

Sütlü Çikolatalarda Kurşun ve Kadmiyum Elementlerinin ICP-OES ile Tespiti ve Metod Validasyon Çalışması

Fatma HEPSAĞ^{1*}, İbrahim HAYOĞLU²

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Gıda Teknolojisi Programı, 80760, Osmaniye

²Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 63040, Şanlıurfa

¹<https://orcid.org/0000-0002-3688-4106>

²<https://orcid.org/0000-0002-6358-8302>

*Sorumlu yazar: fatmahepsag@osmaniye.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 23.12.2021

Kabul tarihi: 14.03.2022

Online Yayınlanma: 18.07.2022

Anahtar Kelimeler:

Çikolata
Kadmiyum
Kurşun
Kakao
Validasyon
ICP-OES

ÖZ

Bu çalışmada, induktif olarak eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) ile çikolatada kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) elementlerin tespiti için metod validasyon çalışması yapılmıştır. Validasyon parametreleri olarak, tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), lineer ölçüm aralığı, hassasiyet ve kesinlik belirlenmiştir. Çalışmada, Sertifikalı Referans Materyalleri (CRM) kullanılmıştır. Tekrarlanabilirlik, Pb için 0,0365-1,197 ppm, Cd için 0,064-0,247 ppm, doğruluk sırasıyla 0,365-1,255 ve 0,065-0,247 ppm aralığında iken geri kazanım oranları ise %71,51-96,56 ve %64,10-88,05 olarak belirlenmiştir. Çalışmada 20 sütlü çikolata örnekleri incelenmiş olup, Pb ve Cd konsantrasyonları sırasıyla 0,004-0,009 ve 0,001-0,002 ppm aralığında tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri ise Pb için 0,005 ve 0,016, Cd için 0,001 ve 0,002 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların, Eurachem “The Fitness for Purpose of Analytical Methods” Second Edition 2014’e ve NMKL 161 metodu ve Türk Gıda Kodeksi “Gıdalarda kurşun, kadmiyum, cıva, inorganik kalay, 3-MCPD, 2 diol ve polisiklik aromatik hidrokarbon seviyelerinin resmi kontrolü için numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri tebliğine (Tebliğ No: 2014/2) göre uygun olduğu görülmüştür.

Determination of Lead and Cadmium Elements in Milk Chocolate with ICP-OES and Method Validation Study

Research Article

Article History:

Received: 23.12.2021

Accepted: 14.03.2022

Published online: 18.07.2022

Keywords:

Chocolate
Cadmium
Lead
Cocoa
Validation
ICP-OES

ABSTRACT

In this study, a method validation study was performed for the determination of lead (Pb), cadmium (Cd) elements in chocolate by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). As the validation parameters, determination limit (LOD), measurement limit (LOQ), linear measurement range, sensitivity and precision were determined. Certified Reference Materials (CRM) were used in the study. Repeatability was in the range of 0,0365-1,197 ppm for Pb, 0,064-0,247 ppm for Cd, accuracy between 0,365-1,255 and 0,065-0,247 ppm, respectively. Recovery rates were determined as 71,51-96,56% and 64,10-88,05%. In the study, 20 milk chocolate samples were examined, Pb and Cd concentrations were determined between 0,004-0,009 and 0,001-0,002 ppm, respectively, and LOD and LOQ values were calculated as 0,005 and 0,016 for Pb, 0,001 and 0,002 for Cd. The results obtained, Eurachem “The Fitness for Purpose of Analytical Methods” Second Edition 2014 and NMKL 161 method and Turkish Food Codex “Lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD, 2

diol and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in foods sampling, sample preparation and analysis method criteria were found to be appropriate for the control according to the communique (Communique No: 2014/2).

To Cite: Hepsağ F., Hayoğlu İ. Sütü Çikolatalarda Kurşun ve Kadmiyum Elementlerinin ICP-OES ile Tespiti ve Metod Validasyon Çalışması. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2022; 5(2): 871-884.

1. Giriş

Her ne kadar kakao içeren gıdalar, temel gıdalara kıyasla az miktarlarda tüketilse de potansiyel olarak yüksek Cd konsantrasyonları nedeniyle beslenmemizde önemli yer tutmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), kakao bazlı ürünlerle Cd alımının, Avrupa nüfusunun günlük toplam gıda tüketiminin %4,3'ünü oluşturduğunu belirtmektedir (EFSA, 2012).

