



**BALDA HMF (Hidroksimetil Furfural), GLİKOZ, FRUKTOZ ve
SAKKAROZ TAYİNİ YETERLİLİK TESTİ RAPORU**

TÜBİTAK ULUSAL METROLOJİ ENSTİTÜSÜ
REFERANS MALZEMELER LABORATUVARI

Rapor No: KAR-G3RM-160.2013.02

Koordinatör: Dr. Fatma AKÇADAĞ

6 Ocak 2014
Gebze/KOCAELİ

Bu yeterlilik testi çalışması "ISO/IEC 17043: 2010 Conformity Assessment - General Requirements for Proficiency Testing" standardına uygun olarak TÜBİTAK UME Referans Malzemeler Laboratuvarı tarafından düzenlenmektedir.

Yazışma adresi

TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü (UME)

Kimya Grubu Laboratuvarları

P.K. 54 41470 Gebze KOCAELİ

T (262) 679 50 00 F (262) 679 50 01

www.ume.tubitak.gov.tr

Koordinatör

Dr. Fatma AKÇADAĞ

e-mail: ume.yeterliliktesti@tubitak.gov.tr

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. ÇALIŞMANIN AMACI	4
3. ÇALIŞMA PROGRAMI	4
4. KULLANILAN METOTLAR	4
5. ANALİZ SONUÇLARININ RAPORLANMASI	4
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	6
7. KAYNAKLAR	10
8. EK-1 ROBUST İSTATİSTİK	11

TABLolar

Tablo 1. Balların özellikleri	2
Tablo 2. Katılımcı laboratuvarların analizlerde kullandıkları metotlar/cihazlar	5
Tablo 3. Balda HMF, glikoz, fruktoz ve sakkaroz tayini sonuçları ve z-skorları	7
Tablo 4. Balda HMF, glikoz, fruktoz ve sakkaroz tayini z-skorlarının dağılımı	9
Tablo 5. Sonuçların dağılımı	9

ŞEKİLLER

Şekil 1. Balda HMF tayini z-skorları	8
Şekil 2. Balda glikoz tayini z-skorları	8
Şekil 3. Balda fruktoz tayini z-skorları	8
Şekil 4. Balda sakkaroz tayini z-skorları	8

1. GİRİŞ

Türk Gıda Kodeksi 2005/49 sayılı Bal Tebliğinde "bal, bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı *Apis mellifera* tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürünü, " olarak tanımlanmıştır.

Genel olarak balın yaklaşık % 80'i değişik şekerlerden, % 17'si sudan meydana gelir. Geri kalan % 3'lük kısım başta enzimler olmak üzere diğer değerli maddelerden oluşur. Balda, demir, bakır, potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, silisyum, alüminyum, krom, nikel ve kobalt gibi değerli mineraller vardır. Salgı balları mineral maddelerce daha zengindir. Bu özelliğinden dolayı tedavi amaçlı olarak ta kullanılırlar ve kristalize olmadıkları için tercih edilirler.

Balın yapısındaki enzimlerin bir kısmı bitkilerden bir kısmı da arının salgı bezlerinden gelir. Enzimler balın en değerli maddeleridir. Doğal ve ısıtılmamış ballarda enzim miktarı yüksek olup bu ballar kaliteli ve çok değerlidir. Bal ısıtıldığı oranda enzim değerinde kayıplar olur.

Ayrıca bal içerisinde onbeş şeker tespit edilmiş olup bunlardan bazıları, fruktoz, glikoz, sakkaroz, maltoz, izamaltoz, erloz, kestoz, melezitiz ve rafinozdur. Genel olarak fruktoz şekeri diğerlerinden farklıdır. Balı bildiğimiz şekerden ayıran çok önemli bir fark vardır. Şeker ancak sindirim sisteminde değişime uğradıktan sonra kana karışırken bal sindirime gerek olmadan çok süratli bir şekilde kana karışır. Dolayısıyla bal insan vücudunun en yüksek derecede ve en hızlı biçimde faydalanacağı bir gıdadır. Ilık su ile karıştırılan balın birkaç dakika içinde vücuda enerji verdiği tespit edilmiştir

