

ALKOLLÜ İÇKİLERİN KALİTE KONTROLÜNDE KULLANILAN FARKLI ALKOL TAYİN METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE NIR (YAKIN KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ) METODUNUN VALİDASYONU*

Merve Darıcı, Turgut Cabaroğlu**

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş / *Received*: 18.08.2017; Kabul / *Accepted*: 04.12.2017; Online baskı / *Published online*: 27.12.2017

Darıcı, M., Cabaroğlu, T. (2018). Alkollü içkilerin kalite kontrolünde kullanılan farklı alkol tayin metotlarının karşılaştırılması ve NIR (yakın kızılötesi spektroskopisi) metodunun validasyonu. *GIDA* (2018) 43 (1): 90-100 doi: 10.15237/gida.GD17083

ÖZ

Etil alkol miktarı alkollü içki endüstrisinde üreticinin kaliteyi standardize etmesi, mevzuat denetimi, ürün sınıf denetiminin yapılması, içki kategorilerinin belirlenmesi ve yasal vergi düzenlemesi açısından bilinmesi zorunlu bir parametredir. Bu çalışmada alkol miktarının tayininde referans metot olan piknometrik metot, sektörde yaygın kullanımı olan dansimetrik metot ve pratik bir metot olan NIR spektroskopisi metotları ele alınmıştır. Şarap ve rakı olmak üzere iki farklı alkollü içki matrisinde üç metodun validasyon çalışması yapılmıştır. Validasyon verileri karşılaştırılarak NIR spektroskopisinin performansı değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik (%RSD_r) değeri; NIR metodunda şarap ve rakı numunesinde %0.05 olarak, piknometrik metotta şarap için %0.31 ve rakı için %0.14 olarak, dansimetrik metot da ise şarap için %0.72 ve rakı için %0.44 olarak belirlenmiştir. NIR metodunda geri kazanım, iki farklı alkol konsantrasyonunda %98 olarak tespit edilmiştir. Rakı ve şarap numunelerinde farklı metotlarla belirlenen alkol miktarı arasında istatistiksel açıdan farklılık belirlenmemiştir. Kesinlik parametreleri karşılaştırıldığında NIR metodunun piknometrik ve dansimetrik metoda göre daha güvenilir olduğu belirlenmiştir. **Anahtar kelimeler:** NIR spektroskopisi, etil alkol analizi, piknometre, dansimetre, metot validasyonu, ölçüm belirsizliği

VALIDATION OF NIR (NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY) METHOD FOR ALCOHOLIC STRENGTH MEASUREMENT IN ALCOHOLIC BEVERAGES: COMPARISON OF DIFFERENT METHODS

ABSTRACT

Alcohol content is an obligatory parameter in the production of alcoholic beverages for both the need of a constant quality in alcoholic beverages industry and from the point of view of legislative and taxation regulations. In this research, pycnometric method as the reference method, electronic densimetry method and NIR methods have been studied for the measurement of the alcohol strength. Wine and raki as the matrix of two different alcoholic beverages are evaluated with single-laboratory validation using these methods. Performance of NIR spectroscopy was evaluated with comparing validation parameters of other methods. The repeatability (%RSD_r) of NIR method is %0.05 in both matrices, RSD_r of pycnometric method is %0.31 for wine and is %0.14 for raki, RSD_r of densimetric method is %0.72 for wine and is %0.44 for raki have been determined for alcoholic strength. Recovery for NIR method in two different alcoholic solutions is %98. There are no significant differences among the alcoholic strengths depending on different methods in samples of raki and wine. Among the methods, NIR method is more reliable depending on precision parameters.

Keywords: NIR spectroscopy, alcoholic strength, pycnometer, densimetry, method validation, measurement uncertainty

* Bu makalenin özeti (poster) 40. Dünya Bağ ve Şarap Kongresi'nde yayınlanmıştır. *Abstract of this article (poster) are published in 40th World Congress of Vine and Wine.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ tcabar@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 6173/2172,

☎ (+90) 322 338 6614

GİRİŞ

Laboratuvar analizlerinde metot validasyonu, bir metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun tespiti için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013). Valide edilmiş yöntemle çalışıldığında yapılan işlemin kesin, doğru, spesifik, tutarlı, geçerli ve güvenilir olduğu garanti edilmiş olur. Metot validasyonunda bir ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğu objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013). Metot validasyonunun amacı, seçilen metodun istenen amaca uygun nitelikte (performansta, kalitede) sonuç verdiğini test etmek ve metodun rutin kullanımı sırasında istenen performansı sağlamanın koşullarını belirlemek ve kontrol altında tutmaktır. Kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansı birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle ölçüm metodunun çok iyi tanımlanması gerekmektedir (Magnusson ve Örnemark, 2014). Aynı analiz için birçok farklı metot bulunabilir. Belli bir analiz için çok değişik metotlardan hangisinin kullanılacağı, analiz edilen örnek cinsine, analiz edilecek bileşenlerin miktarına, günlük yapılacak analiz sayısına, istenen sonucun kalitesine, metodun uygulama kolaylığına, analiz süresine ve analiz maliyetine bağlı olarak yapılacak değerlendirme sonucunda belirlenmelidir.

