemi ile yapılan metot validasyonu ve analiz çalışmalarında kullanılan cihaz parametreleri Çizelge 9'da verilmiştir. Peptidlerin kütle spektrometresi analiz parametreleri Çizelge 10'da verilmiştir. Çalışmadan kullanılacak olan sentetik

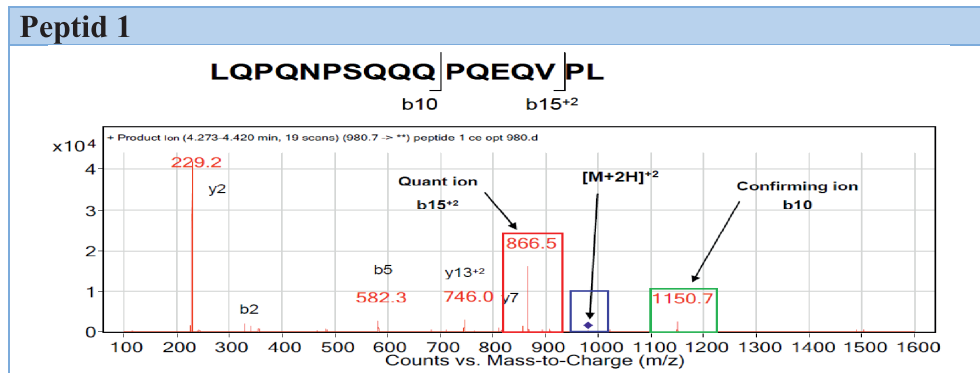
peptidlerin dizilimleri Şekil 6-7-8-9-10-11-12'de yer almaktadır. Bu çalışmada Sealey-Voyksner ve ark. (2010) ile Niewinski, M. ve ark. (2008) metotları kullanılmıştır.

Çizelge 9. Validasyon Parametreleri

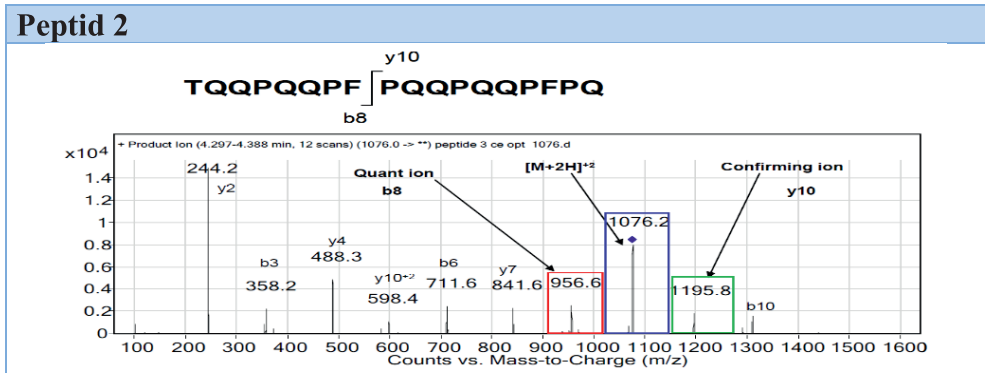
Cihaz marka/model		Waters TQD			
Mobil fazlar	A	Su %95 + ACN %5 (%0,025 TFA)			
	B	Su %5 + ACN %95 (%0,025 TFA)			
Gradient	Zaman(dk)	Akış(ml/dk)	% A	%B	
	0	0,8	95	5	
	2	0,8	95	5	
	4,5	0,8	50	50	
	6	0,8	10	90	
	7	0,8	10	90	
	7,1	0,8	95	5	
10	0,8	95	5		
Desolvation gas flow		1000 L/Hr			
Desolvation Temperature		600 °C			
Capillary Voltage (kW)		4			
Anatilik Kolon		Cortecs, C18, 2,7 µm-4,6x150mm			

Çizelge 10. Peptidlerin kütle spektrometresi analiz parametreleri

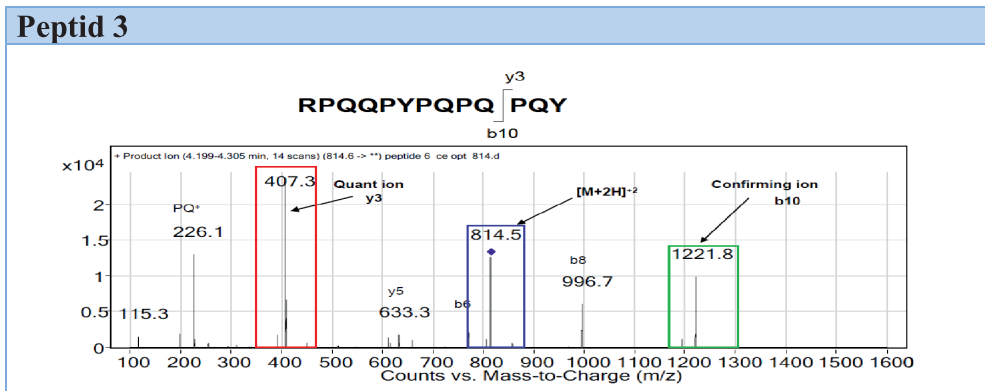
Peptide	Moleküler ağırlık	PI	DI	DwT ms	CV	CE
Peptide 1	1959.16	980,2 ⁽⁺²⁾	866,3 ⁽⁺²⁾	0,02	50	25
		980,2 ⁽⁺²⁾	1150,4	0,02	50	35
Peptide 2	2149.37	1075,3 ⁽⁺²⁾	956,5	0,02	50	30
		1075,3 ⁽⁺²⁾	1195,4	0,02	50	30
Peptide 3	2479.80	1240,5 ⁽⁺²⁾	1126,2 ⁽⁺²⁾	0,02	50	33
		1240,5 ⁽⁺²⁾	762,5	0,02	50	40
Peptide 4	1626.81	814 ⁽⁺²⁾	407,4	0,02	50	30
		814 ⁽⁺²⁾	1221	0,02	50	30
Peptide 5	2149.37	717,3 ⁽⁺³⁾	244,2	0,02	50	25
		1075,5 ⁽⁺²⁾	726,6	0,02	50	30
Peptide 6	702.77	703,3	441,2	0,02	50	25
		703,3	263,3	0,02	50	35
Peptide 7	1532.73	767,2 ⁽⁺²⁾	918,1	0,02	50	20
		767,2 ⁽⁺²⁾	579,9	0,02	50	20