Balların büyük bir kısmı kristalleşmeye eğilimlidir. Kristalleşmenin hızı baldaki glikoz, fruktoz oranına ve su miktarına bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak baldaki fruktoz miktarı glikozdan fazladır. Eğer glikoz miktarı fruktoz miktarına yaklaşırsa bal çabuk kristalleşir, aradaki fark büyürse geç kristalleşir, kristalleşme gecikmektedir. Olgunlaşmamış balda sakkaroz fazla glikoz daha az olduğu için kristalleşme yavaş olurken olgunlaşmış ballarda ise daha az miktarda sakkaroz bulunmaktadır. Kimyasal bileşimi bakımından bal, früktozu fazla olan, koyu, indirgen, şeker sulu çözeltisi gibi olup içinde az miktarda sakkaroz, dekstrin, azotlu maddeler, enzimler, anorganik kokulu ve boyar maddeler, uçucu yağlar, organik asitler, mumlar, polen taneleri içermektedir. HMF ise, fruktozun asit ortamında genellikle ısı ile ayrışması sırasında elde edilir. Zamanla ve sıcaklıkla artış gösterir. HMF seviyesi depolama ve sıcaklık koşullarının bir göstergesidir. Balların özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Balların özellikleri

	Çiçek Balı	Salgı Balı	Çiçek ve Salgı Balı Karışımı	Fırıncılık Balı
Nem (en fazla)	% 20 % 23 (püren- <i>Calluna</i> ballarında)	% 20	% 20	% 23 % 25 (püren- <i>Calluna</i> kaynaklı fırıncılık ballarında)
Sakaroz (en fazla)	5 g/100g 15 g/100g (Yalancı akasya – <i>Robina pseudoacacia</i> , adi yonca- <i>Medicago sativa</i> , <i>Banksia meziei</i> çiçek balı, tatlı yonca- <i>Hedysarum</i> , kırmızı okaliptüs- <i>Eucalyptus camadulensis</i> , meşin ağacı- <i>Eucryphia lucida</i> - <i>Eucyrphia milliganii</i> , narenciye ballarında) 10 g/100g (Lavanta çiçeği- <i>Lavandula spp.</i> , <i>Boraga officinalis</i> ballarında)	5 g/100g 10 g/100g (Kızılçam <i>Pinus brutia</i> ve fıstık çamlarından <i>Pinus pinea</i> elde edilen salgı ballarında)	5 g/100g	5 g/100g
Fruktoz +Glukoz (en az)	100 g'da 60 g	100 g'da 45 g	100 g'da 45 g	-
Fruktoz / Glukoz	0,9 - 1,4	1,0 - 1,4	1,0 - 1,4	-
Suda çözünmeyen madde (en fazla)*	0,1 g/100 g	0,1 g/100g	0,1 g/100 g	0,1 g/100 g
Serbest asitlik (en fazla)	50 meq/kg	50 meq/kg	50 meq/kg	80 meq/kg
Elektrik iletkenliği	En fazla 0,8 mS/cm (Kocayemiş- <i>Arbutus unedo</i> , çan otu- <i>Erica</i> , ökaliptus, ıhlamur- <i>Tilia spp.</i> , süpürge çalı- <i>Calluna vulgaris</i> , okyanus mersini- <i>Leptospermum</i> ve çay ağacı- <i>Melaleuca spp'</i> den elde edilenler hariç olmak üzere) En az 0,8 mS/cm (Kestane balında)	En AZ 0,8 mS/cm	En az 0,8 mS/cm (kestane balı ve salgı balı karışımlarında)	En fazla 0,8 mS/cm
Diastaz sayısı (en az)	8 3 (Narenciye balı gibi yapısında doğal olarak düşük miktarda enzim bulunan ve doğal olarak HMF miktarı 15 mg/kg'dan fazla olmayan balda)	8	8	-
HMF (en fazla)**	40 mg/kg	40 mg/kg	40 mg/kg	-
Balda protein ve ham bal delta C13 değerleri arasındaki fark	-1,0 veya daha pozitif	-1,0 veya daha pozitif - 1,6 veya daha pozitif (Kızılçam <i>Pinus brutia</i> ve fıstık çamlarından <i>Pinus pinea</i> elde edilen salgı ballarında)	- 1,0 veya daha pozitif	- 1,0 veya daha pozitif
Balda protein ve ham bal delta C13 değerlerinden hesaplanan C4 şekerleri oranı (en fazla)	% 7 %10 (Kızılçam <i>Pinus brutia</i> ve fıstık çamlarından <i>Pinus pinea</i> elde edilen salgı ballarında)	% 7 %10 (Kızılçam <i>Pinus brutia</i> ve fıstık çamlarından <i>Pinus pinea</i> elde edilen salgı ballarında)	% 7	% 7
Prolin miktarı (en az)	180 mg/kg	180 mg/kg	180 mg/kg	180 mg/kg
Naftalin miktarı (en fazla)***	10 ppb	10 ppb	10 ppb	10 ppb