Alkollü içkilerde alkol miktarı, damıtma sonucu elde edilen alkollü sıvının, piknometre ile bulunan yoğunluğundan özel çizelgeler yardımıyla % hacim (h/h) olarak hesaplanır (Anonymous, 2013; Anonymous, 2000a). Alkol miktarı hem alkollü içki endüstrisinde üreticinin kaliteyi standardize etmesi, mevzuat denetimi, ürün sınıf denetiminin yapılması, içki kategorilerinin belirlenmesi açısından hem de yasal vergi düzenlemesi açısından bilinmesi zorunlu bir parametredir. Piknometrik, gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (HPLC), elektronik dansimetre ve NIR gibi yöntemler alkol tayininde kullanılan yaygın yöntemlerdir (Ergutay ve Başlar, 2011).

Ulusal ve uluslararası düzeyde alkollü içkilerde alkol tayininde kullanılan referans yöntem

piknometrik yöntemdir (Anonymous, 2014b). Bu yöntemle beraber gerek denetim gerekse işletmelerde kalite kontrolünde yaygın olarak dansimetrik yöntem de kullanılır. Proses sürecinde daha çok dansimetrik yöntem tercih edilir. Son yıllarda alkol tayininde büyük avantajlar sağlayan NIR metoduyla alkol tayini de geliştirilmiştir.

NIR spektroskopisi 780-2500 nm dalga boyu aralığında atomlar arasındaki bağları analiz ederek molekülleri tanımlamaya yarayan bir tekniktir. Her kimyasal bağ kendine has bir frekansta titreşir. Bir moleküldeki bir grup atom (örneğin CH₂) bağların esneme ve bükülme hareketlerinden dolayı birden fazla titreşim moduna sahip olabilir. Eğer bir titreşim molekülün dipol momentinde değişime yol açarsa molekül aynı frekansa sahip bir foton soğurur. NIR spektroskopisi moleküller arası titreşimsel enerji değişimini kullanarak düşük enerjili hv fotonların absorpsiyonuna dayanan bir analizdir (Anonymous, 2014a; Anonymous, 2017). Bu teknik, belirli dalga boyu aralığında numunedeki O-H, C-H ve N-H gibi moleküllerin titreşimindeki değişimin absorpsiyonunu gerçekleştirebilmektedir (Ergutay ve Başlar, 2011). Etil alkol molekülünün böyle bir özelliği mevcuttur (Anonymous, 2014a). Dedektör tarafından okunan absorpsiyon, numunenin hacmen alkol miktarını belirlemek için kullanılır. Alkollü içkilerde etil alkolün 1150-1200 nm dalga boyları arasında spesifik absorpsiyon göstermesi alkol miktarının belirlenmesini mümkün kılar. Bu aralıkta herhangi başka bir bileşik etkileşim yapmaz (Anonymous, 2014a). Alkol miktarının hesaplanması basit bir algoritma ile yapılır. Ölçüm bira için % 2-12 h/h, şarap için % 6-30 h/h ve distile alkollü içki için % 35-65 h/h olmak üzere üç skala üzerinden belirlenir (Anonymous, 2014a). NIR yönteminin en önemli avantajı çok hızlı sonuç vermesi, kullanımının kolay olması, kimyasal sarfiyat ve atığın olmaması ve kullanım maliyetinin ucuz olmasıdır. En önemli dezavantajı ise ilk yatırım maliyetinin yüksek olmasıdır (Ergutay ve Başlar, 2011).

Ülkemizde üretilen alkollü içkiler içerisinde rakı ve şarap önemli bir yer teşkil etmektedir. Bunlardan

rakı yalnızca suma veya tarımsal kökenli etil alkol ile karıştırılmış sumanın, bakır imbiklerde, anason tohumu ile distile edilmesiyle üretilen, hacmen en az %40 etil alkol içeren distile alkollü bir içkidir (Anonymous, 2017). Türkiye'nin coğrafi işaretli bir ürünü olan rakı, ülkemizde en çok üretilen ve tüketilen distile alkollü içkidir ve ülke ekonomisinde alkollü içkiler kategorisinde önemli yer tutar (Anonymous, 2009a). Şarap ise, Parçalanmış veya parçalanmamış yaş üzümün veya üzüm sırasının, kısmen veya tamamen alkol fermantasyonuna bırakılması ile elde edilen, coğrafi işaret ya da köken ismi tescilli yapılmış ya da yapılmamış ve hacmen en az %9 etil alkol içeren bir içkidir (Anonymous, 2009b).

Bu çalışmanın amacı, alkollü içkilerde temel bir analiz olan, etil alkol tayininde kullanılan piknometrik, dansimetrik ve NIR metotlarını şarap ve distile içki kategorilerinde valide etmek ve bu üç metodu karşılaştırarak NIR metodunun geçerli, güvenilir bir metot olup olmadığını belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

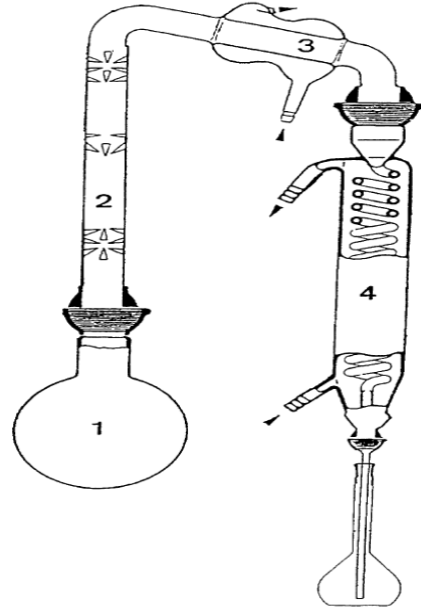
Araştırmada materyal olarak distile alkollü içki kategorisini temsilen rakı, şarap kategorisini temsilen kırmızı sek şarap seçilmiştir. Ticari bir alkollü içki işletmesinden temin edilen yaş üzüm rakısından 10 şişe, piyasadan temin edilen Elazığ yöresi Öküzgözü şarabından 10 şişe numune kullanılmıştır. Analizden önce numuneler 5 °C'deki dolaplarda ağzı kapalı şekilde tutulmuştur.