Çikolata, dünyada en çok tüketilen kakao bazlı üründür. Çikolataların ve diğer kakao ürünlerinin düzenli ve orta derecede tüketimi, antioksidan aktiviteleri, yüksek karbonhidrat içeriği ve Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn ve Zn gibi bazı elementleri yüksek miktarda içermesi nedeniyle sağlığa katkısı önemlidir (Crozier ve ark., 2001; Sager, 2012). Olumlu sağlık etkilerinin yanında, çikolatanın hoş ve lezzetli oluşu muhtemelen popülerliklerinin ana nedenidir (Bruinsma ve Taren, 1999; Parker ve ark., 2006).

Çikolata ürünlerinin kimyasal bileşimi yıllardır araştırılmaktadır (Dahiya ve ark., 2005; Rehman ve Husnain, 2012; Villa ve ark., 2014). Kakaodan üretilen ürünlerde elementlerin bulunması ile ilgili çalışmaların çoğu, minerallerin toplam konsantrasyonlarının belirlenmesine yöneliktir. Villa ve ark., (2014) çikolata örneklerindeki Cd ve Pb'nin toplam içeriğini, bu elementlerin konsantrasyonlarının kakao içeriği ile doğrusal olarak arttığını ve beklendiği gibi koyu renkli çikolataların Cd ve Pb'nin en yüksek konsantrasyonlarını sunduğunu göstermiştir (Sager, 2012). Son dönemde yapılan birçok çalışma, kakao türevi ürünlerdeki Cd konsantrasyonunun kakao içeriğiyle ilişkili olduğunu ve Cd'nin hammaddeden (kakao uçları) kaynaklandığını gösteren benzer sonuçlar bildirilmiştir (Yanus ve ark., 2014; Abt ve ark., 2018; Vanderschueren ve ark., 2019).

Yapılan birçok çalışma, çikolata ürünlerinde Pb ve Cd mevcudiyetinin doğal olarak hammaddeden ve işlenmeye bağlı olabileceğini savunmuşlardır. Bu metaller, doğrudan kakao ağacı tarafından emilebilir, hazırlama işlemi sırasında bulaşabilir veya mutfak eşyaları, çevre kirliliği veya nakliye ve depolama yoluyla kontaminasyondan kaynaklanabilir, dolayısıyla nihai üründe de bulunabilirler (Lee ve Low, 1985; Mesallam, 1987; Rankin ve ark., 2005).

Cd, böbrek ve prostatta, toksik olarak tümör baskılayıcı proteinler ve DNA onarımında bozulmalara Grup1 Kanserojen olarak (IARC, 2012), Pb ise sinir sisteminde, DNA onarımında bozulmalara Grup 2A kanserojen olarak (IARC, 2002) toksidite etkileri bulunmaktadır.

Bu çalışmadaki amaç, çikolata örneklerindeki Pb ve Cd elementlerinin ICP-OES ile tespiti ve validasyon çalışmalarını yapmaktır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmamızda 20 adet sütlü çikolata örnekleri kullanılmıştır. Çikolata örnekleri, 2020 yılında Gaziantep, Adana, Kahramanmaraş ve Mersin illerindeki marketlerden temin edilmiştir. Örneklerin analizleri yapıncaya kadar 5°C'de bekletilmiştir.

2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı

HNO₃ (%65 saflıkta, Merck), %0,4'lük HNO₃ çözeltisi yıkama çözeltisi olarak ve kalibrasyon standartları hazırlamada kullanılmıştır. Konsantre %65'lik nitrik asitten yaklaşık 7 ml alınıp ve balon jodede ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. %6,5'lik HNO₃ çözeltisi, 100 ml konsantre %65'lik HNO₃'ten alınıp ve balon jodede 1000 ml'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır. Standart çalışma çözeltisi (10 ppm) standart stok çözeltilerden (1000 ppm) 1 ml alınarak ultra saf su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır. Kalibrasyon çözeltileri Merck marka Cd, Pb standartları kullanılarak hazırlanmıştır.

2.2. Örneklerin hazırlanması ve analiz işlemleri

Örnekler blenderde öğütülüp ve homojen olarak karıştırıldıktan sonra yaklaşık 0,20-1,00 g arasında teflon örnek yakma kabına konulmuştur. Üzerine 10 mL HNO₃ (%65 saflıkta) eklenerek 20 dakika çeker ocakta bekletilmiştir. Süre sonunda teflon kapların kapakları kapatılarak mikrodalga (Elektrolux EMS 21400 S model) yakma cihazına yerleştirilmiştir. 1 saat süren yakma işlemi sonunda kaplar çıkartılarak 20 dakika çeker ocakta soğuması için bekletilmiştir. Soğuyan kapların içeriği huni yardımı ile balon jojeye aktarılıp ve ultra saf su (MILLIPORE Milli-QIQ 7000) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler daha sonra ICP-OES (Optima 2100, Perkin Elmer England) cihazında okutularak konsantrasyon miktarları 1 no'lu formülle hesaplanmıştır (ISO, 2010).

