

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LC-MS/MS-TQ YÖNTEMİ İLE TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA
JELATİN KAYNAĞININ TÜR BAZLI TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazan BİNGÖL YILMAZ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

TEMMUZ 2025

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LC-MS/MS-TQ YÖNTEMİ İLE TAKVİYE EDİCİ GİDALARDA
JELATİN KAYNAĞININ TÜR BAZLI TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazan BİNGÖL YILMAZ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay YEMİŞ

TEMMUZ 2025

Nazan BİNGÖL YILMAZ tarafından hazırlanan “LC-MS/MS-TQ Yöntemi İle Takviye Edici Gıdalarda Jelatin Kaynağının Tür Bazlı Tanımlanması ” adlı tez çalışması 28.07.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Prof. Dr. Abdil ÖZDEMİR**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Prof. Dr. Gökhan BORAN**
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Prof. Dr. Oktay YEMİŞ** (Danışman)
Sakarya Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “LC-MS/MS-TQ YÖNTEMİ İLE TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA JELATİN KAYNAĞININ TÜR BAZLI TANIMLANMASI” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

28/07/2025

Nazan BİNGÖL YILMAZ



TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi yüksek lisans eğitim maceramın başladığı günden bugüne kadar desteğini ve bilgisini hiç eksik etmeyen, bilgileri ve tecrübesiyle yoluma ışık tutan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Oktay YEMİŞ'e tüm saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca ayrıca desteğini eksik etmeyen, çalışmalarımda tüm laboratuvar koşullarını sağlayan İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu stresli ve yoğun süreçte bilgi ve tecrübesiyle her türlü desteği sunan İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvarı Kimyasal Analizler Birim Şefim Sayın Selim SÜNNETÇİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu süreçte varlıklarıyla hayatımı ve çalışmalarımı kolaylaştıran, güzelleştiren isimlerini buraya sığdıramayacağım sevgili arkadaşlarım, dostlarım sizlere de çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi, manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve bu günlere gelmemde en büyük katkıları olan anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Moral ve motivasyon kaynağım, her zaman bana inanan ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşim, yol arkadaşım Taşkın YILMAZ'a sonsuz sevgilerimi sunar, teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Jelatin	5
2.1.1. Jelatinin fizikokimyasal özellikleri	7
2.1.1.1. Jel kuvveti (Bloom değeri).....	7
2.1.1.2. İzoelektronik nokta.....	7
2.1.1.3. Molekül ağırlığı.....	7
2.1.1.4. Viskozite	8
2.1.2. Jelatinin Fonksiyonel Özellikleri	8
2.1.2.1. Jelleşme özelliği	8
2.1.2.2. Film oluşturma	9
2.1.2.3. Enkapsülasyon	9
2.1.3. Jelatinin biyoaktif özellikleri	10
2.2. Jelatinin Endüstriyel Kullanım Alanları.....	10
2.2.1. Eczacılık	10
2.2.2. Fotoğrafçılık.....	11
2.2.3. Gıda	11
2.3. Jelatinin Kaynakları ve Endüstriyel Üretimi	18
2.3.1. Endüstriyel üretimi.....	18
2.3.2. Jelatinin kaynakları	19
2.3.2.1. Domuz jelatini.....	20
2.3.2.2. Sığır jelatini	20
2.3.2.3. Balık jelatini	21
2.3.2.4. Diğer jelatin türleri	21
2.4. Proteomiks Analizler	21
2.4.1. Proteinin yapısı	21
2.4.2. Proteomik	24
2.4.3. Proteinin enzimasyonu	27
2.4.4. Proteomik analizlerde veri tabanı ile proteinin tanımlanması	28
2.5. Jelatin Kaynağının Belirlenmesi	29
2.5.1. Jelatin kaynağının belirlenmesinin önemi.....	29
2.5.2. Jelatinin kaynağının belirlenmesinde kullanılan yöntemler.....	30
2.5.2.1. Spektroskopik metotlar	31
2.5.2.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	34

2.5.2.3. Kromatografik yöntemler	35
2.5.2.4. LC-MS/MS sistemleri	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	45
3.1. Materyal	45
3.1.1. Takviye edici gıdalar	45
3.1.2. Kimyasal malzemeler	47
3.2. Yöntem	47
3.2.1. Çözeltilerin hazırlanması	47
3.2.2. Jelatin standartlarının hazırlanması ve enzimatik parçalanma	48
3.2.3. Jelatin ekstraksiyonu ve enzimatik parçalanma	48
3.2.4. LC-MS/MS parametrelerinin optimizasyonu	50
3.2.5. Metot validasyonu	55
3.2.5.1. Tespit Limiti (LOD)	55
3.2.5.2. Hassasiyet	55
3.2.5.3. Doğruluk	56
3.2.5.4. Yanlış-Pozitif	56
3.2.5.5. Yanlış-Negatif	57
3.2.5.6. Güvenirlik	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	59
4.1. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	59
4.2. Metod Validasyonu	60
4.2.1. Tespit Limiti (LOD) çalışmaları	61
4.2.2. Hassasiyet çalışmaları	67
4.2.3. Doğruluk çalışmaları	68
4.2.4. Yanlış-Pozitif çalışmaları	69
4.2.5. Yanlış-Negatif çalışmaları	70
4.2.6. Güvenirlik çalışmaları	73
4.3. Takviye Edici Gıda Örneklerinin Analizi	74
4.4. Analiz Süresinin Kısaltılması ile İlgili Yapılan Çalışmalar	87
KAYNAKLAR	97
EKLER	105
ÖZGEÇMİŞ	159

KISALTMALAR

2DE	: İki boyutlu jel elektrofezi
APCI	: Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (Atmospheric-pressure chemical ionization)
APPI	: Atmosferik basınç fotoiyonizasyon kaynağı (Atmospheric-pressure photo ionization)
CE	: Çarpışma enerjisi (Collision energy)
CI	: Kimyasal iyonizasyon (Chemistry ionisation)
dak.	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSEHA	: Takviye edici sağlık ve eğitim hareketi (Dietary supplement health and education act)
EFSA	: Avrupa gıda güvenliği derneği (European food safety association)
ELISA	: Enzim bağlantılı immün sorbent testi (Enzyme-linked immuno sorbent assay)
ESCI	: Elektrosprey Kimyasal İyonizasyon (Electrosprey chemistry ionisation)
ESI	: Elektrosprey iyonizasyonu (Electrosprey ionisation)
FAB	: Hızlı atom bombardmanı (Fast atom bombardment)
FDA	: Gıda ve Tarım (Food and agriculture)
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy)
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
IR	: Kızılötesi (Infrared)
LC	: Sıvı kromatografi (Liquid chromatography)
LC-MS/MS	: Likit kromatografisi - Kütle spektrometresi / Kütle spektrometresi (Liquid chromatography - mass spectrometry/mass spectrometry)
LC-TQ	: Likit kromatografisi-Üçlü kuadropol (Liquid chromatography - Triple Quadrupole)
LOD	: Tespit limiti (Limit of detection)
MALDI	: Matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyonu (Matrix-assisted laser desorption/ionization)

MIR	: Orta bölge kızılötesi (Mid-infrared)
MRM	: Çoklu reaksiyon izleme (Multiple reaction monitoring)
MS	: Kütle spektrometresi (Mass spectrometry)
NIR	: Yakın bölge kızılötesi (Near infrared)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PEEK	: Polieter eter keton (Polyether ether ketone)
PMF	: Peptit kütle parmak izi (Peptide mass fingerprinting)
Q-TOF	: Kuadropol uçuş zamanlı (Quadrupole time-of-flight)
OWL	: Çevrimiçi iyi yaşam (Online well-live)
R	: Radikal
RT	: Alıkonma zamanı (Retention time)
SCAN	: Toplam iyon taraması (Scan mode)
SIM	: Seçilen iyon taraması (Selected ion monitoring)
TEG	: Takviye edici gıda
TOB	: Tarım ve Orman Bakanlığı
TQ	: Üçlü kuadropol (Triple quadripole)

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. COVID-19 pandemisi öncesinde ve sırasında ülkemizde en sık kullanılan besin takviyelerinin yaygınlığı.	17
Tablo 2.2. Asidik aminoasitlerin özellikleri.	22
Tablo 2.3. Bazık aminoasitlerin özellikleri.	23
Tablo 2.4. Nötral aminoasitlerin özellikleri	23
Tablo 2.5. Protein ve peptitlerle ilgili bazı veri tabanları arama metotlarının adı ve adresleri.	29
Tablo 3.1. Hareketli faz akış programı.	52
Tablo 3.2. LC-MS/MS sisteminde taranan domuz ve sığır genleri.	53
Tablo 3.3. Analiz için gerekli LC-MS/MS şartları.	54
Tablo 4.1. Jelatin tespit limiti çalışmaları (% 0,012).	67
Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan 25 adet TEG numunesine ait bilgiler.	78
Tablo 4.3. Farklı bekleme sürelerinde sığır jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları (Çavuş, 2018).	88
Tablo 4.4. Farklı bekleme sürelerinde domuz jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları (Çavuş, 2018).	88
Tablo 4.5. Enzimatik reaksiyon için etüvde bekletilerek hazırlanan ve ultrasonik su banyosunda bekletilerek hazırlanan örneklerin sonuçlarının kıyaslanması.	90



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Jelatine ait peptit zinciri (Deshmukh ve ark, 2017).....	5
Şekil 2.2. Kolajene ait peptit zinciri (Anonim, 2017).....	6
Şekil 2.3. Kolajenin sarmal yapısı (Anonim, 2025a).....	6
Şekil 2.4. Jelatinin tipik özellikleri.	8
Şekil 2.5. Enkapsülasyon görseli (Anonim, 2022).	9
Şekil 2.6. Kapak ve gövde kısmından oluşan jelatin kapsül.....	11
Şekil 2.7. Yaygın diyet takviyesi kategorilerine örnekler (Djaoudene ve ark, 2023).	14
Şekil 2.8. Takviye edici gıda pazarının coğrafi dağılımı (Djaoudene ve ark,2023)..	16
Şekil 2.9. Takviye edici gıdaların bazı formları.	17
Şekil 2.10. Jelatin üretimi akış şeması (Boran, 2011).....	19
Şekil 2.11. Dünyada ve Avrupa’da jelatin üretimi hammadde dağılımı (Duconseille ve ark, 2015).	20
Şekil 2.12. Proteinlerin üç boyutlu sarmal yapısı (Nair, 2007).	22
Şekil 2.13. Jel elektrofezi şematik gösterimi (Anonim, 2024a).....	26
Şekil 2.14. Roepstorff – Fohlmann – Biemann Adlandırması (Steen ve Mann, 2004).	28
Şekil 2.15. FT-IR spektroskopisi ve pik grafiği (Anonim, 2025b).....	33
Şekil 2.16. Raman spektroskopi cihazının şematik görünümü; Rayleigh saçılma (mavi) ve Raman saçılma (kırmızı) (Anonim, 2025c).....	34
Şekil 2.17. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu şematik gösterimi (Anonim, 2025d).	35
Şekil 2.18. Sıvı kromatografisi kısımları (Anonim, 2025e).	37
Şekil 2.19. Kütle spektrometresi şematik gösterimi (Anonim, 2025f).	40
Şekil 2.20. Uçuş zamanlı kütle spektrometresi şematik gösterimi (Anonim, 2024b).	41
Şekil 2.21. Dört kutuplu kütle spektrometresi (Anonim, 2025g).	42
Şekil 2.22. Üçlü kuadropol sistemi şematik gösterimi (Anonim, 2024c).....	43
Şekil 3.1. Metot validasyonu için kullanılan jelatin numuneleri.	45
Şekil 3.2. Materyaller (takviye edici gıdalar 25 adet).....	46
Şekil 3.3. İçi boşaltılan jelatin kapsüller.	49
Şekil 3.4. Jelatin kapsüllerin öğütme işlemi.	49
Şekil 3.5. Yumuşak şeker örneklerinin homojenizasyon işlemi.	49
Şekil 3.6. Enjeksiyona hazır hale getirilmiş numuneler.	50
Şekil 3.7. Analizlerde kullanılan LC-TQ Cihazı.	51
Şekil 4.1. Domuz1 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.	61
Şekil 4.2. Domuz2 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.	62
Şekil 4.3. Sığır1 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.	62
Şekil 4.4. Sığır2 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil 4.5. Kalibrasyon eğrisinde %0.1 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerinin öncü iyon ve yavru iyon pik grafikleri.	64

Şekil 4.6. Kalibrasyon eğrisinde %0.012 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerinin öncü iyon ve yavru iyon pik grafikleri.	65
Şekil 4.7. Kalibrasyon eğrisinde %0.005 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerinin öncü iyon ve yavru iyon pik grafikleri.	66
Şekil 4.8. Domuz jelatini kromatogramı.	69
Şekil 4.9. Sığır jelatini kromatogramı.	69
Şekil 4.10. Sığır kapsülünde domuz jelatini aranması çalışmasına ait kromatogramı.	70
Şekil 4.11. Domuz jelatininde sığır jelatini aranması çalışmasına ait kromatogram.	70
Şekil 4.12. Kapsül numunesi (Sığır 1).	71
Şekil 4.13. Kapsül numunesi (Sığır 2).	71
Şekil 4.14. Gıda katkı numunesi (Domuz 1).	71
Şekil 4.15. Gıda katkı numunesi (Domuz 2).	72
Şekil 4.16. Yumuşak şeker (Domuz 1).	72
Şekil 4.17. Yumuşak şeker (Domuz 2).	72
Şekil 4.18. Standart karışımı ait domuz1, domuz2 peptitlerinin kalibrasyon eğrisi.	75
Şekil 4.19. Standart karışımlarına ait sığır1, sığır2 peptitlerinin kalibrasyon eğrisi.	76
Şekil 4.20. Domuz1 belirteç peptiti öncü iyon (kütle/yük oranı 656.3) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 726.4, 784.3, 870.4).	77
Şekil 4.21. Domuz2 belirteç peptiti öncü iyon (kütle/yük oranı 773,9) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 809.4, 880.5,977.6).	77
Şekil 4.22. Sığır1 belirteç peptiti öncü iyon (kütle/yük oranı 780.9) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 766.5, 823.5,991.6).	77
Şekil 4.23. Sığır2 belirteç peptidi öncü iyon (kütle/yük oranı 596.8) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 669.4, 740.4,797.5).	77
Şekil 4.24. İçerisinde hem sığır hem domuz jelatini olan numuneye ait kromatogram görüntüsü.	80
Şekil 4.25. İçerisinde hem sığır hem domuz jelatini olan numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.	81
Şekil 4.26. İçerisinde sadece sığır jelatin olan numuneye ait kromatogram görüntüsü.	82
Şekil 4.27. Sadece sığır jelatini içeren numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.	83
Şekil 4.28. İçerisinde sadece domuz jelatini olan numuneye ait kromatogram görüntüsü.	84
Şekil 4.29. Sadece domuz jelatini içeren numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.	85
Şekil 4.30. İçerisinde hem domuz hem de sığır jelatini bulundurmeyen numuneye ait kromatogram görüntüsü.	86
Şekil 4.31. Hem domuz hem de sığır jelatini içermeyen numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.	87
Şekil 4.32. Etüvde bekletilerek çalışılan numuneye (Örnek-2) ait kromatogram görüntüsü.	90
Şekil 4.33. Ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilerek hazırlanan numuneye (Örnek-2) ait kromatogram görüntüsü.	91
Şekil 4.34. Etüvde bekletilerek çalışılan numuneye (Örnek-5) ait kromatogram görüntüsü.	91
Şekil 4.35. Ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilerek hazırlanan numuneye (Örnek-5) ait kromatogram görüntüsü.	92

LC-MS/MS-TQ YÖNTEMİ İLE TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA JELATİN KAYNAĞININ TÜR BAZLI TANIMLANMASI

ÖZET

Jelatin, hayvanların bağ dokusundaki kolajenden termal, enzimatik, asidik veya bazik hidroliz yolu ile üretilen, açık sarı-beyaz renkte ve kokusuz nitelikte yüksek saflıkta ticari bir proteindir. Kolajen, başlıca domuz, sığır ve balık gibi hayvanların derisinde ve kemiklerinde bol miktarda bulunan bir bağ dokusudur. Jelatin, temelde kıvam artırıcı özelliği nedeniyle başta gıda endüstrisi (şekerlemeler, kremler, tatlılar, takviye edici gıdalar, et ürünleri, soslar) olmak üzere kozmetik (kremler, losyonlar, yüz maskeleri) ve farmasötik ürünlerde (yumuşak jelatin kapsüller, sert jelatin kapsüller) çok yaygın kullanılan bir biyopolimerdir. Bu temel özelliğinin yanında jelatin, sahip olduğu benzersiz yapısal stabilitesi, kendine özgü işlevsel ve teknolojik özellikleri ve diğer fiziko-kimyasal özellikleri sayesinde jelleştirici, bağlayıcı, kaplayıcı, stabilize edici ve parlaticı ajan olarak çok fonksiyonlu bir gıda bileşenidir.

Günümüzde birçok üründe kullanılan bu bileşenin hangi kaynaktan elde edildiğinin doğru ve kesin bir şekilde ortaya konması başta dini hassasiyetler olmak üzere sağlık ve etik açıdan çok önemlidir. Müslümanlar ve Yahudiler, sahip oldukları inanç sisteminde dini kurallar gereği domuz ve domuz kaynaklı ürünleri tüketmezler. Bu nedenle, bir ürünün helal ya da koşer sertifikası alabilmesi için içerdiği jelatinin kaynağının belirlenmesi gereklidir. Ayrıca tüm dünyada vegan beslenme tercihlerinin artması ile hayvansal bir ürün olan jelatinin kaynağından bağımsız şekilde tüketimi tercih edilmemektedir. Bu bağlamda bir ürünün etiketi üzerinde jelatin kaynağının belirtilmesi, tüketicileri bilgilendirme ve yasal düzenlemelerin yerine getirilmesi açısından zorunludur. Ürün etiketinde görülecek şekilde jelatin kaynağının yazılması gerekir.

Takviye edici gıdalar, karbonhidratlar, aminoasitler, mineraller, vitaminler, temel yağ asitleri, lif gibi besin öğelerini veya bunların dışında fizyolojik olarak etkileri bulunan biyoaktif maddeleri içeren yoğun besin kaynaklarıdır. Bu ürünler, belirli dozaj formlarında (haplar, tabletler, sert ve yumuşak kapsüller, sıvılar, tek kullanımlık toz şase) mevcut olup, normal diyeti desteklemek amacıyla kullanılır. Özellikle Covid-19 pandemisi ile beraber hem ülkemizde hem de tüm dünyada bu ürünlere olan çok ciddi boyutlara ulaşmıştır. Ağırlıklı olarak kapsül ve yumuşak şeker formunda bu ürünlerin üretiminde jelatin kullanılmaktadır. Farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen jelatinlerden domuz jelatini, diğer hayvansal kaynaklı jelatinlere kıyasla hammaddenin daha yaygın ve ucuz olması nedeniyle piyasada çok daha ucuza satılmaktadır. Piyasada bulunan bazı takviye edici gıdalarda ve farmasötik ürünlerde kullanılan jelatinin kaynağına ilişkin yanlış veya eksik bilgilerle etiketlenmiş olabilir. Bu durum, içeriklerin durumu ve üretim sürecinin dini gereklilikleri karşılamaması nedeniyle, Yahudiler ve Müslümanlar için büyük bir sorun haline gelmiştir.

Jelatin kaynağının tam bir kesinlikle belirlenmesi, farklı türlerdeki kolajenlerin amino asit dizilimlerindeki benzerlik nedeniyle özellikle zordur. Bugüne kadar jelatin orijininin

belirlenmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), 2D-SDS-PAGE (Two-dimensional Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ve LC-MS/MS (Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry) analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yüksek lisans tezinde, bu teknikler içerisinde güvenilirlik ve hassasiyet açısından en üst düzeyde olan LC-MS/MS-TQ (Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry-Triple Quadrupole) tekniği ile takviye edici gıdaların çeşitli formlarında jelatin tür tayinine yönelik bir metot geliştirme çalışması yapılmıştır.

Üç temel aşamada gerçekleştirilen bu çalışmada, ilk aşamada LC-MS/MS için çalışma koşulları belirlenmiş ve belirlenen bu koşullarda oluşturulan metota ilişkin validasyon çalışmaları yapılmıştır. Domuz jelatinin tanımlanmasında, 1310 kütle ağırlığına sahip GETGPSGPAGPTGAR diziliminde ve 1465 kütle ağırlığına sahip SAGISVPGMGPSGPR diziliminde iki farklı belirteç peptit göz önünde bulundurulmuştur. Sığır jelatinin tanımlanmasında ise, 1559 kütle ağırlığına sahip GETGPAGPAGPIGPVGAR diziliminde ve 1192 kütle ağırlığına sahip IDQPGAVGPAGIR diziliminde iki farklı peptit indikatör olarak alınmıştır. Analizlerde sıvı kromatografi ile sıralı üçlü kuadrupole sahip bir kütle spektrometresi sistemi (LC-TQ, Liquid Chromatography-Triple Quadrupole) kullanılmıştır. Söz konusu peptitler, 40°C'de termostatlı bir Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 100 mm) kolonunda ters fazlı sıvı kromatografisi ile ayrılmıştır. Mobil faz olarak sulu formik asit %0,1 (v/v) ve asetonitril içinde %0,1 (v/v) formik asit kullanıldığı 28,1 dakikalık bir gradient bir elüsyon programı uygulanmıştır. Bu sistemde akış hızı 0,6 mL/dak olup örnek enjeksiyon miktarı 2 µL olarak uygulanmıştır. Pozitif iyonizasyon modunda m/z 500-5000 kütle aralığında veriler elde edilmiştir. Optimize edilmiş MS parametreleri ise; pozitif iyon modunda ESI yöntemi kullanılmış olup, kurutma gazı sıcaklığı 300 °C, kurutma gazı akışı 11 L/dak, nebulizör basıncı 43 psi, sheath gazı sıcaklığı 330 °C, sheath gazı akışı 10 L/dak, kapiler voltaj 2600 V, nozzle voltaj ise 500 V. Validasyon çalışmalarında tespit limiti (LOD), hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış-negatif ve güvenilirlik olmak üzere altı farklı parametre göz önünde bulundurulmuştur. Sığır ve domuz jelatin standartlarından farklı konsantrasyonlardan oluşan kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve tespit limiti %0,012 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca geliştirilen metotun hassasiyet, doğruluk ve güvenirliliğinin %100 olduğu saptanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, piyasadan 8 adet yurtiçi ve 17 adet yurtdışı menşeli takviye edici gıda satın alınmıştır. Bu ürünlerin 10 adeti yumuşak kapsül, 12 adedi sert kapsül ve 3 adedi de yumuşak şeker formudur. Kapsüller içeriklerinden arındırılarak homojenize edilmiş ve daha sonra tripsin enzimi 16 saat süre ile enzimatik parçalanma işlemine tabi tutulmuştur. Enzimatik parçalanma sonrası validasyonu yapılmış metot ile LC-TQ sisteminde analiz edilmiştir. Türkiye menşeli ürünlerde etiketlerinde sığır jelatini olduğu belirtilmesine rağmen bir tanesinde domuz jelatini tespit edilmiş, bir tanesinde ise her iki tür de tespit edilememiştir. Buna karşın, yurtdışı menşeli sekiz üründe etiketlerinde belirtilmemesine rağmen domuz jelatini tespit edilmiştir. Sonuçlar, söz konusu takviye edici gıdalarda jelatin tür tayininin düzenli olarak güvenilir metotlarla yapılmasının önemini ortaya koymuştur.

