



Kırmızı Pul Biberde Bazı Azo Boyaların LC-MS/MS ile Belirlenmesi

Determination of Some Azo Dyes in Red Pepper Flakes by LC-MS/MS

Ayşe Binnur KARATAŞ¹, İbrahim Emre TOKAT², Ayşegül ARIKAN ASAN³

¹ Gıda Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0001-7750-5427

² Veteriner Hekim, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE-ORCID ID 0000-0003-1975-9706

³ Kimya Yük. Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE-ORCID ID 0000-0002-2664-4635

Özet

Amaç: Çalışmada, 11 adet azo boyanın (Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV, Sudan Orange G, Sudan Black B, Sudan Red B, Sudan Red 7B, Sudan Red G, Para Red, Rhodamine B) kantitatif olarak tespiti için LC-MS/MS cihazı kullanarak metot validasyonu yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem: Çalışmada kırmızı pul biber kullanılmıştır. Örnekler asetonitril ile ekstrakte edilmiştir. Kantitatif hesaplamalar matris uyumlu kalibrasyona göre yapılmıştır. Doğrulama için; doğruluk, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik, tespit limiti (LoD), ölçüm limiti (LoQ) ve geri kazanım parametreleri incelenmiştir. Tüm azo boya için ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır.

Bulgular: Tüm boyalar için doğruluk $r \geq 0,99$ olarak saptanmıştır. LoD değerleri 0,62-13,12 µg/kg aralığında iken, LoQ değerleri ise 2,06-43,72 µg/kg aralığında bulunmuştur. Geri kazanım oranları %83,38-100,27 arasında değişmiştir.

Sonuç: LC-MS/MS metodunun, pul biberde azo boya tespitini için yüksek hassasiyette ve uygulanabilir olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Azo Boyalar, Sudan Boyaları, LC-MS/MS, Kırmızı Pul Biber, Validasyon

Abstract

Objective: In this study, a method validation is performed for quantitative detection of 11 azo dyes (Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV, Sudan Orange G, Sudan Black B, Sudan Red B, Sudan Red 7B, Sudan Red G, Para Red, Rhodamine B) by using LC-MS/MS system.

Material and Methods: In this study red pepper flakes were used and the samples were extracted with acetonitrile. Matrix-match calibration was used for quantification. Linearity, repeatability, reproducibility, limit of detection (LoD), limit of quantification (LoQ) and recovery were studied as validation parameters. Uncertainty was calculated for all azo dyes.

Results: Linearity obtained for all dyes were $r \geq 0,99$. LoD and LoQ were in the range of 0,62-13,12 µg/kg and 2,06-43,72 µg/kg respectively. Recovery range was between 83,38-100,27%.

Conclusion: LC-MS/MS method was found to be high sensitivity and applicable for detection of azo dyes in red pepper flakes.

Key Words: Azo Dyes, Sudan Dyes, LC-MS/MS, Red Pepper Flakes, Verification

1.Giriş

Gıda renklendiricileri; gıda katkı maddelerinde yer alan gruplardan biridir. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde "Gıdalara renk veren veya rengini geri kazandıran, gıdaların doğal bileşenlerini ve genel olarak olduğu gibi gıda olarak tüketilmeyen doğal kaynakları içeren ve genellikle gıdanın karakteristik bir bileşeni olarak kullanılmayan maddeler" olarak tanımlanmaktadır. Kullanım miktarları ise aynı yönetmelik ile belirlenmiş ve sınırlanmıştır (Anonim 2013a). Günümüzde gıdalara uygulanan işleme

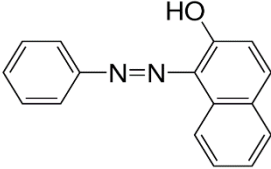
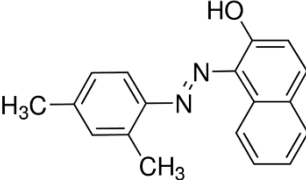
tekniklerinin, gıdaların görünüş özelliklerine olumsuz etkileri olabilmektedir ve bundan dolayı gıdaların teknolojik olarak renklendirilmesi gereksinimi ortaya çıkmıştır (Atlı 2010). Gıdalarda doğal olarak bulunan renklendiriciler, gıda işleme ve depolama sırasında kararsızdır ve hızla değişmektedir. Bu nedenle, düşük fiyat, yüksek etkinlik ve stabilite gibi çeşitli özelliklerinden dolayı sentetik boyalar, tüm dünyada gıda şirketleri tarafından yaygın şekilde kullanılmaktadır (Tsai ve ark. 2015).

Sudan boyaları, endüstride (kozmetik ve tekstil ürünlerinde) yaygın olarak kullanılan sentetik azo boyalardır. Genel görünümü geliştirmek için balmumları, baskı mürekkepleri, cilalar, plastikler ve yağlar gibi ürünlerde kullanılmaktadırlar (Li ve ark. 2014, Fonovich 2013). Sudan boyalarının indirgenme ürünleri kanserojen ve teratojen etkilere sahip olduğu için Avrupa ve Amerika’da gıda renklendiricisi olarak kullanımları yasaklanmıştır. Benzer şekilde ülkemizde de “Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği”ne göre sudan boyalarının gıdalarda kullanımı yasaktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nün bir kolu olan Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (ICRA), sudan boyalarını “Grup 3 genotoksik kanserojen madde” olarak sınıflandırmıştır (Anonim 1975). Sudan boyalarının gıdalarda kullanımına izin verilmemesine rağmen birçok ülkede yapılan kontrollerde bu boyaların halen kullanıldığı tespit edilmektedir. Bu nedenle analizlerin düzenli olarak yapılmasına ihtiyaç vardır (Wang ve ark. 2013, Çağlıcı ve ark. 2017). Bu boyalar düşük maliyetli olmaları ve geniş kullanım alanından dolayı gıdalarda yasak olmasına rağmen renklendirici olarak cazip hale gelmektedirler (Rebane ve ark. 2010). Ayrıca sudan boyalarının yasal olduğu alanların bulunması taklit ve taşış için bu maddelerin teminini kolaylaştırmaktadır. Örneğin Sudan III, kozmetikte kullanılmaktadır. Ancak kozmetik ürünlerde bir renklendirici olarak kullanıldığı zaman tüketiciler için tam bir risk değerlendirilmesi yapılmamıştır (Anonim 2005a). İlk kez Avrupa Birliği (AB) üye ülkelerinden Fransa, ithal ettiği biberlerde Sudan I boyası tespit edildiğini bildirmiştir. Bu durum Avrupa Komisyonu (EC)’nün sudan boyalarına karşı acil önlemler almasını gerektirmiştir (Anonim 2003). 2015 Yılında İngiltere’de Worcester sosunda ve 2016 yılında Çin’de ördek yemlerine Sudan IV konulduğu tespit edilmiştir. Ardından bölgede kapsamlı gıda izleme ve laboratuvar testleri yapılmıştır (Wong 2012).