$$\text{Analiz Miktarı (ppm)} = \text{KD} \times \text{SF} \quad (1)$$

KD: ICP - Axial 'de Okunan Konsantrasyon Miktarı (mg/L)

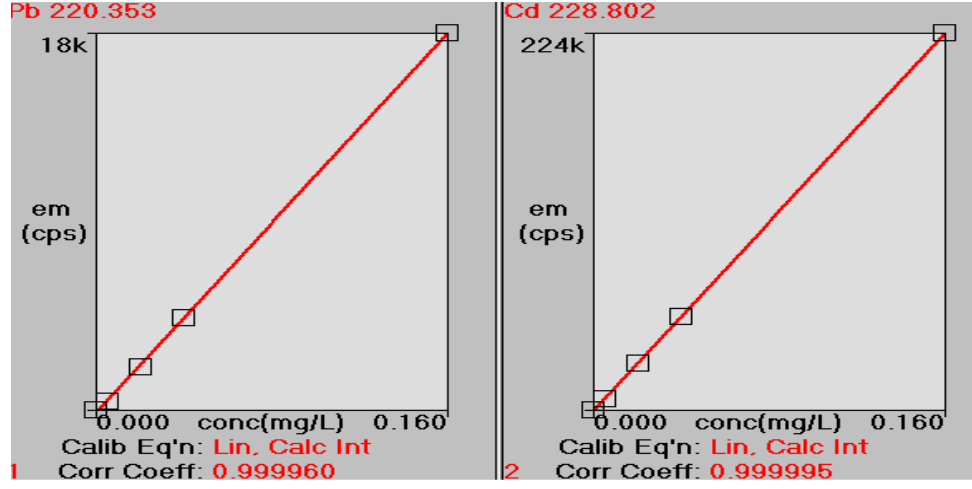
SF: Seyreltme Faktörü

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti

Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışması için kurşun ve kadmiyum standartları (0,005 ppm-0,02 ppm-0,04 ppm-0,16 ppm) ile hazırlanmıştır. Cihazda kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Örnek kullanmaksızın örneğe uygulanan tüm işlemlerin yapıldığı (reagent), birbirinden bağımsız 20 farklı teflon örnek kaplarında yakma işlemi yapılmıştır. Örneğe uygulanan seyreltme oranında seyreltilerek cihazda, gün içinde, 20 farklı kurşun ve kadmiyum okuması yapılmıştır. Elde edilen

değerler kullanılarak Eurachem “The fitness for purpose of Analytical Methods”e göre tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) hesaplanmıştır (EURACHEM GUIDE, 2014).



Şekil 1. Pb ve Cd için kalibrasyon eğrileri

Tablo 1. Örneklere ait Pb ve Cd miktarları

Analiz no	Kurşun (Pb) (ppm)	Kadmiyum (Cd) (ppm)
1	0,007	0,001
2	0,004	0,001
3	0,004	0,001
4	0,005	0,001
5	0,006	0,001
6	0,006	0,001
7	0,006	0,001
8	0,007	0,001
9	0,006	0,001
10	0,006	0,001
11	0,007	0,001
12	0,006	0,002
13	0,006	0,001
14	0,006	0,001
15	0,008	0,001
16	0,005	0,001
17	0,006	0,001
18	0,006	0,001
19	0,006	0,002

20	0,009	0,002
ORT	0,006	0,001
SD	0,001	0,001
LOQ	0,016	0,002
LOD	0,005	0,001

ORT: Ortalama, SD: Standart hata, LOQ: Ölçüm limiti, LOD: Tespit limiti.

3.2. Lineer ölçüm aralığı

Lineer ölçüm aralığını belirlemek için Pb ve Cd'da, gün içinde, 4 farklı konsantrasyonda okuma yapılmış ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir:

Tablo 2. Pb ce Cd için lineer ölçüm aralığı ve miktarları

Pb		Cd	
Konsantrasyon (ppm)	Miktar	Konsantrasyon (ppm)	Miktar
0,005	431,800	0,005	6772,100
0,020	2042,800	0,020	28038,800
0,040	4341,800	0,040	55239,700
0,160	17700,000	0,160	223655,400

3.3. Kesinlik

3.3.1. Tekrarlanabilirlik

Bu amaçla çikolata matriksinde kurşun ve kadmiyum minerallerinin her biri için gün içinde, üç farklı konsantrasyonda toplam 72 geri kazanım çalışması yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 3'de verildiği gibidir:

Tablo 3. Tekrarlanabilirlik için Pb ve Cd'da geri kazanım çalışmaları

Analiz no	Pb			Cd		
	0,5 ppm	1 ppm	1,5 ppm	0,1 ppm	0,2 ppm	0,3 ppm
1	0,381	0,854	1,187	0,077	0,167	0,244
2	0,393	0,931	1,165	0,076	0,175	0,246
3	0,404	0,838	1,182	0,064	0,161	0,222
4	0,388	0,828	1,197	0,066	0,161	0,234
5	0,391	0,908	1,144	0,082	0,169	0,225
6	0,388	0,924	1,154	0,081	0,172	0,244
7	0,365	0,952	1,172	0,065	0,175	0,237
8	0,390	0,966	1,185	0,083	0,176	0,199
9	0,396	0,959	1,073	0,083	0,172	0,232

10	0,385	0,895	1,185	0,083	0,166	0,247
11	0,389	0,878	1,176	0,077	0,167	0,244
ORT	0,388	0,903	1,166	0,075	0,169	0,234
SD	0,010	0,049	0,034	0,008	0,005	0,014
RSD	0,025	0,054	0,030	0,101	0,032	0,061

ORT: Ortalama, SD: Standart hata, RSD: Standart sapma

3.3.2. Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrarlanabilirlik limiti 2 no'lu formüle göre hesaplanmıştır.

$$r = 2,8 \times sr \quad r: \text{Tekrarlanabilirlik limiti}; sr: \text{Standart sapma} \quad (2)$$

HORRAT değeri de 3 no'lu formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{HORRAT (r)} = \text{RSD (r)} / \text{PRSD (R)} \quad (3)$$

$\text{HORRAT (R)} = \text{RSD (R)} / \text{PRSD (R)}$; $\text{PRSD (R)} = 2 \times C(-0,15)$: Tahmin edilen tekrar üretilebilirlik RSD'si; RSD (r): Tekrarlanabilirlik RSD'si; RSD (R): Tekrar Üretilebilirlik RSD'si; C: Kütle Konsantrasyonu (konsantrasyon %100 ise kütle konsantrasyonu 1; konsantrasyon 1 ppm ise kütle konsantrasyonu 0,000001 olarak alınmıştır.)

Tekrarlanabilirlik limiti ve Horrat değeri tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4'de verilmiştir:

Tablo 4. Tekrarlanabilirlik limiti ve Horrat değeri tekrarlanabilirlik sonuçları

Validasyon parametreleri	Pb			Cd		
	0,05	0,1	0,15	0,05	0,1	0,15
Tekrarlanabilirlik limiti	0,027	0,136	0,096	0,021	0,015	0,040
HORRAT değeri tekrarlanabilirlik	0,140	0,339	0,197	0,450	0,156	0,320

3.3.3. Tekrar Üretilebilirlik

Bu amaçla çikolata matriksinde kurşun ve kadmiyum minerallerinin her biri için gün içinde, üç farklı konsantrasyonda toplam 36 geri kazanım çalışması yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 5'de verildiği gibidir:

Tablo 5. Tekrar üretilebilirlik için Pb ve Cd'da geri kazanım çalışmaları

Analiz No	Pb			Cd		
	0,5 ppm	1 ppm	1,5 ppm	0,1 ppm	0,2 ppm	0,3 ppm
1	0,391	0,805	1,166	0,084	0,159	0,237
2	0,403	0,812	1,255	0,086	0,165	0,253
3	0,378	0,754	1,147	0,082	0,152	0,237
4	0,404	0,828	1,1973	0,052	0,161	0,237

5	0,365	0,91	1,073	0,083	0,169	0,199
6	0,389	0,966	1,176	0,077	0,176	0,247
ORT	0,389	0,845	1,169	0,077	0,164	0,235
ort	0,388	0,825	1,216	0,081	0,163	0,242
SD	0,015	0,077	0,060	0,013	0,008	0,019
RSD	0,058	0,077	0,105	0,108	0,053	0,077

ORT: Ortalama, SD: Standart hata, RSD: Standart sapma

Tekrar üretilebilirlik limiti

Tekrar üretilebilirlik limiti 4 no'lu formüle göre hesaplanmıştır.

$$RSD = 2,8 \times SD \quad RSD: \text{Tekrar üretilebilirlik limiti}; SD: \text{standart sapma} \quad (4)$$

Tekrar üretilebilirlik limiti ve Horrat değeri tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 6'da verilmiştir:

Tablo 6. Tekrar üretilebilirlik limiti ve Horrat değeri tekrarlanabilirlik sonuçları

Validasyon parametreleri	Pb			Cd		
	0,05	0,1	0,15	0,05	0,1	0,15
Tekrar üretilebilirlik limiti	0,063	0,177	0,036	0,024	0,024	0,052
HORRAT değeri tekrarlanabilirlik	0,389	0,524	0,633	0,470	0,299	0,365