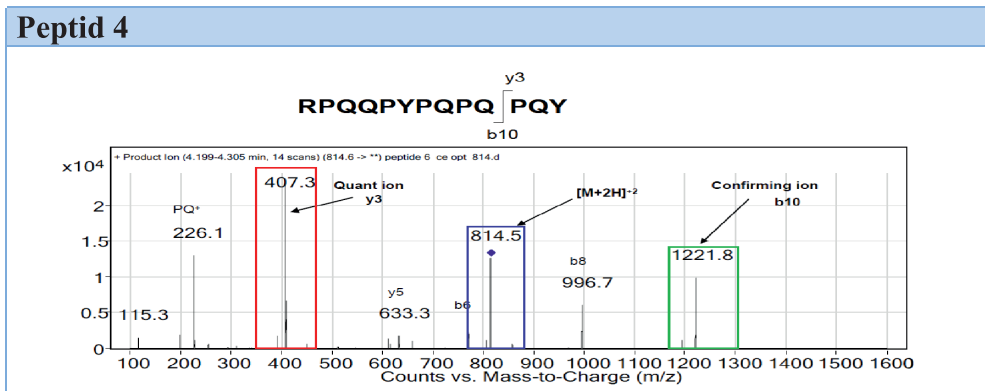
Şekil 6. Peptid 1 dizilim



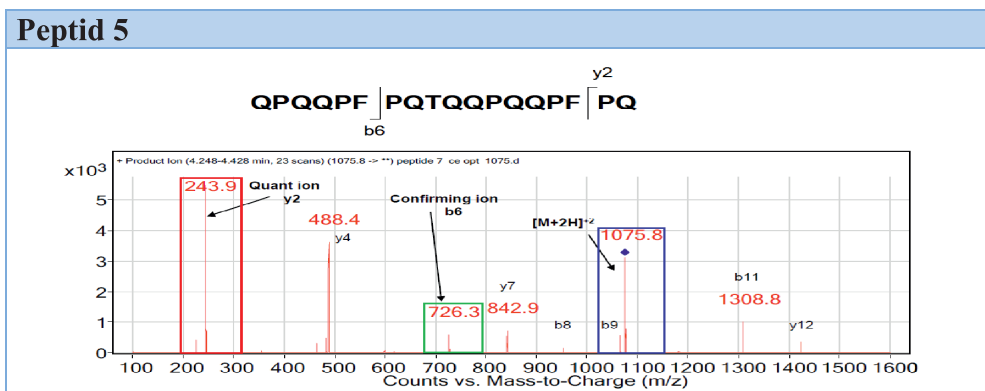
Şekil 7. Peptid 2 dizilim



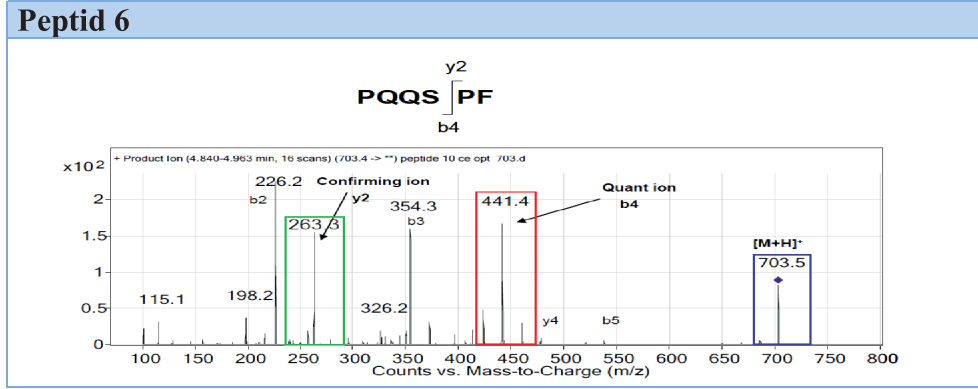
Şekil 8. Peptid 3 dizilim



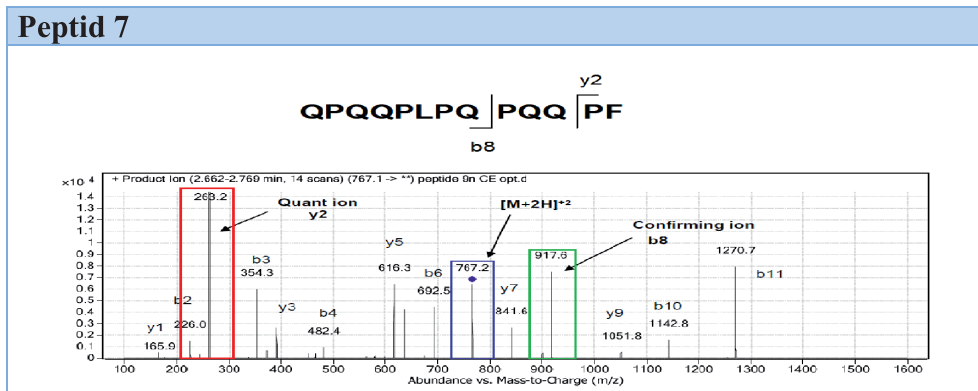
Şekil 9. Peptid 4 dizilim



Şekil 10. Peptid 5 dizilim



Şekil 11. Peptid 6 dizilim

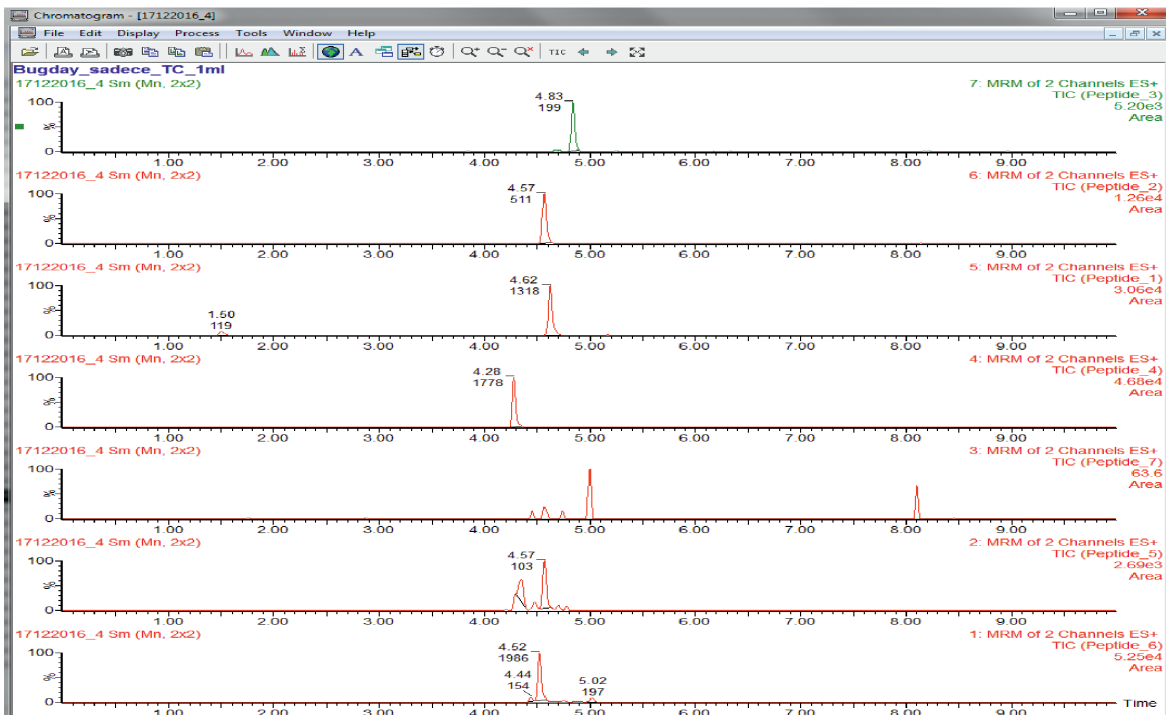


Şekil 12. Peptid 7 dizilim

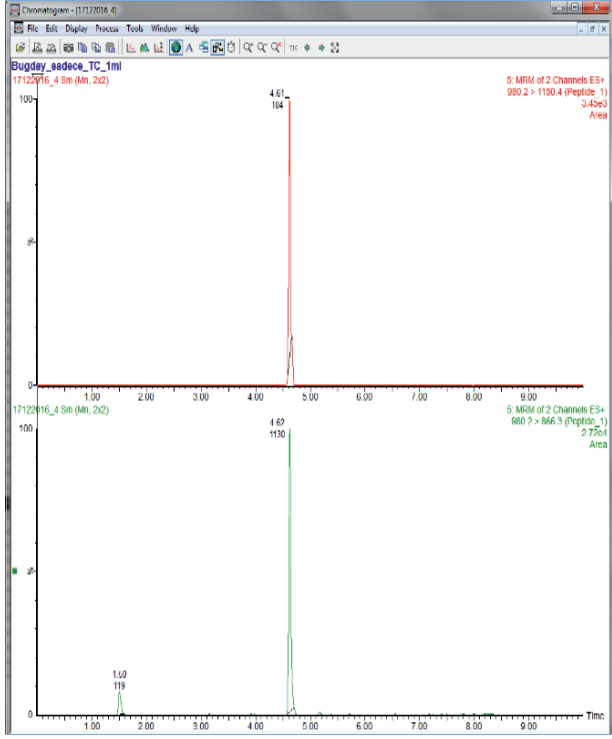
LC-MS/MS de analiz edilen peptidlerin TIC kromatogramları ve MRM (Multiple Reaction Monitoring) geçişleri Şekil 13'de verilmiştir.

Elde edilen bu peptidlerin MRM geçişleri ise Şekil 14-15-16-17-18-19-20'de verilmiştir.

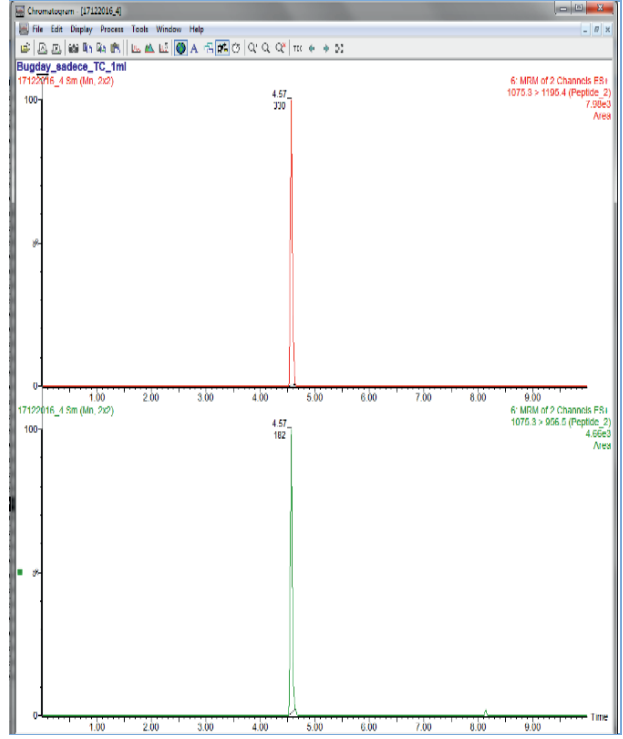
Peptidlerin TIC (Toplam İyon Kromatografisi)



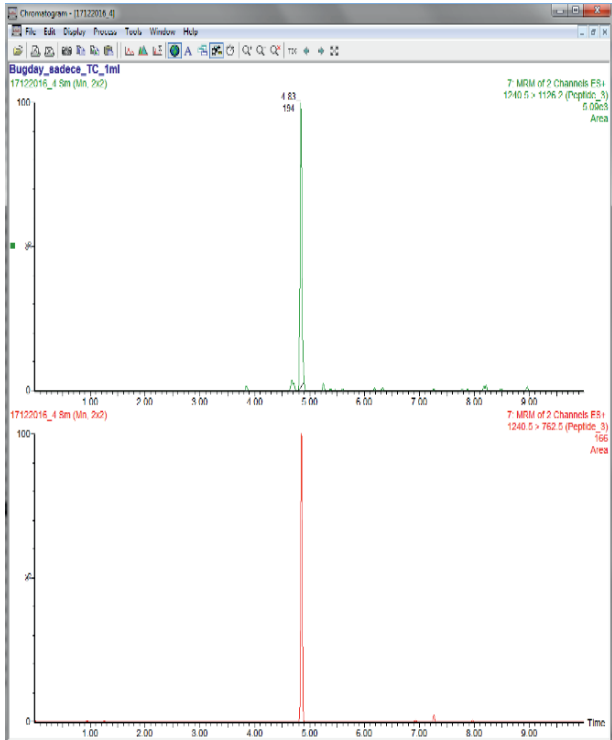
Şekil 13. TIC kromatogramları ve MRM geçişleri