Azo boyaların gıda sektöründeki riskleri yanında tekstil endüstrisinde kullanılması ve atıklarının büyük ölçüde deniz suyunu kirletmesi deniz yaşamına zarar vermektedir. Sudan boyalarının parçalanma ürünlerinden olan “naftilamin” karsinojenik etki gösteren ve suda çözünen bir maddedir (Nisa ve ark. 2016).

Sudan boyaları azot:azot (azo) köprüsü ile karakterize edilen moleküler yapıya sahiptir (Çizelge 1). Bu maddelerin yüksek moleküler ağırlıkları ve düşük polaritede olmaları yağda çözünebilmelerini sağlamaktadır. Bununla birlikte azo boya olan Rhodamine B yapısında bulunan bazik amin grupları sayesinde hem yağ hem de su içinde çözünebilir (Anonim 2006).

Çizelge 1. Azo boyaların kimyasal formülleri.

Kimyasal Adı	Chemical Abstracts Service Number (CAS No)	Molekül Ağırlığı	Kimyasal Formülü
Sudan I	842-07-9	248,28	
Sudan II	3118-97-6	276,33	

Sudan III	85-86-9	352,39	
Sudan IV	85-83-6	380,44	
Sudan Orange G	2051-85-6	214,52	
Sudan Black B	4197-25-5	456,54	
Sudan Red B	3176-79-2	380,44	
Sudan Red 7B	6368-72-5	379,46	
Sudan Red G	1229-55-6	278,31	
Para Red	6410-10-2	293,28	
Rhodamine	81-88-9	479,01	

Tam bir risk değerlendirmesi için yeterli veri olmadığı bildirilmesine karşın, Sudan I ile Rhodamine B'nin genotoksik ve karsinojenik olduğunu gösteren deneysel kanıtlar vardır (Fonovich 2013). Sudan II, Sudan III, Sudan IV ve Para Red için ise kesin kanıtlar bulunmamasına rağmen Sudan I ile kimyasal yapılarının benzer olması, potansiyel olarak genotoksik ve kanserojen olduklarını düşündürmektedir (Anonim 2005b). Bu nedenle yaygın ve kontrolsüz olarak gıdalarda kullanımları nedeniyle tespit edilmeleri önem kazanmaktadır. Azo boyalarını tespit etmek için kullanılan yöntemler Çizelge 2’de özetlenmiştir.

Çizelge 2. Azo boyalarını farklı gıdalarda tespit etmek için kullanılan yöntemler.

Materyal	Kullanılan yöntem	Kaynak
Domates sosu	Manyetik metal-organik sistem ile katı faz ekstraksiyonu- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi-Ultraviyole dedektör (HPLC- UV)	Shi ve ark. 2018
Kırmızı toz biber	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	Lohumi ve ark. 2017
Kırmızı toz biber	UPLC-MS/MS	Wang ve ark. 2013
Gıdalarda	Enzim-bağlı immunosorbent tayini (ELISA)	Wang ve ark. 2011
Yumurta ve hayvan kası	HPLC-UV	Wu ve ark. 2010
Kırmızı toz biber	Liquid chromatography Electrospray Ionization- Time-of-flight Mass Spectrometer (LC-ESI-TOF-MS)	Fang ve Keever 2008
Kırmızı toz biber	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi-Ultraviyole visible dedektör (LC-UV-VIS)	Ertaş ve ark. 2007
Kırmızıbiber	Gel Permeation Chromatography Liquid Chromatography Electrospray İonization Tandem Mass Spectrometry (GPC-LC-ESI-MS/MS)	Sun, Wang ve Ai 2007

Sudan boyalarının Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile analizinde kullanılan yöntemlerde “solvent standart, temiz matrikse hazırlama ve standart ekleme” yöntemleri kullanılmış ve standart ekleme yönteminin geri kazanım yönünden en uygun olduğu görülmüştür (Schreiber ve Czapiewski 2010). Bu nedenle çalışmada numune ve standart hazırlama aşamalarında standart ekleme yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışmada azo boyaların HPLC analizine göre daha hassas olan LC-MS/MS ile metot validasyonu yapılarak analizinin gerçekleştirilmesi ve laboratuvarında yapılabilir duruma gelinmesi amaçlanmaktadır. HPLC analizinde tespit limitleri yüksek ve kromatogramlarda interferans girişimleri olabildiğinden daha hassas ve seçici olan LC-MS/MS metodu ile çalışılması uygun görülmüştür. Ülkemizde ithalat ve ihracatı yapılan kırmızıbiber ve ürünlerinde kullanımına izin verilmeyen azo boyaların kalıntı düzeyinde tespit edilmesi gerekliliği önem kazanmıştır. Bu nedenle çalışma kırmızıbiber ve ürünlerinde sudan boyaları analizlerini kapsamaktadır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler analitik safıkta olup Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri.