Etıl Alkol Analizleri

Alkollü içkilerde kurumadde, piknometrik ve dansimetrik analizlerde, alkol miktarında sapmaya neden olduğu için analizlerden önce örneklere damıtma işlemi uygulanmıştır (Anonymous, 2013; Anonymous, 2000a). Damıtma işlemi, Uluslararası Avrupa Birliği'nin onayladığı damıtma sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).

Buna göre, 200 ml örnek ve 60 ml saf su ölçü balonunda ölçülüp, 500 ml'lik damıtma balonuna alınmıştır. Damıtma yavaş bir şekilde gerçekleştirilmiş, başlangıç hacmin %80'i oranında damıtık toplandığında damıtmaya son

verilmiş ve damıtık başlangıç hacmine saf su ile tamamlanmıştır.



1. Standardize küresel tabanlı cam bağlantılı bir litrelik balon joje litre round-bottomed flask with standardised spherical ground-glass joint.
2. Vigreux rektifiye kolonu, 20 cm 20-cm Vigreux rectifying column.
3. Düz çerçeveli West yoğunlaştırıcı, 10 cm 10-cm straight-rimmed West condenser
4. Soğutucu bobin, 40 cm 40-cm cooling coil

Şekil 1. Damıtma Düzenegi
Figure 1. Distillation Apparatus

Piknometre Metodu

Alkol miktarı, damıtma sonucu elde edilen distilatın, piknometre ile bulunan yoğunluğundan özel alkol çizelgelerinden yararlanarak % hacim (h/h) olarak hesaplanmıştır (Anonymous, 2014b). Damıtık, 100 ml'lik piknometreye alınmış ve 20 °C'lik su banyosunda 30 dakika bekletilmiş ve hassas terazi ile ağırlığı belirlenmiştir. Belirlenen damıtık ağırlığı piknometrenin su kıymetine bölünerek, alkollü sıvının yoğunluğu hesaplanmıştır. Bu yoğunluk karşılığı alkol miktarı, hacmen alkol miktarı cetvelinden bulunmuştur (Anonymous, 2014b).

Elektronik Dansimetre Metodu

Damıtma işleminden sonra, 50 ml damıtık alınmış ve yoğunluk, 20 °C ölçüm sıcaklığında salınım tekniği (osilasyon) prensibine göre elektronik dansimetre ile ölçülmüştür (Anonymous, 2014c). Ölçüm işleminde Mettler Toledo (Densito 30PX) marka elektronik dansimetre kullanılmıştır. Bu yoğunluk karşılığı alkol miktarı, hacmen alkol miktarı cetvelinden bulunmuştur (Anonymous, 2014b).

NIR (Yakın Kızılötesi Spektroskopisi) Metodu

Alkollü içkilerin hacmen alkol miktarı tayini, Anton Paar Alcozyzer (DMA 4500M-Alcozyzer ME) marka NIR (yakın kızılötesi) spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. NIR spektrometresi led ışık kaynağı, çoklu lens ve dedektör array içerir. İlgili dalga boyunda numune NIR ışınları ile karşılaştığı zaman bu bağlar titreşimsel enerji değişikliklerine maruz kalmakta ve bunun sonucu olarak NIR bölgesindeki organik moleküllerin enerji absorpsiyonu meydana gelmektedir. Dedektör tarafından okunan absorpsiyon, numunenin hacmen alkol miktarını belirlemek için kullanılmıştır (Anonymous, 2014a). Cihaz (ölçüm hücresi) sıcaklık kontrolüne sahiptir. Bu şekilde numunenin sıcaklığı 20 °C'ye otomatik olarak ayarlanmıştır. Beher içerisine eklenen 50 ml homojen numune pompa yardımı ile otomatik olarak cihaz içerisine alınmıştır. Cihaz ölçümü yaptıktan sonra dijital göstergeden değer okunmuştur. Cihaz hacmen alkol miktarını 2 basamaklı yüzde olarak doğrudan veren bir programa sahiptir. Hacmen alkol miktarı şarap için cihazdaki şarap skalası (%6-30 h/h) ve rakı için distile skalası (%35-65 h/h) seçilerek ölçülmüştür.

Metot Validasyon Parametrelerinin Hesaplanması

Piknometrik, dansimetrik ve NIR spektroskopisi ile alkol tayini metotlarının validasyonu "Eurachem Rehberi: Analitik Yöntemlerin Amaca Uygunluğu - Metot Validasyonu ve İlgili Konuları için Bir Laboratuvar Rehberi" referansına göre gerçekleştirilmiştir (Magnusson ve Örnemark, 2014).

Doğruluk: Bir metodun ölçüm sonuçlarının gerçek değere ve birbirine yakınlığını göstermek için kullanılır. Doğruluğun gerçeklik ve kesinlik olmak üzere iki bileşeni vardır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013; Ellison ve Williams, 2012). Metotların validasyonunu gerçekleştirmek için gerçeklik ve kesinlik parametreleri hesaplanmıştır.

Kesinlik: Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir ve rastgele hataların dağılımını gösterir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011). Bu parametre için metotlarda, tekrarlanabilirlik ve laboratuvar-ıçi tekrar üretilebilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Yılmaz, 2013; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011).