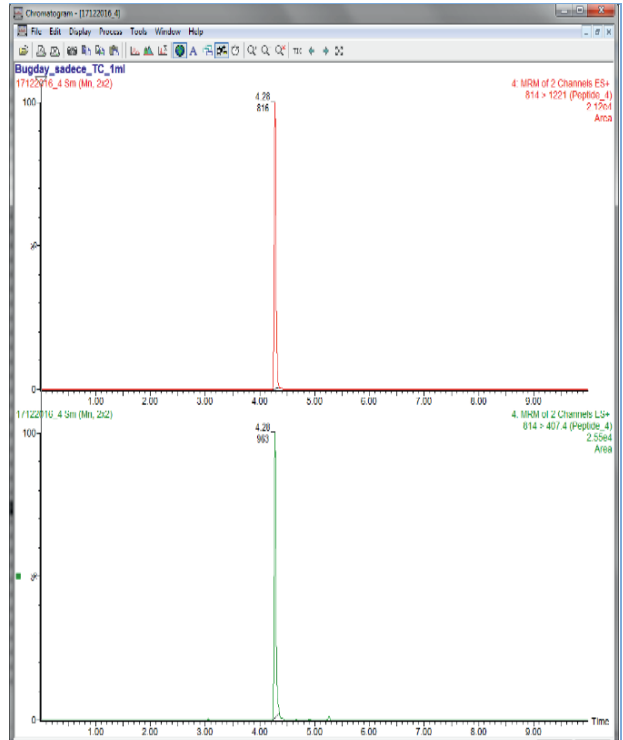
Şekil 14. Peptid 1 yavru iyon



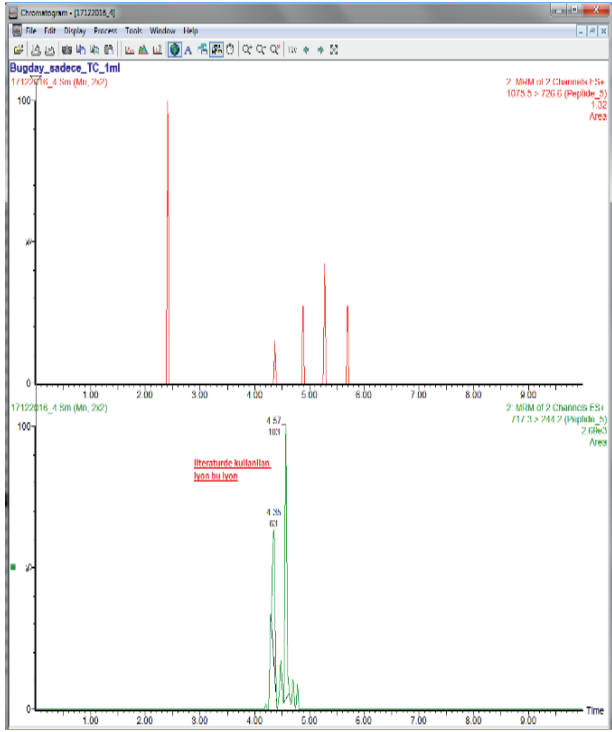
Şekil 15. Peptid 2 yavru iyon



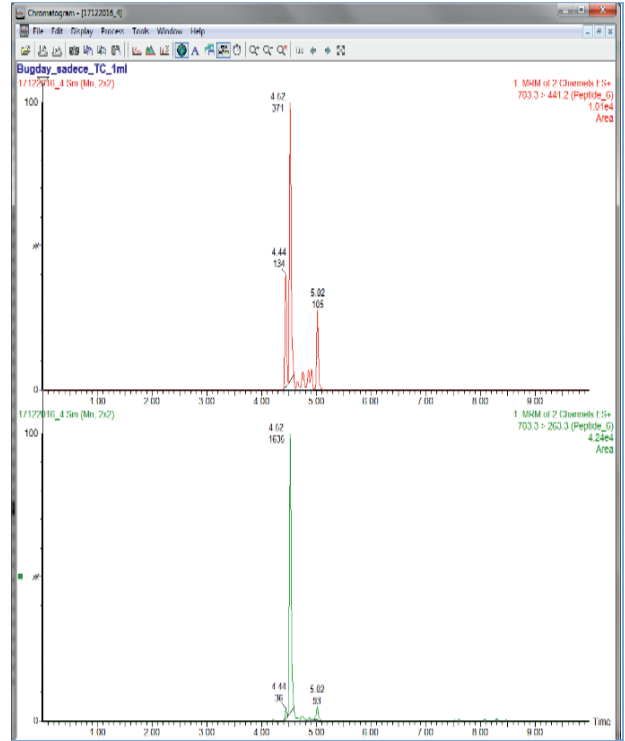
Şekil 16. Peptid 3 yavru iyon



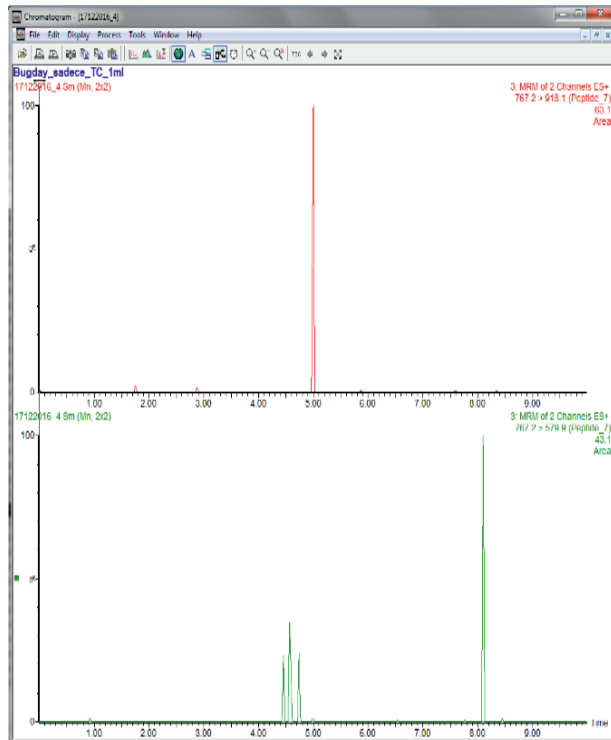
Şekil 17. Peptid 4 yavru iyon



Şekil 18. Peptid 5 yavru iyon



Şekil 19. Peptid 6 yavru iyon



Şekil 20. Peptid 7 yavru iyon

4. Bulgular ve Tartışma:

4.1. ELISA Bulguları

4.1.1. LOD LOQ

En düşük konsantrasyondaki sertifikalı standart madde aynı gün içinde 12 defa analize alınarak elde edilen sonuçların standart sapmasının 3 katı LOD,

10 katı LOQ olarak hesaplanmıştır. Çizelge 11'de LOD-LOQ sonuçları verilmiştir.

Çizelge 11. LOD-LOQ sonuçları

Analistler	Analist 1	Analist 2
15 ppm	16,16	15,52
	14,46	15,81
	16,73	15,09
	14,26	14,52
	17,19	14,81
	15,56	14,62
	14,72	14,21
	14,90	17,01
	14,21	15,33
	16,05	16,79
	15,93	15,15
	16,22	16,62
SD	0,945345	
LOD	2,84	
LOQ	9,45	

4.1.2. Tekrarlanabilirlik

Glütensiz un numunesine 15 ppm düzeyinde ilave yapılan örnek aynı gün içinde 12 defa analize alınarak

elde edilen sonuçların % RSD hesaplanmıştır. Çizelge 12'de Tekrarlanabilirlik sonuçları verilmiştir.

Çizelge 12. Tekrarlanabilirlik sonuçları

Paralel	Analist 1	Analist 2
15 ppm	14,72	14,21
	14,90	17,01
	14,21	15,33
	16,05	16,79
	15,93	15,15
	16,22	16,62
Ortalama	15,34	15,85
SD	0,834444	1,120007
RSD	0,054403	0,070656
n-1	5	5
RSD2	0,00296	0,004992
%RSDpool (kısa dönem)		6,31

4.1.3. Tekrarüretilebilirlik

Glütensiz un numunesine ilave yapılan örnek farklı günlerde (3 gün) içinde 6 defa analize alınarak elde

edilen sonuçlarından % RSD hesaplanmıştır. Çizelge 13'de Tekrarüretilebilirlik sonuçları verilmiştir.

Çizelge 13. Tekrarüretilebilirlik sonuçları

15 ppm	Analist 1	Analist 2
Gün 1	16,16	15,52
	14,46	15,81
Gün 2	16,73	15,09
	14,26	14,52
Gün 3	17,19	14,81
	15,56	14,62
Ortalama	15,73	15,06
SD	1,1932421	0,51433128
RSD	0,0758738	0,03414836
n-1	5	5
RSD2	0,0057568	0,00116611
%RSDpool (uzun dönem)		5,88

ELISA ile yapılan validasyon çalışmalarının sonuçları Çizelge 14’de özetlenmiştir.

Çizelge 14. ELISA Validasyon Çalışması Özeti

ELISA VALİDASYON SONUÇLARI	
PARAMETRELER	VERİLER
TEKRARLANABİLİRLİK VE TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK(%RSDpool)	
Tekrarlanabilirlik (KISA DÖNEM)	6.31
Tekrarüretilebilirlik (UZUN DÖNEM)	5.88
LOD (SDX3)	2.84
LOQ (SDX10)	9.45

ELISA testi ile gerçekleştirilen analizlere ait numune ve sonuçları Çizelge 15-16’da verilmiştir.