Kimyasal Adı	CAS No	Kimyasal Maddelerin Safılıkları (%)
Sudan I standart maddesi	842-07-9	97
Sudan II standart maddesi	3118-97-6	90
Sudan III standart maddesi	85-86-9	100
Sudan IV standart maddesi	85-83-6	100
Black B standart maddesi	4197-25-5	100
Red B standart maddesi	3176-79-2	100
Red 7B standart maddesi	6368-72-5	100
Red G standart maddesi	1229-55-6	100
Orange G standart maddesi	2051-85-6	85
Rhodamine B standart maddesi	81-88-9	95
Para Red standart maddesi	6410-10-2	95
Asetonitril	75-05-8	gradient grade for liquid chromatography
Amonyum format	540-69-2	> 99,00
Formik asit	64-18-6	98-100
Metanol	66-57-1	gradient grade for liquid chromatography

2.2. Materyal

Validasyon çalışmalarında kırmızı pul biber kullanılmıştır. Pul biber örneği satın alma yoluyla temin edilmiş ve 6 tekrarlı çalışma ile azo boyaları içermediği belirlenmiştir. Numuneler analize alınana kadar +4°C de ve karanlık ortamda saklanmıştır.

2.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada; santrifüj (Sigma 3K15), çoklu çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010, Almanya), azot jeneratörü (Peak Scientific Genius 1050, UK), ikili pompa (Shimadzu AD-30, Japonya), autosampler (Shimadzu Nexera X2 SIL-30AC, Japonya), kolon fırını (Shimadzu CTO-20AC, Japonya), C₁₈ kolon (Waters Cortecs 2.1x100 mm, 2.7 µm) ve kütle dedektörü (Shimadzu 8040 MSMS triple quadrapole, Japonya) kullanılmıştır.

2.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart çözeltiler hazırlandıktan sonra +4°C de 6 ay süre ile saklanır. Ancak standardın son kullanma tarihi geçtiği durumlarda stok çözeltiler yeniden hazırlanır. Çalışma çözeltileri ise analiz yapılacağı zaman taze olarak stok çözeltilerden hazırlanır.

Stok Çözeltiler: Azo boyalara ait stok standart çözeltiler Çizelge 4’de belirtilen konsantrasyonlarda, asetonitril ile 100 ml’ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Stok standart çözeltileri hazırlarken analitik safılıkları dikkate alınarak tartım yapılmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden Çizelge 4’te belirtilen konsantrasyonlara ulaşmak için uygun miktarlarda balon jøjeye aktarılmış ve asetonitril ile 100 ml’ye tamamlanmıştır. Bu şekilde stok standart karışımı (mix çözelti) elde edilmiştir.

Azo boyalar ışığa duyarlı olduğu için amber renkli balon jöje kullanılmıştır. Tüm çözeltiler solvent ile tamamlandıktan sonra ultrasonik su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir.

Çizelge 4. Stok standart çözelti hazırlama.

Kimyasal adı	Stok standart çözelti konsantrasyonu (mg/kg)	Karışım (Mix çözelti) içindeki konsantrasyonu (µg/kg)
Black B	10	5
Red 7B		
Sudan I	100	25
Sudan II		
Sudan IV		
Red G		
Rhodamine B		
Sudan III		50
Orange G		
Red B	250	250
Para Red		

Çalışma Çözeltileri: Azo boyası içermeyen numune madde 2.5'e göre ekstrakte edilmiştir. Tüm çalışma çözeltileri bu ekstrakt ile Çizelge 5'de verilen konsantrasyonlar elde edilecek şekilde seyreltilmiştir.

Çizelge 5. Azo boyaların kalibrasyon noktaları.

Madde ismi	Mix Çözelti (µg/kg)	Kalibrasyon Noktaları (µg/kg)				
		1.Seviye	2.Seviye	3.Seviye	4.Seviye	5.Seviye
Black B	5	0,08	0,1	0,2	0,4	1,0
Red 7B	5	0,08	0,1	0,2	0,4	1,0
Sudan I	25	0,4	0,5	1,0	2,0	5,0
Sudan II	25	0,4	0,5	1,0	2,0	5,0
Sudan IV	25	0,4	0,5	1,0	2,0	5,0
Red G	25	0,4	0,5	1,0	2,0	5,0
Rhodamine B	25	0,4	0,5	1,0	2,0	5,0
Sudan III	50	0,8	1,0	2,0	4,0	10
Orange G	50	0,8	1,0	2,0	4,0	10
Red B	50	0,8	1,0	2,0	4,0	10
Para Red	250	4,0	5,0	10	20	50

2.5. Ekstraksiyon

1 gram örnek 50 ml'lik santrifüj tüpüne tartılmıştır. Üzerine 25 ml asetonitril eklenmiş ve 30 dakika çoklu çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Sonrasında 4000 rpm ve 10 dakika santrifüj edilmiştir. Berrak kısım alınarak 0,22 µm filtreden (Millipore Millex-HV) süzülüp viallenmiştir (Tsai ve ark. 2015, Young ve Tran 2014, Schreiber ve Czapiewski 2010).

2.6. Cihaz Parametreleri

LC (Likit Kromatografi) Parametreleri: Mobil faz A 2 mM amonyum format ve %0,1 formik asitli su, mobil faz B ise 2 mM amonyum format ve %0,1 formik asitli metanol:asetonitril (50:50 v/v) karışımıdır. Akış hızı 0,4 ml/dk ve gradient olarak Çizelge 6'da belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 45°C'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 5 µl dir.

MS (Kütle Spektrometresi) Parametreleri: Hedef moleküllerin tespiti için elektrosprey iyonizasyon pozitif mod (ESI+) ve tanımlama için çoklu iyon izleme (MRM) modu kullanılmıştır. Sudan IV ve Sudan RED B için 3 MRM, diğer moleküller için 2 MRM seçilmiştir. Moleküllerin MRM'leri ve uygulanan voltajlar Çizelge 7'de özetlenmiştir.

Çizelge 6. Gradient akış şeması.

Zaman (dakika)	A (%)	B (%)
0,5	40	60
5	0	100
9	0	100
9,5	80	20
12	40	60

Çizelge 7. Azo boyaların MRM listesi ve uygulanan voltajlar.