Çalışmanın üçüncü aşamasında, metot validasyon çalışmalarındaki enzimatik parçalanma süresinin kısaltılmasına yönelik olarak ultrases destekli enzimatik parçalanma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla numune 37°C'de etüvde 15-16 saat

bekletilmek yerine, 15 dakika ultrasonik su banyosunda çözüldürölmüş ve daha sonra enzim eklenerek 15 dakika daha ultrasonik su banyosunda enzimatik parçalanmaya bırakılmıştır. Bu şekilde 37°C’de 16 saatlik enzimatik parçalama işlemi sadece 30 dakika içinde tamamlanabileceğı sonucuna ulaşılmıştır.





THE SPECIES-BASED IDENTIFICATION OF GELATIN SOURCES IN DIETARY SUPPLEMENTS USING THE LC-MS/MS-TQ METHOD

SUMMARY

Gelatin is a high-purity, light yellow-white color and odorless protein produced by thermal, enzymatic, acidic and basic hydrolysis from collagen in the connective tissue of animals. Collagen is a type of connective tissue that is found in significant amount in the skin and bones of animals such as cattle, pigs, and fish. Gelatin is a biopolymer widely used in the food industry (confectionery, creams, desserts, dietary supplements, meat products, sauces), cosmetics (creams, lotions, face masks), and pharmaceutical products (soft capsule shells, hard capsule shells), mainly for its thickening properties. In addition to this basic property, gelatin is a multifunctional food ingredient as a gelling, binding, coating, stabilizing, and glazing agent thanks to its unique structural stability, unique functional and technological properties, and other physicochemical properties.

In the current cultural and sociological climate, it is imperative to accurately and precisely ascertain the provenance of this ingredient, which is utilised in numerous products, particularly from a religious, health and ethical standpoint. Muslims and Jews do not consume pork and pork-derived products due to religious rules in their belief systems. Therefore, in order for a product to be Halal or Kosher certified, it is necessary to identify the source of the gelatine it contains. In addition, with the increase in vegan dietary preferences around the world, gelatine, which is an animal product, is not preferred for consumption regardless of its source. In this context, it is mandatory to indicate the source of gelatine on the label of a product in order to comply with legal requirements and informing consumers. The origin of gelatin must be written clearly on the product of label.

Dietary supplements are defined as concentrated sources of nutrients such as carbohydrates, vitamins, minerals, amino acids, essential fatty acids, fibre or other bioactive substances with physiological effects. These products are available in a variety of dosage forms, including pills, tablets, hard and soft capsules, liquids and disposable powder sachet, and are used to supplement a normal diet. The demand for these products has reached unprecedented levels in both Turkey and the rest of the world, particularly in the context of the ongoing pandemic. Gelatine is predominantly employed in the production of these products, specifically in the form of capsules and soft candies. Porcine gelatine is cheaper than other gelatins due to the greater availability and lower cost of its raw materials. Some dietary supplements and pharmaceutical products on the market may have inaccurate or incomplete labelling about the source of their gelatin. This has become a significant problem for both Jews and Muslims, as the status of the ingredients and the manufacturing process do not meet religious requirements.

Identifying the origin of gelatine with absolute certainty is particularly difficult due to the similarity in the amino acid sequences of different types of collagen. To date, various studies have been conducted to determine the origin of gelatin. In this studies,

PCR (Polymerase Chain Reaction), ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), 2D-SDS-PAGE (Two-dimensional Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) analytical methods have been developed to determine the origin of gelatine. In this Master's thesis, a method development study was conducted for the determination of gelatine species in various forms of dietary supplements using the LC-MS/MS-TQ (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Triple Quadrupole) technique, which is considered to be the most reliable and sensitive of these techniques.

The present study was conducted in three primary stages. In the initial stage, the working conditions for LC-MS/MS were determined, and validation studies for the method developed under these conditions were carried out. In order to identify porcine gelatine, two marker peptides were considered: the sequence GETGPSGPAGPTGAR, with a mass weight of 1310, and the sequence SAGISVPGMGPSGPR, with a mass weight of 1465. In order to identify bovine gelatine, two different peptides were used as indicators. These peptides had the following sequences: GETGPAGPAGPAGPIGPVGAR (mass weight: 1559) and IDQPGAVGPAGIR (mass weight: 1192). The analyses were conducted using a mass spectrometry system incorporating liquid chromatography and sequential triple quadrupole (LC-TQ, liquid chromatography-triple quadrupole) technology. The separation of peptides was achieved through the utilisation of reversed-phase liquid chromatography, employing a thermostatically controlled Poreshell 120 EC-C18 column (4.6 x 100 mm) at a temperature of 40°C. A gradient elution programme was applied for 28.1 min using a mobile phase composed of water (0.1% v/v, formic acid) and acetonitrile (0.1% v/v, formic acid). In this system, the flow rate was 0.6 mL/min, and the sample injection volume was 2 µL. The data were obtained in the mass range m/z 500-5000 in positive ionisation mode. The following MS parameters were optimised: The ESI method was employed in positive ionisation mode, with the drying gas temperature set at 300°C, a drying gas flow of 12 L/min, a nebuliser pressure of 45 psi, a sheath gas temperature of 350°C, a sheath gas flow of 11 L/min, a capillary voltage of 3000 V, and a nozzle voltage of 500 V. Five distinct parameters, namely limit of detection (LOD), precision, accuracy, false-negative, false-positive and reliability, were considered in the validation studies. Calibration curves were generated using different concentrations of bovine and porcine gelatin standards, and the limit of detection was determined to be 0.012%. Furthermore, the developed method was found to be 100% precise, accurate, robust, and reliable.

In the second phase of the study, 8 domestic and 17 imported dietary supplements were purchased from the market. Ten of these products were in soft capsule form, 12 in hard capsule form and 3 in soft candy form. The capsules were homogenised by removing the contents and then subjected to enzymatic digestion with trypsin enzyme for 16 hours. After enzymatic digestion, they were analysed in the LC-TQ system using a validated method. Porcine gelatine was detected in only one supplement despite the declaration of bovine gelatine used on the labels of supplements of Turkish origin. It was interesting that neither bovine nor porcine gelatine could be detected in one of these samples. Conversely, the presence of porcine gelatine was detected in eight supplements of imported origin, despite being undeclared on the labelling. The results showed the importance of regular determination of the type of gelatine in these food supplements by reliable methods.

In the third stage of the study, ultrasonic assisted enzymatic digestion was carried out to reduce the enzymatic digestion process. Instead of keeping the sample in the oven at 37°C for 15-16 hours, this was done by dissolving the sample in an ultrasonic water bath at 37°C for 15 minutes, then adding the enzyme and allowing the sample to enzymatically digest in an ultrasonic water bath for a further 15 minutes. It was concluded that 16 hours of enzymatic digestion at 37°C could be completed in only 30 minutes.





1. GİRİŞ

Takviye edici gıdalar, son yıllarda popülerliği oldukça artan hem ülkemizde hem de dünyada gıda endüstrisinde önemli bir yer edinmeyi başaran bir ürün grubudur. Normal beslenmeyi takviye etmek ve vücutta eksikliği olan mineral, vitamin, aminoasit, protein, lif gibi gruplara olan ihtiyacın giderilmesi amacıyla üretilmektedir. Günlük alım dozları olan bu ürünler ilaç değildir. Takviye edici gıdalar üretilirken çeşitli formlarda olabilmektedir. Bu formlardan biri de jelatin kapsülü şeklinde olup toz haldeki ürünlerin ambalajlanmasını ve sindirimini kolay hale getirmektedir. Kullanılan bu jelatinler çeşitli hayvanların deri, kas kemik gibi kısımlarından üretilmektedir (Yetim, 2011).

Jelatin şeffaf, yumuşak, renksiz ve kokusuz bir yapıya sahiptir (Baziwane ve He, 2003). Bu özelliklerinden dolayı jelatin çeşitli sanayi dallarında geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. İstenilen forma kolayca girmesi, toz haline getirilen ilaçların ve takviye edici gıdaların jelatin kapsüle doldurularak uzun süre muhafaza edilmesini ve direk tüketilebilmesini sağlamaktadır. Ayrıca birçok gıda sektöründe geniş bir kullanım alanı olan jelatinin kaynağının ne olduğu tüketiciler için önemli olmaktadır.

Jelatinin domuz, sığır, balık, eşek derisi gibi birçok kaynağı olabilmektedir (Duconseille ve ark, 2015). Jelatinin orijinin bilinmesi hem ülkemizde hem de dünyada merak edilen ve sorgulanan bir konudur. Jelatin kökeninin tespitinin bu kadar önemli olmasının birçok sebebi bulunmaktadır. Başlıca sebeplerinden biri dini hassasiyetler ve inanç meselesidir. Bazı dinlerde domuz ve domuzdan elde edilen her türlü ürünün tüketilmesi haramken bazı dinlerde ve inanışlarda da sığır ve ürünlerinin tüketimi yasaklanmıştır (Boran ve ark, 2010). Diğer bir yandan bazı uzakdoğu ülkelerinde eşek derisinden elde edilen jelatinin oldukça değerli bir ürün olması sebebiyle yerine kullanılacak başka tür jelatini bu ülkeler gıda hileleri kapsamında değerlendirmektedir (Jinju ve ark, 2022).

Jelatinin orijinin belirlenmesi açısından uzun yıllardır çeşitli teknikler ve analiz yöntemleri kullanılmaktadır (Grundy ve ark, 2016). Ancak bazı jelatin türlerinin birçok açıdan birbirlerine benzer olması ve kullanılan tekniklerde jelatinin kolay bir

şekilde denatüre olması bu konudaki tespitleri zorlaştırmaktadır. Son yıllarda jelatinin tür tayininde kesin sonuçlara ulaşmak açısından oldukça hassas bazı yöntemler geliştirilmiştir.

Jelatin tür tayininde en önemli yöntemlerden biri olan LC-MS/MS sistemleri diğer yöntemlere kıyasla avantajlarının olmasından dolayı tercih edilmeye başlanmıştır (Grundy ve ark, 2016). Jelatin orijinin belirlenmesi amacıyla geliştirilen çeşitli metotlar sayesinde oldukça hassas sonuçlar elde edilerek, jelatinin hangi türe ait olduğu konusunda kesin sonuçlara ulaşılmaktadır. Kalitatif olarak verilen bu sonuçlar net bir şekilde jelatinin türünün ne olduğu konusunda bilgi elde etmemizi sağlamaktadır. LC-MS/MS sistemleri oldukça hassas yeni nesil teknolojilerdendir. Ülkemizde de gelişmekte olan bu yöntemlerle yapılan çalışmalar çağın gerisinde kalmamak amacıyla oldukça önem kazanmaktadır.

Tüm bu bilgilerin ışığında takviye edici gıdalarda kullanılan jelatinin orjinin belirlenmesi amacıyla ileri teknoloji gıda enstrümental analiz yöntemlerinden olan LC-MS/MS sistemlerinden LC-TQ yöntemiyle Türkiye’de ilk defa ürünlerin domuz ve sığır jelatini içerip içermedikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yurtdışından alınan ve ülkemizde üretilen çeşitli takviye edici gıda numuneleri toplanarak jelatin ihtiva eden bu numunelerdeki jelatinin orijini tayin edilmiştir. LC-MS/MS sistemlerinden LC-TQ yöntemi ile öncelikle cihazda metot oluşturularak validasyon çalışmaları yapılmıştır. Validasyonda tespit limiti, hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış-negatif ve güvenilirlik parametreleri çalışılmıştır. Domuz veya sığır jelatini içeren örneklerde yanlış-pozitif, yanlış-negatif testlerinde %100 sonuçlara ulaşılarak metotun başarılı bir şekilde çalışıldığı görülmüştür. Ayrıca yapılan tespit limiti çalışmaları ile %0.012 düzeyine kadar jelatin tespit edilebilmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda metotun kullanılabilirliği kesinleştikten sonra domuz ve sığır jelatin standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Sonrasında bu numunelerde analiz çalışmaları yapılarak bu çizilen kalibrasyon eğrisi içerisinde sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda 1’den 25’e kadar sıralanan ve hangi numaranın hangi numuneye ait olduğu belirtilmeden içerisinde bulunan jelatinlerin türleri ve tespit edilen miktarları ile ilgili bilgiler çalışmaya eklenmiştir. Yapılan tez çalışması sayesinde hem ülkemizde ilk defa LC-TQ yöntemi ile jelatin tür tayini çalışmaları yapılarak metot oluşturulmuş olup hem de metodun geliştirilmesi amacıyla çeşitli yöntemler denenmiştir. Çalışmalar boyunca kalitatif olarak kesin sonuçlara ulaşılmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasına ait hipotezler aşağıda sıralanmış olup, bunlar;

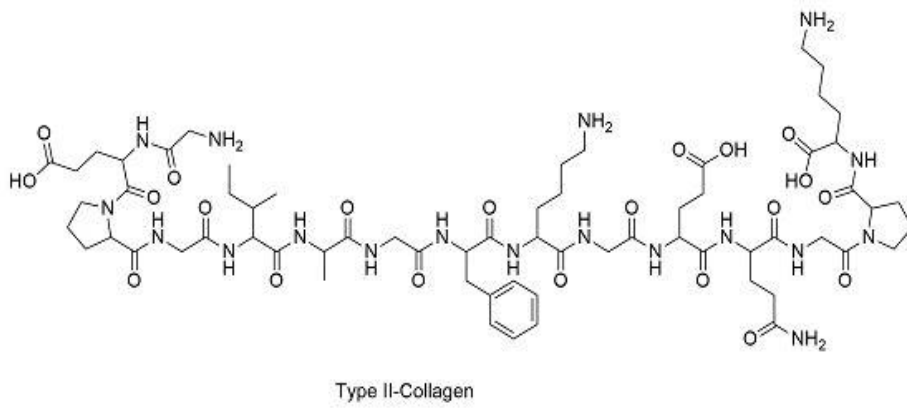
1. "LC-MS/MS-TQ (Sıvı Kromatografisi-Ktle Spektrometrisi-l Kuadropol) tekniğı, takviye edici gıdaların kapsüllerinde bulunan farklı jelatin türlerinin (sığır ve domuz) tespitinde yüksek hassasiyet ve spesifiklik sağılayarak, geleneksel yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar elde edilmesini mümkün kılmaktadır."
2. Ultrases destekli enzimatik parçalama işlemi, geleneksel enzimatik parçalama yöntemlerine kıyasla, enzim aktivitelerini artırarak ve reaksiyon sürelerini belirgin şekilde kısaltarak daha verimli sonuçlar elde edilmesini sağılar.



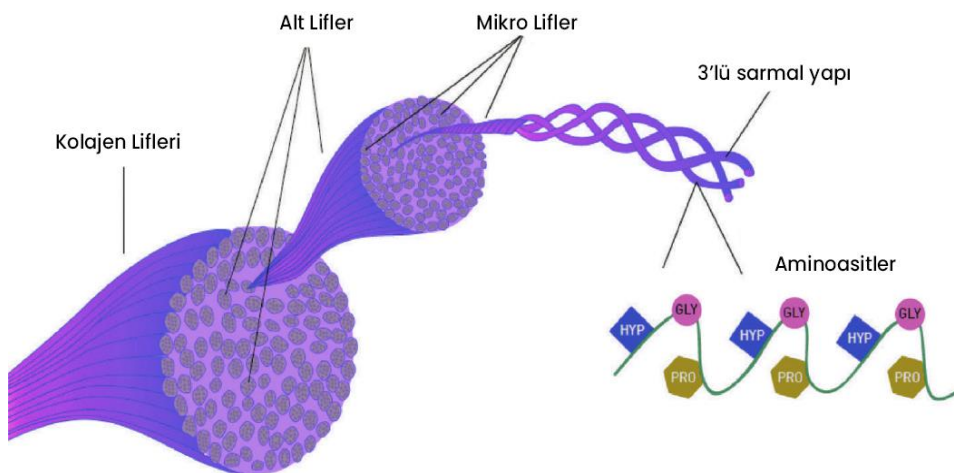


Jelatin, hayvan bağı dokusu olan kolajenden üretilen bir protein türüdür. Memelilerin kemik, kas, bağı dokularından hidrolize edilerek üretilen kolajenden elde edilen protein jelatini oluşturmaktadır (Karim ve Bhat, 2008). Jelatin kelimesi latince donmuş veya sert anlamına gelen “gelatius”tan türemiştir. Renksiz, kokusuz, tatsız, yarı şeffaf ve kırılğan bir yapıya sahiptir (Baziwane ve He, 2003). Kozmetik, ilaç sanayi, fotoğrafçılıkta film ve kağıtlarının üretimi gibi kullanım alanlarının yanında gıda endüstrisinde kullanımı oldukça yaygındır. Ayrıca kokusuz, tatsız, şeffaf olması ve jelatinin kendine has formu sayesinde birçok gıda üretiminde ana malzeme ve yan malzeme olarak kullanımı çokça tercih edilmektedir (Baziwane ve He, 2003). Gıda sanayinde kullanılan jelatinin özelliklerinin endüstriyel olarak uygun olması oldukça önemlidir. Şekil 2.1. de jelatine ait peptit zinciri şekli verilmiştir.

aminoasitler glisin (%33) ve prolin ile hidroksiprolin (%22)'dir. Aminoasit türlerinin farklılıkları jelatin orijinleri arasındaki farklılığı da göstermektedir (Okuyama ve ark, 2012). Kolajenin hidrolizi ile elde edilen jelatinin kuru olarak protein içeriği %100'e yakındır (Nur Hanani ve ark, 2014). Jelatin türlerine göre aminoasit içerikleri değişmektedir. Jelatinde en çok bulunan aminoasitler glisin, prolin, hidroksi prolin, alanindir. Şekil 2.2. kolajene ait peptit zinciri ve Şekil 2.3. te kolajenin sarmal yapısı görselleri verilmiştir.



Şekil 2.2. Kolajene ait peptit zinciri (Anonim, 2017).



Şekil 2.3. Kolajenin sarmal yapısı (Anonim, 2025a).

2.1.1. Jelatinin fizikokimyasal özellikleri

Belirli bir alanda kullanılacak jelatinin kalitesi çözünürlük, renk, tat, koku, vizkozite, jel kuvveti gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Jelatin ile ilgili tipik özellikler Şekil 2.4 de gösterilmiştir. Jelatin, jel formuna geçerken ağırlığının 5-10 katı su bağlama yeteneğine sahiptir. Oluşan jel formu yeniden ısıtılarak eritilebilir. Jelatinin dayanıklılığı, 40 °C üzerinde uzun süre ısıtıldığında giderek zayıflar (GMIA, 2012).

2.1.1.1. Jel kuvveti (Bloom değeri)

Jelatinin jel kuvveti, jel direncinin veya jelin sertliğinin bir ifadesidir. Jelatinin jel kuvvetinin artması ile kalitesi de artmaktadır (Sarbon ve ark, 2013). Jelatinin jel kuvveti; elde edildiği kolajenin kaynağına, aminoasit dağılımına ve içeriğinde bulunan prolin-hidroksiprolin aminoasitlerinin miktarına bağlı olarak değişmektedir.

Jelatinin jelleşmesinde bağlantı bölgelerinin merkezi, prolin ve hidroksiprolince zengin bölgelerden oluşmaktadır. Prolin ve hidroksiprolinden oluşan bu bölgeler hidrojen bağları ile stabilite sağlamakta ve 35-40°C’de sıcaklıklıklarda hassas hale gelmektedir. Dolayısıyla bu sıcaklıklıklarda jelatinin yapısı bozulmaya başlamaktadır. Isıtılıp soğutulan jel yapısının tekrar birleştiği ancak eski haliyle aynı olmadığı jelatin kuvvetinin zamanla arttığı ancak belli bir süre sonra tekrar dengeye ulaştığı yapılan araştırmalarla anlaşılmıştır (Ledward, 2020).

2.1.1.2. İzoelektronik nokta

Jelatin üretiminde ön işlem aşamasında asit ile muamele görmüş ise izoelektrik noktası 7.0-9.4 aralığında değişmektedir. Alkali ile muamele görmüş ise jelatinin izoelektrik noktası 4.8-5.5 aralığında değişmektedir. Alkali ile ön işlem sırasında amonyak oluşmakta ve jelatin asidik bir özellik kazanmaktadır (Ledward, 2020).

2.1.1.3. Molekül ağırlığı

Jelatin hidroliz derecesine göre farklı molekül ağırlıklarında olabilmektedir. Jelatin α -zinciri, β -zinciri ve γ -zincirlerinden oluşmaktadır. Jelatinde bulunan “ γ ” zincirleri 230.000-340.000 dalton arasında, “ β ” zincirleri 123.000-230.000 ve “ α ” zinciri ise 80.000-125.000 dalton aralığındadır. Farklı türde jelatinlerde zincir yapıları değişmektedir. Yapılan çalışmalar zincir miktarlarının farklılıkları jelatinin

viskozitesi, erime sıcaklığı, jel kuvveti gibi özelliklerinin değişmesine neden olduğunu göstermiştir (Ledward, 2020).

2.1.1.4. Viskozite

Viskozite, jelatin için en önemli kalite özelliklerinden biridir. Jelatinin viskozite değeri erime sıcaklığı üzerindeki sıcaklıklarda belirlenmektedir. Gıda sektöründe birçok alanda kullanılan jelatinin viskozitesinin yüksek olması istenen bir özelliktir. Ancak şekerleme gibi ürünlerinde viskozitesi düşük jelatinler tercih edilmektedir (Schrieber ve Gareis, 2007) . Viskozite değeri düşük olan jelatinlerde jelleşmenin zayıf olduğu ve jelatinin yumuşak olduğu, yüksek viskoziteli jelatinlerde ise jelleşmenin sert ve yapısının daha esnek olduğu bildirilmektedir (Karayannakidis, 2014). Şekil 2.4. te jelatinlere ait tipik özellikler verilmiştir.



Şekil 2.4. Jelatinin tipik özellikleri.

2.1.2. Jelatinin Fonksiyonel Özellikleri

2.1.2.1. Jelleşme özelliği

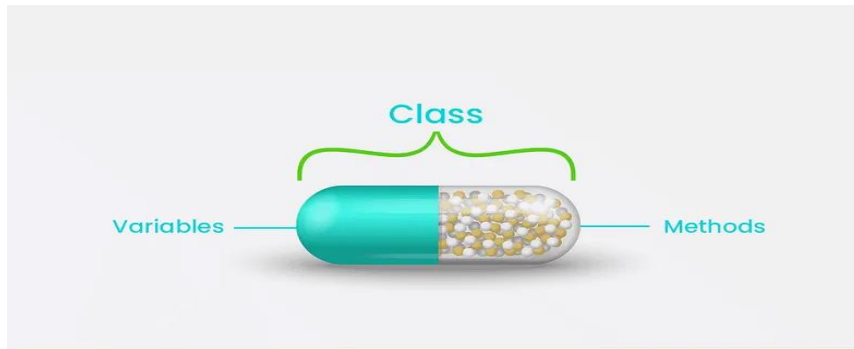
Jelatinler iyonik yükleri, moleküler yapısı ve büyüklükleri açısından, elde edildiği kolajen kaynağının yapısına göre değişmektedir. Jelatin büyük oranda prolin, hidroksprolin, glisin ve alanin aminoasitlerinden oluşmaktadır. Kolajenlerin içerdiği prolin-hidroksprolin miktarlarının değişmesi jelatin türleri arasında da farklılığa sebep olmaktadır. Prolin içeriği fazla olan jelatin ısıya daha dayanıklıdır. Ayrıca ısıya dayanıklılığı belirleyen diğer bir önemli aminoasit ise hidrojen bağı kurabilen hidroksprolindir. Örnek olarak prolin ve hidroksprolin miktarı düşük olan balık jelatini memeli jelatinlerine göre daha zayıf jelleşme özelliği göstermektedir (Ledward, 2020).