Çizelge 15. ELISA yöntemi ile yapılan numuneler

ELISA yöntemi ile yapılan numuneler				
Ana Ürün Özelliği	Ürün	Paralel Sayısı	Tekerrür Sayısı	Toplam
Glütensiz	un	2	6	12

Çizelge 16. ELISA yöntemi ile yapılan numune analiz sonuçları

ELISA yöntemi ile yapılan numune analiz sonuçları			
Ekstraksiyon adeti	Paralel 1 (ppm)	Paralel 2(ppm)	Ortalama
1	<10	<10	<10
2	<10	<10	<10
3	<10	<10	<10
4	<10	<10	<10
5	<10	<10	<10
6	<10	<10	<10

4.2. HPLC Bulguları

4.2.1. LOD ve LOQ

Glütensiz un numunesine 500 mg/kg ilave yapılan örnek aynı gün içinde 12 defa analize alınarak elde

edilen sonuçların standart sapmasının 3 katı LOD 10 katı LOQ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 17).

Çizelge 17. HPLC LOD ve LOQ Değerleri

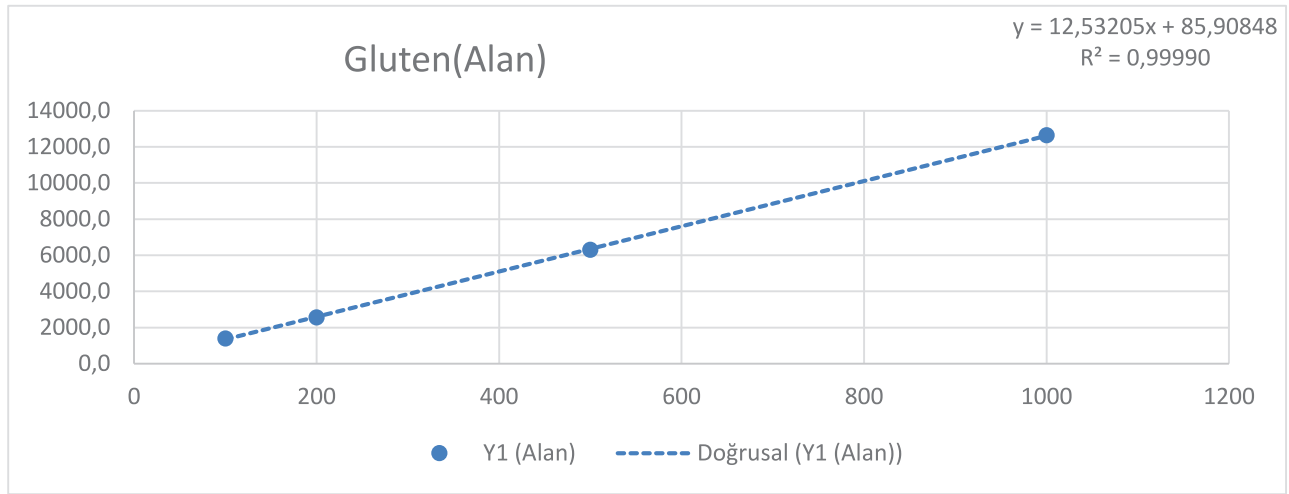
LOD & LOQ							
Tekrar Sayısı	İlavet Teorik (mg/kg)	1.paralel (mg/kg)	Geri Kazanım (%)	Uygunluk	2.paralel (mg/kg)	Geri Kazanım (%)	Uygunluk
1	500	467,45	93,49	Uygun	469,91	93,98	Uygun
2	500	488,82	97,76	Uygun	465,54	93,11	Uygun
3	500	486,65	97,33	Uygun	492,21	98,44	Uygun
4	500	491,27	98,25	Uygun	493,33	98,67	Uygun
5	500	471,71	94,34	Uygun	496,74	99,35	Uygun
6	500	466,69	93,34	Uygun	482,22	96,44	Uygun
7	500	468,82	93,76	Uygun	478,78	95,76	Uygun
8	500	492,22	98,44	Uygun	488,85	97,77	Uygun
9	500	491,71	98,34	Uygun	475,74	95,15	Uygun
10	500	477,74	95,55	Uygun	469,92	93,98	Uygun
11	500	469,99	94,00	Uygun	489,21	97,84	Uygun
12	500	488,84	97,77	Uygun	488,84	97,77	Uygun
ORT		480,16			482,61		
SS		10,65			10,46		
RSDr		0,02			0,02		
% RSDr		2,22			2,17		
LOD (3ss)		31,94			31,38		
LOQ (10ss)		106,47			104,61		

4.2.2. Doğrusallık

Bu çalışmada sertifikalı referans maddeler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şelik 21). Hesaplanan değerler Çizelge 18’de verilmiştir.

Çizelge 18. HPLC Doğrusallık değerleri

Kalibrasyon verileri			
Kalibrasyon ($y=a+bx$)			
(kons)	Y1 (Alan)	Y2 (Alan)	ORT
100	1398,7	1398,7	1398,7
100	1362,9	1362,9	1362,9
100	1437,4	1437,4	1437,4
200	2550,6	2550,6	2550,6
200	2546,9	2546,9	2546,9
200	2550,7	2550,7	2550,7
500	6363,9	6363,9	6363,9
500	6273,5	6273,5	6273,5
500	6296,9	6296,9	6296,9
1000	12455,7	12455,7	12455,7
1000	12714,3	12714,34	12714,3
1000	12752,0	12752,0	12752,0
a (kalibrasyon doğrusunun kesim noktası)			85,90848
b (kalibrasyon doğrusunun eğimi)			12,53205
S (residuel standart sapma)			90,6
r^2 (her bir konsantrasyon için okuma sayısı)			0,9999



Şekil 21. HPLC Doğrusallık grafiği

4.2.3. Tekrarlanabilirlik

Glütensiz un numunesine 1400 ve 3500 ppm (7 peptidin toplam konsantrasyonu) ilave yapılan örnek aynı gün içinde 12 defa analize alınarak elde

edilen sonuçların % RSD hesaplanmıştır ve Çizelge 19’da verilmiştir.

Çizelge 19. HPLC Tekrarlanabilirlik değerleri

Tekrarlanabilirlik			
Konsantrasyon:			
mg/kg	n	1400	3500
	1	1263,01	3329,62
	2	1283,93	3359
	3	1257,3	3375,25
	4	1280,06	3407,5
	5	1294,43	3363,98
	6	1299,03	3366,85
Ortalama		1279,63	3367,03
Standart sapma		16,67	25,21
RSD		0,013	0,007
%RSD		1,30	0,75

4.2.4. Tekrarüretilebilirlik:

Glütensiz un numunesine 1400 ve 3500 ppm (7 peptidin toplam konsantrasyonu) ilave yapılan

örnek farklı günlerde analize alınarak elde edilen sonuçların % RSD hesaplanmıştır ve Çizelge 20'de verilmiştir.

Çizelge 20. HPLC Tekrarüretilebilirlik değerleri

Tekrarüretilebilirlik Birinci konsantrasyon:													
1400 ppm	Zaman dilimi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Paralel 1	1263,0	1283,9	1257,3	1280,1	1294,4	1299	1251	1270,3	1268,4	1251,6	1257,3	1293,4
	Paralel 2	1275,3	1295,2	1265,8	1275,3	1286,2	1288,3	1565,6	1282,6	1277,5	1260,3	1264,5	1286,8
	ort	1269,2	1289,6	1261,6	1277,7	1290,3	1293,7	1408,3	1276,4	1273,0	1256,0	1260,9	1290,1
	std sapma	8,7	8,0	6,0	3,4	5,8	7,6	222,5	8,7	6,4	6,1	5,0	4,7
	%RSD	0,7	0,6	0,5	0,3	0,5	0,6	15,8	0,7	0,5	0,5	0,4	0,4
Tekrarüretilebilirlik İkinci konsantrasyon:													
3500 ppm	Zaman dilimi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Paralel 1	3329,62	3359	3375,3	3407,5	3364	3366,9	3365,2	3420	3365,86	3359,97	3356,89	3350,41
	Paralel 2	3389,6	3375,6	3401,1	3427,9	3379,8	3369,4	3347,1	3455,8	3345,1	3381,2	3316,8	3362,7
	ort	3359,6	3367,3	3388,2	3417,7	3371,9	3368,1	3356,1	3437,9	3355,5	3370,6	3336,8	3356,6
	std sapma	42,4	11,7	18,3	14,4	11,2	1,8	12,8	25,3	14,7	15,0	28,3	8,7
	%RSD	1,3	0,3	0,5	0,4	0,3	0,1	0,4	0,7	0,4	0,4	0,8	0,3

4.2.5. Geri Kazanım

Glütensiz un numunesine ilave yapılan örnek farklı günlerde 12 defa analize alınarak elde edilen

sonuçların geri kazanımı hesaplanmıştır ve Çizelge 21'de verilmiştir.

Çizelge 21. HPLC Geri Kazanım değerleri

GeriKazanım						
Birinci konsantrasyon:	n	1400	3500	% r 200 ppm	% r 500 ppm	AOAC %90-107 gerçeklik kontrolü
		200ppm	500 ppm			
Glüten	1	1263,01	3329,62	90,22	95,13	uygun
	2	1283,93	3359	91,71	95,97	uygun
	3	1257,3	3375,25	89,81	96,44	uygun
	4	1280,06	3407,5	91,43	97,36	uygun
	5	1294,43	3363,98	92,46	96,11	uygun
	6	1299,03	3366,85	92,79	96,20	uygun
	7	1250,98	3365,18	89,36	96,15	uygun
	8	1270,28	3419,99	90,73	97,71	uygun
	9	1268,47	3365,86	90,61	96,17	uygun
	10	1251,65	3359,97	89,40	96,00	uygun
	11	1257,38	3356,89	89,81	95,91	uygun
	12	1293,44	3350,41	92,39	95,73	uygun
% R- Ortalama				90,9	96,2	
% R- Standart sapma				1,23	0,69	

4.2.6. Belirsizlik

Belirsizlik değerleri Çizelge 22’de verilmiştir.