Adı	Precursor Ion (m/z)	Production Ions (I ve II) (m/z)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
Sudan I	249,0	93,0	-28	-28	-16
		156,0	-29	-17	-28
Sudan II	277,0	121,1	-30	-22	-24
		106,1	-30	-44	-20
Sudan III	353,1	128,1	-23	-40	-22
		156,0	-23	-30	-22
Sudan IV	381,1	224,2	-25	-23	-14
		143,1	-25	-34	-29
		104,1	-10	-52	-18
Sudan Orange G	215,0	93,0	-27	-27	-16
		122,1	-28	-17	-23
Sudan Black B	457,2	194,1	-15	-36	-19
		221,1	-15	-29	-14
Sudan Red B	381,20	224,1	-26	-24	-22
		225,2	-28	-20	-24
		134,1	-23	-23	-23
Sudan Red 7B	380,1	115,0	-18	-48	-21
		183,1	-28	-16	-12
Sudan Red G	279,2	108,1	-15	-36	-19
		123,1	-15	-20	-23
Para Red	293,9	156,2	-12	-19	-29
		128,0	-24	-27	-22
Rhodamine B	443,30	399,2	-23	-44	-27
		355,1	-23	-55	-24

CE: Çarpışma Enerjisi; Q1: Giriş voltajı; Q3: Çıkış voltajı

2.7. Metot Validasyon Parametreleri

Ulusal veya uluslararası valide bir metodun laboratuvarında uygulanabilirliğinin görülmesi amacıyla kantitatif analizlerde aşağıdaki parametreler uygulanmaktadır (Anonim 2018a).

- Doğrusallık
- Tespit Limiti (Limit of Detection, LoD)
- Ölçüm Limiti (Limit of Quantification, LoQ)
- Doğruluk
 - Kesinlik (Precision)
 - Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 - Tekrarüretilebilirlik (Reproducibility-with in Laboratory)
 - Gerçeklik (Trueness)
 - Geri Kazanım (Recovery)

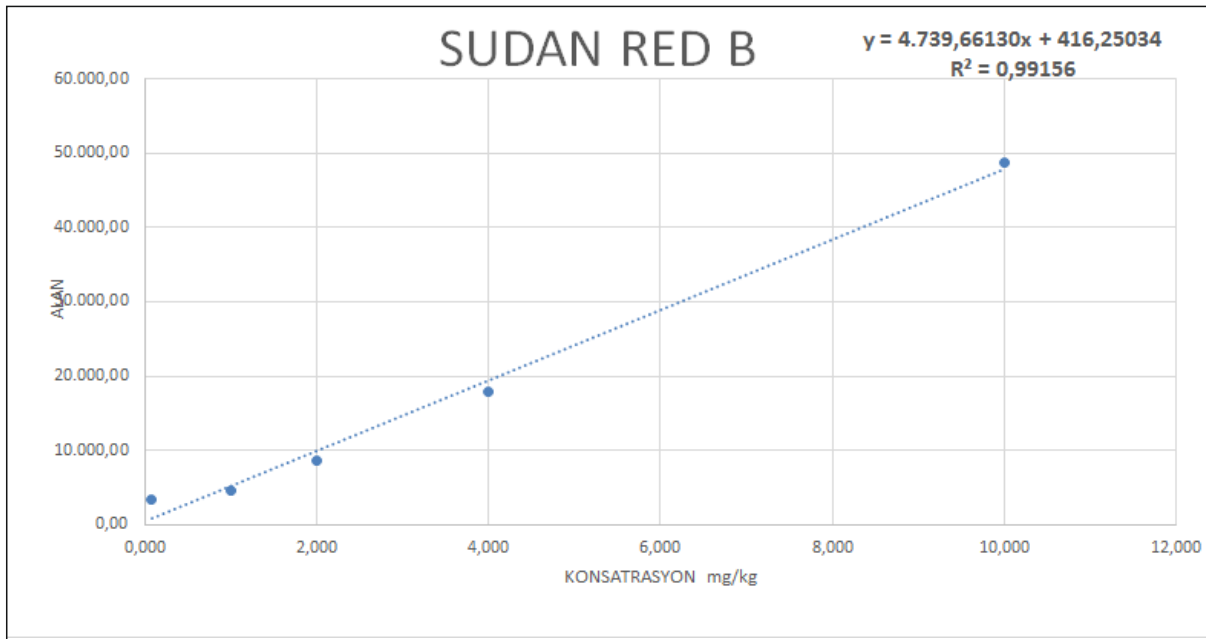
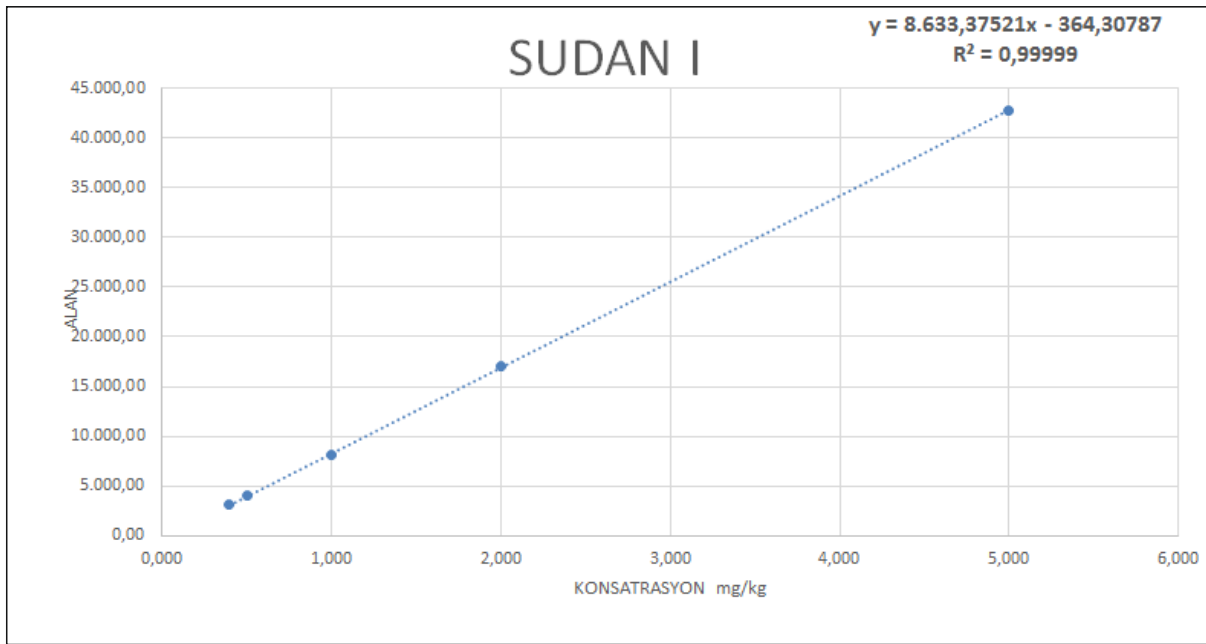
3. Bulgular