2.1.2.2. Film oluşturma

Yenilebilir film kaplamalar gıda endüstrisinde son yıllarda kullanımı oldukça artmış bir uygulamadır. İlk olarak Çin’de limon ve portakal gibi meyveler mumla kaplanarak nem kaybının engellenmesi amaçlanmıştır. Film kaplama uygulaması 19. yüzyılda ortaya çıkmıştır. Gıdaların daha dayanıklı ve uzun ömürlü olması amaçlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalar jelatin ile yapılan yenilebilir film ve kaplamalarının gıda muhafazasında başarıyla kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmalardan birinde, jelatin bazlı filmlere yeşil çay, üzüm çekirdeğı, zencefil, mabet yaprağı gibi bazı doğal antioksidan maddeler eklenerek performansı araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda eklenen tüm antioksidan maddelerin jelatin üzerinde olumlu aktivitelere sahip olduğı gözlenmiştir ve bu antioksidanların jelatin filmlerde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir (Li ve ark, 2014). Jelatin bazlı film ve kaplamalar raf ömrünü arttırmak amacıyla çeşitli bileşenlerle duysal, fiziksel, kimyasal, mekanik ve fonksiyonel özellikleri geliştirilerek etkin bir şekilde kullanılabilir.

2.1.2.3. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, bir veya birden fazla aktif bileşenin çeşitli kaplama materyalleri ile bazı teknikler kullanılarak muhafaza altına alınmasıdır. Enkapsülasyon, duyarlı ve hassas olan aktif bileşenleri korur ve bu bileşenlerin zamanla salınmasını sağlar. Bu teknik ile; ilaç, gıda maddeleri, aroma maddeleri gibi pek çok aktif bileşenin stabilitesi korunur ve salınması kontrollü olarak gerçekleşir (Açı ve ark, 2014). Kapsülasyonda çeşitli doğal ve sentetik polimerler kullanılabilmektedir. Bu polimerlerden biri olan jelatin doğal yapıdadır. Jelatinin biyoyumluluğı, biyolojik olarak parçalanabilirliğı, tadının ve kokusunun olmaması ve düşük antijen özelliğı nedeniyle bir dizi formülasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.5’te enkapsülasyona ait görsel verilmiştir.



Şekil 2.5. Enkapsülasyon görseli (Anonim, 2022).

2.1.3. Jelatinin biyoaktif özellikleri

Gıda endüstrisinde oldukça yaygın olarak kullanılan jelatinin sağlık açısından faydaları da bilinmektedir. Sindirim sisteminde meydana gelen yaraların hızlı iyileşmesini kolaylaştırır. Sindirim sistemini düzenleyerek hasar görmüş bağırsak duvarlarının onarımını sağlar. Antimikrobiyal, mineral bağlayıcı, bağışıklık sistemi düzenleyici gibi özellikleri sayesinde sağlık üzerine yararlı etki gösterdiği bildirilmiştir (Gómez-Guillén ve ark, 2011; Nur Hanani ve ark, 2014; Akagündüz ve ark, 2014; Nikoo ve ark, 2014; Sun ve ark, 2013). Jelatin ve kolajenin lipit emilimini ve metabolizmasını düzenlediği görülmüştür (Saito ve ark, 2009). Bu sayede vücutta oluşan ödemin atılmasında kolaylık sağlar. Yüksek bir protein kaynağıdır. Kemikler, kaslar, eklemlere iyi geldiği gibi saç ve tırnak yapısına da katılarak güçlenmesini destekler. Özellikle ileri yaşlarda karşılaşılan kas ve kemik erimesi gibi hastalıkların önlenmesinde kolajen desteğinin önemli bir yeri vardır (Cheng ve ark, 2009). Diğer bir faydası da vücuttaki melatonin salgısını artırarak düzenli bir uyku geçirilmesine fayda sağlar. Ayrıca cilt sağlığı açısından önemi, cildin elastikiyetini, nemini, parlaklığını ve pürüzsüzlüğünü, tendonların gücünü artırması ise jelatinin kozmetik sanayi ve gıda sanayide kullanımının yaygınlaşmasını önemli ölçüde büyötmektedir.

2.2. Jelatinin Endüstriyel Kullanım Alanları

2.2.1. Eczacılık

Jelatinin eczacılıkta kullanım amacı bir veya daha fazla aktif maddenin bileşiminin toz ya da sıvı hale getirilerek kapsül içerisinde doldurularak muhafazasının sağlanmasıdır. Jelatinden üretilen sert veya yumuşak kapsüller yenilebilir olması sebebiyle ilaç endüstrisinde oldukça yaygın kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde jelatinin büyük bir kısmı yumuşak ve sert jelatin kapsüller, tabletler, tabletlerin kaplanması, granül yapımı, enkapsülasyon ve mikroenkapsülasyonda kullanılmaktadır. Etkin maddelerin hava ile temasını keserek oksidasyonun engellenmesini sağlamaktadır. Ayrıca kapsül içine konulan maddeler nem, sıcaklık ve diğer istenmeyen çevresel faktörlerden korunarak üründe stabilizasyon sağlanmaktadır (Gibbs ve ark, 1999).

Eczacılıkta kullanılan jelatin kapsüller kapak ve gövde olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır ve bu kapsül formunun içine toz, granül, mikrokapsül, minitabketlerin yanı sıra yarı katılar konulabilmektedir (Şekil 2.6.). Bu kapsüller ağız yoluyla kullanım için tasarlanmış formlardır.

Eczacılıkta kullanılan jelatin kapsüllerin formları ve büyüklükleri içine konulacak dolgu maddesinin miktarına ve etken maddenin yapısına göre değişmektedir.



Şekil 2.6. Kapak ve gövde kısmından oluşan jelatin kapsül.

2.2.2. Fotoğrafçılık

Jelatin, 19. yüzyılın sonlarına doğru fotoğrafçılıkta kullanılarak tarihindeki en önemli kullanım amaçlarından birini yaşamıştır. Richard Leach Maddox 1871'de, fotoğraf filmi üretiminde jelatini gümüş bromür ile birleştirerek ilk modern fotografik kuru plakanın geliştirilmesini sağlamıştır. Fotoğrafçılık endüstrisinde devrim niteliğinde olan bu buluş sayesinde jelatin fotoğraf filmlerinde ve kağıtlarında film oluşturuca olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Genellikle filmler başlıca üç kısımdan meydana gelmektedir. Bunlar elastik, yanmaz bir malzemeden oluşan taşıyıcı taban; ışığın film plakasından yansıyarak, başka bir görüntünün oluşmasına sebep olmaması amacıyla kullanılan, suda çözünebilir tabaka ve içinde gümüş bileşiklerinin bir askıda katı şekilde kalmasını jelatin tabakasıdır. Filmleri çizik, sıyrık vs. gibi dış etkilerden korumak düşüncesiyle üstü sertleştirilmiş jelatinden yapılmış bir koruyucu tabaka bulunur. Jelatinin, fotografik emülsiyonlar yapmak için en iyi ortam olduğu bilinmektedir (GMIA, 2012).

2.2.3. Gıda

Gıda endüstrisinde jelatin oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Jelatinin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı avantajları oldukça fazladır. Birçok gıda ürününde jelatin ana madde veya yan ürün olarak kullanılarak yapıya katılmaktadır.

- **Jelleşme ajanı**

Gıda endüstrisinde oldukça sevilen jöleli tatlılar ve şekerlemelerde jelatin jelleşme ajanı olarak kullanılmaktadır. Parlak, renklendirilebilir ve lezzetli görüntüsüyle çokça

tercih sebebi olmaktadır. Ayrıca et ve et sosları gibi tüketimi fazla olan ürünlerde de jelleşme ajanı olarak kullanımı tercih edilmektedir (Haug ve Draget, 2009).

- **Yapı sağlayıcı ve bağlama ajanı**

Yine çokça sevilen ve tüketilen lokum, koz helvası, sufleler, fırın ürünleri gibi gıda ürünlerinde jelatin yapı bağlayıcı görevi görmektedir. Jelatinin su tutma ve bağlayıcı özelliği sayesinde birçok üründe dokunun bütünlüğünü sağlaması yönünden yapı sağlayıcı olarak tercih edilmektedir. Konserveler, süt ürünleri, etler ve şekerlemeler gibi gıdalarda jelatin, bağlama ajanı görevi görmektedir. Fazlar arasında bağlayıcı rol oynayarak gıda maddesinde homojenize yapıyı geliştirir (Haug ve Draget, 2009).

- **Kolloidal yapıyı koruyucu**

Jelatin kullanılan şekerlemeler, dondurmalar, donmuş tatlılar gibi ürünlerde kolloidal yapıyı koruyarak ürünlerde faz ayrışmasını engeller. Ürün içerisindeki bileşenlerin heterojen dağılımını korur (Kobayashi, 1996).

- **Durultma ajanı**

Bira, şarap, meyve suları gıda endüstrisinde durultma yardımcı malzeme olarak kullanılır. Mayşe içine karıştırılan jelatin posayı içine hapsederek filtrasyon öncesinde durultma işlemine yardımcı olmaktadır (Boran, 2011).

- **Film oluşturucu**

Meyvelerin kaplanması koruyucu film olarak kullanılan jelatin mikrobiyel bozulmayı geciktirerek uzun süre dayanıklılığı artırır. Şeffaf, kokusuz ve tatsız olması da bu tür kullanımda avantaj sağlamaktadır (Boran, 2011).

- **Koyulaştırıcı**

Et suyu, soslar, çorbalar, pudingler, jöleler, şuruplar ve toz içecekler gibi gıda ürünlerinde kıvamın koyulaşması için kullanılmaktadır. Bazı ürünlerde suyun yoğun hale getirilerek kıvamının koyulaştırılması istenen bir tekstürdür. Jelatinin su tutma özelliğinden faydalanılarak kıvam koyulaştırmada istenen etki yaratılabilmektedir (Boran, 2011).

- **Emülgatör**

Yağ ve suyu gibi birbirine karışmayan maddelerin homojen olarak karışmasını sağlayan yardımcı malzemeye emülgatör denir. Bazı ürünlerde sıvı ve yağ fazın

ayrışması hem kalite açısından istenmemekte hemde gıdanın bozulmasına sebep olmaktadır. Jelatin; et ürünleri, soslar, tatlandırıcılar, çorbalar, kremalar, şekerlemeler gibi içerisinde yağ ve su fazlarını barındıran gıdalarda emülgatör olarak kullanılarak homojenizasyonu sağlar (Boran, 2011).

- **Stabilizör**

Gıdalarda ayrışmaya meyilli olan fazların dağılmasını engelleyen yardımcı malzeme olan jelatin; peynirler, çikolatalı sütler, yoğurt, kremalar, donmuş tatlılar gibi ürünlerde stabilizör görevi de görmektedir. Gıdanın homojen yapısını koruyarak dağılmasını ve ayrışmasını engeller (Kobayashi, 1996).

- **Köpürmeyi sağlayıcı**

Köpük gazı gıdalar için önemli ve istenen bir yapıdır. Köpürmeyi sağlayarak lezzet ve tekstürde istenen kıvam sağlanabilmektedir. Jelatinin köpük sağlayıcı özelliği de vardır. Özellikle pastacılık ürünleri olmak üzere şekerlemeler, kremalar, dondurmalar vb. inde köpük sağlayıcı olarak jelatin kullanılmaktadır. Aynı zamanda emülgatör stabilizör gibi görevlerde sağladığı için birçok açıdan jelatin kullanımı tercih edilmektedir (Schrieber ve ark, 2007; Haug ve ark, 2009).

- **Kristalizasyonu düzenleyici**

Dondurmalar, buzlu ürünler, donmuş tatlılar gibi ürünlerde içerisinde bulunan suyun faz olarak ayrışması ve donmaya bağlı olarak kristalizasyonu gerçekleştirebilmektedir. Bu istenmeyen bir tekstürdür. Jelatinin kristallenmeyi düzenleyici işlevi sayesinde ürünlerde kullanımı tercih edilmektedir (Schrieber ve ark, 2007; Haug ve ark, 2009).

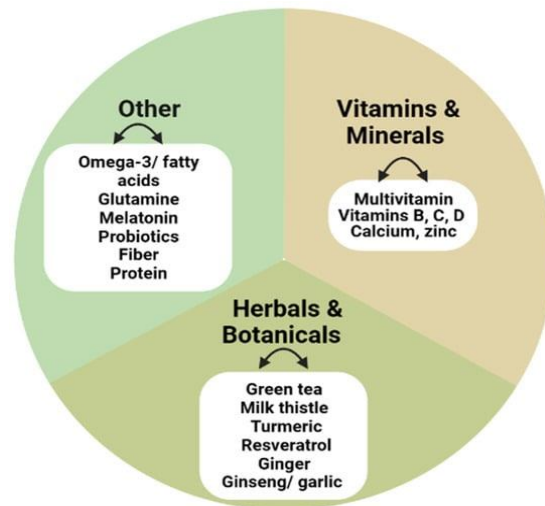
- **Kapsül formda tüketilen ürünlerde gıda ambalajı**

Kapsül formda tüketilen gıda maddelerinden olan takviye edici gıdalar son zamanlarda oldukça rağbet görmektedir. Hastalıklarla mücadelede alternatif tıp olan bitkisel takviyelere artan talep takviye edici gıdaların hızla büyük bir sektör olmasını sağlamıştır. Özellikle dünyada pandemi başlamasıyla birlikte hastalığa karşı uygulanan ilaçların ve aşıların ilk kez denenmesi sebebiyle çözümü alternatif tıpta arayanların sayısı artmış olup bu da takviye edici gıdalara yönelmelere sebep olmuştur (Aday ve Aday, 2020). Takviye edici gıdaların kullanılmasında ana sebepler; bağışıklık sisteminin iyileştirilmesi, sağlığın ve zindeliğin sağlanması, kişilerin beslenmesindeki eksiklikleri karşılamak olarak tespit edilmiştir (Altun ve ark, 2021).

Takviye edici gıdalar genellikle birden fazla karışımların toz hale getirilerek jelatin kapsüllerde hapsedilmesiyle yapılmaktadır. Ayrıca yumuşak şekerleme formda olanları da fazladır. Takviye edici gıdaların artmasıyla birlikte kullanılan hammaddelerin ve içeriklerinin araştırmaları yeni birçok çalışmaların bu yönde artmasını sağlamıştır. Kapsül formda ve yumuşak şeker formda olan takviye edici gıdalarda kullanılan jelatinin kökeni de tüketici açısından sorgulanmaya başlamıştır.

Takviye edici gıdalar

Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği'nde tanımlandığı şekliyle, “Takviye edici gıda: Normal beslenmeyi takviye etmek amacıyla, vitamin, mineral, protein, karbonhidrat, lif, yağ asidi, amino asit gibi besin öğelerinin veya bunların dışında besleyici veya fizyolojik etkileri bulunan bitki, bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler, biyoaktif maddeler ve benzeri maddelerin konsantre veya ekstraktlarının tek başına veya karışımlarının kapsül, tablet, pastil, tek kullanımlık toz paket, sıvı ampul, damlalıklı şişe ve diğer benzeri sıvı veya toz formlarda hazırlanarak günlük alım dozu belirlenmiş ürünleri” ifade eder. Yaygın takviye edici gıda kategorilerine örnek Şekil 2.7.'de verilmiştir. “Dietary Supplements (Takviye Edici Gıda)” terimi ilk olarak 1994 yılında ABD kongresi tarafından Gıda Takviyesi Ulusal Sağlık ve Eğitim Hareketi (DSEHA- Dietary Supplement Health and Education Act) yasasına göre resmi literatüre girmiştir (Doğan ve ark, 2020a).



Şekil 2.7. Yaygın diyet takviyesi kategorilerine örnekler (Djaoudene ve ark, 2023).

Amerika Birleşik Devletlerin’de takviye edici gıda (TEG) endüstrisi, FDA Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA-Food and Agriculture) tarafından düzenlenmektedir. Tüm

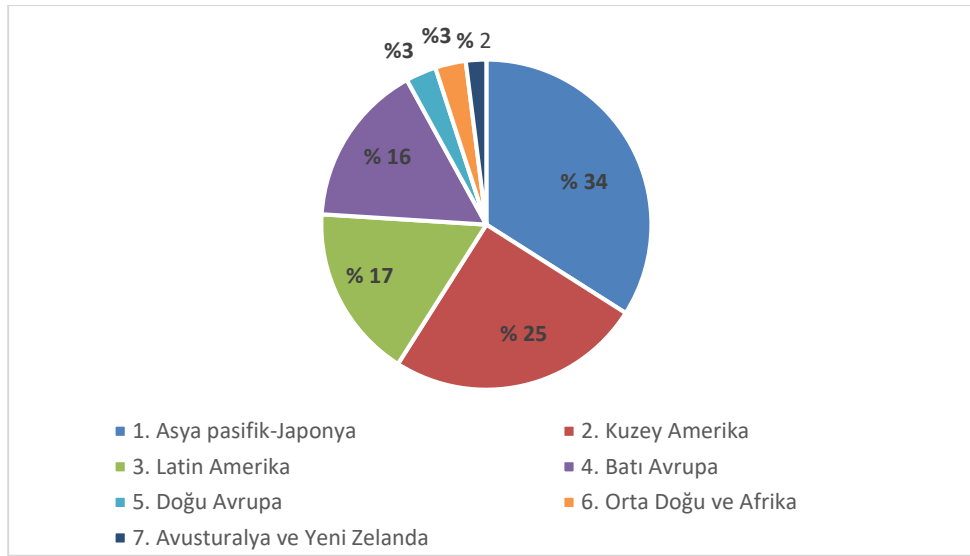
kişi ve kurumların etkili bir şekilde TEG piyasasını kontrol edebilmesi amacıyla bir kayıt platformu olan online iyi yaşam kütüphanesi (OWL- Online well-live) sistemi geliştirilmiştir. Bu platformda işletmeler zorunlu olarak ürettikleri ürünlere ait tüm bilgileri paylaşmakta ve gerekli bilgiler tüketicilerin ulaşabileceği şekilde oluşturulmaktadır (Özbekler, 2019). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA-European Food Safety Association), takviye edici gıdaların, vücutta eksiklik görülmeleri halinde yeterli düzeyde alımının sağlanabilmesi için kullanılabileceğini bildirmektedir (Demir ve ark, 2021). İngiltere’de ise takviye edici gıdalar, hastalıkların önlenmesinde ve sağlığın korunmasında, vücutun ihtiyaçı olan olan besin öğelerinin çeşitli formlarda vücuda dışarıdan alınan destekleyici besinler olarak tanımlanmaktadır (Tan, 2021).

Takviye edici gıdalar ilaç değildir. Gıda takviyeleri, besin öğeleri yönünden dengeli beslenmediğimiz durumlarda temel besin maddelerini yeteri düzeyde dışarıdan takviye almamıza yardımcı olmaktadır. Günlük yeterli ve dengeli bir beslenme ile birlikte ihtiyaçı duyulan tüm makro ve mikro besin öğeleri karşılanabilmektedir. Ancak pişirme, kızartma, yıkama, haşlama gibi tüketimden önceki ön işlemlerde besin bileşenlerinde kayıplar meydana gelebilmektedir. Takviye edici gıdalar daha çok sağlık aısından vücutu destekleme, gücünü arttırma ve eksikliği olan besinlerin takviye edilmesi için kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli hastalıkların tedavi sürecinde vücut için gerekli olan bileşenler; yeteri düzeyde alınamamaktadır. Takviye edici gıdalar vücutu birçok yönden desteklemektedir. Kemik sağlığı, enerji metabolizmasına katkı, sinir sisteminin sağlığı, sindirim sisteminin işleyişini düzenleme gibi birçok faydası olabilmektedir (Aday ve Aday, 2020).

Hastalıklarla mücadele ve vücut direncini arttırmak amacıyla ilaç kullanmak konusunda çekinik kalan insanların da beslenmesine kattığı takviye edici gıdalar son yıllarda oldukça ilgi görmektedir. Özellikle pandemi döneminde ve sonrasında takviye edici gıdalara yönelimin arttığı da bilinmektedir (Altun ve ark, 2021). Pandemide hükümetlerin bazı kısıtlamalar getirmesi dolayısıyla yaşam tarzlarında ve beslenmelerinde değişiklikler olmuştur. Bu durum hızlı bir şekilde büyüyen TEG pazarının daha da artmasına yol açmıştır (Kazaz ve Gençyürek Erdoğan, 2020). Bağışıklık sistemi için beslenme alışkanlıkları oldukça önemlidir. Bu nedenle pandemi döneminde bireyler, hastalıklardan korunmak veya hastalığı en az hasarla atlatmak için

bağıklık sistemlerini güçlendirmeye çok önem vermiş, yeterli ve dengeli beslenmeye her zamankinden daha fazla dikkat etmişlerdir.

Dünya çapında takviye edici gıdaların pazarı gittikçe büyümektedir. TEG pazarının coğrafi dağılımı incelendiğinde Asya-Japonya, Kuzey Amerika ve Latin Amerika'nın en büyük paya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 2.8.). Takviye edici gıda pazarı 2021 yılında 82 milyar ABD dolarından 149,50 milyar ABD dolarına yükseldi (Hamulka ve ark, 2020; Petkova ve ark, 2019). Bu durumun yıllar içinde arttığı bilinmektedir. Artış hızına bakıldığında 2028'de 308 milyar ABD dolarına ulaşacağı ve %8,90'lık bileşik yıllık büyüme oranı olacağı varsayılmaktadır.



Şekil 2.8. Takviye edici gıda pazarının coğrafi dağılımı (Djaoudene ve ark,2023).

Bazı insanlar tarafından gıda takviyeleri neredeyse her gün beslenme programına katılmıştır. Tüketicinin bu konudaki taleplerinin artması endüstriyel olarak hızlı bir artışa geçmesini sağlamıştır. Pazarın hızla büyümesinin altında yatan en önemli sebeplerden bazıları doğru reklam ile satış stratejileri ve bu ürünlere ulaşımındaki rahatlık sayılabilir (Atalay ve Erge, 2018; Özbekler, 2019).

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de TEG kullanımı artmaktadır. Buna bağlı olarak TEG endüstrisi de hızlı bir büyüme göstermektedir (Atalay ve Erge, 2018; Özbekler, 2019). Ülkemizde en çok eksikliği görülen vitamin ve mineraller B grubu ve D vitaminleri, demir, fosfat, magnezyum ve çinko olduğu bilinmektedir. Bu eksikliklerin giderilmesi amacıyla kişiler takviye edici gıdalara yönelmektedir (Baltacıoğlu, 2019; Özbekler, 2019). Ülkemizde COVID-19 öncesi ve sırasında en sık kullanılan takviye edici gıdalara örnek Tablo 2.1.’de verilmiştir.

Tablo 2.1. COVID-19 pandemisi öncesinde ve sırasında ülkemizde en sık kullanılan besin takviyelerinin yaygınlığı.