3.4. Doğruluk

Doğruluk için gerçeklik çalışması geri kazanım ile yapılmıştır. Geri kazanım için çikolata matriksinde kurşun ve kadmiyum minerallerinin her biri için gün içinde, üç farklı konsantrasyonda toplam 84 geri kazanım çalışması yapılmıştır. % Hata (Bias) 5 no'lu formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{Hata (Bias)} = [(X_i - X_t) / X_t] \times 100, \quad X_i: \text{Ölçülen değer}; X_t: \text{Gerçek değer.} \quad (5)$$

Sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir:

Tablo 7. Doğruluk için Pb ve Cd'da geri kazanım çalışmaları sonuçları

Analiz No	Pb			Cd		
	0,5 ppm	1 ppm	1,5 ppm	0,1 ppm	0,2 ppm	0,3 ppm
1	0,381	0,854	1,187	0,077	0,167	0,244
2	0,393	0,931	1,165	0,076	0,175	0,246
3	0,404	0,838	1,182	0,064	0,161	0,222
4	0,388	0,828	1,197	0,066	0,161	0,234
5	0,391	0,908	1,144	0,082	0,169	0,225
6	0,388	0,925	1,154	0,065	0,172	0,244

7	0,365	0,952	1,172	0,083	0,175	0,237
8	0,390	0,966	1,185	0,082	0,176	0,199
9	0,396	0,959	1,073	0,082	0,172	0,232
10	0,385	0,895	1,185	0,077	0,166	0,247
11	0,389	0,878	1,176	0,084	0,167	0,244
12	0,391	0,805	1,166	0,086	0,158	0,237
13	0,403	0,812	1,255	0,082	0,164	0,253
14	0,378	0,754	1,147	0,082	0,152	0,237
Xi	0,389	0,879	1,171	0,077	0,167	0,236
Xt	0,500	1,000	1,500	0,100	0,200	0,300
%Hata	-22,220	12,110	-21,960	-22,620	-16,600	-21,440

3.5. Geri Kazanım

Geri kazanım için çikolata matriksinde kurşun ve kadmiyum minerallerinin her biri için gün içinde, üç farklı konsantrasyonda toplam 84 geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanım oranı 6 no'lu formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%R = [(CF-CU)/CA] \times 100 \quad (6)$$

%R: Geri kazanım; CF: Standart eklenmiş kör örnek ölçüm sonucu; CU: Standart eklenmemiş kör örnek ölçüm sonucu; CA: Eklenen standart miktarı.

Sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir:

Tablo 8. Pb ve Cd için geri kazanım sonuçları

Analiz No	Pb						Cd					
	0,5 ppm	%Geri Kazanım	1 ppm	%Geri Kazanım	1,5 ppm	%Geri Kazanım	0,1 ppm	%Geri Kazanım	0,2 ppm	%Geri Kazanım	0,3 ppm	%Geri Kazanım
1	0,381	76,270	0,854	85,400	1,187	79,150	0,077	77,100	0,167	83,500	0,244	81,270
2	0,393	78,670	0,931	93,120	1,165	77,680	0,076	75,600	0,175	87,450	0,246	81,970
3	0,404	80,790	0,838	83,800	1,182	78,790	0,064	64,100	0,161	80,500	0,222	74,030
4	0,388	77,630	0,828	82,830	1,197	79,820	0,066	66,200	0,161	80,650	0,234	78,070
5	0,391	78,250	0,908	90,800	1,144	76,290	0,082	82,200	0,169	84,550	0,225	74,830
6	0,388	77,630	0,925	92,450	1,154	76,920	0,065	64,900	0,172	85,800	0,244	81,300

7	0,365	73,090	0,952	95,240	1,172	78,160	0,083	82,500	0,175	87,650	0,237	78,900
8	0,390	78,070	0,966	96,560	1,185	78,970	0,082	82,400	0,176	88,050	0,199	66,500
9	0,396	79,170	0,959	95,880	1,073	71,510	0,082	82,400	0,172	86,150	0,232	77,330
10	0,385	77,070	0,895	89,510	1,185	78,970	0,077	76,600	0,166	82,900	0,247	82,270
11	0,389	77,790	0,878	87,780	1,176	78,400	0,084	83,900	0,167	83,350	0,244	81,270
12	0,391	78,240	0,805	80,540	1,166	77,740	0,086	85,700	0,158	79,000	0,237	78,870
13	0,403	80,620	0,812	81,210	1,255	83,690	0,082	82,300	0,164	82,150	0,253	84,200
14	0,378	75,660	0,754	75,400	1,147	76,430	0,081	82,200	0,152	75,850	0,238	79,100
ORT	0,388	77,780	0,879	87,890	1,171	78,040	0,077	77,380	0,167	83,400	0,236	78,560
SD	0,009	1,960	0,066	6,540	0,039	2,610	0,008	7,620	0,007	3,560	0,014	4,480