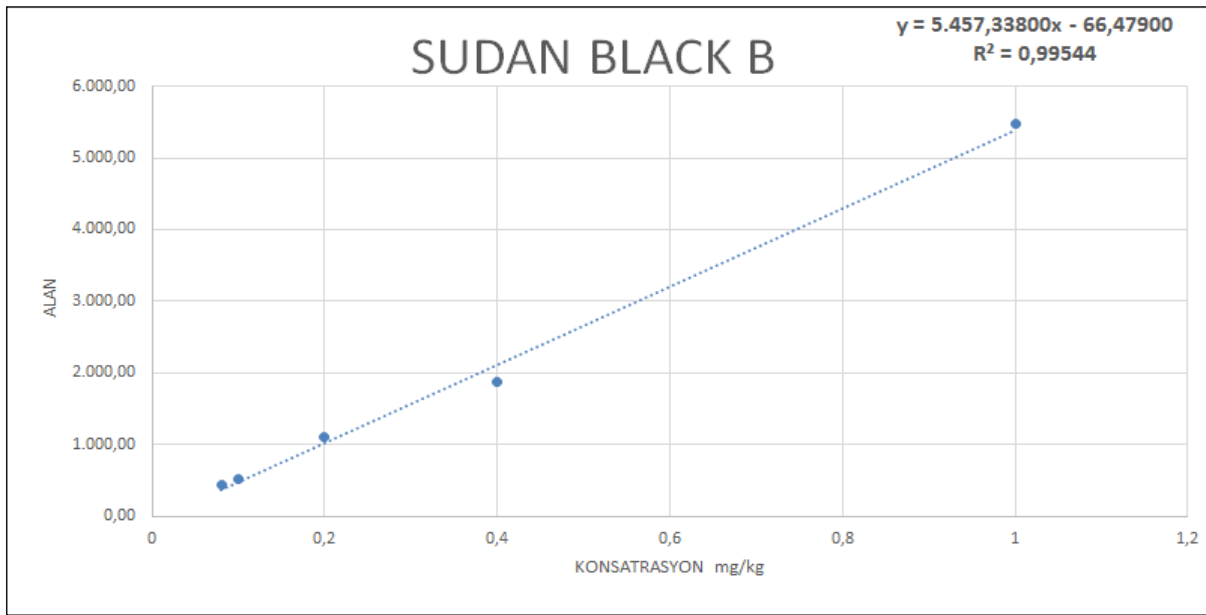
3.1. Metot Validasyonu

3.1.1. Kalibrasyon ve Doğrusallık

Doğrusallık çalışmalarında kullanılan standartlar Çizelge 4’deki gibi hazırlanmıştır. Kırmızı pul biber ile matris uyumlu kalibrasyon yapılarak Çizelge 5’te verilen doğrusal aralıkta çalışmalar yapılmıştır. Çalışma aralığı 5 farklı konsantrasyon seviyesinde, 2 tekrarlı yapılmıştır (Anonim 2002).

Doğrusal aralık için $r^2 \geq 0,99$ olarak belirlenmiş ve bazı boyalara ait doğrusallık grafikleri Şekil 1’de gösterilmiştir.





Şekil 1: Azo boyalardan Sudan I, Black B ve Red B'ye ait doğrusallık kalibrasyon grafikleri.

3.1.2. Tespit (Dedeksiyon) Limiti (LoD), Ölçüm (Kantitasyon) Limiti (LoQ)

Ölçüm limiti için Çizelge 8'de belirtilen konsantrasyonlarda ve temiz kırmızı pul bibere kirletme işlemi uygulanarak toplam 10 adet bağımsız çalışma yapılmıştır. LC-MS/MS cihazının performansı da göz önünde bulundurulmuş ve tespit edilebilen en düşük konsantrasyona inilmiştir. Bazı sudan boyaalarına ait kromatogram örnekleri Şekil 2'de yer almaktadır.