Vitaminler/Mineraller	Pandemi öncesi %	Pandemi sonrası %	Anket çalışması	Kaynak
D vitamini	10.7	5.5	Kesitsel	(Karaçıl, 2022)
C vitamini	14.2	41.1	Kesitsel	(Karaçıl, 2022)
Kalsiyum	0.2	0.2	Kesitsel	(Karaçıl, 2022)
Çinko	0.2	-	Kesitsel	(Karaçıl, 2022)

Çeşitli formlarda üretilip piyasaya sunulan takviye edici gıdaların özellikle kapsül formları ve yumuşak şeker formları yaygındır. Kapsül formda üretilen takviye edici gıdaların yenilebilir kapsül ambalajlarının üretiminde jelatin kullanılmaktadır. Bu kapsül yapılar sert kapsüller ve yumuşak kapsüller olabilmektedir. Sert kapsüller %12-16 arasında nem içerirler. Hazırlanması basit ve kolaydır. Ancak ince olması sebebiyle bazı maddeler jelatinle reaksiyona girebilir, su ile kolayca hidrolize olabilir bu yüzden muhafazası zordur. Ayrıca çabuk erimesi sebebiyle yutarken yemek borusuna yapışma gibi riski olduğundan yumuşak kapsüller de tercih edilmektedir. Yumuşak kapsüller daha sert ve esnek yapıya sahiptir. Bu yüzden içindeki etken madde ile reaksiyona girmesi daha zordur. Muhafazası sert kapsüle göre daha iyidir. Şekil 2.9. da takviye edici gıda formlarına örnek verilmiştir.



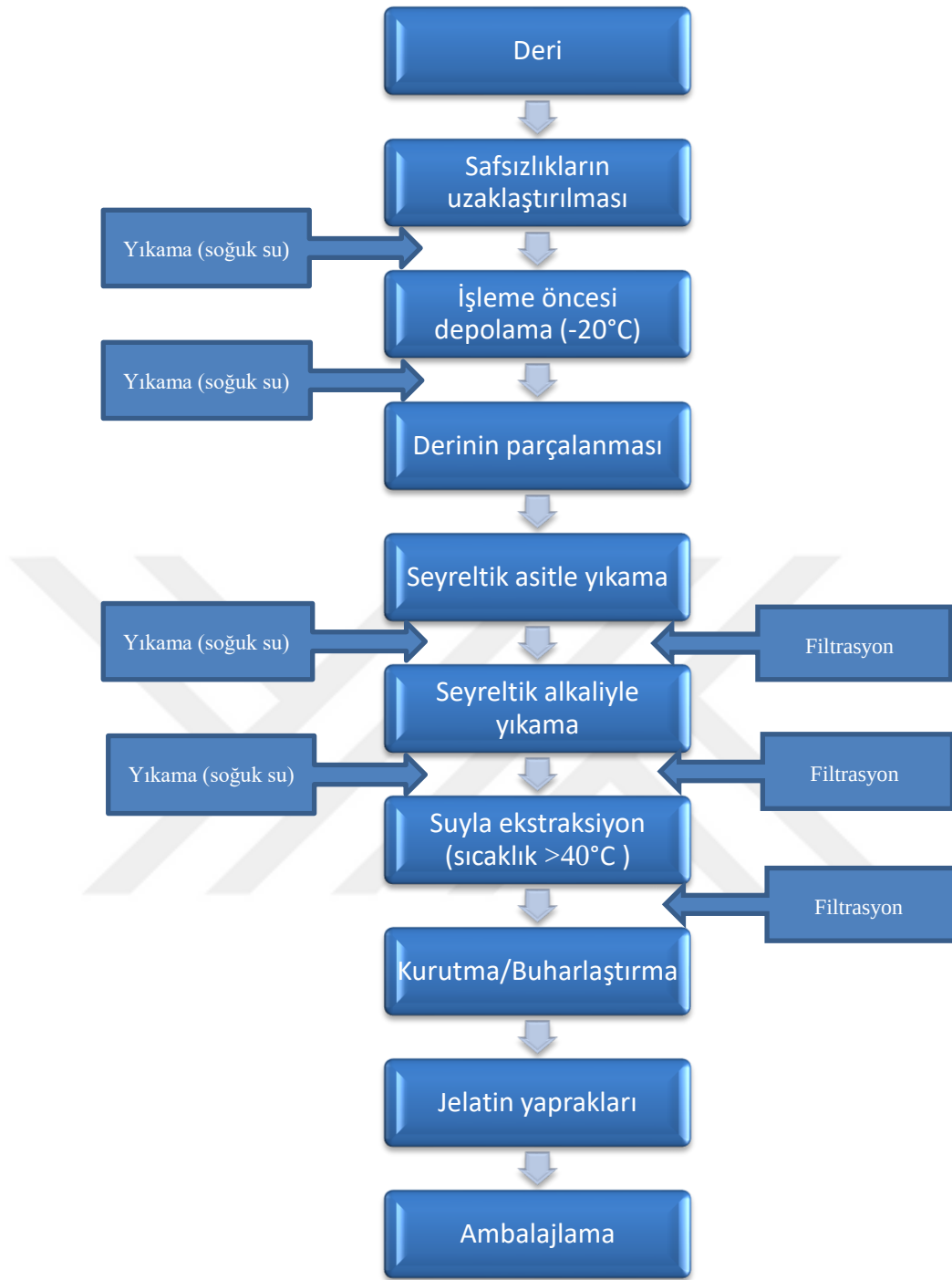
Şekil 2.9. Takviye edici gıdaların bazı formları.

2.3. Jelatinin Kaynakları ve Endüstriyel Üretimi

2.3.1. Endüstriyel üretimi

Jelatin üretimi üç temel aşamadan oluşmaktadır. Bunların ilki kolajen içeren dokuların üretime hazırlanmasıdır. Bu aşamada yıkama, parçalama, safsızlıklardan arındırma, seyreltilmiş asit veya alkali ile yıkama, yağ ve tuz gibi bileşiklerin uzaklaştırılması, kolajen dokunun belli bir dereceye kadar ölçülü bir şekilde yıpratılması ile jelatin ekstraksiyon için hazır hale getirilir. İkinci aşamada 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda suda karıştırılarak bekletilir ve jelatin ekstraksiyonu sağlanır. Üçüncü aşamada ise ekstraksiyon çözeltisi süzülerek 40-80°C aralığındaki sıcaklıklarda buharlaştırılır veya dondurarak kurutma işlemi gerçekleştirilir. Oluşan jelatin istenilen forma getirilerek ambalajlanması sağlanır. Bu basamakların en önemli aşması ön işlem ve ekstaksiyon aşamasıdır.

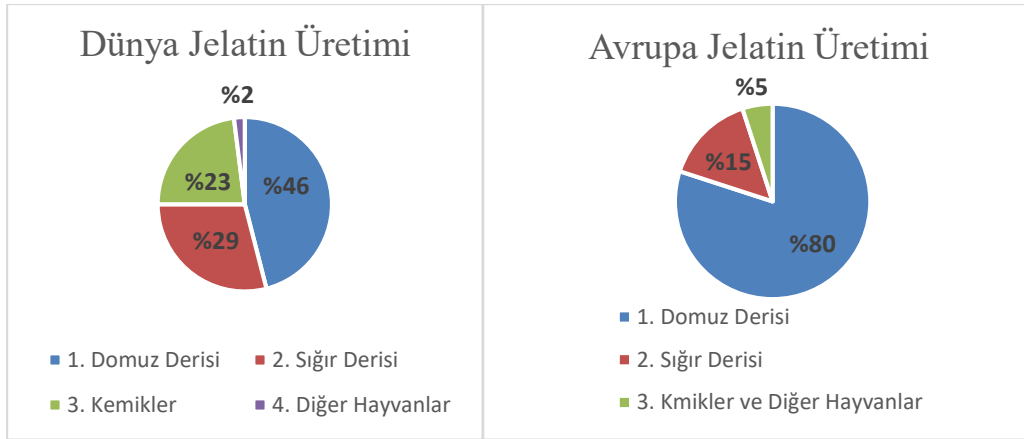
Temizleme aşamasında, domuz ve sığır derileri su ile yıkanmaktadır. Kemikler ise parçalanıp %4-7'lik hidroklorik asit (HCl) çözeltisinde en az iki gün bekletilir, "ossein" olarak bilinen süngerimsi yapıdaki kemik materyali elde edilmektedir. İkinci aşama olan ekstraksiyon aşamasında asitle veya bazla muamele edilir. Asit veya bazdan hangisinin uygulanacağına jelatin kalitesine, elde edildiği materyale, çapraz bağ miktarına ve hayvanın yaşına göre karar verilmektedir (DeMan, 1999). Üçüncü aşama kademeli olarak sıcaklık uygulanmaktadır. İlk ekstraksiyon sıcaklığı 50°C'de başlayıp 10'ar derece artırılarak kademeli olarak sıcaklık 100°C'e kadar yükseltilmektedir. Uygulanan ilk sıcaklıkta hidrojen bağları kopmaktadır. Bu süreçte kolajenin çözünür jelatine dönüşümü ile sağlanmaktadır. Asit ile ön muamele görmüş domuz derisi gibi materyallerde ekstraksiyon, pH 4-5 arasında gerçekleştirilmektedir. Sığır derisinde ise ekstarksiyon pH 2.0-3.5 gibi çözeltilerde uygulanmaktadır. Ekstraksiyonda sıcaklık, pH, süre gibi faktörlerde optimum denge sağlanmaktadır (Eysturskarð, 2010a). Bu aşamadan sonra jelatin çözeltisi filtre edilmekte ve evaporasyon işlemi ile belirli bir konsantrasyona getirilmektedir. Son aşamada koyulaştırılarak jel kıvamına getirilmiş jelatin geniş ve uzun bantlarda hava ile kurutularak yaprak, granül veya toz haline getirilmektedir. Jelatin akış şemasına ait görsel Şekil 2.10.'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Jelatin üretimi akış şeması (Boran, 2011).

2.3.2. Jelatinin kaynakları

Dünya’da üretilen jelatinin yaklaşık %46’sı domuz derisinden, %29’u sığır derisinden, %23’ü kemiklerden ve %2’si diğer hayvanlardan elde edilmektedir (Duconseille ve ark, 2015). Avrupa’da ise jelatin üretiminin %80’i domuz derisinden temin edilmektedir. Geriye kalan %20’lik bölümün %15’i sığır derisinden, %5’lik bölümü ise domuz ve sığır kemikleri ve balıklardan temin edilmektedir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Dünyada ve Avrupa’da jelatin üretimi hammadde dağılımı (Duconseille ve ark, 2015).

2.3.2.1. Domuz jelatini

Dünya üzerinde jelatin üretiminin en büyük kısmı domuzdan yapılmaktadır. Domuz jelatini çoğunlukla domuz derisinden elde edilmektedir (Duconseille ve ark, 2015). Domuz jelatinin viskozitesinin daha düşük olması sebebiyle yumuşak şekerleme gibi ürünlerde kullanımı sığır jelatinine göre daha tercih edilmektedir. Ancak bazı dinlerde domuz ürünlerinin tüketilmesinin haram olması sebebiyle kullanılması bu toplulukların yaşadığı ülkelerde tercih edilmemektedir (Tekle ve ark, 2013). Bu sebeple sığır, balık gibi jelatinler tercih edilmektedir. Domuz derisinden elde edilen jelatinin protein yapısı incelendiğinde glisin (%25-30), prolin (%16-18), hidroksiprolin (%13,5) gibi aminoasitlerin ağırlıkta olduğu görülmüştür (Ledward, 2000).

2.3.2.2. Sığır jelatini

Sığır deri, kemik, kas ve bağ dokularında bulunan kolajenin hidrolizi ile oluşan jelatin türüdür. Dünyada jelatin üretiminde kullanılan kaynakların başında gelir. Domuzdan elde edilen jelatinin gıda, eczacılık ve kozmetik gibi alanlarda kullanımının Müslümanlık, Yahudilik gibi bazı dinlerde yasak olması sebebiyle sığır jelatinin bu topluluklar için oldukça önemli olmaktadır. Bunun aksine Hinduizm gibi dinlerde sığır jelatini kullanımı istenmemektedir (Tekle ve ark, 2013). Sığır jelatinin viskozitesinin yüksek olması sebebiyle daha sert bir yapısı vardır. Sığır jelatinin besin değerleri incelendiğinde ise 100 g da 60 kcal olduğu hesaplanmıştır. Sığır jelatinin protein yapısı incelendiğinde ise domuz jelatini ile benzer olarak glisin (%25-28), prolin (%13-16), hidroksiprolin (%11-14) gibi aminoasitlerin yine ağırlıkta olduğu görülmüştür (Ledward, 2000).

2.3.2.3. Balık jelatini

Balık jelatini saf, kokusuz, açık sarı renkte sağlıklı bir balık kemikleri ve derisinde bulunan kolajenin hidroliz ürünüdür. Genellikle balık derisinden elde edilir. Balık jelatinin erime noktasının düşük olması sebebiyle domuz ve sığır jelatinine göre ağızda erimesi daha hızlıdır. Bu sebeple balık jelatini ile yapılan gıdaların ağızda erimesi daha hızlı olmaktadır. Balık jelatinin düşük erime noktası bazı gıdalar için tercih sebebi olabilmektedir. Balık derisinde bulunan kolajenden jelatin üretmek için asit veya alkali işlemler uygulanır. Bunun ardından saflaştırma işlemi gerekir. Farklı balık türlerinden yaklaşık %2-64 oranında jelatin üretilmiştir (Gökçin, 2013). Balık jelatinin protein yapısının %80 inden fazlasını glisin, valin, prolin ve alanin aminoasitlerinden oluştuğu görülmüştür.

2.3.2.4. Diğer jelatin türleri

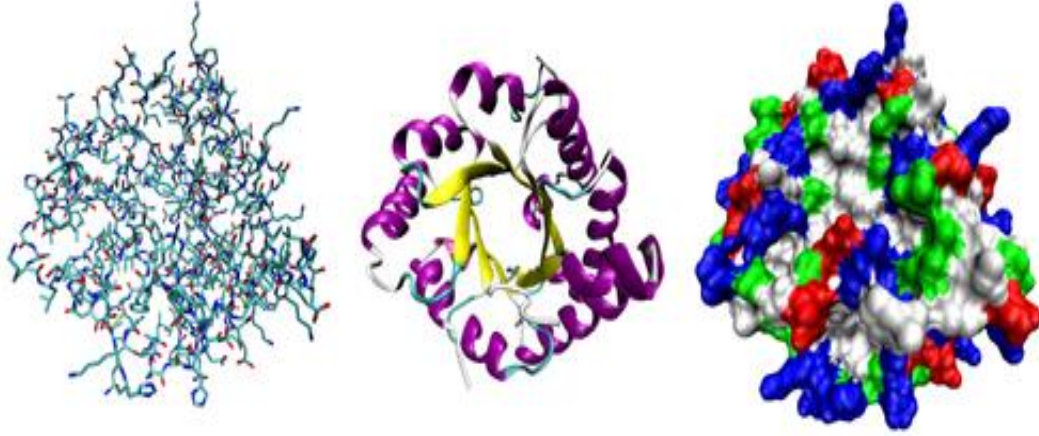
Hayvansal kaynaklı jelatinin çoğunluğunu domuz ve sığır jelatini oluşturmaktadır. Balık jelatini ise atık olan balık kalıntılarının değerlendirilmesi açısından son zamanlarda yaygınlaşmaktadır. Bunlar dışında eşek, tavuk gibi bazı hayvanlardan elde edilen jelatinlerde mevcuttur. Ancak bunlar hayvansal kaynaklı jelatinin ancak %1,5’u kadardır. Eşek derisinden elde edilen jelatin, özellikle Çin’de kıymetli bir ürün olması ve ilaç sanayinde kullanılması sebebiyle değerli bir jelatin türüdür. Eşek derisinde bulunan kolajenin hidrolizi ile jelatin üretilmektedir (Jinju ve ark, 2022).

2.4. Proteomiks Analizler

2.4.1. Proteinin yapısı

Proteinler, her organizmada bulunan, aminoasit monomerlerinden oluşan oldukça karmaşık yapıya sahip polimerlerdir. Makromoleküller arasında en çok işleve sahip proteinler, yapısal destek, depolama, savunma, taşıma, sinirsel iletim gibi birçok görevde bulunurlar. Aynı α -karbon atomuna bağlı $-COOH$ ve $-NH_2$ gruplarından oluşan ve proteinlerin yapısını oluşturan yapı taşlarına aminoasit denir. Proteinler genellikle 20 aminoasitten oluşmaktadırlar. Aminoasitler, amino ve karboksil grubu içeren organik moleküllerdir. Bu farklılık sayesinde, proteinin kendine özgü yapısı ve işlevi oluşmaktadır. Aminoasitler protein yapımı, hormon ve nörotransmitter sentezi gibi yaşamsal süreçler için gereklidir. 20 temel aminoasit vardır ve bu aminoasitlerin hepsinde R olarak adlandırdığımız birbirinden farklı yan zincirler bulunmaktadır. Aminoasit şemalarında gösterilen bu R harfi “Radikal” kelimesinin baş harfidir. R

harfî değişken uzunluk ve yapıdaki yan zincirleri temsil etmektedir. Yan zincirlerin farklılıkları sayesinde proteinler; büyüklükleri, şekilleri, işlevleri, H⁺ bağlama yetenekleri ve kimyasal etkileşim yetenekleri bakımından çeşitlilik göstermektedirler. Şekil 2.12.'de proteinlerin üç boyutlu sarmal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Proteinlerin üç boyutlu sarmal yapısı (Nair, 2007).

Aminoasitlerin 19 tanesinin amino grupları serbesttir. Sadece prolin adı verilen aminoasidin amino grubu bağlıdır. R grubu yan zincir olarak da adlandırılır ve amino asidin özelliklerine göre değişkenlik gösterir. Aminoasitlerin işlevinin ve görevinin belirlenmesinde değişken yan zincir etkilidir. Aminoasidin kendine özgü fonksiyonlarının belirlenmesi R grubunun yapı, boyut, yük ve suda çözünürlük gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişkenliğine bağlıdır. Bu nedenle amino asitler R grubunun hidrofilik, hidrofobik, asidik, bazik, aromatik gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre gruplandırılırlar (Tablo 2.2., Tablo 2.3., Tablo 2.4.).

Tablo 2.2. Asidik aminoasitlerin özellikleri.

Adı (Kısaltması)	Yapısı	Erime Nok. (oC)	Çözünürlük g/100 ml su	Mono izotopik kütle g/mol
Aspartik asit (Asp)	$\text{HOOCCH}_2\underset{\substack{ \\ \text{NH}_3^+}}{\text{CHCOO}^-}$	269	0,4	115,026943
Glutamik asit (Glu)	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\underset{\substack{ \\ \text{NH}_3^+}}{\text{CHCOO}^-}$	247	0,7	129,042593

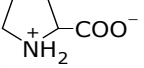
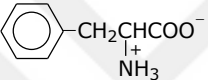
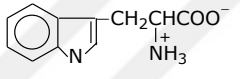
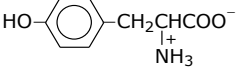
Tablo 2.3. Bazik aminoasitlerin özellikleri.

Adı (Kısaltması)	Yapısı	Erime Noktası (°C)	Çözünürlük g/100 ml su	Mono izotopik kütle g/mol
Asparagin (Asn)	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$	236	2,4	114,042927
Lizin (Lys)*	$\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2}(\text{CH}_2)_3\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$	255	Çok	128,094963
Arginin (Arg)*	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\text{C}}=\text{NH}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$	230	15	156,101111
Hisditin (His)*	$\text{CH}=\text{C}-\text{CH}_2\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$ $\text{N}=\text{CH}-\text{NH}$	287	0,4	137,058912

Tablo 2.4. Nötral aminoasitlerin özellikleri

Adı (Kısaltması)	Yapısı	Erime Noktası (°C)	Çözünürlük g/100 ml su	Mono izotopik kütle g/mol
Glisin (Gly) (2-Aminoasetik asit)	$\text{H}-\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$	233	25	57,021464
Alanin (Ala)	$\text{CH}_3\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$	297	17	71,037114
Valin (Val)*	$(\text{CH}_3)_2\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCHCOO}^-}$	315	9	99,068414
Lösin (Leu)*	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$	337	2	113,084064
İzolösin (İleu)*	$\text{CH}_3\text{CH}_2\underset{\text{NH}_3^+}{\overset{\text{CH}_3}{\text{CHCHCOO}^-}}$	284	4	113,084064
Serin (Ser)	$\text{HOCH}_2\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCOO}^-}$	228	5	87,032028
Treonin (Thr)*	$\text{HO}\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CHCHCOO}^-}$ CH_3	257	Çok	101,047679

Tablo 2.4. (Devamı): Nötral aminoasitlerin özellikleri.

Adı (Kısaltması)	Yapısı	Erime Nok. (°C)	Çözünürlük g/100 ml su	Mono izotopik kütle g/mol
Sistein (Cys, Cysh)	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$	-	Çok	103,00918 5
Metionin (Met)*	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$	283	3	131,04048 5
Prolin (Pro)		220	162	97,052764
Fenilalanin (Phe)*		283	3	147,06841 4
Triptofan (Trp)*		289	1	186,07931 3
Tirosin (Tyr)		344	0,04	163,06332
Glutamin (Gln)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$	186	3,6	128,05857 8

Amino asitlerin kendine özgü çeşitli fonksiyonları vardır. Bu da proteinin yapısının bulunduğu aminoasit türüne ve sayısı göre değişmesini sağlar. Proteinin yapısının farklılık göstermesi genetik çalışmalarla birleşerek araştırmacılara çeşitli araştırma konuları sunmaktadır.

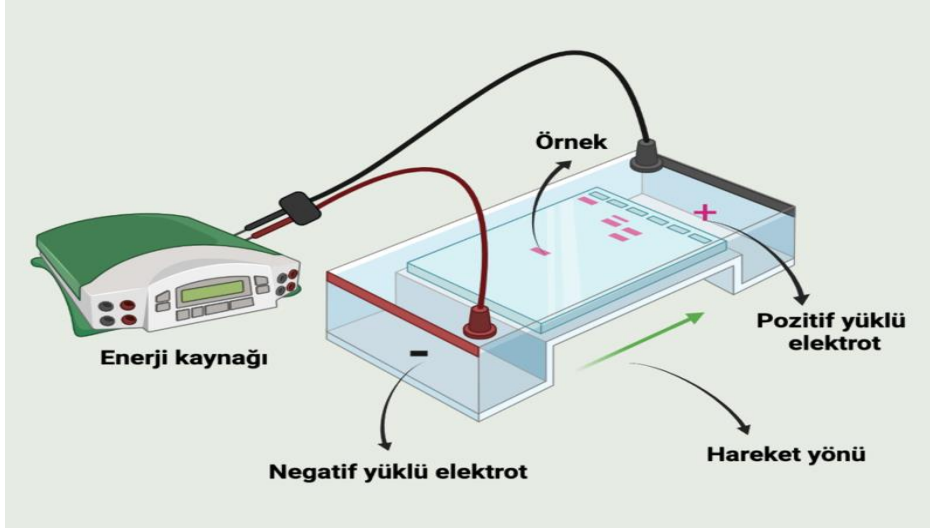
2.4.2. Proteomik

Proteomik, belirli dokularda belirli şartlarda genom tarafından kodlanan tüm proteinlerin; bileşiminin, yapısının, aktivitesinin, yerleşim yerlerinin, miktarlarının, transkripsiyon sonrası modifikasyonlarının, doku ve hücrelerdeki görevlerinin analiz edilerek incelenmesidir. Proteomik analizleri insan genomu başta olmak üzere çeşitli

organizmalardaki proteinin genetik yapısını inceleyen önemli bir alandır. Proteomik, genleri tanımlamaya çalışan genomik araştırmalara ek olarak gelişmektedir. Proteomik, proteinlerin tanımlanmasının yanı sıra makro moleküllerle etkileşimini, yerleşimini, aktivitesini ve işlevlerini belirler (Fields, 2001). Proteomik analizler kalitatif ve kantitatif analizlerdir. Çeşitli sebeplerden dolayı genomik çalışmalara göre daha karmaşıklardır. Bu yüzden proteomik analiz çalışmalarında çeşitli yöntemler geliştirilmektedir.