Tekrarlanabilirlik: Aynı şartlar altında, kısa zaman aralığında, aynı örneğin analizinden elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının göstergesidir. Tekrarlanabilirlik için her iki numunede de, her metot ile 10 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden, standart sapma (SD), yüzde rölatif standart sapma (%RSD) değerleri formül [1] ve [2] kullanılarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik, "RSD_r" ile ifade edilmiştir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011).

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

x_i: analiz sonucu

x_{ort}: analiz sonuçlarının ortalaması

n: analiz sayısı

$$\%RSD = \frac{SD}{x_{ort}} \times 100 \quad RSD_r = \frac{SD_r}{x_{ort}} \quad [2]$$

Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik: Aynı laboratuvarında, farklı ekipman ya da aynı ekipmanda ve farklı analistler tarafından uzun zaman aralığında elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının göstergesidir. Tekrar üretilebilirlik için, her metot ile günde 2 tekerrür olacak şekilde 25 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden, rölatif standart sapma (RSD) değerleri formül [3] kullanılarak hesaplanmıştır. Tekrar

üretilebilirlik “RSD_R” ile ifade edilmiştir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaztekin ve Cabaroğlu, 2011; Anonymous, 2016a).

$$RSD_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left[\frac{(x_i - y_i)}{x_{ort}} \right]^2}{2n}} \quad [3]$$

x_i: Birinci tekrar sonucu

y_i: İkinci tekrar sonucu

x_{ort}: Paralel analiz sonuçlarının ortalaması

n: Örnek sayısı (paralel sayısı)

Gerçeklik (Geri kazanım): Ölçüm sonuçlarının gerçek değere yakınlığını ifade etmektedir ve bu nedenle sistematik hata hesabı yapılır (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz, 2013). %12 ve %45 h/h alkol miktarına sahip kalite kontrol standart çözeltileri hazırlanmış ve NIR metodu ile her bir konsantrasyon için 20 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden, formül [4] kullanılarak % geri kazanım (GK) hesaplanmıştır (Magnusson ve Örnemark, 2014).

$$\%GK = \frac{X_{bulunan}}{X_{referans}} \times 100 \quad [4]$$

Ölçüm Belirsizliği

Bir ölçümün sonucu rapor edilirken, sonucun kalitesini belirten sayısal bir parametre olmalıdır. Böylece sonucun güvenilirliği temin edilebilir. Bu parametre ölçüm belirsizliğidir. Ölçüm belirsizliği, sonucu etkileyen rastgele ve sistematik hataların birleştirilmiş şeklidir (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012). NIR metodu için ölçüm belirsizliği hesaplanırken, belirsizlik kaynakları belirlenmiş ve her bir belirsizlik bileşeni için rölatif standart belirsizlik (U(x)) hesaplanmıştır. Daha sonra hesaplanan tüm standart belirsizlik bileşenlerinin varyansları toplamının karekökü bulunarak birleştirilmiş belirsizlik (U_{birleştirilmiş}) formül [5] kullanılarak hesaplanmıştır. Son aşamada ise birleştirilmiş belirsizlik (U_{birleştirilmiş}) değeri 2 katsayı ile çarpılarak genişletilmiş belirsizlik (U_{genişletilmiş}) hesaplanmıştır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012).

$$U_{birleştirilmiş} = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + \dots} \quad [5]$$

İstatistiksel Analizler

Metotlar arasında farklılık olup olmadığı varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Veri setlerinde sapan değerlerin belirlenmesi için tekrarlanabilirlik veri setlerine Grubb’s testi uygulanmıştır (Rivera ve Rodriguez, 2015). Geri kazanım çalışmalarında sistematik hata olup olmadığının kontrolünde t testi uygulanmıştır. Validasyon çalışmaları kapsamında yapılan istatistiksel analizlerde Eurachem Rehberi’ne göre %95 güven aralığı kullanılmıştır (Magnusson ve Örnemark, 2014).

Validasyon Verilerinin Uygunluk Değerlendirmesi

Grubb’s Testi: Veri setlerinin kesinlik parametrelerini hesaplamadan önce sonuçların normal bir dağılım gösterip göstermediği belirlenmelidir. Bu amaçla veri setlerine Grubb’s testi uygulanmış ve sapan değer veri setinden çıkarılmıştır (Anonymous, 2000b). Bu teste, ölçüm sonuçları küçükten büyüğe doğru sıralanmış ve veri setindeki minimum (X_{min}) ve maksimum (X_{maks}) değerler belirlenmiştir. Grubb’s düşük (GL) ve Grubb’s yüksek (GH) değerleri [6] numaralı formüller ile hesaplanmıştır (Anonymous, 2000b; Anonymous, 2016b). Elde edilen değerler, Grubb’s tablosundaki kritik değer ile karşılaştırılmıştır (Anonymous, 2016b).

$$GL = \frac{(\bar{X} - X_{min})}{SD} \quad GH = \frac{(X_{maks} - \bar{X})}{SD} \quad [6]$$

Horwitz/HorRat: Horwitz eşitliği (PRSD) ve HorRat (Horrat) eşitliği, performans parametreleri olup kimyasal metotların kesinliğinin kabul edilebilirliği konusunda bilgi verir (Yılmaz, 2013). Horwitz eşitliği [7] numaralı formülle hesaplanırken, HorRat değeri ise [8] numaralı formül kullanılarak hesaplanmıştır (Rivera ve Rodriguez, 2015).

$$PRSD = 2 * (C^{-0,1505}) \quad [7]$$

C: matris içinde aranan maddenin desimal olarak miktarıdır.