Çizelge 22. Belirsizlik değerleri

TOPLAM BELİRSİZLİK				
Parametre		Değer (X)	u(X)	u(X)/X
Kalibrasyon		100,0	5,12	0,051
Geri kazanım		90,9	0,356	0,004
Tekrarlanabilirlik		1	0,011	0,011
Tekrarüretilebilirlik		1	0,044	0,044
Relatif birleşik belirsizlik				0,069
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik				0,137
Toplam birleşik belirsizlik=				Relatif birleşik belirsizlik * Ölçüm sonucu
*Genişletilmiş toplam birleşik belirsizlik				Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik*Ölçüm sonucu
Raporlama				X ± (Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik) *X
*%95 güven aralığı, k=2				
X :ölçüm sonucu (ppm)				
GLÜTEN				
Ölçüm sonucu (X):	100	ppm		
Raporlama:	100	±	13,75	mg/kg

4.3. LC MS Bulgular

4.3.1. LOD ve LOQ

En düşük konsantrasyondaki sertifikalı standart madde aynı gün içinde 12 defa analize alınarak elde edilen sonuçların standart sapmasının 3 katı LOD.

10 katı LOQ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Çizelge 23’de verilmiştir.

Çizelge 23. LC MS/MS LOD-LOQ Değerleri

LOD-LOQ	
n	Konsantrasyon ppm
1	82,392
2	87,020
3	73,130
4	84,156
5	89,398
6	79,380
7	69,510
8	75,993
9	74,842
10	76,000
Ortalama	79,18
SD	6,41
LoD	19,24
LoQ	64,13

4.3.2. Doğrusallık

Bu çalışmada sertifikalı referans maddeler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

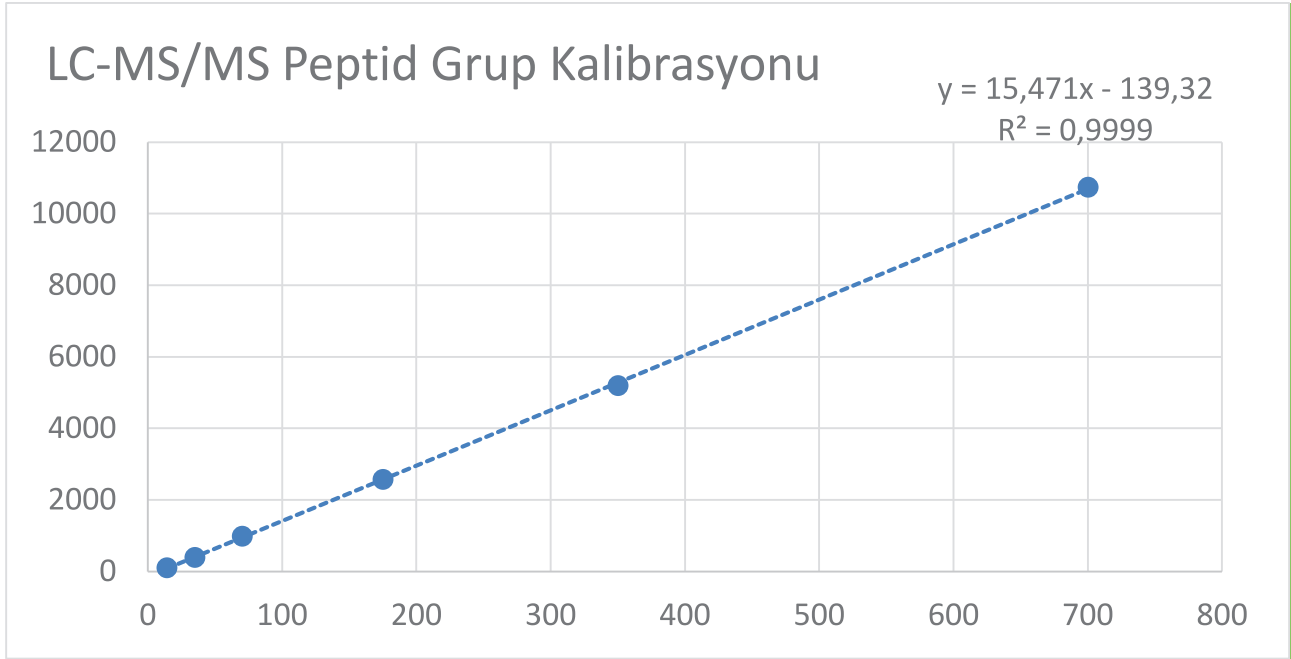
Hesaplanan değerler Çizelge 24'de ve Şekil 22'de verilmiştir.

Çizelge 24. LC MS Doğrusallık hesaplamaları

Kalibrasyon verileri	
X (kons)	Y1 (Alan) ORT
14	15,1
35	34,2
70	72,8
175	174,7
350	344,5
700	702,5
a (kalibrasyon doğrusunun kesim noktası)	15,471
b (kalibrasyon doğrusunun eğimi)	-139,32
S (residuel standart sapma)	36,9

r^2 (her bir konsantrasyon için okuma sayısı)

0,9999



Şekil 22. LS MS Doğrusallık grafiği

4.3.3. Tekrarlanabilirlik

Glütensiz un numunesine ilave yapılan örnek aynı gün içinde 12 defa analize alınarak elde edilen

sonuçların % RSD hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Çizelge 25’de verilmiştir.

Çizelge 25. LC MS/MS Tekrarlanabilirlik verileri

Tekrarlanabilirlik					Tekrarlanabilirlik				
I.Analist					II.Analist				
Birinci konsantrasyon:		10		ppm	Birinci konsantrasyon:		10		ppm
I.Konsantrasyon	n	Enj.1	Enj. 2	ort	I.Konsantrasyon	n	Enj.1	Enj. 2	ort
	1	101,95	82,39	92,17		1	89,16	79,38	84,27
	2	103,46	87,02	95,24		2	92,47	68,00	80,24
	3	86,66	73,13	79,90		3	84,33	69,51	76,92
	4	104,10	84,16	94,13		4	84,24	75,99	80,12
	5	108,32	89,40	98,86		5	100,03	74,84	87,44
	6	124,33	77,01	100,67		6	116,02	76,00	96,01
Ortalama					Ortalama				84,17
Standart sapma					Standart sapma				6,86
RSD					RSD				0,08
I.Analist					II.Analist				
İkinci konsantrasyon:		50		ppm	İkinci konsantrasyon:		50		ppm
II.Konsantrasyon	n	Enj.1	Enj. 2	ort	II.Konsantrasyon	n	Enj.1	Enj. 2	ort
	1	313,69	227,73	270,71		1	313,61	234,29	273,95
	2	349,86	274,31	312,08		2	349,67	272,24	310,96
	3	292,59	241,49	267,04		3	312,47	234,62	273,55
	4	385,42	272,81	329,12		4	366,46	263,73	315,10
	5	327,75	245,21	286,48		5	311,03	234,83	272,93
	6	364,91	270,73	317,82		6	334,37	248,98	291,68
Ortalama					Ortalama				289,69
Standart sapma					Standart sapma				19,45
RSD					RSD				0,07
I.Analist - %RSDpool					I.Analist -% RSDpool				7,5

4.3.4. Tekrarüretilebilirlik

Glütensiz un numunesine ilave yapılan örnek farklı günlerde (6 gün) içinde 6 defa analize alınarak elde

edilen sonuçlardan % RSD hesaplandı. Çizelge 26’da tekrarüretilebilirlik verileri yer almaktadır.

Çizelge 26. LC MS/MS Tekrarüretilebilirlik verileri

Tekrarüretilebilirlik										
Birinci konsantrasyon:		10		ppm		GÜNLER ARASI				
Zaman	1. zaman	2. zaman	3. zaman	4. zaman	5. zaman	6. zaman	ort	std sapma	%RSD	
I.Analist	92,1	95,2	79,9	94,1	98,8	100,6	93,49	7,35	7,9	
II.Analist	84,2	80,2	76,9	80,1	87,4	96,0	84,17	6,86	8,2	
KİŞİLER ARASI	ort	88,2	87,7	78,4	87,1	93,1	98,3			
	std sapma	5,59	10,61	2,10	9,91	8,08	3,30			
	RSD	0,063	0,121	0,027	0,114	0,087	0,034			
İkinci konsantrasyon:		50		ppm		GÜNLER ARASI				
Zaman dilimi	1. zaman	2. zaman	3.z aman	4. zaman	5. zaman	6. zaman	ort	std sapma	RSD	
I.Analist	270,7	312,0	267,0	329,1	286,4	317,8	297,21	26,04	8,8	
II.Analist	273,9	310,9	273,5	315,1	272,9	291,6	289,69	19,45	6,7	
KİŞİLER ARASI	ort	272,3	311,5	270,3	322,1	279,7	304,7			
	std sapma	2,290	0,798	4,600	9,911	9,584	18,485			
	%RSD	0,008	0,003	0,017	0,031	0,034	0,061			

4.3.5. Geri Kazanım

Glüten içermeyen pirinç ununa 7 adet peptidin herbirinden 10 ve 50 mg/kg konsantrasyondaki

sentetik peptidlerden ilave yapıldı. Elde edilen sonuçların uygunluk değerlendirmesi Çizelge 27’de yer almaktadır.