Proteomik araştırmalarının temeli, proteinlerin ayrılması ve ayrılan bu proteinlerin tanımlanması esasına dayanmaktadır. Proteinler hücre içerisindeki ortamdan uzaklaştırılır ve uzaklaşan protein yapı fiziksel ve kimyasal özelliklerinden faydalanılarak ayrılması sağlanır (Edman, 1949). Proteomikte de proteinlerin tanımlanmasında örnek analiz edilmeden önce tespit edilmeye çalışılan proteinin diğer proteinlerden ya da tüm proteinlerin birbirlerinden ayrılması gereklidir. Proteinlerin seperasyonu amacıyla en sık kullanılan yöntem iki boyutlu jel elektroforezi (2D) ve proteinlerin tanımlanması amacıyla en sık kullanılan yöntem ise kütle spektrometresidir. Proteomik çalışmaların temeli olarak iki boyutlu jel elektroforezi kullanılarak yapılan çalışmalar ile ayrılan proteinlerin veri tabanlarının oluşturulmaya başlanması kabul edilmektedir (O'Farrell, 1975). Birbirinden ayrılan ve ulaşılmak istenen proteinler, MS gibi analitik sistemler kullanılarak analizleri yapılır. Sisteme bağlı çeşitli yazılımlar sayesinde bu analizlerden datalar elde edilir.

Proteinlerin ayrımı için kullanılan birçok elektrofez modeli bulunmaktadır. Bunlardan sık kullanılan bir boyutlu ve iki boyutlu olmak üzere jel elektrofezleri bulunmaktadır. Bir boyutlu jel elektrofezinde proteinler farkı ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilerek molekül büyüklüğüne göre ayrılması sağlanır. İki boyutlu jel elektrofezinde ise proteinler agaroz jel üzerinde ilerleyerek molekül ağırlıklarına ve izoelektronik noktalarına göre ayrılmaktadır. Bu yöntem ile elde edilen protein kısımları jelden kesilerek kütle spektrometresinde peptitlere ayrılır. Şekil 2.13.'te jel elektrofezine ait şematik gösterim verilmiştir.



Şekil 2.13. Jel elektrofezi şematik gösterimi (Anonim, 2024a).

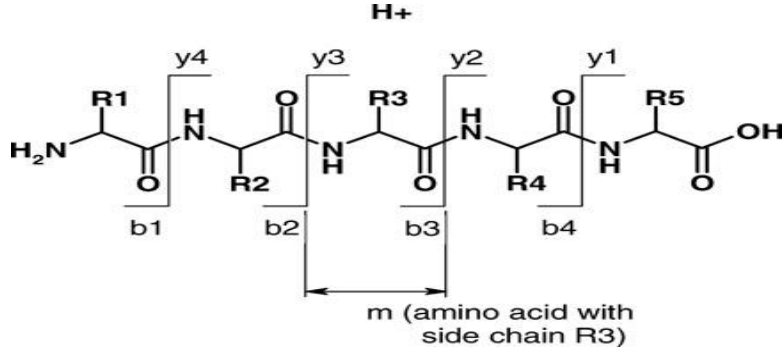
Proteinin tanımlanmasında en temel kriter kütesidir. Kütle spektroskopisi moleküllerin kütesini oldukça yüksek hassasiyette saptayan analiz tekniğidir. Bu sebeple kütle spektrometresi (Mass Spectrometry – MS) yaygın olarak analitik tekniklerde kullanılmaktadır. Kütle Spektrometresi, 1980’li yıllarda kullanılmaya başlanmıştır ancak 90’lı yıllardan sonra biyolojik maddelerde kullanımı artmıştır. Böylece biyolojik numunelerin analizinde önemli bir yer edinmiştir. Proteinler büyük yapıli moleküller olması sebebiyle numuneyi gaz faza geçirmek ve iyonize etmek oldukça zordur (Cañas ve ark, 2006). MS ile peptit analizinde duyarlılık ve hassasiyet oldukça yüksek seviyelere çıkartılmıştır. MS sistemlerinde bulunan Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) gibi iyonlaştırma sistemleri kuadrupol, iyon tuzağı, fourier-dönüşüm iyon siklotron rezonansı, orbitrap ve uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) gibi kütle analizörüne bağlanarak proteomik analizde kullanılmaya başlanmıştır (Cañas ve ark, 2006). Uzun yıllardan beri proteinlerle ilgili MS verileri toparlanarak gen dizilimlerinin korelasyonu saptanmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda genomik analizlerde kullanılmaktadır. Proteomik çalışmalarda MS, proteinlerin, protein kombinasyonlarının ve diğer makro moleküllerin özelliklerini tanımlamakta kullanılmaktadır. Numune içerisinde bulunan protein, belirli bir proteaz kullanılarak parçalanır. Daha sonra, proteinin içerdiği amino asit dizilimine göre peptit parçaları oluşur. Proteinlerde bulunan peptit dizilimleri ile ilgili bu zamana kadar oluşturulan veri tabanlarından faydalanılarak türetilen parçaların kütlelerinin karşılaştırılması yapılır. Protein parçasının kullanılan yazılımda veri bankasının içerisinde bulunması

gerekmektedir. Protein parçaları Tandem MS, üçlü kuadrupol, kuadrupol TOF ve Tandem TOF cihazlarına verilerek proteomik analizler gerçekleştirilebilir (Cañas ve ark, 2006).

2.4.3. Proteinin enzimasyonu

Proteinleri daha küçük peptit yapılara veya aminoasitlere parçalayan, proteolizi katalize eden enzimlere proteaz denilmektedir. Peptitler arasındaki bağların kırılmasıyla proteinler parçalanır. Proteazlar, peptidaz, proteinaz proteolitik enzimler olarak da bilinirler. Proteini parçalayan enzimler pepsin, tripsin, kimotripsin, procine, dipeptidaz, karboksipeptidaz gibi enzimlerdir. Pepsin enzimi; insanların ve birçok hayvanın sindirim sisteminde bulunan ana proteazlardandır. Aminoasitleri amino ucundan keser. Mide enzimi olarak bilinir. pH 5,6 üzerinde inaktiftir. Tripsin ve Kimotripsin enzimleri de insan ve hayvanların sindirim sisteminde bulunan enzimlerdir. İnce bağırsakta bulunan bu enzimler protein yapıların parçalanmasında pepsin ile birlikte görev yapmaktadır. Pankreasın salgıladığı bu enzimler midede başlayan protein sindirimini devam ettirirler. Tripsin enzimi aminoasitleri amino (NH₂) ucundan keserken kimotripsin enzimi aminoasitleri karboksil (COOH) ucundan kesmektedir. Çalışmaları için en uygun pH 8'dir.

Her enzimin optimum sindirim koşulları vardır ve proteini spesifik bir bölgeden kesmektedir. Örneğin tripsin enzimi proteini Lys (C) ve Arg (C) bölgesinden keserken pepsin ve kimotripsin enzimi proteini Phe, Trp, Try (C) bölgelerinden kesmektedir. MS sistemlerinde proteomik analizlerde tripsin enzimi kullanılmaktadır. Tripsin enziminin kullanılmasının çeşitli sebepleri vardır. Öncelikle tripsin enziminin kestiği spesifik bölgeler kısa peptitler olması, veri tabanlarında mevcut protein setleri ile karşılaştırılmasının kolay olmasıdır. Peptidin parçalanmasıyla iyonlar meydana gelir (Vékey ve ark, 2008). Bu tür iyonlara “b” ve “y” türü iyonlar denir. Peptit parçalanırken var olan yük “b” ve “y” terminalde kalır. Yük amino terminalindeyse “b” türü, karboksi terminalindeyse “y” türü iyonlar oluşur. Tripsin enzimi yükün karboksi terminalinde bırakarak “y” türü iyonlar oluşmasını sağlar. Şekil 2.14.'te b ve y adlandırmasına ait görsel verilmiştir. MS Quadrupole veya Quadrupole-TOF türü cihazlarda y-iyonları baskın halde bulunmaktadır (Steen ve Mann, 2004). Bu da tripsin enziminin tercih edilme sebeplerinden olmaktadır. Ayrıca tripsin enzimi düşük maliyetli, kolay bulunabilen bir proteazdır.



Şekil 2.14. Roepstorff – Fohlmann – Biemann Adlandırması (Steen ve Mann, 2004).

2.4.4. Proteomik analizlerde veri tabanı ile proteinin tanımlanması

Proteinlerin profillerinin oluşturulmasında ve protein tanımlamasında ilk adım genelde 2D jel elektrofezi ile başlar. Jel elektrofezinde proteinler izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar. Ayrılan proteinlerin gümüş, coomassie blue veya floresan boyalarla boyanarak görünür olması sağlanır. Daha sonra jel içinde spesifik protein enzimleri ile (örneğin tripsin) peptidlere parçalanırlar. Elde edilen peptitler jel parçalarından ekstrakte edilir ve kütle spektrometresi ile analiz edilir. Bir proteine ait peptitlerden elde edilen kütle spektrumu, o proteinin parmak izinin oluşması sağlanır. Bu yöntemle proteinler tanımlanabilirler.

Deneyssel olarak tanımlanan protein kütleleri veri tabanlarında bulunan aynı proteinin aynı enzimle bilgisayar simülasyonu ile hazırlanmış kütle profilleri ile kıyaslaması yapılır. Veri tabanında bulunan proteinler, eşleşen peptit miktarına göre belirli bir kütle hata oranıyla sıralanırlar. Veri tabanındaki MALDI piklerinin doğruluğunun yüksek olması ve zengin bir veri tabanı bulundurması proteinlerin başarı bir şekilde tanımlanması için çok önemlidir (Canas ve ark, 2006).

Son yıllarda belirlenen proteinlerin çoğu duyarlı, hızlı ve güvenilir protein tanımlama yöntemi olması sebebiyle peptit kütle parmak izi (PMF) ve MALDI-TOF kombinasyonu ile oluşturulmuştur. Günümüzde ise gelişen MS/MS sistemleriyle daha fazla peptit tanımlamalar yapılmaktadır. Kütle parmak izi ile protein tanımlanmasında peptitlerden faydalanılarak veri tabanı yardımıyla proteine ulaşılabilir veya direk proteinin kendisinden yola çıkılarak veri tabanında proteinden yararlanılır. Proteinin kendisinden faydalanmak amacıyla Swiss-Prot geliştiricileri tarafından hazırlanan ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<http://www.expasy.ch>) adresinde UniProtKB/Swiss-Prot veri tabanındaki protein bilgisinde çok detaylı arama yapılabilmektedir.

MS analizlerinde çeşitli firmaların geliştirdiği lisanslı programlar olan veri tabanları mevcuttur. Ayrıca bazı üniversitelerin ve kurumların geliştirdiği, internet üzerinde herkesin erişebileceği arama motorları da vardır. Bu veri tabanlarında marker olarak tanımlanan birçok spesifik peptitlere ulaşılabilir (Tablo 2.5.).

Tablo 2.5. Protein ve peptitlerle ilgili bazı veri tabanları arama metotlarının adı ve adresleri.

Arama motorunun adı	Adresi	Yapılabilen analiz
MASCOT	http://www.matrixscience.com/	MS, MS/MS
Protein Prospector	http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.html	MS, MS/MS
BLAST	http://www.ebi.ac.uk	MS/MS
SEQUEST	http://fields.scripps.edu	MS/MS
OMSSA	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa	MS/MS

2.5. Jelatin Kaynağının Belirlenmesi

2.5.1. Jelatin kaynağının belirlenmesinin önemi

Jelatin hayvansal kaynaklı bir kolajen olması sebebiyle üretiminde çeşitli kaynaklardan faydalanılmaktadır. Bu kaynaklar domuz derisi ve kemikleri, sığır derisi ve kemikleri, balık derisi, eşek derisi gibi hayvansal kaynaklar olabilmektedir. Domuzdan jelatin elde edilmesi, sığır, eşek ve balık gibi hayvanlardan elde edilmesine göre genel olarak daha ucuzdur ve kolaydır. Bu sebeple çoğu ülkede gıda endüstrisinde domuz ürünleri kullanılabilir. Jelatin hammadde olarak en yaygın domuz ve sığır derisinden üretilmektedir (Duconseille ve ark, 2015). Jelatin üretiminde, hammaddeye erişilebilirlik, maliyet, dini inanışlar, kalite kriterleri gibi farklı sebepler etkili olmaktadır. Çeşitli kaynaklardan üretilen jelatinlerin benzer özelliklerde olması ancak her toplumda her jelatin türünün tüketilmemesi sebebiyle orijinin belirlenmesi dünya genelinde önemli hale gelmiştir. Toplamların bazı jelatin kaynaklarının önemli olması, özellikle müslüman ve yahudi toplumlarda domuz ürünlerinin tüketilmemesi jelatin kullanımında tür tayininin tespitini zorunlu hale getirmiştir. Benzer şekilde

Hinduizm gibi dinlerde sığır tüketiminin yasak olması da bu dine mensup insanlar için jelatin orijininin bilinmesi gerekliliğini doğurmuştur (Boran ve ark, 2010). Yine vejetaryen ve vegan olan insanlar hayvansal kaynaklı jelatinli ürünleri tercih etmemektedir (Nhari ve ark, 2012). Bazı sertifikalandırma kuruluşlarının (Halal ve Kosher gibi) ürünleri sertifikalandırırken domuz ürünlerinin kullanılmasına izin vermemektedir. Tüketicilerin bu sertifikalı ürünleri tercihi de üreticilerin ürünlerinde bu hususa dikkat etmesini gerekli kılmıştır. Balık ve diğer bazı jelatin türlerinin elde edilmesi zor olduğundan dünyada sığır ve domuzun jelatin kaynağının büyük bir kısmını karşıladığı görülmektedir. Sığır ve domuz jelatin peptitlerinin oldukça benzer olması tür tayinin kesin bir doğrulukta ortaya konulmasında en büyük engeldir. Bugün farklı tekniklerle jelatin tür tayini yapılmakla beraber kesin doğruluk açısından bu yöntemlerin dezavantajları vardır. Bu nedenle jelatin orijininin belirlenmesinde daha hassas teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de büyük bir sektör olması sebebiyle gıdalarda taklit taşış oldukça yaygındır. Bu sebeple gıdalardaki hilelerin tespiti hem tüketici hem de üretici açısından çok büyük önem taşımaktadır. Jelatinin tür tayininde helal doğrulaması için kullanılan çeşitli analitik yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin çoğunda analitik teknikler kullanılarak saf jelatinin türünün belirlenmesi sağlanmıştır. Bu yöntemlerden bazıları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Spektrometrik yöntemler, kütle spektrometresi (MS), kromatografik yöntemlerdir. Çalışmalar yapılırken bazı yöntemlerin pahalı olması, bazı yöntemlerde ise proteinin yapısı sebebiyle kolay bir şekilde denatürasyona uğramasından dolayı ekili sonuçlara ulaşılamamış ve farklı birçok yöntem geliştirilmiştir.

2.5.2. Jelatinin kaynağının belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Jelatin tür tayini tüm dünyada önemli bir konu olması sebebiyle eski yıllardan beri çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Günümüzde gelişen teknolojilerle araştırmacılar bu konunun üzerine daha fazla eğilmeye başlamıştır. Genel olarak bu çalışmalarda jelatin tür tayininin PCR temelli, elektroforetik, spektroskopik, kromatografik uygulamaları ve immünokimyasal teknikler da dahil olmak üzere analitik yöntemler kullanılarak yapılabileceği belirlenmiştir (Zhang ve ark, 2009). Bir çalışmada Grundy ve ark. (2016), gıda sanayinde ve ilaç sektöründe kullanılan jelatinin kökeninin tespitinde ELISA, PCR ve kütle spektrometresi analiz yöntemlerini

karşılaştırmışlardır. Kütle spektrometresinin jelatin türü tayininde diğer yöntemlere göre daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Doi ve ark. (2009), jelatine alerjisi olabilecek kişilerde işlenmiş gıdalarda domuz ve sığır jelatinini tespit edebilecek sandviç enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin duyarlılık ve uygulanabilirlik açısından sığır ve domuz jelatin için özgül olduğu ancak balık jelatini için çok az reaktivite gösterdiği görülmüştür. Yine bir çalışmada, Tukiran ve ark. (2016), ticari şekerleme ürünlerinde bulunan jelatinin türünü ELISA yöntemini ile tayin etmişlerdir. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi) kullanılarak domuz jelatini %90,28 üzerinde geri kazanım değerleri analiz edilebilmiştir. Nhari ve ark. (2012), çalışmalarında sığır ve domuz jelatininin gıda ürünlerindeki tespiti için çeşitli analitik yöntemleri genel çerçevede değerlendirmişlerdir. FTIR, ELISA, HPLC, HPLC-MS sistemlerinin avantaj ve dezavantajlarını belirtmişlerdir.

2.5.2.1. Spektroskopik metotlar

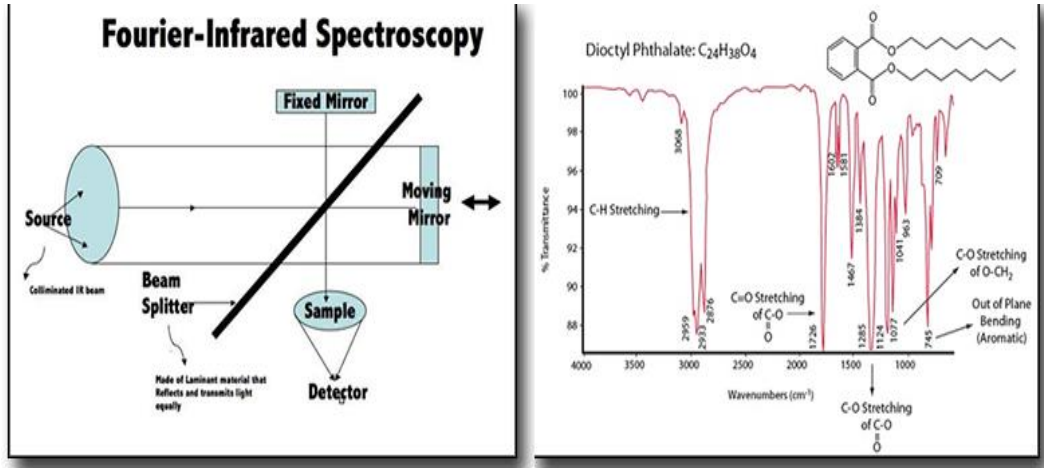
Spektroskopik metotlar, numunelerin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Işın-madde etkileşimini inceleyen bilimsel yöntemlerdir. Farklı spektroskopi teknikleri, çalışılan proses ve enerji değişimi büyüklüğüne bağlı olarak belirli frekans aralıklarında çalışmaktadır. Bazı spektroskopik tekniklere örnek verecek olursak fourier dönüşümlü (FTIR, fourier infrared), yakın bölge kızılötesi (NIR, near infrared), orta bölge kızılötesi (MIR, mid-infrared), Raman spektroskopisi ve üstün uzaysal görüntüleme spektroskopisi gibi spektroskopik metotlarıdır. Hızlı ve hassas sonuçlar veren, düşük maliyetli, modern enstrümental analizlerdir. Kalitatif ve kantitatif olarak sonuçlar elde etmek mümkündür.

FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi) spektroskopisi

Bir tür titreşimsel spektroskopi tekniğidir. Molekül içi bağlar üzerine gönderilen kızılötesi ışınların, bağların titreşimsel ve dönme hareketleri ile kızılötesi bölgede soğurulması temeline dayanır (Sun, 2009). Kızılötesi dalga boyu aralığı 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi, orta dalga boylu kızıl ötesi ve uzak dalga boylu kızıl olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. Bu sistemde ışın demeti ikiye ayrılır, ışın demetlerinden biri sabit aynaya diğeri ise hareketli aynaya gider. Yansıyan ışınlar geri dönüp birleştiğinde, bu iki ışın bileşeninin yol farkından dolayı bir interferans paterni oluşur. Işın örnek içinden geçtikten sonra interferometre

tarafından kızılötesi spektral bilgisini içeren interferans sinyallerini oluşturur. Bu interferans sinyalleri tekrar edecek şekilde dedektör tarafından üretilir ve ölçülür (Alvarez-Ordenez ve Prieto, 2012). Katı, sıvı, gaz halindeki örneklerin yapısındaki fonksiyonel grupların durumuna göre ölçüm yapılır. Yapıdaki bağların konumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik olup olmadığı bu yöntemle belirlenebilmektedir. FTIR spektroskopisi gıdalardaki et ve jelatinin kaynağının belirlenmesinde kullanılarak helal gıda yönünden analizlerin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Bir çalışmada ATR-FTIR kullanılarak Jelatin kaynaklarının sınıflandırılması ve ayrılması analiz ile elde edilen sonuçlar domuz ve sığır jelatini karışımlarından sığır jelatinini başarıyla ayırmıştır (Cebi ve ark, 2016).

Cebi ve ark. (2016), çalışmalarında zayıflatılmış toplam yansıma Fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) spektrumlarını kemometrik analizlerle birleştirerek gıda ürünlerindeki jelatin kaynaklarının farklılaştırılması ve doğrulanması için alternatif bir yöntem olarak hızlı bir spektroskopik teknik geliştirmişlerdir. ATR-FTIR spektral verileri, sığır ve domuz jelatinlerinin karışımından saf sığır jelatinini başarıyla ayırt etmiştir. Bu yöntem, jelatin içeren ürünlerde hem jelatinin varlığının hem de kökeninin hızlı, basit ve ekonomik bir şekilde belirlenmesinde faydalı olabileceğini göstermiştir. Hashim ve ark. (2010), çalışmalarında jelatini köken türlerine göre sınıflandırmak için, Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) ile zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) ve ayırıcı analizin birleşimi kullanılarak nitel belirleme için basit ve hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Jelatinler Amid I ve Amid II titreşimsel bantları kullanılarak başarılı şekilde ayırt edilebilmiştir. Bu yaklaşım, jelatinin kaynağının hızlı bir şekilde belirlenmesini sağlamıştır. Hermanto ve ark. (2013), spektroskopik ve elektroforetik analizleri kullanarak sığır ve domuz jelatini türlerini ayırt etmek için pepsin enzimi kullanmışlardır. Pepsin enzimi kullanılarak hidroliz yapılmış ve farklı molekül ağırlığına sahip peptit parçalarını elde etmişlerdir. Ultraviyole-görünür bölgede ve FTIR spektrumlarındaki farklılıkları gözlemleyerek değerlendirmeler yapmışlardır. Metotların doğru ve güvenilir olduğu belirtilmiştir ancak metotların dezavantajları uzun zaman sürmeleri, yorucu, maliyetli ve zorlayıcı olmalarıdır. Şekil 2.15.'te FT-IR spektrometresi ve pik grafiğine ait görsel verilmiştir.