* Pres balında suda çözünmeyen madde miktarı 0,5 g/100 g'ı geçemez.

** Ürettiği bölge etiketinde belirtilmek koşulu ile tropikal iklim bölgeleri kaynaklı ballarda HMF miktarı en çok 80 mg/kg olmalıdır.

*** Balmumunda naftalin miktarı 10 ppb'den fazla olamaz.

Laboratuvar yeterlilik testleri, test ve ölçüm yapan laboratuvarların performansının belirlenmesinde önemli bir araçtır ve laboratuvarın kendi performansını diğer laboratuvarlarla karşılaştırma olanağı sağlar.

TÜBİTAK UME Kimya Grubu yeterlilik testlerinin önemini göz önüne alarak laboratuvarlarda yapılan analitik ölçümlerin performansını belirlemek amacıyla yeterlilik testi çalışmaları düzenlenmektedir. Çalışma 2004 yılında “Balda Hidroksi Metil Furfural (HMF) Analizi” olarak düzenlenmiş, 2005 yılında ise parametrelerin sayısı artırılarak çalışma “Balda HMF (Hidroksimetil Furfural), Glikoz, Fruktoz ve Sakkaroz Tayini” olarak düzenlenmiştir.

Bu dönem düzenlenen çalışmada, çalışmaya katılmayı bildiren 8 laboratuvara numuneler 22 Ekim 2013 tarihinde kargo ile gönderilmiş ve laboratuvarlardan analiz sonuçlarını 22 Kasım 2013 tarihine kadar göndermeleri istenmiştir.

2. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmada gıda laboratuvarlarında yapılan balda HMF, glikoz, fruktoz ve sakkaroz tayinlerinde laboratuvarların performanslarının belirlenmesi ve laboratuvarların kendi performanslarını geliştirmeye yönelik katkı sağlaması amaçlanmıştır.

3. ÇALIŞMA PROGRAMI

Çalışmanın amacı, organizatörler, çalışmaya katılım koşulları, test örneği hakkında bilgi, çalışma programı, tayin edilecek parametreler, kullanılacak metotlar, sonuçların raporlanması ve çalışmanın gizliliği ile ilgili esasları içeren çalışma protokolü <http://www.ume.tubitak.gov.tr/lak/kimya/> adresinde yayınlanmıştır. Katılımcı laboratuvarlardan, çalışmalarını bu protokole uygun olarak yürütmeleri istenmiştir.

Yaklaşık 100 g test örneği daha önceden temizlenmiş kahverengi cam şişelerde paketlenerek çalışmaya katılmayı bildiren 8 laboratuvara 22 Ekim 2013 tarihinde kargo ile gönderilmiştir.

Çalışma sonuçlarının takibi için her bir laboratuvara ayrı bir numara verilmiştir. Laboratuvarların test örneğini analiz ederek sonuçları 22 Kasım 2013 tarihine kadar göndermeleri istenmiştir.

4. KULLANILAN METOTLAR

Bu çalışmaya katılan laboratuvarların analizlerde kullandıklarını bildirdikleri metotlar/cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Bu çalışmada sonuçların dağılımı ile analizlerde kullanılan metotlar karşılaştırıldığında aralarında bir ilişki olmadığı tespit edilmiş olup aynı metotları kullanan laboratuvarların sonuçlarının birbirinden çok farklı olduğu tespit edilmiştir.

5. ANALİZ SONUÇLARININ RAPORLANMASI

Katılımcı laboratuvarlardan ölçüm sonuçlarının ortalamasını, standart sapma değerlerini ve ölçüm metodunu, kendilerine verilen kullanıcı adı ve şifresini kullanarak <http://www.ume.tubitak.gov.tr/lak/kimya/> internet adresinde bulunan “VERİ GİRİŞİ” bölümüne girmeleri istenmiştir.