Çizelge 27. LC MS/MS Geri Kazanım Uygunluk Değerlendirilmesi

GeriKazanım					
Birinci konsantrasyon:		70	ppm		
	n	eneksiyoı	eneksiyoı	ort	% R
	1	82,39	79,38	80,89	115,6
	2	87,02	68,00	77,51	110,7
	3	73,13	69,51	71,32	101,9
	4	84,16	75,99	80,07	114,4
	5	89,40	74,84	82,12	117,3
	6	77,01	76,00	76,51	109,3
İkinci konsantrasyon:		350	ppm		
	n	Enj. 1	Enj. 2	ort	% R
	7	313,69	313,61	313,65	89,6
	8	349,86	349,67	349,77	99,9
	9	292,59	312,47	302,53	86,4
	10	385,42	366,46	375,94	107,4
	11	327,75	311,03	319,39	91,3
	12	364,91	334,37	349,64	99,9
% R- Ortalama					
% R- Standart sapma					

4.3.6. Belirsizlik

Belirsizlik değerleri Çizelge 28’de verilmiştir.

Çizelge 28. LC MS Belirsizlik Değerleri

TOPLAM BELİRSİZLİK					
Parametre		Değer (X)	u(X)		u(X)/X
Kalibrasyon		35,0	2,00		0,057
Geri kazanım		103,6	3,037		0,029
Tekrarlanabilirlik		1	0,083		0,083
Tekrarüretilebilirlik		1	0,087		0,087
Relatif birleşik belirsizlik					0,137
*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik					0,273
Toplam birleşik belirsizlik=				Relatif birleşik belirsizlik * Ölçüm sonucu	
*Genişletilmiş toplam birleşik belirsizlik =				Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik*Ölçüm sonucu	
Raporlama				X ± (Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik) *X	
*%95 güven aralığı, k=2					
X :ölçüm sonucu (ppm)					
Toplam Peptid					
Ölçüm sonucu (X):	35	ppb			
Raporlama:	35	±	9,56851	µg/kg	
	0,035	±	0,00957	mg/kg	

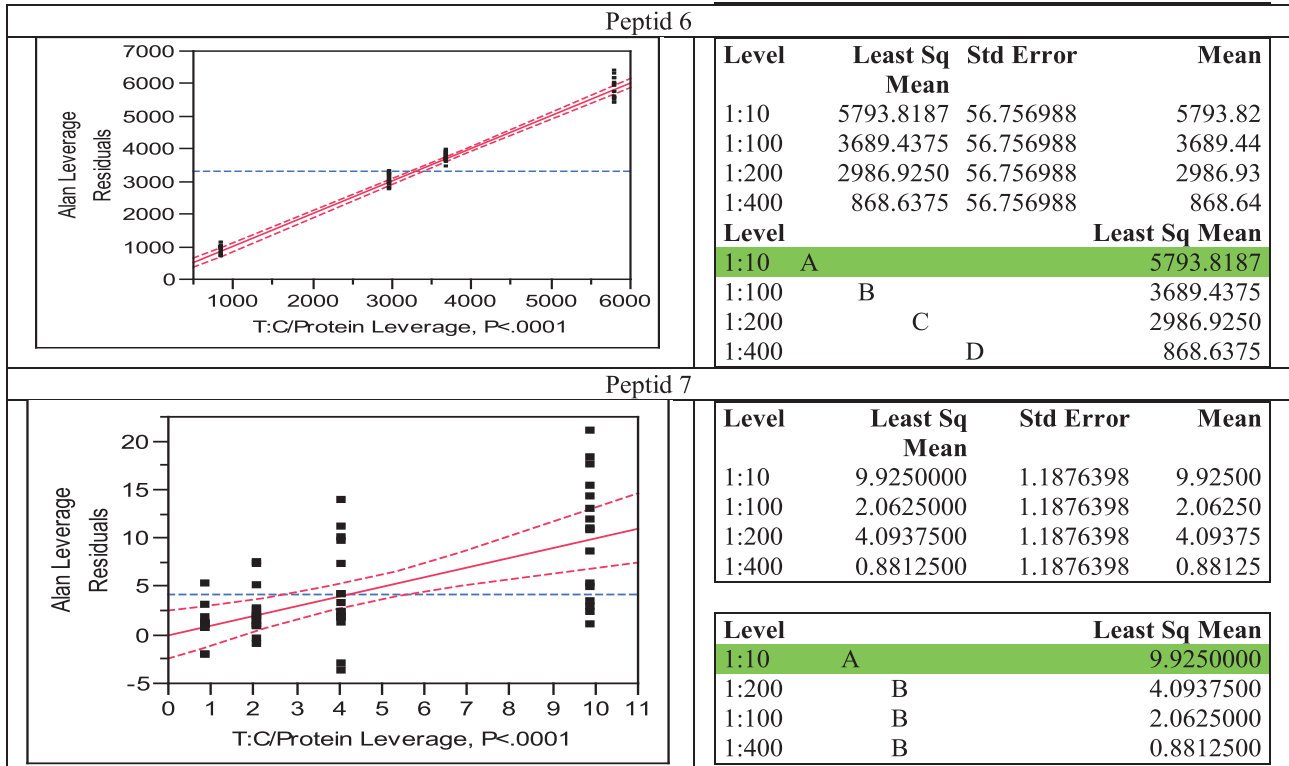
4.3.7. Numune hazırlama optimizasyonu

Glüten proteininden beklenen numune hazırlama sonrasında belirlenmiş olan peptidlerin en fazla düzeyde elde edilmesine yönelik olarak protein enzim oranının belirlenmesi, enzim reaksiyon süresi ve ultrasonik uygulaması çeşitli ölçütlerde denenmiştir.

4.3.7.1. Protein/Enzim oranının denemesi

Proteinin parçalanarak en fazla miktarda peptid oluşumunun sağlanmasına yönelik uygun enzim:protein oranının belirlenmesi için farklı düzeylerde (1:10, 1:100, 1:200, 1:400) çalışma yapılmış ve istatistiksel olarak değerlendirme yapılmıştır. İstatistiksel olarak elde edilen değerlendirmeler Çizelge:23’de verilmiş olup en iyi enzim:protein performansın genel olarak tüm peptidler için 1:10 olduğu görülmüştür.