$$Horrat = \frac{RSD (bulunan)}{PRSD} \quad [8]$$

BULGULAR VE TARTIŞMA**Kesinlik Parametreleri ve Metot Güvenilirliği**

Piknometrik, dansimetrik ve NIR metotları ile elde edilen etil alkol analiz sonuçları, hesaplanan

kesinlik parametreleri ve metot validasyon uygunluk test sonuçları çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Kesinlik Parametreleri ve Metot Güvenilirliği

Table 1. Precision Parameters and Method Reliability

	NIR Metot		Piknometrik Metot		Dansimetrik Metot	
	NIR Method		Pycnometric Method		Densimetric Method	
	Şarap	Rakı	Şarap	Rakı	Şarap	Rakı
	Wine	Raki	Wine	Raki	Wine	Raki
Ortalama (%h/h) Mean	11.35	44.33	11.32	44.31	11.30	44.30
SD _s	0.005	0.02	0.04	0.06	0.08	0.19
Min. Değer Minimum	11.35	44.30	11.30	44.20	11.20	44.00
Maks. Değer Maximum	11.36	44.36	11.38	44.40	11.40	44.60
GL	0.77	1.17	0.62	1.94	1.22	1.54
GH	1.16	1.53	1.45	1.59	1.22	1.54
Grubb's Değerlendirme	<2.29	<2.29	<2.29	<2.29	<2.29	<2.29
RSD _r (%) ^a	0.05	0.05	0.31	0.14	0.72	0.44
r (%h/h)	0.01	0.06	0.10	0.17	0.22	0.53
PRSD _{rHorwitz} (%)	1.39	1.13	1.39	1.13	1.39	1.13
RSD _R (%) ^b	0.20	0.03	3.00	1.00	1.00	0.20
R (%h/h)	0.02	0.10	0.16	0.27	0.36	0.85
PRSD _{RHorwitz} (%)	2.77	2.26	2.78	2.26	2.78	2.26
Horrat _r	0.02	0.02	0.11	0.06	0.26	0.19

a, ölçüm sayısını n: 10; b, ölçüm sayısı n: 25; SD, standart sapma; Min, minimum değer; Maks, maksimum değer; GL ve GH, Grubb's düşük ve yüksek sınır değerleri; RSD, rölatif standart sapma; r tekrarlanabilirlik limiti, PRSD_r, hedeflenen tahmini rölatif standart sapma; R, Tekrar üretilebilirlik limiti

a, number of measurements is 10; b, number of measurements is 25; SD, standard deviation; Min, minimum value, Maks, maximum value; GL and GH; Grubb's low and high value; RSD, relative standard deviation; r, repeatability limit, PRSD_r, targeted-predicted relative standard deviation; R, reproducibility limit

Her bir metot ile aynı gün içerisinde rakı ve şarap numuneleri için 10 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analiz verilerinin ortalamaları (X_{ort}), standart sapmaları (SD) ve rölatif standart sapmaları (RSD) ile yüzde rölatif standart sapma (RSD%) değerleri hesaplanmıştır. Aynı gün içinde her bir metot için hesaplanan RSD değerleri metodun tekrarlanabilirlik (RSD_r) parametresini ifade etmektedir. Veri setleri için minimum ve maksimum değerler ile GL ve GH değerleri hesaplanmıştır.

Tekrarlanabilirlik çalışması sırasında elde edilen analiz verileri setinde sapan değerlerin olup olmadığı Grubb's testi ile belirlenmiştir. Hesaplanan GL ve

GH değerleri, %95 güven aralığına göre belirlenen Grubb's tablo kritik değerinden küçük ise sapan değer belirlenmemiştir, büyük ise sapan veriler olduğu şeklinde değerlendirme yapılmıştır (Anonymous, 2000b; Anonymous, 2016b). Her üç metot için de veri setlerinde sapmanın olmadığı Çizelge 1’de gösterilmiştir.

Rakı numunesinin hacmen alkol miktarı; NIR metodu ile %44.30-44.36 arasında, piknometrik metot ile %44.20-44.40 arasında, dansimetrik metot ile ise %44.00-44.60 arasında değişmiştir. Rakı numunesi için RSD_r değeri; NIR metodu ile %0.05, piknometrik metot ile %0.14, dansimetrik metot ile de %0.44 olarak belirlenmiştir. Analiz

yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak ($P > 0.05$) fark bulunmamış olmasına rağmen, veriler arasında en yüksek sapma dansimetrik metot (SD, %0.19 h/h) ile yapılan analiz sonuçlarında görülmüştür. Şarap numunesinde ise hacmen alkol miktarı; NIR metodu ile %11.35-11.36 arasında, piknometrik metot ile %11.30-11.38 arasında, dansimetrik metot ile %11.20-11.40 arasında değişmiştir. Şarap numunesi için RSD_r değeri NIR metodu ile %0.05, piknometrik metot ile %0.31, dansimetrik metot ile de %0.72 olarak belirlenmiştir. Analiz yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak ($P > 0.05$) fark bulunmamış olmasına rağmen, veriler arasında en yüksek sapma dansimetrik metot (SD, %0.08 h/h) ile yapılan analiz sonuçlarında görülmüştür. Alkol konsantrasyonu düştükçe uygulanan metotlardaki analiz sonuçlarının sapmasında artış gözlenmektedir.