Tablo 2. Katılımcı laboratuvarların analizlerde kullandıkları metotlar/cihazlar

Lab. No	HMF		Glikoz		Fruktoz		Sakkaroz	
	Kullanılan Metot	Kullanılan Cihaz	Kullanılan Metot	Kullanılan Cihaz	Kullanılan Metot	Kullanılan Cihaz	Kullanılan Metot	Kullanılan Cihaz
01	TSE 3036	Spektrofotometre	DIN 10758	HPLC	DIN 10758	HPLC	DIN 10758	HPLC
02	TS 3036	Spektrofotometre	AOAC 977,20	HPLC	AOAC 977,20	HPLC	AOAC 977,20	HPLC
03	HMIHC 2009, White	Spektrometre	TS 13359 Mart 2008	HPLC-RID	TS 13359 Mart 2008	HPLC-RID	TS 13359 Mart 2008	HPLC-RID
04	AOAC	HPLC	AOAC	HPLC	AOAC	HPLC	AOAC	HPLC
05	TS13356	HPLC	TS13359	HPLC	TS13359	HPLC	-	-
06	-	-	TS 13359	HPLC	TS 13359	HPLC	TS 13359	HPLC
07	TS 3036	PC SPECTRO	AOAC 18th Ed 2005	HPLC	AOAC 18th Ed 2005	HPLC	AOAC 18th Ed 2005	HPLC
08	TS 3036	Spektrofotometre	-	-	-	-	TS 3036 (Lane Eynon Metodu)	-

6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada referans değerler, HMF glikoz ve fruktoz katılımcı laboratuvar sonuçlarının “median”ı alınarak, sakkaroz için ise referans laboratuvar sonucu kullanılarak belirlenmiştir.

Laboratuvarlar arası çalışmalarda sonuçların değerlendirilmesinde önemli etkenlerden bir tanesi de standart sapma değeridir. Bu değer çalışmanın amacına uygun olarak belirlenmesi gerekir. Bu çalışmada standart sapma değerleri HMF için Horwitz Eşitliği kullanılarak, glikoz ve fruktoz için referans değer % 5'i sakkaroz için ise referans değer % 15'i alınarak belirlenmiştir.

Horwitz Eşitliği:

$$\% \text{RSD}_x = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (1)$$

Burada,

% RSD_x: tekrar gerçekleştirilebilirlik koşullarında bağıl standart sapma [% RSD_x = (s / X)x100]

C: derişim oranı (referans değer) (100 g/100 g = 1 ; % 100 = 1,00 ; 1 mg/kg (ppm)= 10⁻⁶)

Katılımcı laboratuvarların z-skoru değerleri eşitlik (2) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$z = \frac{x - X}{\sigma} \quad (2)$$

Burada,

X : referans değer

x : katılımcı laboratuvar sonucu

σ : yeterlilik testi değerlendirmesi için standart sapma

Bu çalışmada, < x şeklinde raporlanan değer için z-skoru hesaplanmamıştır.

Laboratuvar sonuçları Tablo 3'te, z-skorlarının grafiksel değişimi ise Şekil 1-3'te verilmiştir.

|z| ≤ 2,0 ise analiz uygundur.

2,0 < |z| < 3,0 ise kabul edilebilir, ancak problemin irdelenmesi gerekir.

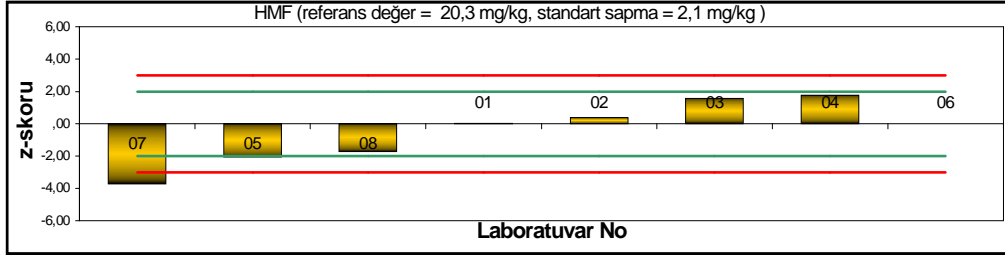
|z| ≥ 3,0 ise analiz kabul edilemez, düzeltici faaliyet uygulanmalıdır.