T:C/Protein Oranı																																									
Peptid 1																																									
<p style="text-align: center;">T:C/Protein Leverage, P<.0001</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Least Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1:10</td> <td>5617.3625</td> <td>56.257181</td> <td>5617.36</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>3676.7313</td> <td>56.257181</td> <td>3676.73</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>2982.9813</td> <td>56.257181</td> <td>2982.98</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>868.2375</td> <td>56.257181</td> <td>868.24</td> </tr> <tr> <th>Level</th> <th colspan="3">Least Sq Mean</th> </tr> <tr> <td>1:10</td> <td>A</td> <td></td> <td>5617.3625</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>B</td> <td></td> <td>3676.7313</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>C</td> <td></td> <td>2982.9813</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>D</td> <td></td> <td>868.2375</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean	1:10	5617.3625	56.257181	5617.36	1:100	3676.7313	56.257181	3676.73	1:200	2982.9813	56.257181	2982.98	1:400	868.2375	56.257181	868.24	Level	Least Sq Mean			1:10	A		5617.3625	1:100	B		3676.7313	1:200	C		2982.9813	1:400	D		868.2375
Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean																																						
1:10	5617.3625	56.257181	5617.36																																						
1:100	3676.7313	56.257181	3676.73																																						
1:200	2982.9813	56.257181	2982.98																																						
1:400	868.2375	56.257181	868.24																																						
Level	Least Sq Mean																																								
1:10	A		5617.3625																																						
1:100	B		3676.7313																																						
1:200	C		2982.9813																																						
1:400	D		868.2375																																						
Peptid 2																																									
<p style="text-align: center;">T:C/Protein Leverage, P<.0001</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Least Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1:10</td> <td>1094.7563</td> <td>11.583340</td> <td>1094.76</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>68.2063</td> <td>11.583340</td> <td>68.21</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>1.5938</td> <td>11.583340</td> <td>1.59</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>0.3437</td> <td>11.583340</td> <td>0.34</td> </tr> <tr> <th>Level</th> <th colspan="3">Least Sq Mean</th> </tr> <tr> <td>1:10</td> <td>A</td> <td></td> <td>1094.7563</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>B</td> <td></td> <td>68.2063</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>C</td> <td></td> <td>1.5938</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>C</td> <td></td> <td>0.3437</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean	1:10	1094.7563	11.583340	1094.76	1:100	68.2063	11.583340	68.21	1:200	1.5938	11.583340	1.59	1:400	0.3437	11.583340	0.34	Level	Least Sq Mean			1:10	A		1094.7563	1:100	B		68.2063	1:200	C		1.5938	1:400	C		0.3437
Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean																																						
1:10	1094.7563	11.583340	1094.76																																						
1:100	68.2063	11.583340	68.21																																						
1:200	1.5938	11.583340	1.59																																						
1:400	0.3437	11.583340	0.34																																						
Level	Least Sq Mean																																								
1:10	A		1094.7563																																						
1:100	B		68.2063																																						
1:200	C		1.5938																																						
1:400	C		0.3437																																						
Peptid 3																																									
<p style="text-align: center;">T:C/Protein Leverage, P<.0001</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Least Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1:10</td> <td>1216.2125</td> <td>86.187745</td> <td>1216.21</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>4113.3375</td> <td>86.187745</td> <td>4113.34</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>2905.3625</td> <td>86.187745</td> <td>2905.36</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>436.5500</td> <td>86.187745</td> <td>436.55</td> </tr> <tr> <th>Level</th> <th colspan="3">Least Sq Mean</th> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>A</td> <td></td> <td>4113.3375</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>B</td> <td></td> <td>2905.3625</td> </tr> <tr> <td>1:10</td> <td>C</td> <td></td> <td>1216.2125</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>D</td> <td></td> <td>436.5500</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean	1:10	1216.2125	86.187745	1216.21	1:100	4113.3375	86.187745	4113.34	1:200	2905.3625	86.187745	2905.36	1:400	436.5500	86.187745	436.55	Level	Least Sq Mean			1:100	A		4113.3375	1:200	B		2905.3625	1:10	C		1216.2125	1:400	D		436.5500
Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean																																						
1:10	1216.2125	86.187745	1216.21																																						
1:100	4113.3375	86.187745	4113.34																																						
1:200	2905.3625	86.187745	2905.36																																						
1:400	436.5500	86.187745	436.55																																						
Level	Least Sq Mean																																								
1:100	A		4113.3375																																						
1:200	B		2905.3625																																						
1:10	C		1216.2125																																						
1:400	D		436.5500																																						
Peptid 4																																									
<p style="text-align: center;">T:C/Protein Leverage, P<.0001</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Least Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1:10</td> <td>3779.7563</td> <td>62.466930</td> <td>3779.76</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>4571.8063</td> <td>62.466930</td> <td>4571.81</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>1747.2250</td> <td>62.466930</td> <td>1747.22</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>67.6500</td> <td>62.466930</td> <td>67.65</td> </tr> <tr> <th>Level</th> <th colspan="3">Least Sq Mean</th> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>A</td> <td></td> <td>4571.8063</td> </tr> <tr> <td>1:10</td> <td>B</td> <td></td> <td>3779.7563</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>C</td> <td></td> <td>1747.2250</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>D</td> <td></td> <td>67.6500</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean	1:10	3779.7563	62.466930	3779.76	1:100	4571.8063	62.466930	4571.81	1:200	1747.2250	62.466930	1747.22	1:400	67.6500	62.466930	67.65	Level	Least Sq Mean			1:100	A		4571.8063	1:10	B		3779.7563	1:200	C		1747.2250	1:400	D		67.6500
Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean																																						
1:10	3779.7563	62.466930	3779.76																																						
1:100	4571.8063	62.466930	4571.81																																						
1:200	1747.2250	62.466930	1747.22																																						
1:400	67.6500	62.466930	67.65																																						
Level	Least Sq Mean																																								
1:100	A		4571.8063																																						
1:10	B		3779.7563																																						
1:200	C		1747.2250																																						
1:400	D		67.6500																																						
Peptid 5																																									
<p style="text-align: center;">T:C/Protein Leverage, P<.0001</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Level</th> <th>Least Sq Mean</th> <th>Std Error</th> <th>Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1:10</td> <td>834.78750</td> <td>24.280435</td> <td>834.788</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>131.30625</td> <td>24.280435</td> <td>131.306</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>15.70000</td> <td>24.280435</td> <td>15.700</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>1.13750</td> <td>24.280435</td> <td>1.138</td> </tr> <tr> <th>Level</th> <th colspan="3">Least Sq Mean</th> </tr> <tr> <td>1:10</td> <td>A</td> <td></td> <td>834.78750</td> </tr> <tr> <td>1:100</td> <td>B</td> <td></td> <td>131.30625</td> </tr> <tr> <td>1:200</td> <td>C</td> <td></td> <td>15.70000</td> </tr> <tr> <td>1:400</td> <td>C</td> <td></td> <td>1.13750</td> </tr> </tbody> </table>	Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean	1:10	834.78750	24.280435	834.788	1:100	131.30625	24.280435	131.306	1:200	15.70000	24.280435	15.700	1:400	1.13750	24.280435	1.138	Level	Least Sq Mean			1:10	A		834.78750	1:100	B		131.30625	1:200	C		15.70000	1:400	C		1.13750
Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean																																						
1:10	834.78750	24.280435	834.788																																						
1:100	131.30625	24.280435	131.306																																						
1:200	15.70000	24.280435	15.700																																						
1:400	1.13750	24.280435	1.138																																						
Level	Least Sq Mean																																								
1:10	A		834.78750																																						
1:100	B		131.30625																																						
1:200	C		15.70000																																						
1:400	C		1.13750																																						