Tekrar üretilebilirlik (RSD_R) çalışmasında rakı ve şarap numunelerinin hacmen alkol miktarı stabil bir değer olmadığı ve zamana bağlı değişebildiğinden; farklı günlerde, farklı numunelerle ve günde 2 tekrerrür yapılarak 25 kez analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 25 analiz sonucu ile RSD_R değeri metotta belirtilen [3] numaralı formüle göre hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer laboratuvar içi tekrar üretilebilirliği (RSD_R) ifade etmektedir (Magnusson vd., 2012; Van Reeuwijk ve Houba, 1998). Günde 2 tekrerrürlü yapılan analiz sonuçları arasındaki farkın tekrarlanabilirlik limiti (r) sınırları içinde olup olmadığı kontrol edilmiştir. “ r ”, tekrarlanabilirlik çalışması sonucu belirlenen SD’nin 2.8 ile çarpılması ile belirlenmiştir. Bu değer tekrerrürler arasındaki olmasına izin verilen maksimum farkı ifade etmektedir (Magnusson ve Örnemark, 2014; Yılmaz 2013; Magnusson vd., 2012).

Validasyon sonuçlarının uygunluğu için Horwitz eşitliği formül [7] kullanılarak tahmini rölâtif standart sapma (PRSD) hesaplanmış ve bu değer ikiye bölünmesi ile de hedeflenen tahmini rölâtif standart sapma ($PRSD_r$) belirlenmiştir (Rivera ve Rodriguez, 2015). Belirlenen RSD_r değerinin, hedeflenen ($PRSD_r$) değerden küçük

olması ve belirlenen RSD_R değerinin de $PRSD_R$ değerinden küçük olması metot güvenilirliği sağlamıştır.

Horrat ise analizlerle belirlenen RSD değerinin öngörülen $PRSD$ değerine oranıdır. Metot güvenilirliği için bu oranın 1.3’ün altında olması gerekmektedir (Rivera ve Rodriguez, 2015). Yapılan analizlerle belirlenen $Horrat_r$ değerleri tüm metotlarda ve numunelerde 1.3’ün altında belirlenmiştir. $Horrat_r$ değeri 1.5’in üzerinde ise metodun tekrarlanabilirliği beklenenden daha yüksek olup bu durumda gözden geçirme önerilir. $Horrat_r$ değeri 2’nin üzerinde ise tekrar üretilebilirlikte sorun vardır ve validasyon tekrarlanmalıdır (Yılmaz, 2013).

Metot güvenilirliği için referans alınan metotların vermiş olduğu kesinlik çalışmalarındaki değerler referans olarak kullanılabilir. Uluslararası Bağcılık ve Şarap Organizasyonun yayınladığı şarapta piknometrik ve dansimetrik yöntem ile gerçekleştirilen etil alkol analiz metodundaki kesinlik değerleri, şarap numunesi analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Referans alınan piknometrik metotta r değeri 0.1 h/h olarak belirtilmiştir (Anonymous, 2016c). Bu çalışmada şarap numunesinde piknometrik yöntem ile elde edilen sonuçların r değeri 0.1 h/h olarak bulunmuştur. Bu değer referans çalışmadaki değere eşit olduğu için sonuçlar uygun bulunmuştur. Referans alınan dansimetrik metottaki kesinlik çalışması sonucunda verilen r değeri % 0.067 h/h olarak verilmiştir (Anonymous, 2016c). Çalışmadaki şarap numunesinde dansimetrik metot ile belirlenen r değeri referans değerden yüksek bulunduğu için sonuçlar uygun bulunmamıştır.

Uluslararası Bağcılık ve Şarap Organizasyonun yayınladığı bağcılık kökenli distile alkollü içkilerde piknometrik ve dansimetrik metotlarla yapılan validasyon çalışmalarında elde edilen RSD değerleri, rakı numunesi analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Referans piknometrik metotta rakı benzeri bir numune olan grappa içkisinde RSD_r değeri %0.25, dansimetrik metotta ise %0.19 olarak verilmiştir (Anonymous, 2014b). Bu çalışmada rakı numunesinde piknometrik yöntem ile elde edilen sonuçların RSD_r değeri 0.14 ve

dansimetrik metot ile elde edilen RSD_r değeri ise 0.44 olarak belirlenmiştir. Piknometrik metot sonuçları OIV'nin bildirdiği değerden küçük olduğu için uygun bulunurken, dansimetrik metot sonuçları uygun bulunmamıştır. Her iki numunede gerçekleştirilen farklı analiz metotlarından elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak ($P > 0.05$) fark bulunmamış olsa da, dansimetrik metot verilerindeki sapmanın yüksek olduğu görülmektedir.

Geri Kazanım (Gerçeklik)

Geri kazanım (GK), yapılan analiz sırasında bir kayıp olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmaktadır (Anonymous, 2016a). Şarap numunesini temsilen %12 h/h ve rakı numunesini temsilen de %45 h/h etil alkol miktarına sahip iki farklı konsantrasyondaki kontrol çözeltileri NIR metodu ile 20 kez analiz edilmiştir. NIR metodu için gerçekleştirilen geri kazanım verileri çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. NIR metodu geri kazanım çalışması sonuçları

Table 2. Recovery results of NIR method

	%12 Etil Alkol Çözeltisi %12 Ethyl Alcohol Solution	%45 Etil alkol çözeltisi %45 Ethyl Alcohol Solution
RSD _r (%)	0.07	0.05
Geri kazanım (%) Recovery	98	98
n*	20	20
	Ort Mean	0.98
	SD	0.001
	n*	40
Rölatif Standart Belirsizlik Relative Standard Uncertainty	$U(x) = [SD / \sqrt{(n)}] / Ort$	0.0001

*n, ölçüm sayısını; Ort, ortalama değer; SD, standart sapmayı ifade etmektedir

*n, represents the number of measurements; Ort, mean; SD, standard deviation

NIR metodu için iki farklı konsantrasyonda da GK, %98 olarak belirlenmiştir. Bu değer kabul edilebilir geri kazanım aralık değerine uygun bulunmuştur (Magnusson ve Örnemark, 2014). Bu GK değerlerinin metot güvenilirliği kontrolü ise t testi ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar uygun olarak belirlenmiştir. Toplamda yapılan 40 analiz sonucunda ortalama geri kazanım değeri 0.98 ve SD ise 0.001 olarak hesaplanmıştır. Standart belirsizlik (u_x) ise SD'nin ölçüm sayısının kareköküne bölünerek 0.0001 olarak belirlenmiştir. Bu değer ortalamaya bölünerek rölatif belirsizlik hesaplanmıştır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012).