Tablo 4'te z-skoru dağılımları, Tablo 5'te ise sonuçların dağılımları verilmiştir.

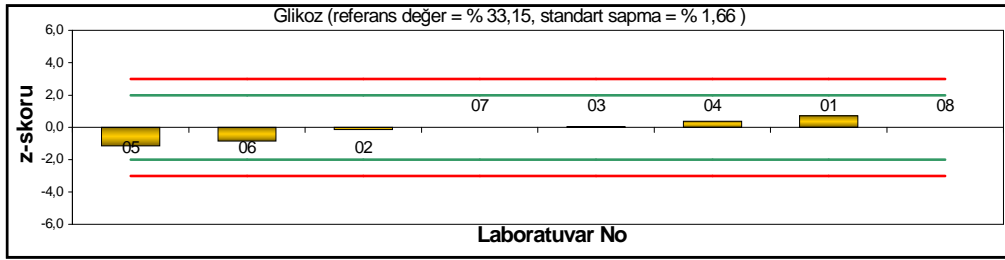
Bu çalışmada sakkaroz sonuçlarının geniş dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Laboratuvarların metotlarını gözden geçirmeleri önerilmektedir.

Tablo 3. Balda HMF, glikoz, fruktoz ve sakkaroz tayini sonuçları ve z-skorları

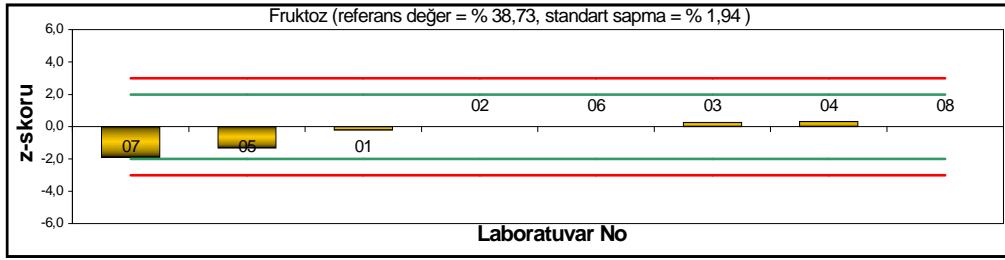
Lab. No	HMF				Glikoz				Fruktoz				Sakkaroz			
	Referans değer = 20,3 mg/kg				Referans değer = % 33,15				Referans değer = % 38,73				Referans değer = % 0,2			
	Standart sapma = 2,1 mg/kg				Standart sapma = % 1,66				Standart sapma = % 1,94				Standart sapma = % 0,03			
	Sonuç	s	Belirsizlik	z	Sonuç	s	Belirsizlik	z	Sonuç	s	Belirsizlik	z	Sonuç	s	Belirsizlik	z
01	20,35	0,0023	0	0,0	34,34	0,2526	0,01	0,7	38,29	0,0939	0,01	-0,2	0,16	0,0	0,0	-1,3
02	21,12	1,05	-	0,4	32,93	0,2	-	-0,1	38,73	0,19	-	0,0	0,25	0,0	-	1,7
03	23,61	-	-	1,6	33,23	-	-	0,0	39,26	-	-	0,3	0	-	-	-6,7
04	24,01	0,59	-	1,8	33,78	1,11	-	0,4	39,36	0,83	-	0,3	0,49	0,0	-	9,7
05	16	0,5	-	-2,0	31,26	0,26	-	-1,1	36,17	0,04	-	-1,3	-	-	-	-
06	-	-	-	-	31,73	-	-	-0,9	38,73	-	-	0,0	2,84	-	-	88,0
07	12,48	0,96	-	-3,7	33,15	0,16	-	0,0	35,05	0,04	-	-1,9	TEDB	-	-	-
08	16,656	-	-	-1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	1,776	-	-	52,5