3.6. Belirsizlik Kaynakları ve Hesaplamaları

Kesinlikten gelen belirsizlik, tekrar üretilebilirlik çalışmalarının matris ve her konsantrasyon için hesaplanan rölatif standart sapması kesinlik belirsizliği olarak alınmıştır. Doğrudan gelen belirsizlik, geri kazanım çalışmalarının ortalamalarının 1'den farkı 7 no'lu formülle hesaplanmıştır.

$$t = \frac{|1 - \bar{R}|}{u(\bar{R})} \quad \bar{R} : \text{Geri alma oranlarının ortalaması}$$

$$u(\bar{R}) : \text{Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması (yani } s / \sqrt{n} \text{)} \quad (7)$$

Geri kazanım çalışmasının ortalaması, matris ve tüm konsantrasyonlarda 1'den farkı önemli bulunmuş ve doğrudan gelen belirsizlik 8 no'lu formülle hesaplanmıştır.

$$u(R_a) = \sqrt{\left(\frac{1 - \bar{R}}{k}\right)^2 + u(\bar{R})^2} \quad (8)$$

$u(R_a)$: Geri kazanımdan gelen artırılmış belirsizlik; \bar{R} : Geri kazanım oranlarının ortalaması; k : Genişletilmiş belirsizlik hesabında kullanılan kapsama faktörü; $u(\bar{R})$: Geri kazanım oranlarının ortalamalarının standart sapması (yani s/\sqrt{n}).

3.7. Belirsizlik Sonuç Tablosu

Belirsizlik bileşenleri ve elde edilen sonuçlar Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Belirsizlik sonuçları

	Pb			Cd		
	0,5 ppm	1 ppm	1,5 ppm	0,1 ppm	0,2 ppm	0,3 ppm
Kesinlik	0,058	0,077	0,105	0,108	0,053	0,077
Doğruluk	0,114	0,083	0,084	0,099	0,086	0,089
Birleştirilmiş Belirsizlik	0,128	0,113	0,134	0,147	0,101	0,118
Genişletilmiş Belirsizlik (%95 güvenle, k=2)	0,256	0,226	0,269	0,294	0,202	0,236

Validasyon çalışmalarından elde ettiğimiz sonuçlardan, tekrarlanabilirlik, Pb için 0,0358-0,1771 ppm, Cd için 0,0244-0,0519 ppm, doğruluk sırasıyla 0,3889-1,1706 ve 0,0774-0,2357 ppm aralığında idi. Geri kazanım oranları ise 77,78-87,89 ve 77,38-83,4 olarak belirlenmiştir. Çalışmada 20 sütlü çikolata örnekleri incelenmiş olup, Pb ve Cd konsantrasyonları sırasıyla 0,0038-0,0079 ve 0,0011-0,0019 ppm aralığında tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların, Eurachem “The Fitness for Purpose of Analytical Methods” Second Edition 2014’e (Eurachem-Guide, 2014) e NMKL 161 metodu ve Türk Gıda Kodeksi “Gıdalarda kurşun, kadmiyum, cıva, inorganik kalay, 3-MCPD, 2 diol ve polisiklik aromatik hidrokarbon seviyelerinin resmi kontrolü için numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri tebliğine (Tebliğ No: 2014/2) (NMKL 161 Metodu ve Türk Gıda Kodeksi, 2014) göre uygun olduğu görülmüştür.

Yapılan bir diğer çalışmada, sırasıyla sütlü çikolatada ortalama Pb oranı 0,034 ppm (0,012-0,395) olarak bulunmuştur. Aynı çalışmanın çikolata örneklerinde bulunan Cd konsantrasyonlarının çoğu oldukça düşük miktarda bulunmuştur (ortalama 0,043 ppm), ancak 7 örnekte >0,30 ppm üzerinde tespit edilmiştir (Sager, 2012).

Malezya'daki bir diğer çalışmada sütlü çikolata örneklerinde Cd miktarı ortalama 0,29 ppm (0,26-0,42) ve bitter çikolata örneklerinde 0,30-0,42 ppm tespit edilmiştir (Lee ve Low, 1985). 2004 yılında, Hindistan'da satılan çikolata örneklerinde yapılan bir diğer çalışmada Pb oranları bitter çikolata için 0,24-2,04 ppm ve sütlü çikolata için 0,23-2,62 ppm aralığında, Cd ise genel olarak tüm örneklerde ortalama 0,07 ppm (0,01-0,85) olarak tespit edilmiştir (Seifert ve ark., 2000). Polonya'da, incelenen çikolata örneklerinde Pb oranları koyu çikolatalar (süt içermeyen) için 0,044±0,011 ve sütlü çikolatalar için 0,049±0,026 olarak tespit edilmiştir. Örneklerde Cd için Polonya ulusal standardına (0,050 ppm) uymayan hiçbir örneğe ulaşılamamıştır (Dahiya ve ark., 2005; Figurska-Ciura ve ark., 2006).