NIR Metodu için Belirsizlik Kaynakları ve Toplam Belirsizlik

NIR metodu için belirsizlik kaynakları olarak analistten kaynaklanan belirsizlik, standarttan saflığından gelen belirsizlik, malzemeden gelen hacim belirsizliği, kesinlik parametrelerinden (Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik) gelen

belirsizlik ve geri kazanımdan gelen belirsizlik olarak sayılabilmektedir (Magnusson vd., 2012).

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için hesaplanan RSD değerleri standart belirsizlik olarak ele alınır ve geri kazanım çalışmasında hesaplanan rölatif standart belirsizlik (U_x) ile birlikte toplam belirsizlik hesaplamasında kullanılır. Bunların yanında hacimden gelen belirsizlik ve standardın saflığından gelen belirsizlik de hesaplanmıştır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012).

Kullanılan malzemelerin üstünde belirtilmiş sapma değerleri kullanılırsa B tipi belirsizlik olarak değerlendirilip dikdörtgen dağılıma göre hesaplama yapılırken, kalibrasyon sertifikalarından gelen sapmalar kullanılacak olursa A tipi belirsizlik olarak değerlendirilir ve normal dağılıma göre belirsizlik hesaplaması gerçekleştirilir (Ellison ve Williams, 2012; Anonymous, 2016a). Cam malzemeler için kalibrasyon sertifikaları verileri kullanıldığı için A tipi

belirsizlik olarak değerlendirilmiş ve normal dağılıma göre hesaplama yapılmıştır. Buna göre standart belirsizlik (u_x), kalibrasyon sertifikalarından elde edilen ölçüm belirsizliği değerlerinin 2'ye bölünmesi ile hesaplanmıştır. Standart belirsizlikler de kullanılan malzemelerin hacim miktarına bölünerek rölatif standart belirsizlik (U_x) olarak hesaplanmıştır. Tüm hacimden gelen belirsizlik her bir malzeme için tek tek hesaplanarak birleşik rölatif standart belirsizlik hesaplanmıştır.

Standart saflığından gelen belirsizlikte standart maddenin üzerinde yazan saflık değerleri

kullanıldığı için belirsizlik B tipidir ve dikdörtgen dağılıma göre hesaplamalar gerçekleştirilmiştir (Ellison ve Williams, 2012; Anonymous, 2016a). Buna göre standart belirsizlik (u_x), standardın açıklamasından elde edilen safsızlık değerlerinin $\sqrt{3}$ 'e bölünmesi ile hesaplanmıştır. Standart belirsizlikler de standardın saflığına bölünerek rölatif standart belirsizlik (U_x) hesaplanmıştır.

Toplam belirsizlik birleşenleri ve bütçesi, birleşik belirsizlik ($U_{\text{Birleşik}}$) ve genişletilmiş belirsizlik ($U_{\text{Genişletilmiş}}$) çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. NIR Metodu Toplam Belirsizlik Bileşenleri ve Bütçesi
Table 3. Total Uncertainty Components and budget of NIR Method

Belirsizlik bileşenleri <i>Uncertainty Components</i>	Rölatif Standart Belirsizlik <i>Relative Standard Uncertainty</i> $U(x)=u(x)/x$
Tekrarlanabilirlik (RSD_r) <i>Repeatability</i>	0.0005
Tekrar Üretilbilirlik (RSD_R) <i>Reproducibility</i>	0.0003
Geri Kazanım ($U(x)$) <i>Recovery</i>	0.0001
Standart Madde Belirsizliği ($U(x)$) <i>Uncertainty of Chemical</i>	0.0006
Hacim Belirsizliği ($U(x)$) <i>Uncertainty of Volume</i>	0.0029
U Birleştirilmiş	0.003
U* Genişletilmiş	0.006

$U_{\text{birleştirilmiş}}$, birleştirilmiş ölçüm belirsizliği; $U_{\text{genişletilmiş}}$, genişletilmiş ölçüm belirsizliği; *%95 güven aralığında $k=2$ ile çarpılmıştır

$U_{\text{birleştirilmiş}}$, *Combined measurement uncertainty*; $U_{\text{genişletilmiş}}$, *expanded measurement uncertainty*; * *multiple with k:2 in %95 confident level*

Birleştirilmiş belirsizlik belli bir emniyet katsayısı ile çarpılarak genişletilmiş belirsizlik hesaplanmıştır. Bu katsayı %95 güven aralığı için 2'dir. Genişletilmiş belirsizlik, ölçüm sonucu değerlerinin büyük bir kısmını içeren aralık olarak tanımlanır (Ellison ve Williams, 2012; Magnusson vd., 2012). Bu sonucun 100 ile çarpılması ile de yüzde ± 0.6 ölçüm belirsizliği değeri belirlenmiştir.