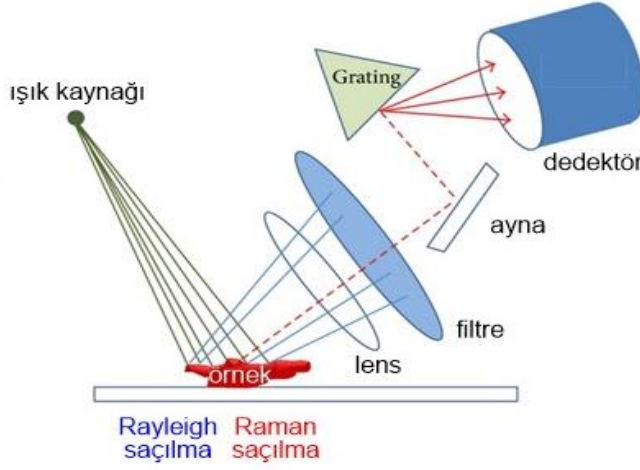
Şekil 2.15. FT-IR spektroskopisi ve pik grafiği (Anonim, 2025b).

Raman spektroskopisi

Raman spektroskopisi, maddenin yapısı veya özellikleriyle ilgili bilgiler edinmek için ışığın madde ile etkileşiminden yararlanarak ölçüm yapan spektroskopik bir tekniktir. Raman spektroskopisi de FTIR ve IR gibi bir titreşimsel spektroskopik bir tekniktir ancak IR ve FTIR spektroskopisi ışığın absorpsiyonlanması tekniğiyle çalışırken Raman spektroskopisi ışığın saçılması prosesine dayanmaktadır. Işığın saçılmasını sağlayan parçacık çapları ışımının dalga boyuna eşit veya daha büyük ise bu “Tyndall Saçılması” olarak adlandırılır. Görünür bölgedeki ışıma, kolloidal veya bulanık çözeltilerdeki saçılma bu saçılmaya örnektir. Işığın saçılmasına sebep olan parçacık çapları ışımının dalga boyundan küçük ise buna da “Rayleigh Saçılması” denir ve saçılma sırasında saçılan ışığın enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur. (Rodes ve ark, 2004). Bu sistem yüksek seçiciliğe sahip olması, kısa sürmesi, numuneyi özel olarak hazırlama işlemi gerektirmemesi (örnek üzerine direkt ışın göndererek ölçüm yapılabilmesi), sıvı sistemler ile uyumlu olması gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (Yang ve Ying, 2011).

Cebi (2018), yaptığı çalışmada jelatin tür tayinin belirlenmesinde FTIR ve Raman spektroskopisi, LC-MS/MS kromatografik tekniği ve RT-PCR tekniklerini kullanmıştır. Çalışmanın öncelikli aşamasında standart jelatinlerin türünün belirlenmesine yönelik FTIR ve kemometri temelli yöntemler geliştirilmiştir ve jelatinlerin FTIR spektroskopisi tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde türüne göre sınıflandırılabilirdiği görülmüştür. Benzer şekilde Raman spektroskopisi ile standart jelatinlerin kökenine göre ayırt edilebildiği tespit edilmiş ve kemometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Raman tekniğinin kemometri ile birlikte uygulanması sonucunda

standart jelatinlerin sığır veya domuz kökenli olmalarına göre sınıflandırılabilir ve ayırt edilebileceğini göstermiştir. Raman spektroskopisi cihazının şematik görünümü Şekil 2.16.'da gösterilmiştir.



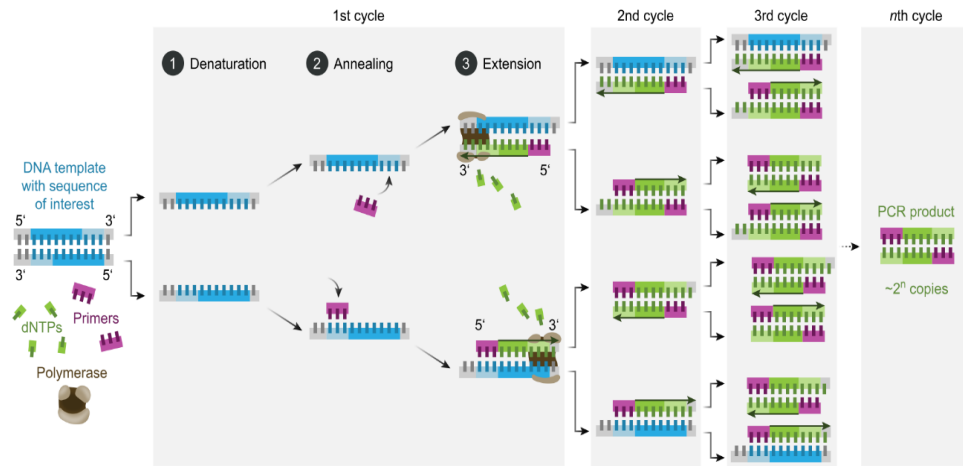
Şekil 2.16. Raman spektroskopisi cihazının şematik görünümü; Rayleigh saçılma (mavi) ve Raman saçılma (kırmızı) (Anonim, 2025c).

2.5.2.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

DNA'ya uygulanan yüksek sıcaklık sonrasında DNA'da bulunan iki sarmal zincirinin denatüre olarak ayrılması ve tek sarmal haline gelen DNA zincirine sentetik oligonükleotidlerin bağlanması tekniğine polimeraz zincir reaksiyonu denir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA zincirlerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Acuna-soto ve ark, 1993). Polimeraz zincir reaksiyonu üç temel kısımdan oluşur. Bu aşamalar denatürasyon, hibridizasyon ve polimerizasyondur. Denatürasyon aşaması yüksek sıcaklığa maruz bırakılan DNA zincirleri birbirinden ayrılmasıdır. Hibridizasyon aşaması, birbirinden ayrılarak tek zincire dönüşen DNA zincirine sentetik oligonükleotidlerin bağlanması aşamasıdır. Polimerizasyon aşaması ise DNA zincirinin uzaması aşamasıdır. Bu işlem, genel olarak 25-40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütülür. Yürütülen DNA parçacıkları ethidium bromide veya gümüş nitrat ile boyanarak gözlem yapılır. PCR tekniği, uygulaması kolay, spesifik ve hassas bir tekniktir. PCR tekniğine ait görsel Şekil 2.17.'de verilmiştir.

Demirhan ve ark. (2012), RT-PCR tekniğini kullanarak Helal/Kosher kimlik doğrulaması için yumuşak şekerlerde, Türk lokumunda ve marşmelovda jelatin kökenini belirlemek üzere bir araştırma yapmışlardır. Tespit edilebilen minimum

sahtecilik seviyesi hatmi ve sakızlı şekerler için %1,0 w/w bulunmuştur. Cai ve ark. (2012), RT-PCR tekniğini kullanarak jelatin karışımlarında ve kapsüllerde sığır ve domuz türlerinin nicel ve nitel olarak tespiti kantitatif PCR analizleri ile gerçekleştirmiştir. Çalışmada jelatin kapsüllerde, önemli ölçüden daha az DNA tespit edilmesine rağmen, domuz ve sığır tür kimliklerinin belirlenmesi ve her türün göreceli tahminin mümkün olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada Tanabe ve ark. (2007), gıdalarda domuz eti, tavuk, sığır eti, koyun eti ve at etinin eser miktarlarını tespit etmek için hızlı gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Yine bir çalışmada, Mutalib ve ark. (2015), jelatin kapsüllerinin helallik yönünden incelemek amacıyla klasik PCR tekniği ile PCR-southern hibridizasyon tekniklerini kullanmışlardır. Yirmi markaya ait örneklerle çalışma yapmışlardır. Yirmi örneğin altı tanesinde PCR-southern hibridizasyon tekniği ile domuz geni tespit edilirken, klasik PCR tekniğinde domuz içeren bir örnek tespit edilememiştir.



Şekil 2.17. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu şematik gösterimi (Anonim, 2025d).

2.5.2.3. Kromatografik yöntemler

Sıvı kromatografisi

Kromatografi terimi Yunanca kökenli olup “khramoma” renk anlamına gelirken, “graphe” yazı anlamına gelmektedir. Bir karışımdaki bileşenlerin ayrılması ve tanımlanmasında kullanılan bileşenleri niteliklerine ve niceliklerine göre ayıran bir tekniktir (Yıldız ve ark, 1997; Burtis ve Ashwood, 2007). Bileşiklerin ayrılmasında sıvı hareketli faz kullanılmaktadır. Hareketli faz kullanılarak, sabit bir faz üzerinde, maddelerin değişik hızlarla sürüklenmeleri esasına dayanır. Proteomik analizlerde oldukça kullanılan bu yöntem büyük moleküllü yapıları ayırabilmektedir. Özellikle

kütle spektrometresi ile kombine kullanılması proteomik analizlerde başarılı sonuçlara ulaşılmasını sağlamaktadır.

Nemati ve ark. (2004), çalışmalarında temel bileşen analizi (PCA) gibi kemometrik yöntemler kullanılarak 14 sığır jelatini ve 5 domuz jelatini analizini ters fazlı (RP) HPLC ile gerçekleştirmişlerdir. HPLC analizi ile tespit edilen 20 pik arasından biri sığır jelatininde çok tipik olduğu görülmüştür. Bu yöntemlerin domuz ve sığır jelatinlerinin ayırt edilmesinde kullanılabileceği bilgisine ulaşmışlardır. Bir çalışmada Azilawati ve ark. (2015), RP-HPLC tekniği ile domuz, sığır ve balık jelatinlerine ait amino asit dizilimi belirlemişlerdir. Jelatin bazlı ticari ürünlerden 12 örnek kullanılarak yapılan çalışmada veri tabanı ile karşılaştırmalarda gruplama kalıpları ve değişken korelasyonlar doğrulamıştır. Bu nedenle, bu kantitatif yöntem, çeşitli kaynaklardan jelatini belirlemek için bir tarama yöntemi olabileceği belirtilmiştir.

Mobil Faz

Maddeleri sabit faz olan kolon üzerinde taşıyan hareketli sıvı fazdır. Çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözücülerdir. Belli bir saflıkta olması gerekir. Çalışılacak maddeye, detektöre ve sabit faza göre hareketli fazın özellikleri değişmektedir.

Degazör

Mobil fazlar genellikle birkaç maddeden oluşan çözeltilerdir. Bu çözeltilerde hava kabarcıkları oluşur ve bu kabarcıklar pompada ve sabit faz olan kolonda problemlere sebep olmaktadır. Mobil faz hazırlandıktan sonra ultrasonik su banyosunda tutularak hava kabarcığı kısmen uzaklaştırılmaktadır. Ancak mobil fazın hareket sırasında oluşabilecek kabarcıklarında pompaya ulaşmadan önce uzaklaştırılması gerekir. Bu yüzden hava kabarcıklarının pompaya ulaşmadan önce giderilmesini sağlayan kısım degazördür.

Pompa

Hareketli fazın ve numunenin enjektör, kolon ve dedektör üzerinde sürekli dolaşımını sağlayan kısımdır. Degazörden mobil fazı çekerek belli bir basınç ve akış hızında sabit faza oradan da detektöre taşınmasını sağlar. Pompanın hızı ayarlanabilmektedir ve akış hızının tekrarlanabilirliği %0.5 veya daha iyi olmalıdır. Pompanın basınç göstergesinin düşük olması gerekmektedir. Pompalar çok sayıda çözücünün korozyon etkisine karşı dayanıklı olması gerekmektedir (Burtis ve Ashwood, 2007).

Enjektör

Numunenin mobil faza enjekte edilerek mobil faz içinde pompa ile sabit faza iletilmesini sağlayan kısımdır. Numunenin enjektöre verilmeden önce mutlaka filtreden süzölmüş olması gerekir. Enjeksiyon ünitesi bir enjeksiyon valfinden ve numune haznesinden oluşmaktadır.

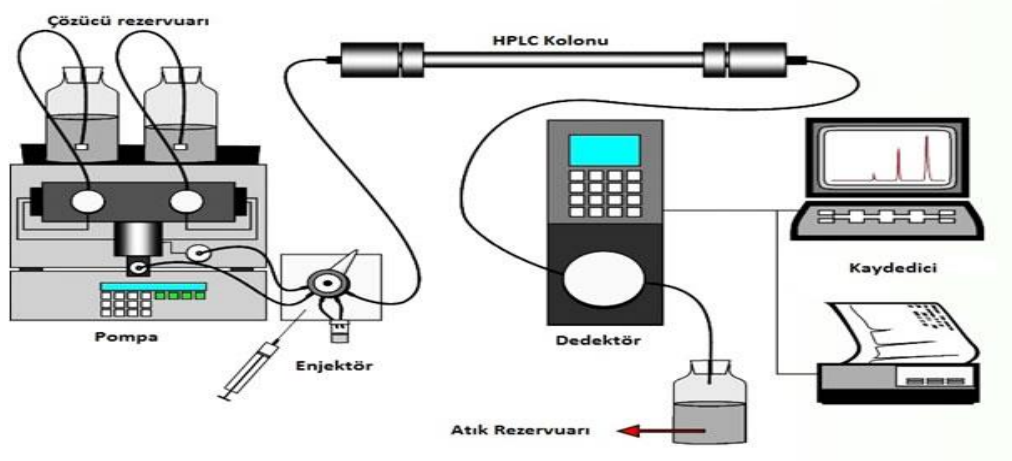
Sabit Faz (Kolon) ve Kolon Fırını

Kolon olarak tabir edilen sabit faz, hareketli fazın taşıdığı maddelerin etkileşimlere girerek alıkonulduğu fazdır. Genellikle dış malzeme olarak çelik, PEEK ve camdan üretilmektedir. İç bölümde ise Silika veya polimer gibi dolgu malzemesi kullanılmaktadır. Belirli dolgu malzemeleri hazırlanan kolonlar analit özelliklerine göre farklı amaçlarda imal edilmektedir.

Kolon fırını ise; Kolonun saklandığı bölümdür. Kolonun belli bir sıcaklıkta tutulmasını sağlamaktadır. Sıcaklık ayarlanabilen bir sistemdir ve her analiz metoduna göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Dedektör

Sabit fazdan çıkan bileşenlerin görülmesini ve miktarlarının belirlenmesini sağlayan kısımdır. Dedektörde belirlenen bileşikler kromatogram üzerinde miktarına göre belirli alanlar oluşturan pikler olarak gösterilmektedir. Belirlenecek maddelere göre kullanılan dedektörler değişiklik göstermektedir. Dedektörlerin çalışması genellikle ultraviyole veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanır. Şekil 2.18.'de sıvı kromatografisi kısımları gösterilmiştir.



Şekil 2.18. Sıvı kromatografisi kısımları (Anonim, 2025e).

Kütle spektrometresi

Kütle spektroskopisi (Mass spectrometry); organik moleküllerin parçalanması sonucu üretilen gaz fazın iyonlaştırılarak bu iyonların kütle/yük (m/z) oranlarının belirlenmesi esasına dayanan bir analiz tekniğidir. Maddeler bazı yöntemlerle artı ya da eksi yüklü iyonlara dönüştürülür ve bu yüklü iyonların ya da molekül parçalarının kütleleri; kütle/yük oranı üzerinden tespit edilir (İşlekel, 2011; Biberoğlu, 2003; Aguilar, 2004).

Kütle spektrometrelerinde farklı iyonlaştırma teknikleri kullanılmaktadır. Bunlar; elektrosprey iyonlaştırma (ESI, electrospray ionization), atmosfer basınçlı kimyasal iyonlaştırma (APCI, atmospheric-pressure chemical ionization), atmosfer basınçlı foto iyonlaştırma (APPI, atmospheric pressure photoionisation) ve elektrosprey kimyasal iyonlaştırma (ESCI, electrospray chemical ionization) teknikleridir. Kütle spektroskopometrelerinde 4-kutuplu kütle spektrometresi (quadropole) ve uçuş zamanlı kütle spektrometresi (TOF, time of flight) gibi çeşitli enstümental analiz yöntemleri bulunmaktadır.

Kütle Spektrometresi iyon kaynağı, kütle analizörü ve iyon dedektör sistemi olmak üzere başlıca üç kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar kütle spektrometresinin temel ögeleri olup çeşitli teknikler kullanılarak geliştirilmiştir.

Kütle Spektrometresi ve sıvı kromatografisinin birlikte kullanıldığı sistemlerde yapılan çalışmalarda oldukça hassas ve doğruluğu kuvvetli sonuçlar elde edilebilmesi sebebiyle, son zamanlarda çalışmalar bu yöne de kaymıştır. Zhang ve ark. (2009), bu çalışmada, sindirilen jelatinlerdeki işaretleyici peptitlerin tespiti ve tanımlanmasına dayalı olarak sığır ve domuz jelatini arasında ayırım yapmak için geliştirdikleri yöntemde prolin hidrosilasyonunun peptit tanımlamasını etkileyen önemli bir faktör olduğu bulunmuştur. HPLC–MS/MS kullanılarak sindirilmiş jelatin örneğindeki belirteç peptitlerin saptanmasının sığır ve domuz jelatini arasında ayırım yapmak için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir. Zhang ark. (2008), HPLC/MS yöntemiyle kolajen dizilerindeki marker peptitlerden yararlanarak saf jelatini ayırt etmişlerdir. Başka bir çalışmada Tan ve Lock (2014), yumuşak şekerlerdeki jelatin kökenini belirlemek üzere kromatografik bir teknik olan LC-MS/MS tekniğini kullanmışlardır. Bir çalışmada Cheng ve ark. (2012), UPLC/Q-TOF-MS tekniğini, temel bileşen analizi ile birlikte uygulayarak jelatinleri tanımlayabilmişlerdir. Yılmaz ve ark. (2013), ultra performanslı sıvı kromatografisi ve elektrosprey iyonizasyon dört kutuplu uçuş zamanlı kütle spektrometresi (nanoUPLCESI-q-TOF-MSE) tekniği ile sığır ve domuz

jelatinlerini başarılı şekilde ayrımını sağlamışlardır. Yoğurt, dondurma ve peynir gibi örneklerle çalışmışlardır. Bu yöntemlerin güvenilir ve başarılı olduğunu bildirilmişlerdir. Xian Long ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada HPLC-QTOF-MS ile domuz, sığır, at, eşek ve kaplumbağa ait bir tane ayırt edici peptit elde etmişlerdir. Xiao-Mei ve ark. (2019), çalışmalarında Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve doğrusal iyon tuzağı (LTQ)/Orbitrap yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi kullanarak farklı sıcaklıklarda jelleştirilen domuz jelatini ile çalışmışlardır. HPLC-LTQ/Orbitrap, farklı sıcaklıklarda hazırlanan domuz jelatinlerinin de tanımlama için çeşitli işaretleyici peptitler olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu ortak triptik peptitleri kullanmak, domuz jelatini tanımlamasının doğruluğunu etkili bir şekilde artırabileceğini göstermiştir.

İyon Kaynağı

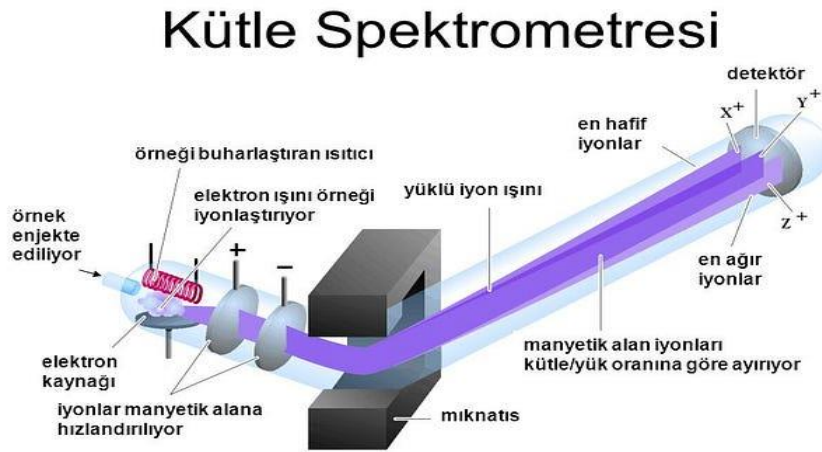
Birkaç farklı teknikle iyonlaştırma yapılabilir. Öncelikle numune gaz formda değilse katı maddeler veya buhar basıncı çok düşük sıvılar bir kapılar tüp yardımıyla giriş kısmındaki ısıtıcının yanına getirilir ve buharlaştırılır. İyonlaştırma kaynağına gaz halde giren madde elektronlar tarafından bombardımana uğratarak iyonlaştırılır. Bombardıman sonucunda moleküler iyonlar meydana gelir. Elektron bombardımanı ile oluşan pozitif iyonlar büyük bir hızla analizör kısmına ulaşır. Kullanılan diğer yöntemler ise kimyasal iyonizasyon (CI, chemical ionization), hızlı atom bombardımanı (FAB, fast atom bombardment) veya elektrosprey yöntemi (ESI, electrospray ionization)'dir. ESI, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşmektedir. Bu yöntemin avantajı, sıcaklık ile kolayca parçalanabilen maddelerin mol kütlelerinin belirlenebilmesidir. ESI yöntemi özellikle sıvı kromatografi/kütle spektrometri (LC/MS)'si ile kullanılmaktadır (İşlekel, 2011; Biberoğlu,2003).

Kütle Analizörü

İyon kaynağından gelen iyonlar, kütle analizöründe elektriksel alana tabi tutularak m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayrılmalarının sağlandığı bölümdür. İyonlaştırma işlemi ile çok sayıda iyon oluşturan atom veya moleküller, hızla kütle analizörüne ulaşarak burada pozitif ve negatif yük durumları ile m/z oranlarına göre birbirinden ayrılır. Ortaya çıkan iyonlar çoğu kez kararlı olmayıp, daha da ileri seviyede parçalanarak kütleleri çok daha küçük yeni iyonlar oluşturabilirler (İşlekel, 2011; Biberoğlu ,2003).

Dedektör

MS dedektörü yüksek duyarlılığa sahip, pozitif ve negatif iyonları analiz edebilen bir iyon dedektör sistemidir (İşlekel, 2011; Biberoğlu, 2003). Molekül ağırlığı 50-2000 (m/z) aralığında tarama yapabilmektedir. Maddeler bazı yöntemlerle artı ya da eksi yüklü iyon haline getirilir. İyon haline getirilen bu moleküller ve molekül parçalarının kütleleri; kütle/yük oranı kullanılarak tespit edilir. Kütle spektrometrelerinin çeşitli ölçüm yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar, 4-Kutuplu Kütle Spektrometresi (Quadropole) ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresidir (TOF). Kütle spektrometresi şematik gösterimi Şekil 2.19.'da verilmiştir.



Şekil 2.19. Kütle spektrometresi şematik gösterimi (Anonim, 2025f).