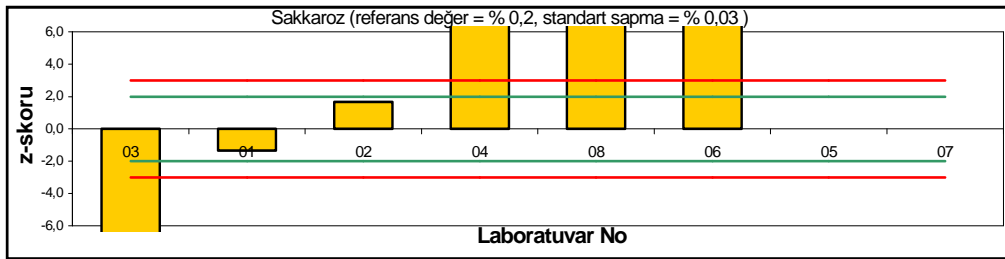
Şekil 1. Balda HMF tayini z-skorum



Şekil 2. Balda glikoz tayini z-skorum



Şekil 3. Balda fruktoz tayini z-skorum



Şekil 4. Balda sakkaroz tayini z-skorum

Tablo 4. Balda HMF, glikoz, fruktoz ve sakkaroz tayini z-skorlarının dağılımı

z-skoru	$ z \leq 2,0$		$2,0 < z < 3,0$		$ z \geq 3$		Laboratuvar Sayısı
	Laboratuvar Sayısı	%	Laboratuvar Sayısı	%	Laboratuvar Sayısı	%	
HMF	5	71	1	14	1	14,3	7
Glikoz	7	100					7
Fruktoz	7	100					7
Sakkaroz	2	33			4	67	6

Tablo 5. Sonuçların dağılımı

	HMF	Glikoz	Fruktoz	Sakkaroz
Laboratuvar sayısı (n)	7	7	7	6
Ortalama değer	19,2	31,3	37,9	0,919
Referans değer*	20,3	33,15	38,73	0,2
Standart sapma*	2,1	1,66	1,94	0,03
Maksimum değer*	24,01	34,34	39,36	2,84
Minimum değer*	12,48	31,26	35,05	0
Dağılım aralığı (Maks-Min)*	11,53	3,08	4,31	3

* HMF için mg/kg, diğerleri için %

7. KAYNAKLAR

1. ISO/IEC 17043: 2010, Conformity assessment - General Requirements for Proficiency Testing
2. ISO 13528: 2005, Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons
3. ISO/IEC 17025: 2005, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories
4. Farrant, T., Practical Statistics for the Analytical Scientist, RSC, 1997
5. Lawn, R.E., Thompson, M. and Walker F, R., Proficiency Testing in Analytical Chemistry, RSC, 1997
6. Thompson, M., Ellison, S.R. and Wood, R., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, Pure & Appl. Chem., Vol. 78, No. 1, p. 145-196, 2006
7. Boyer, K.W., Horwitz, W. and Albert, R., Analytical Chemistry, 57, 454-459, 1985
8. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi, Bal Tebliği, Tebliğ No: 2005/49
9. Balda HMF (Hidroksimetil Furfural), Glikoz, Fruktoz ve Sakkaroz Tayini Yeterlilik Testi Çalışması Protokolü, Ekim 2013

8. EK-1 ROBUST İSTATİSTİK

Robust istatistik ile veri setinde outlier yapmadan tüm verileri dikkate alarak değerlendirme yapılır. Bu durumda ortalama değer olarak median kullanılır.

Robust Ortalama (median)

Konsensus değer tüm katılımcıların sonuçlarının robust ortalaması (median) alınarak hesaplanabilir. Robust ortalama basit olarak “Median” olarak tanımlanır.

Tüm sonuçlar ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$) en küçükten en büyüğe doğru sıra dizilir. Sıraya dizilen sonuçlarda sonuç sayısı tek ise en ortadaki değer, eğer sonuç sayısı çift ise ortadaki iki değer ortalaması alınarak hesaplanan değer “median”dır.

Simetrik bir dağılımda “median” ve ortalama değer birbirinin aynıdır. Median çok farklı değerlerden etkilenmez.

$$X = \begin{cases} X_m & n \text{ tek sayı ise } 1, 3, 5 \\ \frac{X_m + X_{m+1}}{2} & n \text{ çift sayı ise } 2, 4, 6 \end{cases}$$

Örnek

Sonuç (g)	5,6	5,4	5,5	5,4	5,6	5,3	5,2
Küçükten büyüğe sıralanmış değerler							
Sonuç (g)	5,2	5,3	5,4	5,4	5,5	5,6	5,6

Median = 5,4