Rankin ve ark., (2005) ikolata örneklerindeki Pb konsantrasyonunun (0,070-0,230 ppm) ortalama olarak ham kakao çekirdeklerinden ($\leq 0,0005$ ppm) ok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Duran ve ark., (2009) kakao türevi Őekerlerde Cd ve Pb seviyelerini 1,347 ppm, 0,681 ppm olarak belirlemişlerdir. Benzer Őekilde, Abt ve ark., (2018) ABD pazarındaki ikolatalardaki Cd ve Pb seviyelerini araştırmışlardır. Bulguları, ikolatalardaki kakao tozunun miktarı ile Pb ve Cd miktarının doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Mounicou ve ark., (2003) sekiz ülkeden getirdikleri kakao örneklerinde Cd ve Pb miktarları oldukça farklılıklar göstermiştir. Manton, (2010) tarafından yapılan benzer bir çalışmada da on iki ülkeden toplanan kakao örneklerinde Pb ilgili coğrafi varyasyonlar bulunmuştur. Villa ve ark., (2014) ikolata örneklerinde bulunan kakao içeriği ile Pb ($R^2= 0,955$) ve Cd ($R^2= 0,907$) arasında pozitif yönde güçlü bir korelasyon olduğunu vurgulamışlardır. Gramlich ve ark., (2016) Honduras'ta satılan kakao çekirdeklerini Cd açısından değerlendirmiş ortalamayı 1,1 ppm olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca kakao çekirdeklerinin toprak faktörlerine göre değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir. Gramlich ve ark., (2016) Bolivya'da satılan kakao çekirdeklerinde ortalama Cd konsantrasyonu 0,21 ppm olarak bulmuşlardır. Chavez ve ark., (2016a; 2016b) araştırılan on beş farklı yerde yetişen kakao çekirdeklerinin %73'ünün 0,6 ppm'den fazla Cd içerdiğini bildirmişlerdir.

Sonuçta, ikolata gibi kakao içeren gıda ürünlerinde kadmiyum ve kurşun seviyelerini değerlendirmek için yapılan çalışmaların farklı sonuçlar verdiği görülmektedir. Kakao içeren ürünlerin kurşun ve kadmiyum içeriklerini etkileyen faktörlerin en önemli sebeplerinden birinin yapılan çalışmalarda kakaonun yetiştirildiği toprak, kültürel ve işleme faktörlerinin olduğu söylenebilir (Kruszewski ve ark., 2018).

4. Sonuç

Avrupa çapında yapılan yeterlilik testlerinden elde edilen verilere göre, %50 genişletilmiş belirsizlik değerinin (%95 güven aralığı, $k=2$), laboratuvarlar arası farklılıkları kapsadığı tespit edilmiş ve resmi kontrollerde bu değerin dikkate alınması önerilmiştir. Yapılan alışmalarda, NMKL 161 metodu ve Türk Gıda Kodeksi “Gıdalarda kurşun, kadmiyum, cıva, inorganik kalay, 3-MCPD, 2 diol ve polisiklik aromatik hidrokarbon seviyelerinin resmi kontrolü için numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri tebliği (Tebliğ No: 2014/2) dokümanının ilgili bu maddesine dayanılarak, çalışmamızda bulunan genişletilmiş belirsizlik değerinin %50'nin altında olduğu görülmüştür. Ayrıca alışmamızda elde ettiğimiz çikolata rneklerinin Pb ve Cd konsantrasyonlarında, Eurachem “The fitness for purpose of Analytical Methods” Second Edition ve NMKL 161 metodu ve Türk Gıda Kodeksi dökümanına uygun değerlerdir.

ıkar atışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar atışması olmadığını beyan eder.

Araştırmacı Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye aynı oranda katkı sağlamış olduğunu beyan eder.