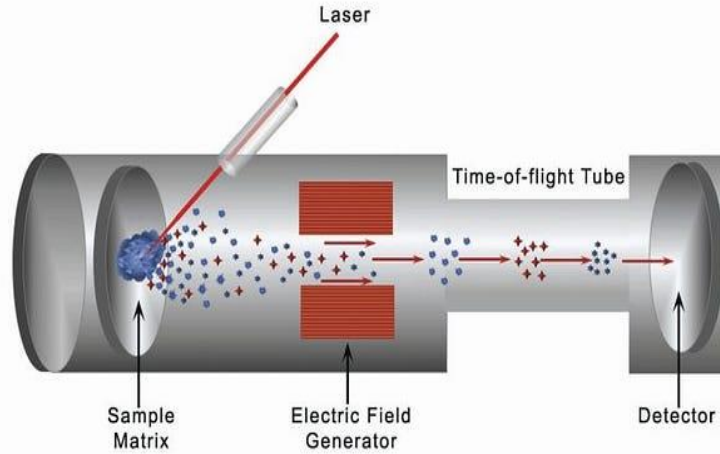
2.5.2.4. LC-MS/MS sistemleri

Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS), sıvı kromatografinin ayırma özelliği ile kütle spektrometresinin duyarlılığı ve özgüllüğünü birleştiren bir teknolojidir. Çoklu bileşen içeren maddelerin içerisindeki analitlerin eser miktarlarının tayinlerinde kullanılır. Çok düşük miktarlarda bulunan bu analitlerin kalitatif ve kantitatif olarak sonuçlarını kesin doğrulukla tespit edebilen oldukça ileri bir sistemdir. LC-MS/MS sistemlerde ölçümler μL numune hacimlerinde ng, pg düzeyinde hassasiyetle tespit edilebilmektedir. Sıvı kromatografi ünitesinden ayrıştırılmış analitler iyonlaştırılarak MS/MS ünitesine gönderilirler. MS/MS ünitesinde iyonlar ilk quadropolden kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak collision cell olarak bilinen girişim hücresine yönlendirilirler. Burada yüksek saflıkta azot gazı

ile çarpıştırılan moleküller parçalanarak ikinci quadropole gönderilirler. İkinci quadropol ünitesindeki bu ikinci iyonlar da kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak kütleli olarak tayin edilirler (Işlekel, 2011; Biberoğlu, 2003; Aguilar, 2004).

Uçuş zamanlı kütle spektrometresi (TOF)

Uçuş zamanı kütle spektrometresi (MS-TOF), çeşitli numunelerin kütle analizi için kullanılan, bir iyonun kütle-yük oranının uçuş zamanı ölçümüyle belirlenmesi ilkesine dayanan spektrometrik bir yöntemdir. Eser miktardaki bileşikler de dahil olmak üzere geniş bir konsantrasyon aralığında numunelerin nicel ve nitel analizlerinde oldukça hassas ölçümlerin yapıldığı sistemlerdir. İyonlar, gücü bilinen bir elektrik alanı tarafından kütle/yük oranına bağlı olarak hızlandırılırlar. Aynı yüke sahip iyonlardan ağır olanın hızı daha yavaş olur. İyonun bilinen bir mesafede bir detektöre ulaşması için geçen süre ölçülür. İyonlar, uçuş tüpü denilen bir tüp boyunca hareket ederler. İlk enerjileri aynı olmasına rağmen hafif moleküller daha hızlı hareket ederken, ağır moleküller ise yavaş ilerlerler. Böylece moleküllerin kütleleri detektörlere ulaşma zamanlarına göre tespit edilir (Şekil 2.20.).

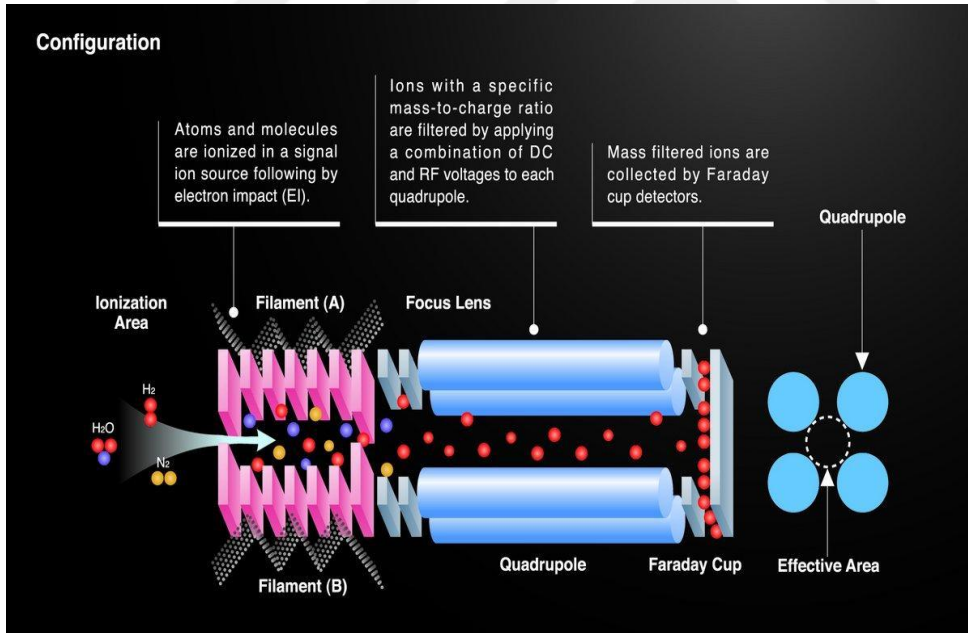


Şekil 2.20. Uçuş zamanlı kütle spektrometresi şematik gösterimi (Anonim, 2024b).

Bu yöntem ile jelatin tür tayininde yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Örneğin bir çalışmada Cheng ve ark. (2012), UPLC/Q-TOF-MS tekniğini, temel bileşen analizi ile birlikte uygulayarak jelatinleri tanımlayabilmişlerdir. Eşek derisi jelatini, sığır derisi jelatini, domuz derisi jelatini, kaplumbağa kabuğu jelatini ve geyik boynuzu jelatininin tanımlamak için yapılan bu çalışmada başarılı sonuçlar edilmiştir. Yöntemin güvenli bir şekilde uygulanabileceği gösterilmiştir.

Üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (TQ)

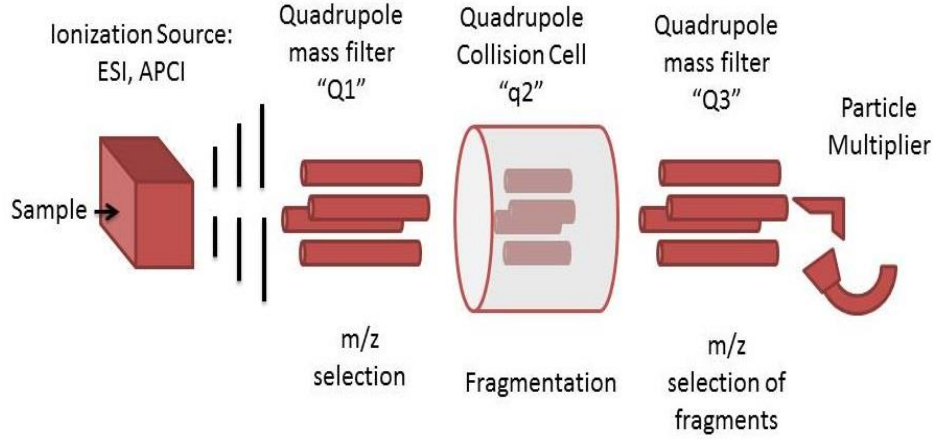
Kütle spektrometresinde kullanılan dört kutuplu kütle analizörü (quadrupole mass spectrometry), birbirine paralel olarak konumlandırılmış dört silindirik çubuktan oluşur. Kuadrupol kütle analizörü, iyonların kuadrupol çubuklarına uygulanan salınımlı elektriksel alanlarındaki yörüngelerinin kararlılığına bağlı olarak ayrılması prensibiyle çalışır. Kuadrupol dört adet paralel silindirik metal çubuktan oluşur ve karşılıklı bu elektrotlar elektriksel olarak bağlıdır. Çubuklar hiperboliktir. Elektrotlar arasına radyo frekansı voltajı uygulanır. İyon kaynağından gelen iyonlar, yüksek frekanslı elektrik alan içine belirli elektron volt enerji ile gönderilirler. Uygulanan voltaja bağlı olarak belirlenen bir kütle-yük oranındaki iyonlar detektöre ulaşırken diğer iyonlar kararsız yörüngeleri sebebiyle elektrot çubuklara çarparak nötralize olurlar ve gaz olarak atılırlar. Elektrik alan içerisinde tanımlanmış kütle/yük oranına sahip iyonlar kararlı yörüngelerini takip ederek çıkış yaparlar. Sistem belirli bir m/z 'ye sahip bir iyonun ayrılmasına izin verir ya da kullanıcının uygulanan gerilimi sürekli değiştirerek bir dizi m/z değerini taramasını sağlar (Şekil 2.21.).



Şekil 2.21. Dört kutuplu kütle spektrometresi (Anonim, 2025g).

Üçlü dört kutuplu kütle spektrometresi (TQ-MS) sistemleri ise 3 tane kuadropolun seri halde dizilimi ile oluşan sistemlerdir. Bu yapılandırma genellikle QqQ olarak kısaltılır, burada Q_1 , q_2 , Q_3 . Temel olarak üçlü kuadrupol kütle spektrometresi, tekli kuadrupol kütle analizörüyle aynı prensiple çalışır. Q_1 ve Q_3 kütle filtrelerinin ikisi de dört adet silindirik metal çubuktan oluşur. Hem Q_1 hem de Q_3 kuadropollerine doğru akım ve

radio frekansları voltajı uygulanır. Çarpışma hücresi olan q_2 kuadrupol ise yalnızca radio frekansı potansiyeline tabi tutulur ve seçilen tüm iyonların içinden geçmesine izin verir (Dass, 2007). Üçlü kuadrupol sistemine ait şematik gösterim Şekil 2.22.'de verilmiştir.



Şekil 2.22. Üçlü kuadrupol sistemi şematik gösterimi (Anonim, 2024c).

Üçlü kuadrupol sistemler birincil kütle seçimi, çarpışma kaynaklı ayrışma ve çarpışma kaynaklı ayrışma sırasında üretilen parçaların kütle analizleri ve tespiti, sistemin ayrı bölmelerinde gerçekleşmesi nedeniyle uzayda tandem düzenlemesini takip eder (Johnson ve ark, 1990). Hem ilk kütle analizörü Q_1 hem de çarpışma hücresi olan q_2 , zamandan bağımsız bir şekilde, kaynaktan gelen iyonlara sürekli olarak maruz kalır. İyonlar üçüncü kütle analizörü olan Q_3 'e girdiğinde, zaman bağılı hale gelirler (Johnson ve ark, 1990). Numune iyonizasyon kaynağından çıktıktan sonra ilk dört kutuplu kütle filtresi olan Q_1 'e gelir ve m/z olarak seçilirler. Seçilenden farklı m/z oranına sahip iyonların Q_1 'e sızmasına izin verilmez. "q" olarak gösterilen çarpışma hücresi, Q_1 ve Q_3 arasında yer alır ve inert bir gazın varlığı ile parçalanmanın sağlandığı kısımdır. Parçalanmış iyonlar, çarpışma hücresinden çıktıktan sonra, m/z seçiminin tekrar meydana gelebileceği ikinci dört kutuplu kütle filtresi olan Q_3 'e, hareket eder. Üçlü kuadrupol, çok küçük moleküllerin analiz edilmesini sağlar ve düşük enerjili düşük moleküllü reaksiyonların incelenmesine izin verir (Dass, 2007).

Jelatin tür tayininin belirlenmesi çalışmalarının, son yıllarda tüm dünyada önemli artmıştır. Bu tayinlerden FTIR, Raman gibi spektroskopi metotlar, PCR yöntemleri kullanılmakta ancak çeşitli dezavantajları bulunabilmektedir. Son yıllarda LC-MS/MS yöntemleri ile jelatin tür tayininde yapılan çalışmaların çok başarılı sonuçlar vermesi

bu yöntemlerin üzerinde daha fazla durulmasına sebep olmuştur. Memeli jelatinleri, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (HPLC-MS/MS) gibi birçok yöntemle tanımlanmıştır. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi saf sığır ve domuz jelatinlerini ayırt edebilir ancak domuz jelatinini karışım jelatinlerden ayırt edemez (Lee ve ark, 2016). Sığır ve domuz kolajeni arasında çok yüksek bir homoloji vardır (> %95) ve ELISA sığır ve domuz jelatinleri için türlere özgü tespit sunamaz (Yılmaz ve ark, 2013). Ayrıca üretim sırasında sıcak su ve asidik koşullar altında türlere özgü orijinal DNA'nın tahrip olması nedeniyle PCR jelatin kaynağını doğru bir şekilde belirleyememiştir (Jannat ve ark, 2018). Buna karşılık, HPLC-MS/MS, kolajen dizilerindeki küçük farklarla memeli jelatinlerini hassas bir şekilde doğrulamak için kullanılmıştır (Xiao-Mei ve ark, 2018).

Bir çalışmada Xiao-Mei ve ark. (2022), yaptıkları başka bir çalışmada kütle spektrumları 50 °C ve 100 °C derecelerde ekstrakte edilen jelatinlerde 44 ve 49 adet ortak karakteristik peptidi tanımlayabilmişlerdir. Diğer çalışmalarıyla karşılaştırdıklarında çeşitli termal etkilerde 20 ortak karakteristik peptidi ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmalarda LC-TQ yöntemi ile jelatin tür tayini oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Yine bir çalışmada Grundy ve ark. (2016), gıda sanayinde ve ilaç sektöründe kullanılan jelatinin kökeninin tespitinde ELISA, PCR ve kütle spektrometresi analiz yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada kütle spektrometresinin jelatin türü tayininde diğer yöntemlere göre daha başarılı olduğunu görülmüştür.

Jelatin kapsülleri ve yumuşak şeker formlarında ELISA, PCR gibi yöntemlerde jelatinin tür tayininin zorlaştığı bilinmektedir. LC-MS/MS sistemleri ile yumuşak şekerlerde yapılan çalışmalarda ise çok düşük tespit limitlerinde başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Takviye edici gıdalar

Bu çalışmada metot validasyon çalışmaları için 6 adet numune ile çalışılmıştır. Bu numunelerden domuz jelatini içeren yumuşak şeker ve gıda katkı maddesi numuneleri Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvarından temin edilmiştir. Sığır jelatini numunesi, domuz jelatini numunesi ve bitkisel jelleştirici numunesi ve sığır kapsülü numunesi İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünden temin edilmiştir. Metot validasyonu için kullanılan numuneler Şekil.3.1.'de verilmiştir.

Ayrıca çalışmamızda Türkiye’de üretilen ve yurtdışından ithal edilen kapsül formdaki ve yumuşak şeker formdaki 25 çeşit takviye edici gıda örnekleri temin edilmiştir. Analiz çalışmalarında bu örneklerin jelatin kısımları kullanılmıştır. İçerisindeki etken maddelerden iyice temizlenen numunelerin jelatin kısımları analiz çalışmalarına hazır hale getirilmiştir. Örneklerden 10 tanesi yumuşak kapsül, 3 tanesi yumuşak şeker ve 12 tanesi sert kapsül formundadır. Örneklerden 17 tanesi yurtdışından temin edilmiş olup 8 tanesi yurt içinde üretilen numunelerden temin edilmiştir. Kullanılan numuneler piyasada yaygın tüketilen takviye edici gıdalardan alınmıştır. Bu numunelere ait görseller Şekil 3.2.’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Metot validasyonu için kullanılan jelatin numuneleri.



Şekil 3.2. Materyaller (takviye edici gıdalar 25 adet).

3.1.2. Kimyasal malzemeler

Takviye edici gıda numunelerinde jelatinin türünün belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada standart madde olarak sığır jelatin standardı (Merck Milipore, G6650), domuz jelatin standardı (Merck Milipore, 48724) kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan, asetronitril LC-MS/MS grade (%99 saflıkta), formik asit LC-MS/MS grade (%98-100 saflıkta) Merck firmasından satın alınmıştır. Jelatin ve enzim çözeltilerinin hazırlanmasında ultra saf su, amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3 , Sigma Aldrich 09830), tripsin enzimi (Sigma Aldrich, T8003) kimyasal malzemeleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çözeltilerin hazırlanması

Amonyum bikarbonat çözeltisinin hazırlanması;

Bu amaçla, 0.3953 g amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) 100 ml'lik balon jöjeye tartılmış ve daha sonra distile su ile hacme tamamlanmıştır. Amonyum bikarbonat tamamen çözündürülerek 50 mM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır.

Enzim çözeltisinin hazırlanması;

Enzim çözeltisi hazırlanırken, 0,025 g tripsin enzimi (Sigma Aldrich) 2 ml'lik santrifüj tüpüne tartılmıştır. Üzerine 300 μL 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi eklenip tamamen çözündürülerek % 8.3'lük enzim çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Bu miktar bir numune için gerekli enzim çözeltisidir. Çözelti miktarı örnek sayısı kadar hazırlanmıştır.

HPLC hareketli fazlar;

Mobil faz A: Ultra saf su (%0.1'lik formik asit). 1000 ml ultra saf su temiz mobil faz şişesine aktarılmış ve üzerine 1 ml formik asit ilave edilmiştir. İyice karıştırılıp ultrasonik su banyosunda degaze edildikten sonra hazır hale getirilmiştir.

Mobil faz B: Asetonitril (%0.1'lik formik asit). 1000 ml LC-MS grade asetronitril temiz mobil faz şişesine aktarılmış ve üzerine 1 ml formik asit ilave edilmiştir. İyice karıştırılıp ultrasonik su banyosunda degaze edildikten sonra hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Jelatin standartlarının hazırlanması ve enzimatik parçalanma

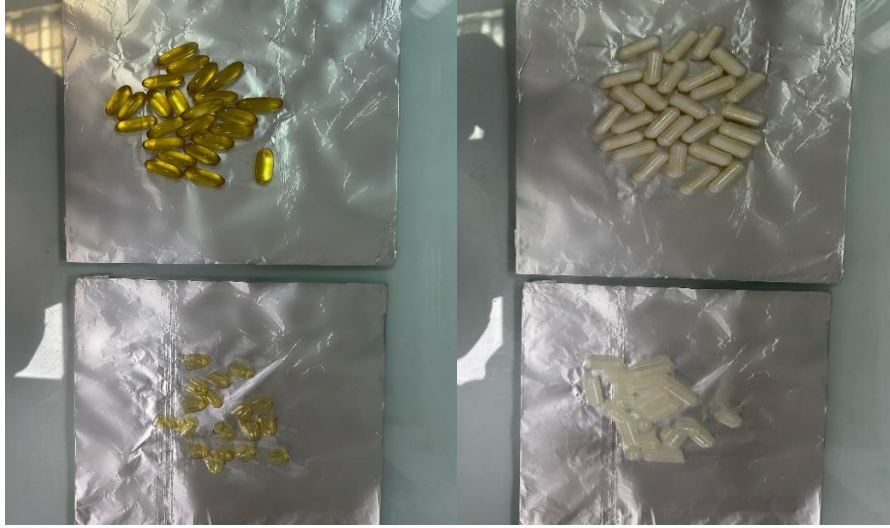
Çalışma standartları hazırlanırken domuz ve sığır jelatin standartları aynı oranda karıştırılarak %1'lik standart karışımı hazırlanmıştır. Bu amaçla, 2 ml'lik santrifüj tüpüne 18 mg sığır ve 18 mg domuz jelatini tartılmıştır. Daha sonra 1800 µL amonyum bikarbonat çözeltisi eklenerek vorteks karıştırıcıda hızlı bir karıştırma yapılmıştır.

Standart için kullanılmak üzere 2 ml'lik bir santrifüj tüpüne 50 mg enzim tartılarak üzerine 300 µL amonyum bikarbonat eklenmiştir. Enzim de hızlı bir şekilde vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Karıştırılan enzim ve standart jelatin karışımı 37°C'ye ayarlanmış etüvde 15-20 dak. bekletilmiştir. Sonra 300 µL standart karışımdan ve 300 µL enzimden alınarak başka bir santrifüj tüpünde birleştirilmiştir. Enzimatik parçalanma için, 37°C etüvde 16 saat bekletildikten sonra standart karışım (enzimli) 4000 rpm'de 5 dak. santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı 0,45 µm'lik naylon filtreden (Chromafil, Macherey-Nagel, Almanya) süzölmüştür. Böylece %0.5 standart karışım hazır hale gelmiştir. Hazır olan %0.5'lik standarttan, %0.1, %0.05, %0.025, %0.012, %0.005 olacak şekilde 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ile seyreltme yapılmıştır.

3.2.3. Jelatin ekstraksiyonu ve enzimatik parçalanma

Öncelikle çalışılacak tüm örnekler homojen hale getirilmiştir. Örneklerden kapsül formda olanların kapsül içerisindeki toz veya sıvı kısım boşaltılarak sadece jelatin kısımlarının kalması sağlanmıştır (Şekil 3.3.). İçerisindeki etken maddelerden fiziksel olarak ayırma yapılarak iyice temizlenen numunelerin jelatin kısımları analiz çalışmalarına hazır hale getirilmiştir. Bu hazırlık sırasında sert kapsüllere doldurulan toz maddeler boşaltılarak amonyum bikarbonat çözeltisi ile kapsüller temizlenmiştir. Yumuşak kapsüllerde de benzer şekilde sıvı kısım boşaltılarak amonyum bikarbonat çözeltisi ile jelatin kapsül kısmı temizlenmiştir. Elde edilen bu jelatin kısımlar laboratuvar tipi bir öğütücü (etsch gm 200, Almanya) yardımı ile 10000 rpm de 3 dak. iyice öğütölmüştür (Şekil 3.4.). Yumuşak şeker formunda olanlar ise ince bıçaklı bir öğütücüde (Waring, ABD) homojen hale gelene kadar iyi bir şekilde karıştırılarak parçalanmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.3. İçi boşaltılan jelatin kapsüller.



Şekil 3.4. Jelatin kapsüllerin öğütme işlemi.

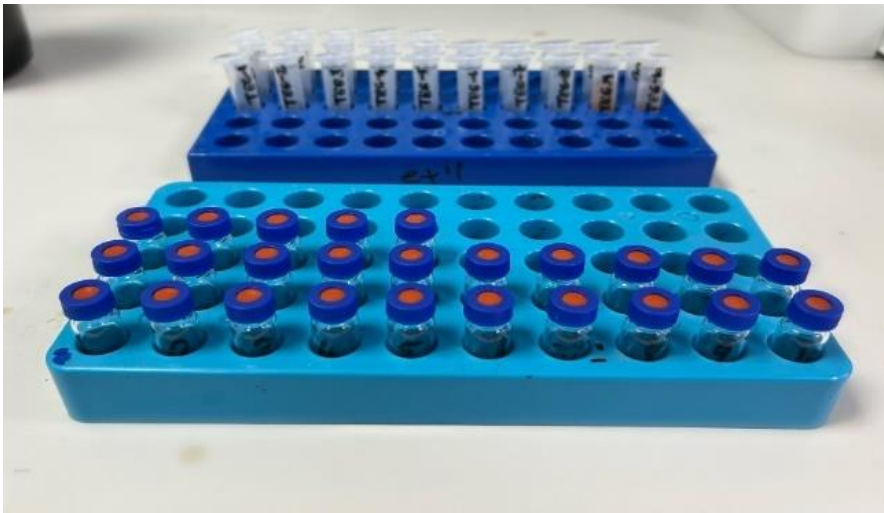


Şekil 3.5. Yumuşak şeker örneklerinin homojenizasyon işlemi.

Homojen hale getirilen numuneden 2 ml'lik santrifüj tüpüne 15 mg tartılmıştır. Üzerine 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisinden 1800 µL ilave edilerek vorteks karıştırıcıda yüksek hızda 1-2 dakika karıştırılmıştır.