SONUÇ

Alkollü içkilerde etil alkol tayininde kullanılan piknometrik, dansimetrik ve NIR metodlarının valide edilerek sonuçlarının karşılaştırıldığı bu çalışmada her üç metodunda güvenilir olduğu belirlenmiştir. Bunlardan NIR spektroskopisi

metodu verileri, hem tekrarlanabilirlik (RSD_r : %0.05) hem de tekrar üretilbilirlik açısından rakı ve şarapta diğer metodların verilerinden daha iyi sonuçlar vermiştir. Rakı numuneleri için RSD_r değeri %0.05 ve RSD_R değeri %0.03 olarak, şarap numuneleri için ise RSD_r değeri %0.05 ve RSD_R değeri %0.2 olarak belirlenmiştir. Geri kazanım (%98) çalışması farklı iki konsantrasyonda başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Yöntemler arasında istatistiksel olarak bir fark ($P > 0.05$) görülmemiştir. Daha hızlı bir yöntem olması ve damıtma gibi bir ön hazırlığa ihtiyaç duyulmaması NIR metodunu daha ilgi çekici ve avantajlı hale getirmektedir. NIR metodunun validasyon ve ölçüm belirsizliği verileri daha güvenilir sonuçlar

vermiştir. Bu nedenle etil alkol analizinin yoğun olarak yapıldığı işletmelerde veya analiz laboratuvarlarında NIR metodu önerilir.

TEŞEKKÜR

Rakı numunelerini sağlayan Antalya Alkollü İçecek A.Ş.'ye teşekkür ederiz. Laboratuvar analizlerine katkı sağlayan Aşkım AKÇA, Benu GERDAN, Damla METİN, Elvin BUCDE, Gizem PARMAKSIZ' a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Anonymous (2000a). Reference Methods for the Analysis of Spirits Drinks. Official Journal of the European Communities, Council Regulation (EEC) No: 2870/2000 of 19 December 2000.

Anonymous (2000b). Türk Standardı, TS 5822-2 ISO 5725-2, Ölçme Metotlarının ve sonuçlarının doğruluğu (Gerçeklik ve Kesinlik)-Bölüm 2: Standard bir ölçme metodunun tekrarlanabilirliğinin ve uyarılığın tayini için temel metot, Kasım 2000.

Anonymous (2009a). Türk Patent Enstitüsü, Rakı-Distile Alkollü İçki, Coğrafi İşaret Tescil Belgesi (no: 136), 8 Aralık 2009 tarih ve 27426 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2009b). Türk Gıda Kodeksi, Şarap Tebliği (2008/67). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 4 Şubat 2009 tarih ve 27131 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2013). Türk Gıda Kodeksi, Distile Alkollü İçkiler Analiz Metotları Tebliği (2013/11). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 11 Nisan 2013 tarih ve 28615 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2014a). International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of vitivinicultural origin, near infrared reflectance spectroscopy, OIV-MA-BS-08:R2009.

Anonymous (2014b). *International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of vitivinicultural origin*, Reference method for the determination of the real alcoholic strength by volume of spirit drinks of viti-vinicultural origin: measurement by pycnometry, OIV-MA-BS-03: R2009.

Anonymous (2014c). *International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of vitivinicultural origin*, Reference method for the determination of the real alcoholic strength by volume of spirit drinks of viti-vinicultural origin: measurement by electronic densimetry, OIV-MA-BS-04: R2009.

Anonymous (2016a). *International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of wine and must analysis*, Practical guide for the validation, quality control, and uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method, Resolution 10/2005, OIV-MA-AS1-12: R2005.

Anonymous (2016b). ASTM Standardı, ASTM E178-16a, Standard Practice for Dealing With Outlying Observations, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016, www.astm.org.

Anonymous (2016c). International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of wine and must analysis, alcoholic strength by volume, Resolution 337/2009, OIV-MA-AS312-01A: R2009.

Anonymous (2017). Türk Gıda Kodeksi, Distile Alkollü İçkiler Tebliği (2016/55). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 21 Mart 2017 tarih ve 30014 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Ellison, S. L. R., Williams A. (ed.) (2012). *Eurachem / CITAC Guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 3rd Edition, Eurachem, www.eurachem.org.

Ertugay, M. F., Başlar, M. (2011). Gıdaların Kalite Özelliklerinin Belirlenmesinde Yakın Kızılötesi (NIR) Spektroskopisi, *GIDA* 36: 49-54.

Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., Krysell, M. (2012). *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*, Nordtest NT Technical Report 537, Edition 3.1, www.nordtest.info.

Magnusson B., Örnemark U. (ed.) (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd edition, ISBN 978-91-87461-59-0, Eurachem, www.eurachem.org.

Rivera, C., Rodriguez R. (2015). Horwitz Equation as Quality Benchmark in ISO/IEC 17025 Testing Laboratory. Retrieved from <http://www.bii.mx/documentos/horwitzCf11.pdf>.

Van Reeuwijk L. P., Houba V. J. G. (ed.) (1998). *Guidelines for Quality Management in Soil and Plant Laboratories*, FAO Soils Bulletin 74, Section 7, Quality of Analytical Procedures (<http://www.fao.org/docrep/W7295E/w7295e09.htm>, section 7.5.2.3).

Yılmaz, A. (2013). *Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu*. Turklab Kalibrasyon ve Deney Laboratuvar Derneđi, TURKLAB Rehber 01, Rev.02, 51s.

Yılmaztekin, M., Cabaroğlu, T. (2011). Confirmatory method for the determination of volatile congeners and methanol in Turkish Rakı according to European Union Regulation (EEC) No. 2000R2870: single-laboratory validation, *J AOAC Int*, Vol. 94, No: 2.