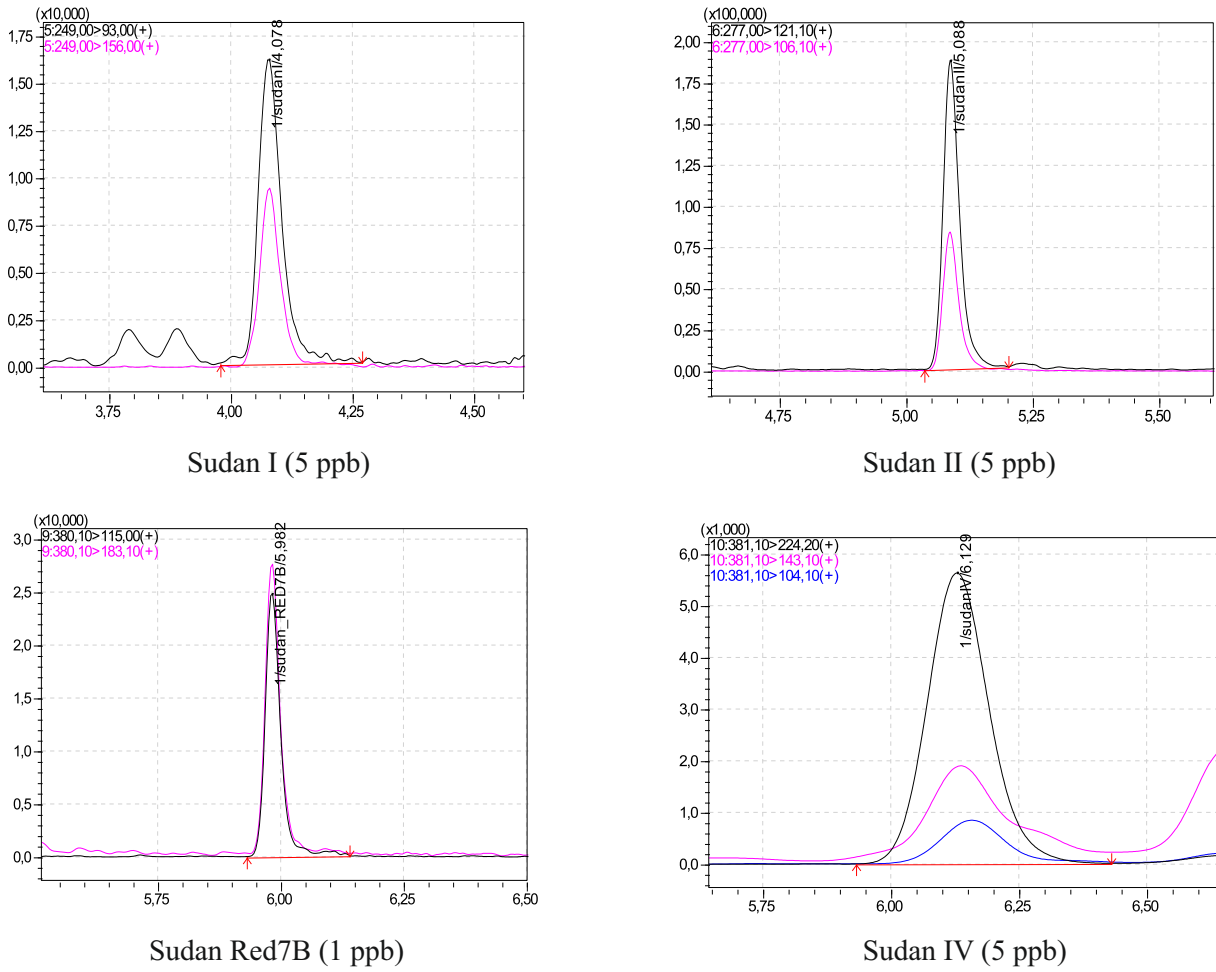
Çalışmalar sonucunda bulunan değerlerin standart sapma (s) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Hesaplanan standart sapmaların 3 katı LoD ($LoD=3xs$), 10 katı ise LoQ ($LoQ=10xs$) olarak belirlenmiştir (Anonim 2018a).

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

s: standart sapma
x: Ölçüm sonuçlarının ortalaması
xi: Her bir ölçüm sonucu
N: Yapılan çalışma sayısı

Çizelge 8. Azo boyaların LoD ve LoQ çalışma sonuçları.

Analit	Konsantrasyon (µg/kg)	LoD (µg/kg)	LoQ (µg/kg)
Sudan I	10	3,50	11,67
Sudan II	10	3,63	12,10
Sudan III	20	6,88	22,95
Sudan IV	10	3,56	11,88
Sudan Orange G	20	7,10	23,68
Sudan Black B	2	0,62	2,06
Sudan Red B	20	6,87	22,91
Sudan Red 7B	2	0,68	2,27
Sudan Red G	10	3,00	10,01
Para Red	100	13,12	43,72
Rhodamine B	10	2,90	9,68



Şekil 2. Azo boyalarına ait kromatogram örnekleri.

3.1.3. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik ve Tekrarüretilebilirlik)

Tekrarlanabilirlik, bir metodun aynı laboratuvarında, aynı cihazla/metotla, aynı uygulama koşulları altında, aynı kişi tarafından kısa zaman (analizin süresi ve analitin yapısına göre değişir) aralığında, aynı veya benzer matrislerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür ve % rölatif standart sapma (%RSDr) ile ifade edilir. Analistlerin farklı konsantrasyon seviyelerindeki kesinlik değerleri arasında fark olup olmadığı F-Testi ile kontrol edilmiştir. Cihazın ve metodun tekrarlanabilirliği için temiz örnekler standart ile kirletilerek her bir analist için aynı gün, 2 farklı konsantrasyonda, 6 paralel olacak şekilde numune hazırlama prosedürüne göre hazırlanmış ve analize alınmıştır.

Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik ise, bir metodun aynı laboratuvarında aynı/farklı cihazlarla, farklı kişiler tarafından, geniş zaman aralığında, aynı veya eş değer matrislerde yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür (Anonim 2018a). Tekrarüretilebilirlik için örnekler her bir analist için 2 farklı konsantrasyonda, 3 farklı günde toplam 10 paralel olacak şekilde numune hazırlama prosedürüne göre hazırlanmış ve analize alınmıştır.

Tekrarlanabilirlik (%RSDr) ve tekrarüretilebilirlik (%RSDR) değerleri Horwitz eşitliğinden hesaplanmıştır. Elde edilen %RSD'ler Çizelge 9'da verilmiştir. %RSD değerlerinin uygunluk değerlendirmesi "Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi"nde yer alan kriterlere göre yapılmıştır. Tüm tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik sonuçları ilgili kriterlere göre uygun bulunmuştur (Anonim 2018a).

$$RSD (CVr) = \frac{s}{\bar{x}}$$

s: standart sapma
x: Ölçüm sonuçlarının ortalaması

$$\% RSD (CVr) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Çizelge 9. Tekrarlanabilirlik (%RSD_r) ve tekrarüretilebilirlik (%RSD_R) değerleri.

Adı	Tekrarlanabilirlik (%RSD _r)	Tekrarüretilebilirlik (%RSD _R)
Sudan I	2,56	2,53
Sudan II	2,43	8,12
Sudan III	3,99	3,78
Sudan IV	3,36	9,36
Sudan Orange G	2,58	5,12
Sudan Black B	4,22	5,02
Sudan Red B	3,36	9,23
Sudan Red 7B	4,80	7,89
Sudan Red G	3,55	4,65
Para Red	2,62	2,98
Rhodamine B	2,54	3,40

3.1.4. Geri Kazanım

Kirletilmiş materyal ile gerçeklik çalışması için temiz örneklere ihtiyaç vardır. Kirletme yoluyla geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı rutin numune ile çalışma yapılabilmesidir (Anonim 2018a). Metodun geri kazanım oranı için, örnekler 2 analist tarafından 3 farklı günde, toplam 10 bağımsız çalışma olacak şekilde numune hazırlama prosedürüne göre hazırlanmış ve analize alınmıştır. Bulunan geri kazanım değerleri Çizelge 10’da verilmiştir. Geri kazanım oranlarının uygunluk değerlendirmesi “Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi”nde yer alan kriterlere göre yapılmıştır.

$$\% \text{ GK} = \frac{\bar{X}' - \bar{X}}{X_{\text{kirletilmiş}}} \times 100$$

% GK: Geri kazanım oranı

x : Kirletilmemiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

x' : Kirletilmiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

x kirletilmiş: Kirletmek için kullanılan analit miktarı (eklenen konsantrasyon)

Çizelge 10. Azo boyaların geri kazanım değerleri.