5. Kaynakça

- Abt E., Sam JF., Gray P., Robin LP. Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives & Contaminants: Part B* 2018; 11(2): 92-102.
- Bruinsma K., Taren DL. Chocolate: food or drug. *Journal of The American Dietetic Association*, 1999; 99: 1249-1256.
- Chavez E., He ZL., Stoffella PJ., Mylavarapu R., Li Y., Baligar VC. Evaluation of soil amendments as a remediation alternative for cadmium-contaminated soils under cacao plantations. *Environmental Science Pollution Research* 2016a; 23: 17571–17580.
- Chavez E., He ZL., Stoffella PJ., Mylavarapu RS., Li YC., Baligar VC. Chemical speciation of cadmium: an approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere* 2016b; 150: 57–62.
- Crozier SJ., Preston AG., Hurst JW., Payne MJ., Mann J., Hainly L., Miller DL. Cacao seeds are a “super fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central Journal* 2001; 5: 1-6.
- Dahiya S., Karpe R., Hedge AG., Sharma RM. Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. *Journal Food Composition and Analysis* 2005; 18: 517-522.
- Duran A., Tuzen M., Soylu M. Trace metal contents in chewing gums and candies marketed in Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 2009; 149: 283–289.
- EFSA. Cadmium dietary exposure in the European population *EFSA Journal* 2012; 10(2551).
- Eurachem Guide. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* 2014; Second Edition.
- Figurska-Ciura D., Styczynska M., Malicki A., Bruzewicz S. Zawartość wybranych metali ciężkich oraz zanieczyszczeń mikrobiologicznych w wyrobach czekoladowych. *Acta Scientiarum Polonorum Medicina Veterinaria* 2006; 5: 57-63.
- Gramlich A., Tandy S., Gauggel C., Lopez M., Peria DG., Schulin R. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. 18th International Conference on Heavy Metals in the Environment, Ghent, 2016; Belgium.
- Gramlich A., Tandy S., Andres C., Paniagua JC., Armengot L., Schneider M., Schulin R. Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *The Science of the Total Environment* 2017; 580: 677–686.
- Grivetti LI., Shapiro H. *Chocolate: History, culture and heritage*. Wiley, 2009; Hoboken.

- IARC. Traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2002; 82: 1–556.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations, A review of human carcinogens, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2012; 100: 224–248.
- ISO. UNI EN 15763:2010. Foodstuff, Determination of trace elements, Determination of arsenic, cadmium, mercury and lead in foodstuff by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after pressure digestion. 2010.
- Kruszewski B., Obiedziński MW., Kowalska J. Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. *Journal of Food Composition and Analysis* 2018; 66: 127–135.
- Lee CK., Low KS. Determination of cadmium, lead, copper and arsenic in raw cocoa, semi finished and finished chocolate products. *Pertanika* 1985; 8: 243-248.
- Manton WIIM. Determination of the provenance of cocoa by soil protolith ages and assessment of anthropogenic lead Contamination by Pb/Nd and lead isotope ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 713-721.
- Mesallam AS. Heavy metal content of canned orange juice as determined by direct current plasma atomic emission spectrophotometry (DCPAES). *Food Chemistry* 1987; 26(1): 47-58.
- Mounicou S., Szpunar J., Andrey D., Blake C., Lobinski R. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Addition Contamination* 2003; 20: 343–352.
- NMKL 161 Metodu ve Türk Gıda Kodeksi. “Gıdalarda kurşun, kadmiyum, cıva, inorganik kalay, 3-MCPD, 2 diol ve polisiklik aromatik hidrokarbon seviyelerinin resmi kontrolü için numune alma, numune hazırlama ve analiz metodu kriterleri tebliği (Tebliğ No: 2014/2) 2014.
- Parker G., Parker I., Brotchie H. Mood state effects of chocolate. *Journal of Affective Disorders* 2006; 92: 149-159.
- Rankin CW., Nriagu JO., Aggarwal JK., Arowolo TA., Adebayo K., Flegal AR. Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113(10): 1344-1348.
- Rehman S., Husnain SM. Assessment of trace metal contents in chocolate samples by atomic absorption spectrometry. *Journal Trace Element Analysis* 2012; 1: 1-11.
- Sager M. Chocolate and cocoa products as a source of essential elements in nutrition. *Journal Nutritional & Food Science* 2012; 2: 1-10.
- Seifert M., Jaritz M., Holzinger S., Seeber O., Anke M. Alimentary strontium intake: first results in Germany. *Trace Elements in Medicine* 2000; 17: 115-118.

- Vanderschueren R., Montalvo D., De Ketelaere B., Delcour JA., Smolders E. The elemental composition of chocolates is related to cacao content and origin: A multi-element fingerprinting analysis of single origin chocolates. *Journal of Food Composition and Analysis* 2019; 83: 103277.
- Villa JEL., Peixoto RRA., Cadore S. Cadmium and lead in chocolates commercialized in Brazil. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 2014; 62: 8759-8763.
- Yanus RL., Sela H., Borojovich EJC., Zakon Y., Saphier M., Nikolski A., Gutflais E., Lorber A., Karpas Z. Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. *Talanta* 2014; 119: 1-4.