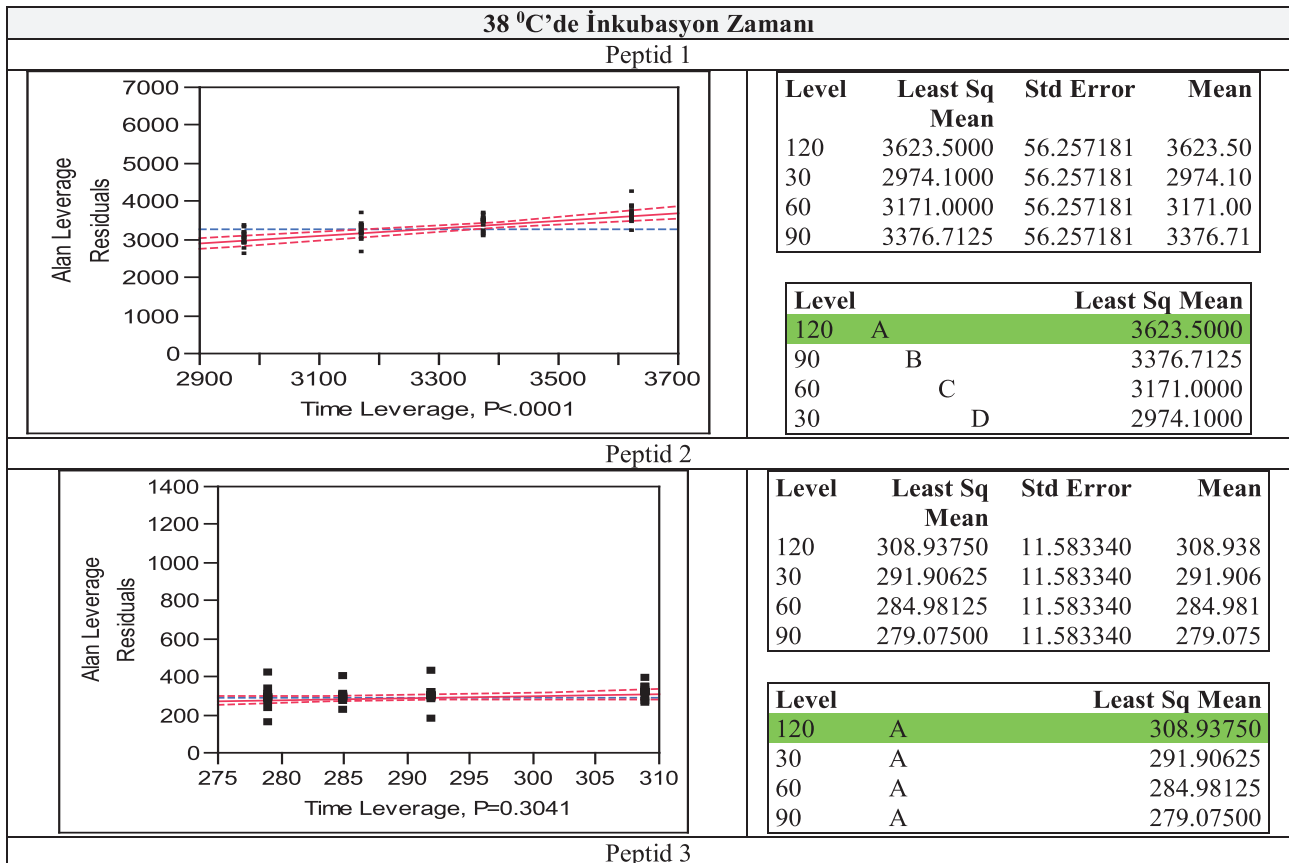


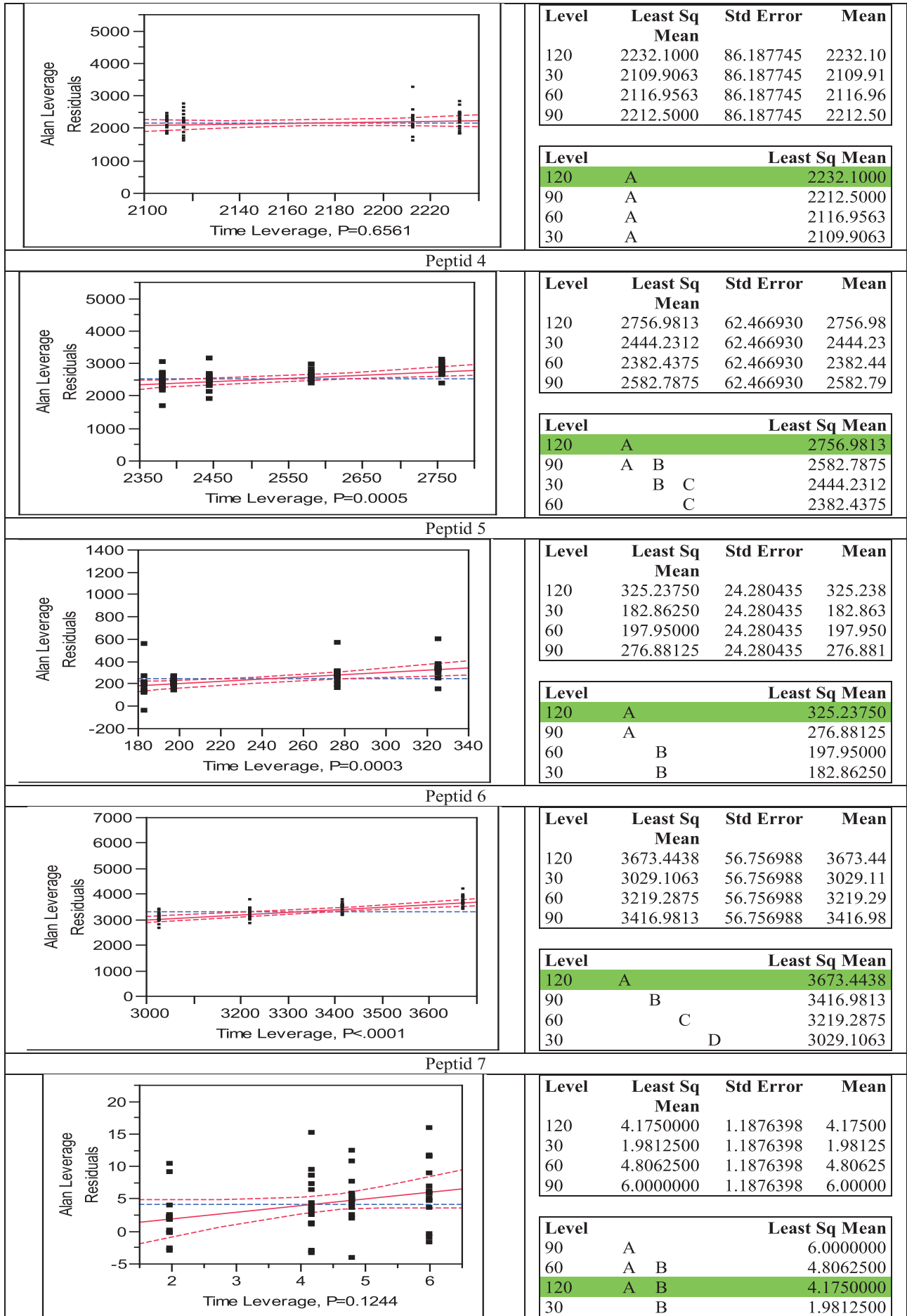
Şekil 23. T:C/Protein oranı istatistiksel değerlendirmesi

4.3.7.2. Enzim Reaksiyon Süresi Denemesi

Numune hazırlama aşamasında test edilen bir diğer değişken ise en etkin enzim ile muamele süresidir. Bu amaca yönelik olarak 30-60-90 ve 120dk 38°C'de inkübasyona tabi tutuldu. Elde edilen sonuçların

istatistiksel olarak değerlendirmeleri Çizelge:24'de verilmiş olup en iyi inkübasyon süresinin 120dk olduğu belirlenmiştir.





Şekil 24. 38°C’de İnkubasyon zamanı istatistiksel değerlendirmesi

5. Sonuç

ELISA ve kromatografik yöntemler olan HPLC ve LC-MS/MS yöntemine ait validasyon performansları Çizelge 29'da özetlenmiştir.

Bu çalışmada LOD değerleri ve belirsizlik değerleri göz önünde bulundurulduğunda hem glutensiz hem de çok düşük glutenli gıdaların analizinde ELISA kit yönteminin başarılı olduğu görülmüştür.

Çizelge 29. Çalışmada yer alan üç yöntemin özet validasyon verileri

	LOD	LOQ	R ² >0.99	Tekrarlanabilirlik %RSD	Tekrarüretilebilirlik %RSD	Belirsizlik ppm
ELISA	2,84	9,45	-	6,31	5,88	-
HPLC	31,94	106,47	0,9999	1,30	15,8	100±13,75
LC-MS/MS	19,24	63,13	0,9999	8,3	8,8	0,035±0,009

TGK 2012/04'e göre gluten içeriği yönünden sınırlandırılmış olan çok düşük glutenli ve glutensiz gıdalarda bulunması gereken limitler 0-20, 20-100 ppm aralığında olduğu belirtilmiştir. HPLC DAD analiz metodu çalışmalarında bu limitleri karşılamak için analiz edilmesi gereken peptidler cihazda görülmüştür. Yapılan HPLC çalışmalarında LOD değeri 31,94mg/kg, LOQ değeri ise 106,47mg/kg düzeylerinde metod performansları elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre HPLC metodunun çok düşük glutenli ve glutensiz gıdaların analizi için uygun olmadığı görülmüştür.

LC-MS/MS ile yapılan çalışmamızda ise literatürde yer alan peptidlerin ana iyonları, hesaplama ve doğrulamada kullanılacak olan yavru iyonları cihaza tanıtılması başarı ile gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışmalarımızda her bir peptid için yasal limitleri karşılayacak LOD ve LOQ değerlerine ayrı ayrı ulaşılmıştır. Ancak gluten için yapılan hesaplama modeline göre tüm bu peptidler kullanılarak grup kalibrasyonları yapılmıştır. Bu durumda gerçekleşen

LOD değeri 19,24mg/kg, LOQ değeri ise 64,13mg/kg olarak gerçekleşmiştir. Sealey-Voyksner ve ark. (2010)'nın yapmış oldukları çalışmada yer alan grup kalibrasyon hesaplama yöntemine göre her bir peptid için ayrı ayrı hesaplanmış toplam LODt değeri 88,5 mg/kg, toplam LOQt değeri ise 350 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmaya göre ihtiyaç duyulan 0-20 mg/kg ve 20-100 mg/kg bandındaki ürünlerin analizlerin her iki grubu için kullanılabilir bir metoda ulaşamadığı görülmüştür. Çalışmamız sonucunda geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile 20-100 mg/kg bandındaki ürünlerin analizleri yapılabirliği ortaya konulmuştur.

Ayrıca geliştirilen LC-MS/MS yöntemi sonucunda ulaşılmış olduğumuz 19,24mg/kg toplam LODt değeri. Sealey-Voyksner ve ark. (2010)'nın yapmış oldukları çalışmada buldukları toplam LODt değeri olan 88,5 mg/kg'a göre 4,6 kat, toplam LOQt değeri olan 350 mg/kg'a göre 3,9 kat düşük seviyeler de olduğundan literatürdeki metotlara oranla daha hassas bir metod oluşturulmuştur.

6. Kaynaklar

- Anonim, 2012a. EURACHEM / CITAC Guide CG 4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, QUAM:2012.P1
- Anonim, 2012b. FAPAS, (27/12/2012). Available Quality Control Materials <<http://www.fapas.com/quality-control-materials/Available-quality-control-materials.cfm>>
- Anonim, 2017. ISO 21748:2017 Guidance for the Use of Repeatability, Reproducibility and Trueness Estimates in Measurement Uncertainty Evaluation
- Anonim, 2019. ISO 5725-2:2019 Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results—Part 2: Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method
- Battais, F., Courcoux, P., Popineau, Y., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. A. and Denery-Papini, S., 2005. Food Allergy to Wheat: Differences in Immunoglobulin E-Binding Proteins as a Function of Age or Symptoms. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 109-117.
- Ciclitira, P. J., Ellis, H. J. and Lundin, K. E., 2005. Gluten-Free Diet—What is Toxic?. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 19(3), 359-371.
- Farrell, R. J. and Kelly, C.P., 2002. Celiac Sprue. *New England Journal of Medicine*, 346(3), 180-188.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W.S., Courtin, C.M., Gebruers, K. and Delcour, J.A., 2005. Wheat Flour Constituents: How They Impact Bread Quality, and How to Impact Their Functionality. *Trends in food science & technology*, 16(1-3), 12-30.
- Gómez, A.V., Ferrer, E., Añón, M.C. and Puppo, M.C., 2012. Analysis of Soluble Proteins/Aggregates Derived From Gluten-Emulsifiers Systems. *Food Research International*, 46(1), 62-68.
- Hopper, A., Hadjivassiliou, M., Butt, S. and Sanders Ds., 2007. Adult Coeliac Disease. *BMJ*; 335: 558-562. L5-29
- Kieffer, R., Schurer, F., Köhler, P. and Wieser, H., 2007. Effect of Hydrostatic Pressure and Temperature on the chemical and Functional Properties of wheat Glüten: Studies on Glüten, Gliadin and Glütenin. *Journal of Cereal Science*, 45(3), 285-292.
- Maki, M, and Lohi, O., 2004. Celiac Disease. In: Walker WA, Goulet O, Kleinman RE, Sherman PM, Shneider BL, Sanderson IR (eds). *Pediatric Gastrointestinal Disease*. 4th ed. Ontario: B.C. Decker,: 932-43.
- Mowat, A.M., 2003. Coeliac Disease – a Meeting Point for Genetics, Immunology and Protein Chemistry. *The Lancet*; 361:1290-1292
- Niewinski, M.M., 2008. Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(4), 661-672.
- Özkaya, B., 1999. Tahılların Neden Olduğu Alerjiler Ve Önemi-2. *Food Hi-Tech*, Mar. 82-88.
- Sealey-Voyksner, J. A., Khosla, C., Voyksner, R.D. and Jorgenson, J.W., 2010. Novel Aspects of Quantitation of Immunogenic Wheat Gluten Peptides by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4167-4183.
- Sollid, L.M. and Jabri, B., 2005. Is Celiac Disease an Autoimmune Disorder?. *Current opinion in immunology*, 17(6), 595-600.
- Urgancı, N., 2005. Çölyak Hastalarına Ekmek Zehir Oluyor. http://212.174.46.149/w/dergi/basinpdf/kasim2004/18_19_20.pdf.
- Van Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitira, P.J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H. J. and Mendez, E., 2006. Towards a New Gliadin Reference Material—Isolation and Characterisation. *Journal of cereal science*, 43(3), 331-341.