Adı	Geri Kazanım (%)
Sudan I	97,16
Sudan II	83,38
Sudan III	98,95
Sudan IV	96,69
Sudan Orange G	89,74
Sudan Black B	96,46
Sudan Red B	97,55
Sudan Red 7B	100,27
Sudan Red G	89,35
Para Red	96,56
Rhodamine B	97,09

3.1.5. Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliği; ölçüm sonucunda elde edilen değerleri mantıklı kılabilen dağılımları karakterize eden ve ölçümün sonucuyla bağlantılı olan parametrelerdir. Ölçüm sonucunun kalitesinin bir göstergesidir ve ölçüm sonuçlarından istatistiksel olarak hesaplama ile elde edilir (Anonim 2018b). Doğrusallık, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik, geri kazanım gibi validasyon parametrelerinden hesaplanan belirsizlikler bu grup altında toplanır (Anonim 2013b). Yapılan çalışmalar sonucunda hesaplanan ölçüm belirsizlikleri için kullanılan formüller Çizelge 11’de, Azo boyalara ait ölçüm belirsizlikleri ise Çizelge 12’de verilmiştir.

Çizelge 11. Ölçüm belirsizliği hesaplamaları için kullanılan formüller.

Belirsizlik Kaynakları	Formüller	Açıklama
Kalibrasyon eğrisi ölçüm belirsizliği U(c₀)	$U(c_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$	S: Residual Standart Sapma B ₁ : Eğim p: Örnek ölçümü için okuma sayısı n: Kalibrasyon için yapılan ölçüm sayısı c ₀ : Tayin edilen çözelti derişimi S _{xx} : Aşağıdaki formüle göre hesaplanır \bar{C} : Farklı kalibrasyon standartlarının ortalaması
Tekrarüretilebilirlik ölçüm belirsizliği U(RSDR)	$RSD_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times RSD_1^2 + (n_2 - 1) \times RSD_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}}$	RSD _{pool} : Genişletilmiş Bağlı Standart sapma n: Yapılan ölçüm sayısı RSD: Bağlı Standart sapma
Tekrarlanabilirlik ölçüm belirsizliği U(RSDr)	$RSD_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times RSD_1^2 + (n_2 - 1) \times RSD_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}}$	RSD _{pool} : Genişletilmiş Bağlı Standart sapma n: Yapılan ölçüm sayısı RSD: Bağlı Standart sapma
Geri kazanım ölçüm belirsizliği U(GK)	$U(gk) = \frac{s}{\sqrt{n}}$	s: Standart Sapma n: Yapılan ölçüm sayısı
Rölatif Bileşik Belirsizlik U(x)	$U(X) = \sqrt{\frac{U(co)}{co} + \frac{U(RSDR)^2}{RDSR} + \frac{U(RSDr)^2}{RSDr} + \frac{U(gk)^2}{gk}}$	U(x): Birleştirilmiş belirsizlik U(c ₀):Kalibrasyon eğrisinin belirsizliği U(RSDR): Kesinlik – Tekrarüretilebilirlik belirsizliği U(RSDr): Kesinlik – Tekrarüretilebilirlik belirsizliği U(gk): Geri Kazanım belirsizliği
Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği = Rölatif Birleşik Belirsizlik x 2 (%95 güven aralığında, k=2)		

Çizelge 12. Azo boyaların ölçüm belirsizlikleri.

Adı	Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği (%) %95 güven aralığında, k=2
Sudan I	7,21
Sudan II	17,09
Sudan III	11,15
Sudan IV	19,96
Sudan Orange G	11,72
Sudan Black B	13,49
Sudan Red B	20,14
Sudan Red 7B	18,81
Sudan Red G	11,74
Para Red	8,09
Rhodomine B	8,54

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışma sonucu elde edilen verilerin (tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik ve geri kazanım) değerlendirilmesi AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, (1998) AOAC International'a göre yapılmış ve uygun olduğu tespit edilmiştir (Anonim 1998).

Azo boyalar; düşük üretim maliyetli olmaları ve renk bütünlüğünü sağlamaları nedeniyle gıdalarda taklit ve taşıyıcı amacıyla kullanılmaktadır. Bu özelliklere rağmen olası kanserojen ve teratojenik etkileri nedeniyle sağlık açısından riskli bulunmaktadır. Azo boyaların daha hassas yöntemler ile tespit gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Wang ve ark. (2013) UPLC-MS/MS ile 10 farklı toz biber örneğinde 8 tane sudan boyasının tespiti için validasyon çalışması yapmışlardır. Kalibrasyon eğrisi çalışma aralığı 0,1-25 mg/kg'dır. Geri kazanım oranları %80,7-104,4 aralığında değişmiştir. Metodun rutin analizlerde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Çağılıcı ve ark. (2017) spektrofotometre ile yapmış oldukları çalışmada, Sudan I için LoQ değerini 500-3.000 µg/kg aralığında bulmuştur. Başka bir çalışmada, gıdalarda 6 adet Sudan boyası ve Para Red UPLC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Sudan boyaları için lineer çalışma aralığı 2-50 µg/kg, Para Red için 10-250 µg/kg (ppb)'dir. Geri kazanımlar ise %83,4-112,3 aralığında değişmiştir. Ölçüm limiti sudan boyaları için 0,9-4,8 µg/kg ve Para Red için 19,8 µg/kg bulunmuştur (Li ve ark. 2010).

Bir diğer yapılan çalışmada HPLC sisteminde UV-Vis dedektör kullanılmıştır. Kırmızı toz biberde Sudan I, II, III, IV ve Para Red tespiti için metot validasyonu yapılmıştır. Çalışma sonucunda geri kazanım oranı %89-98, ölçüm limiti 4-18 µg/kg aralığında bulunmuştur (Ertaş ve ark. 2007).

Çalışmada LC-MS/MS sistemi kullanarak kırmızı pul biberde azo boyaların validasyon çalışması yapılmıştır. LoQ değerleri 2,06-43,72 µg/kg aralığında belirlenmiştir. Geri kazanımlar ise %83,38-100,27 aralığında bulunmuştur.

Yapılan çalışma göstermiştir ki; azo boyaların tespitinde LC-MS/MS sisteminin kullanılmasının avantajı yüksek hassasiyette, daha az solvent harcayarak ve kısa sürede analiz yapılmasıdır. Sonuç olarak baharatlarda, özellikle kırmızıbiberde, renk vermek amacıyla kullanılsa dahi bulaşmış olan sudan boyaları tespit edilecektir.

5. Kaynaklar

- Anonim, 1975. Summaries and evaluations; sudan I. International Agency for Research on Cancer.
- Anonim, 1998. AOAC Peer-verified methods program, Manual on policies and procedures, AOAC International.
- Anonim, 2002. TS ISO 11095, 2002. Referans malzemeler kullanarak doğrusal kalibrasyon. Ankara.
- Anonim, 2003. Commission decision on emergency measures regarding hot chilli and hot chilli. Official Journal of the European Union, (2003/460/EC).
- Anonim, 2005a. Opinion on the use of CI26100 (CI Solvent Red 23) as a colorant in cosmetic products. European Commission Health. (https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_013.pdf)
- Anonim, 2005b. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission to review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU. The EFSA Journal(263), 1-71.
- Anonim, 2006. Analysis of illegal dyes in paprika powder by LC-MS/MS. Statutory Analysis Government Chemist Programme Ad Hoc Project I.
- Anonim, 2013a. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği.
- Anonim, 2013b. EA-4/02 Kalibrasyonda ölçüm belirsizliğinin değerlendirilmesi. (<http://www.turkak.org.tr/TURKAKSITE/docs/EA402.pdf>)
- Anonim, 2018a. Gıda ve kontrol genel müdürlüğü, kimyasal ve fiziksel analizlerde metot validasyonu/verifikasyonu rehberi. (https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/G%C4%B1da%20ve%20Yem%20Hizmetleri/gıda_kontrol/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehber.pdf)

- Atlı, B., 2010. Gıda Boyaları. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi.
- Çağlıcı, O. C., Gümrükçüoğlu, A., Alp, H., Vanlı, E., Ocak, Ü. ve Ocak, M., 2017. Baharatlarda Sudan I boyasının tayini için basit bir spektrofotometrik yöntem. Karadeniz Chem. Sci. Tech., 16-21.
- Ertaş, E., Özer, H. and Alasalvar, C., 2007. A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. Food Chemistry (105), 756-760.
- Fang, Y. and Keever, J., 2008. A Rapid and sensitive analysis method for sudan reds in curry and chili powder using LC/MS/MS. (<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-7308EN.pdf>)
- Fonovich, T. M., 2013. Sudan dyes: Are they dangerous for human health? Drug and Chemical Toxicology, 36, 343-352.
- Li, C., Chen, L. and You, X., 2014. Extraction of Sudan dyes from environmental water by hemimicelles-based magnetic titanium dioxide nanoparticles. Environmental Science and Pollution Research, 21, 12382–12389.
- Li, C., Wu, Y. L. and Shen, J. Z., 2010. UPLC-ESI-MS/MS analysis of Sudan dyes and Para Red in food. Food Additives and Contaminants (27), 1215-1220.
- Lohumi, S., Joshi, R., Kandpal, L. M., Lee, H., Kim, M. S., Cho, H. and Cho, B.K., 2017. Quantitative analysis of Sudan dye adulteration in paprika powder using FTIR spectroscopy. Food Additives and Contaminants, 34, 678-686.
- Nisa, A., Zahra, N. and Butt, Y., 2016. Sudan dyes and their potential health effect. Pak. J. Biochem. Mol. Biol., 49(1), 29-35.
- Rebane, R., Leito, I., Yurchenko, S. and Herodes, K., 2010. A review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrixes. Journal of Chromatography A, 1217(17), 2747–2757.
- Schreiber, A. and Czapiewski, K., 2010. Quantitation and Identification of 13 Azo-dyes in Spices using LC-MS/MS. AB SCIEX Application Note, Publication number: 1281510-01.
- Shi, X-R., Chen, X-L., Hao, Y-L., Li, L., Xu, H-J., Wang, M-M., 2018. Magnetic metal-organic frameworks for fast and efficient solid-phase extraction of six Sudan dyes in tomato sauce. Journal of Chromatography B, 1086, 146-152.
- Sun, H., Wang, F. and Ai, L., 2007. Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography–liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1164(1-2), 120-128.
- Tsai, C. F., Kuo, C. H. and Shih, D. Y., 2015. Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrups-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Food and Drug Analysis, 23(3), 453-462.
- Wang, L., Zheng, J., Zhang, Z., Wang, T. and Che, B., 2013. Determination of eight sudan dyes in chili powder by UPLC-MS/MS. Scientific Research Publishing, 5, 154-157.
- Wang, Y., Yang, H., Wang, B. and Deng, A., 2011. A sensitive and selective direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for fast detection of Sudan I in food samples. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(10), 1836-1842.
- Wong, Y., 2012. Inter-laboratory comparison programme on Sudan dyes in chilli powder. Journal of the Association of Public Analysts, 40, 13-27.
- Wu, Y., Li, C., Xia, X., Liu, Y. and Shen, J., 2010. Development and validation of a confirmatory HPLC method for simultaneous determination of sudan dyes in animal tissues and eggs. Journal of Chromatographic Science, 48(1), 63-67.
- Young, M.S., Tran, K.V., 2014. Waters application note , LC-MS determination of sudan dyes in Chili oleoresin using the cortecs C₁₈ column , wate