Başka bir santrifüj tüpüne her numune için ayrı ayrı 25 mg enzim tartılıp üzerine 300 µL amonyum bikarbonat çözeltisi eklenmiştir. Enzim çözeltisi vorteks karıştırıcıda 1-2 dk hızlı bir şekilde karıştırılmıştır. Numunenin ve enzim çözeltisinin iyi bir şekilde çözünmesini sağlamak amacıyla 37 °C'lik etüvde 15-20 dakika bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan homojen enzim ve numune çözeltilerinin oda sıcaklığına gelmesi için beklenmiştir. Bu çözeltiden 300 µL alınıp ayrı bir 2 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpüne aktarılan örnek çözeltisinin üzerine 300 µL enzim çözeltisi ilave edilip vorteks karıştırıcıya hızlı bir şekilde karıştırılmıştır.

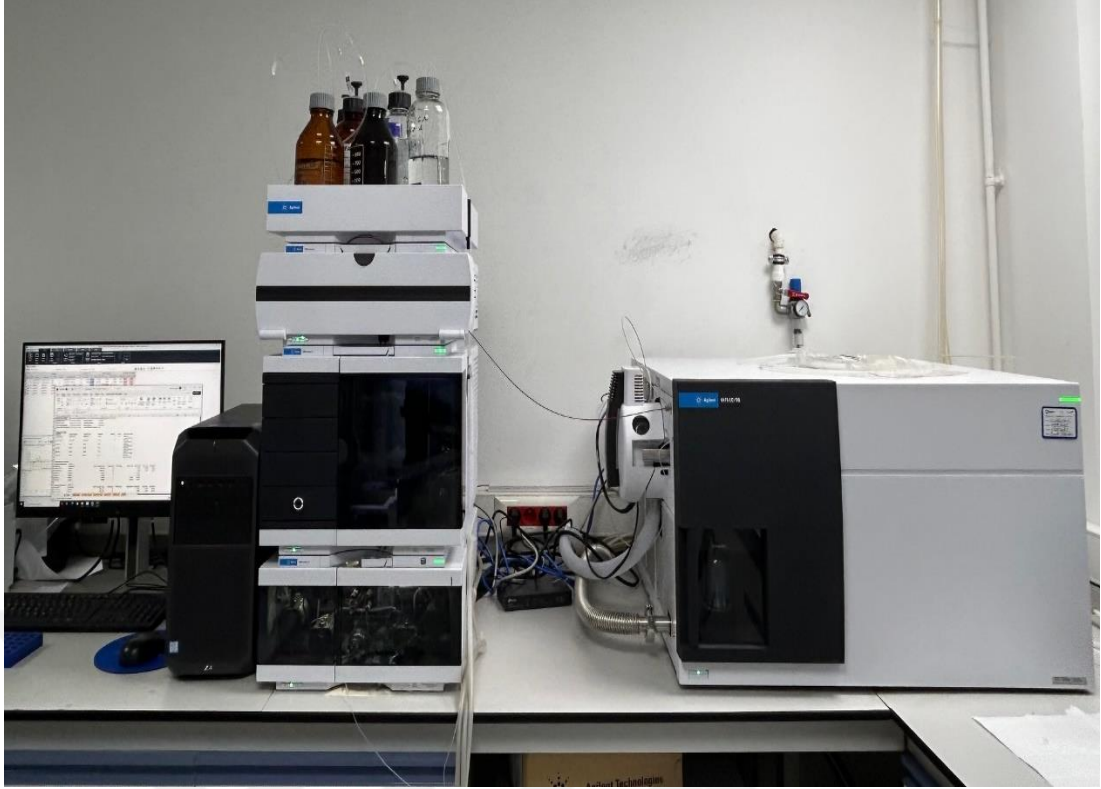
Enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla enzim ve örnek çözeltisi 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 16 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan çözelti 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı 0,45 µm'lik naylon filtreden (Chromafil, Macherey-Nage1, Almanya) direkt olarak HPLC viallerine süzölmüşve LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir. Enjeksiyona hazır hale getirilmiş numune viallerine ait görsel Şekil 3.6.'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Enjeksiyona hazır hale getirilmiş numuneler.

3.2.4. LC-MS/MS parametrelerinin optimizasyonu

Jelatin örneklerinde tür tayinin belirlenmesinde LC-MS/MS sistemlerinden olan LC-TQ (Agilent, G6475A) cihazı ve Agilent MassHunter Quantitative yazılım programı kullanılmıştır (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Analizlerde kullanılan LC-TQ Cihazı.

Kromatografi koşulları:

LC-TQ sisteminin sıvı kromatografi kısmında;

Agilent 1290 serisi G7120A pompa, G7116B kolon fırını, G7167B multisampler ve G7122A degasser kullanılmıştır.

Kolon, Poroshell 120 EC-C18 (Agilent) kolonu kullanılmıştır.

- Modeli: 695975-902T
- Boyut: 4.6x100 mm
- Dolgu maddesinin partikül büyüklüğü: 2.7 micron
- Dolgu maddesinin por çapı: 120 Å

Mobil faz,

- Mobil Faz A Çözeltisi : 1000 ml ultra saf su üzerine 1 ml formik asit ilave edilerek ultrasonik su banyosunda iyice karıştırılmıştır.
- Mobil Faz B Çözeltisi : 1000 ml asetonitril üzerine 1 ml formik asit ilave edilerek ultrasonik su banyosunda iyice karıştırılmıştır.

Hareketli fazın akış programı sisteme tanımlanmıştır (Tablo 3.1.)

Tablo 3.1. Hareketli faz akış programı.

Zaman(dakika)	A [%]	B [%]
0.0	95.0	5.0
0.5	95.0	5.0
25.0	5.0	95.0
28.0	5.0	95.0
28.10	95.0	5.0

- Örnek enjeksiyon hacmi: 2 µl
- Sistem akış hızı: 0,6 ml/dak.
- Kolon fırınının sıcaklığı: 40 °C

MS/MS Parametreleri

LC-TQ sisteminin kütle spektrometresi kısmında Agilent 1290 serisi G1958-65638 iyonizer, G6475A kütle analizörü ve dedektör kullanılmıştır.

İyon kaynağı, sıcaklığı;

- Optimizasyon modu : ESI, 300 °C

Tarama parametreleri;

- Gaz sıcaklığı (Gas temperature): 180 °C
- Kaplama sıcaklığı (Sheath gas temperature): 330 °C
- Kılcal voltajı (Capillary voltage): 2600 V
- Nebulizer: 43 psi
- Gaz akışı (Gas flow): 12 L/dk
- Kaplama gaz akışı (Sheath gas flow): 10 L/dk
- Hortum girişi voltajı (nozzle voltage): 500 V

Bileşik parametreleri;

- Çarpışma enerjisi öncül iyon varlık eşiği (Precursor abundance threshold): 5000
- Çarpışma enerjisi yavru iyon varlık eşiği (Product abundance threshold): 500
- Çarpışma enerjisi MRM varlık eşiği (MRM abundance threshold): 100
- Bölünme voltajı (Fragmentor): 115 V'den 155 V'ye

Sistemin kütle spektrometresi kısmı için öncelikle gerekli olan domuz ve sığır spesifik peptitleri http://www.matrixscience.com/search_form_select.html adresindeki veri veri tabanı programı kullanılarak bulunmuş ve sistemde taranarak tanımlanmıştır. Domuz ve sığır peptitlerinin kütlesi, bu peptitlere ait öncü iyonlar (precursor ion) ve yavru iyonlar (product ion) ile alıkonma zamanları belirlenmiştir (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. LC-MS/MS sisteminde taranan domuz ve sığır genleri.

Peptit (Marker) adı	Peptitin Kütlesi	Peptit Dizilimi	z	Precursor m/z	Product m/z	Alıkonma zamanı dak.
DOMUZ 1	1310,6223	GETGPSGPAGPTGAR	2	656.3	726.4	4,15
					784.3	
					870.4	
DOMUZ 2	1465,73	SAGISVPGPMGPSGPR	2	773,9	809,4	5,71
					880,5	
					977,6	
					1034,5	
SİĞİR 1	1559,8000	GETGPAGPAGPIGPVG AR	2	780.9	766.5	6,23
					823.5	
					991.6	
					513.3	
					669.4	
SİĞİR 2	1192,66	IDQPGAVGPAGIR	2	596.8	740.4	5,97
					797.5	
					894.5	

Ayrıca sistemde iyon taramaları yapılarak bölünme voltajı (fragmentor), çarpışma enerjisi (Collision Energy CE), polarite değiştirme süresi (Dwell), iyonun polaritesi (polarity) gibi analiz için en uygun sistem parametreleri oluşturulmuştur (Tablo 3.3).

Sığır ve domuz jelatin standartları enzimatik reaksiyon sonrasında LC-TQ cihazına enjekte edilerek datalar elde edilmiştir. Elde edilen MS/MS datalarının (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) veri tabanı adresinden elde edilen peptit dizilimlerden domuz ve sığır jelatini için ayırt edici peptit (marker) nitelik

taşıyanlar tespit edilmiştir. Numunelerin ekstraksiyonu sonucunda marker peptitlerin (alınma zamanı, tolerans %1-2)(Anonim,2021), öncü iyon (precursor ion) ve yavru iyon (product ion) değerleri kullanılarak numune içeriğinde olup olmadığı incelenmiştir. % 0,012'lik jelatin standartları ile karşılaştırması yapılarak kalitatif olarak sonuçlandırılmıştır.

Tablo 3.3. Analiz için gerekli LC-MS/MS şartları.

Peptit Adı	Yük z	Precursor m/z	MS1 res	Product m/z	MS2 res	Dwell (ms)	Fragmen tor (V)	CAV (V)	CE (V)	Polarite y
DOMUZ 1	2	656.3	Unit	726.4	Unit	100	135	5	35	Positive
DOMUZ 1	2	656.3	Unit	784.3	Unit	100	135	5	35	Positive
DOMUZ 1	2	656.3	Unit	870.4	Unit	100	135	5	35	Positive
DOMUZ 2	2	773.9	Unit	809.4	Unit	100	135	5	35	Positive
DOMUZ 2	2	773.9	Unit	880.5	Unit	100	135	5	35	Positive
DOMUZ 2	2	773.9	Unit	977.6	Unit	100	135	5	35	Positive
DOMUZ 2	2	773.9	Unit	1034.5	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 1	2	780.9	Unit	766.5	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 1	2	780.9	Unit	823.5	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 1	2	780.9	Unit	991.6	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 2	2	596.8	Unit	513.3	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 2	2	596.8	Unit	669.4	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 2	2	596.8	Unit	740.4	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 2	2	596.8	Unit	797.5	Unit	100	135	5	35	Positive
SIĞIR 2	2	596.8	Unit	894.5	Unit	100	135	5	35	Positive

3.2.5. Metot validasyonu

Bu validasyon çalışmaları, saf kristalize jelatinler (domuz jelatini, sığır jelatini, bitkisel jelleştirici) sığır jelatinli kapsül, yumuşak şeker ve toz gıda katkı maddesi olmak üzere 6 ayrı örnek ile çalışılarak yapılmıştır. Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC- Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi dikkate alınarak çalışmalar yapılmıştır.

Bu metot için aşağıda belirtilen validasyon parametreleri çalışılmıştır.

- LOD (Limit of Detection- Tespit Limiti)
- Hassasiyet (Precision)
- Doğruluk (Accuracy)
- Yanlış-Pozitif
- Yanlış-Negatif
- Güvenilirlik (Robustness)

3.2.5.1. Tespit Limiti (LOD)

Bu amaçla, domuz ve sığır jelatini standartlarından %1'lik standart karışım numunesi hazırlanmıştır. Daha sonra %0.1, %0.05, %0.025, %0.012, %0.005 konsantrasyonlara seyreltilen domuz ve sığır karışım standartları, LC-TQ cihazına analiz edilerek okunan sonuçlarla kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu değerlere bakıldığında standart piklerinin gürültü piklerinden ayrılabilirdiği en düşük düzeyin %0.012 olduğu görülmüştür. %0.005 düzeyinde standart pikleri ile gürültü piklerinin seviyelerinin çok yakın olması ve ayırt edilmesinin zor olması sebebiyle %0.005 noktası kalibrasyon eğrisinden çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilen değer domuz1 domuz2 sığır1 ve sığır2 parametreleri için % 0,012 olarak belirlenmiştir.

3.2.5.2. Hassasiyet

Hassasiyet çalışmalarında 6 farklı numune ile çalışılmıştır. Bu numuneler bitkisel jelleştirici, domuz jelatini numunesi, sığır jelatini numunesi, yumuşak şeker (domuz jelatini içeren), gıda katkısı (domuz jelatini içeren) ve sığır kapsülü numunesidir. Tüm

bu numunelerden iki farklı kişi ile toplam 140 çalışma yapılmıştır. 140 pozitif çalışmanın tümü pozitif, 140 negatif çalışmanın tümü de negatif bulunmuştur. Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi göz önünde bulundurulduğunda testin hassasiyeti, $140/140=1 \times 100=100$ yani % 100 bulunmuştur.

3.2.5.3. Doğruluk

İçerisinde domuz ve sığır jelatini bulunmayan bitkisel jelleştirici numunesine domuz jelatini ve sığır jelatini eklenmiştir. Kalibrasyon eğsinin içinde kalacak şekilde % 0,03 oranında domuz ve sığır jelatini eklenerek numune hazırlanmıştır ve homojenize edilmiştir. Hazırlanan numunelerin LC-TQ cihazında okumaları yapılarak sonuçlar gözlemlenmiştir. alışmalar iki ayrı kişi tarafından yürütülmüştür. Her iki kişi de 10 adet numune üzerinden çalışmalarını yapmıştır.

alışmalar sonunda 20 ayrı numunenin hepsinde hem domuz hem sığır pikleri tespit edilebilmiştir. Her grup için verilen pozitif numunelerin sonuçlarının pozitif olduğu oransal olarak $20/20 = 1 \times 100 = \% 100$ doğruluk oranına ulaşıldığı görülmüştür. Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi dikkate alındığında doğruluk oranının %100 olduğu ve uygun olduğu görülmüştür.

3.2.5.4. Yanlış-Pozitif

Yanlış pozitif çalışmaları iki ayrı kişi ile gerçekleştirilmiştir. İçerisinde domuz ve sığır jelatini bulunmayan bitkisel jelleştici numunesi, domuz jelatini numunesi, sığır jelatini numunesi, yumuşak şeker numunesi (domuz jelatini içeren), gıda katkısı numunesi (domuz jelatini içeren) ve sığır kapsülü numunesinden çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmalarda bitkisel jelleştirici, sığır jelatini ve sığır kapsülü numunelerinde domuz jelatini aranmıştır ve tespit edilememiştir. Domuz jelatini, yumuşak şeker, gıda katkı numunelerinde sığır jelatini aranmıştır ve tespit edilememiştir.

İki kişi tarafından yapılan çalışmalar sonunda her bir parametre için her negatif çalışma örneğinin çalışmalar sonunda yine negatif bulunduğu, domuz jelatini için 60/60=1 oranında negatif rneği negatif tespit edildiği, sığır jelatini için 80/80=1 oranında negatif rneği negatif tespit edildiği hesaplanmış ve yanlış pozitif verme oranının sıfır olduğu tespit edilmiştir.

3.2.5.5. Yanlış-Negatif

Yanlış negatif çalışmaları iki ayrı kişi ile gerçekleştirilmiştir. İçerisinde domuz ve sığır jelatini bulunmayan bitkisel jelleştirici numunesi, domuz jelatini numunesi, sığır jelatini numunesi, yumuşak şeker numunesi (domuz jelatini içeren), gıda katkısı numunesi (domuz jelatini içeren) ve sığır kapsülü numunesinden çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmalarda bitkisel jelleştirici, sığır jelatini ve sığır kapsülü numunelerinde sığır jelatini aranmıştır ve tespit edilmiştir. Domuz jelatini, yumuşak şeker, gıda katkı numunelerinde domuz jelatini aranmıştır ve tespit edilmiştir.

İki kişi tarafından yapılan çalışmalar sonunda her bir parametre için her negatif çalışma örneğinin çalışmalar sonunda yine negatif bulunduğu, domuz jelatini için 60/60=1 oranında negatif rneği negatif tespit edildiği, sığır jelatini için 80/80=1 oranında negatif rneği negatif tespit edildiği hesaplanmış ve yanlış negatif verme oranının sıfır olduğu tespit edilmiştir.

Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi dikkate alındığında yanlış pozitif/yanlış negatif çalışmalarının uygun olduğu görülmüştür.

3.2.5.6. Güvenirlik

Beklenen (gerçek) sonuçlar ile gözlenen (verifikasyon çalışmasında elde edilen) sonuçların istatistiksel olarak %90 güven aralığında ne oranda uyumlu olduğunu belirlemek için Cohen'nin Kappa Katsayısı Testi (Cohen's Kappa Coefficient Test) kullanılır (3.1). Kappa değeri %90 güven aralığında aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Kappa (K)} = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e} \quad (3.1)$$

$$p_0 = \frac{(N_{11} + N_{22})}{N} \quad (3.2)$$

$$p_e = \frac{(N_{1-} \times N_{-1}) + (N_{2-} \times N_{-2})}{(N \times N)} \quad (3.3)$$

N₁₁: Gerçekte pozitif olup, analiz sonucunda da pozitif saptanan örnek sayısı

N₂₂: Gerçekte negatif olup, analiz sonucunda da negatif saptanan örnek sayısı

N₁₋: Gerçekte pozitif olan toplam örnek sayısı

N₂₋: Gerçekte negatif olan toplam örnek sayısı

N₋₁: Analiz sonucunda pozitif saptanan toplam örnek sayısı

N₋₂: Analiz sonucunda negatif saptanan toplam örnek sayısı

N: Çalışmada kullanılan toplam örnek sayısı

İki ayrı personel tarafından yapılan validasyon çalışmalarından elde edilen sonuçların hepsi hesaplanmıştır.

Bu amaçla Kappa değeri hesaplandığında K=1 olmaktadır. Cohen'nin Kappa Katsayısı Testi (Cohen's Kappa Coefficient Test)'ine göre;

Kappa (K) ≤ 0.20 → Zayıf uyum

Kappa (K) 0.21-0.40 → Kötü uyum

Kappa (K) 0.41-0.60 → Orta uyum

Kappa (K) 0.61-0.80 → İyi uyum

Kappa (K) ≥ 0.80 → Çok iyi uyum” olduğu belirtilmektedir.

Bu değerlendirmeye göre yapılan metot validasyon çalışmasının “Çok iyi uyum” olduğu görülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Validasyon çalışmalarında bazı yöntemler dikkate alınarak optimum koşullar elde edilmiştir. Zang ve ark. (2008) yaptıkları yöntem geliştirme çalışmasında, 10 mg örnek üzerine 5 ml 0.05 M NH_4HCO_3 ekleyerek çözündürmüşlerdir. Bu çözeltiden 100 μL alarak üzerine 50 μL enzim çözeltisi (1 mg/ml, 0.05 M NH_4HCO_3) ekleyip bu karışımı 37°C etüvde 6 saat inkübe etmişlerdir. Bu çalışmada, HPLC mobil fazları olarak su (%0.1 asetik asit içeren) ve asetoniitril (%0.1 asetik asit içeren) kullanılmıştır. Analizde kullanılan enjeksiyon hacmi 10 μL , süresi 120 dak olup analiz 0.2 ml/dk akış hızı altında gerçekleştirilmiştir. İyon sprej voltajı 4.5 kV, gaz akış hızı 60 Kpa, kılcal (capillary) sıcaklığı 300 °C’de tutulmuştur. MS taraması m/z 400-2000 ve çarpışma enerjisi %35 olarak ayarlanmıştır.

Guifeng ve ark. (2009)’nın metodu incelendiğinde Zang ve ark. (2008)’nin metoduyla benzer bir metot çalışması yaptıkları görülmüştür. Yine 10 mg örnek tartılarak 5 ml 0.05 M NH_4HCO_3 ekleyerek çözündürülmüştür. Bu çözeltiden 100 μL alınarak üzerine 20 μL enzim çözeltisi (1 mg/ml, 0.05 M NH_4HCO_3) eklenmiş ve 37 °C’de 10 saat inkübe edilmiştir. Mobil faz olarak, su (%0.1 trifloraasetik asit içeren) ve %60 ACN su içinde (%0.1 trifloraasetik asit içeren) kullanılmıştır. Akış hızı 0.2 ml/dak., analiz süresi 120 dak. ve enjeksiyon hacmi 10 μL ’ye ayarlanmıştır. İyon sprej voltajı 4.5 kV, gaz akış hızı 60 Kpa, kılcal (capillary) sıcaklığı 300 °C’de tutulmuştur. MS taraması m/z 400-2000 ve çarpışma enerjisi %35 olarak ayarlanmıştır.

Shimadzu’nun “Targeted Proteomics Approach for Sensitive Detection of Bovine and Porcine Gelatins in Food, Pharmaceutical Capsules and Personal Care Products” isimli uygulama notunda (Shimadzu Application News No. AD-0179) 5 mg örnek tartılarak 600 μL NH_4HCO_3 (su içeren, pH:8) tampon çözelti eklenmiştir. Bu karışım 37 °C’de 15 dak. inkübe edilmiştir. Örnek çözeltisine 1:100 oranında olacak şekilde enzim çözeltisi (NH_4HCO_3 tampon çözeltisi içinde) eklenmiştir. Karışım 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Mobil faz olarak su (%0.1 formik asit içeren) ve asetoniitril (%0.1 formik asit içeren) kullanılmıştır. Akış hızı 0.3 mL/dak., kolon sıcaklığı 40 °C

ayarlanmıştır. İyon spreyi ESI 300 °C, MRM modu pozitif, blok sıcaklığı 400 °C, nebulize gaz akışı N₂ 3 L/dak., kuru gaz akışı N₂ 10 L/dak., ısıtıcı gaz akışı sıfır hava 10 L/dak. olarak ayarlanmıştır.

Tüm bu metotlar ve incelenen diğer çalışmalar dikkate alınarak LC-TQ sisteminde optimum çalışma koşullarını ayarlamak için çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda çeşitli örnek hacimleri ve enzim çözeltileri ile çalışılmış örnek ve enzim oranının 1:10 ayarlanarak hazırlanan örnek ekstraksiyonlarının daha düzgün sonuçlar verdiği görülmüştür. Etüvde bekleme süreleri dikkate alındığında 16 saat inkübasyon süresinin iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Mobil faz çözeltisi olarak su ve asetonitril içinde formik asit ve asetik asitle çalışmalar yapılmıştır. Formik asit ile yapılan çalışmalarda kromatogram görüntüsünde daha düzgün ve temiz bir akış görülmüş olup formik asitle çalışmalara devam edilmiştir. Akış hızı 0.6 mL/dak. ve akış süresi 33 dk ayarlanarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Enjeksiyon hacmi sırasıyla 10 µL, 8 µL, 6 µL, 4 µL, 2 µL ve 1 µL'ye ayarlanarak denemeler yapılmıştır. 10 µL, 8 µL, 6 µL, 4 µL ve 2 µL enjeksiyon hacimlerinde pik alanlarında değişiklik olmadığı 1 µL'de ise bazı çalışmalarda düzgün pik alanları oluşmadığı görülmüştür. Dolayısıyla cihaza daha az numune enjekte ederek kirlilik oluşumunu engellemek amacıyla enjeksiyon hacmi 2 µL'ye ayarlanmıştır. Çalışmalar boyunca sisteme tanımlanan sığır ve domuz peptitlerine ait öncü iyonlar ve yavru iyonlara ait kromatogramlar incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda sığır1 (GETGPAGPAGPIGPVGAR), sığır2 (IDQPGAVGPAGIR), domuz1 (GETGPSGPAGPTGAR) ve domuz2 (SAGISVPGPMGPSGPR) peptitlerinin öncü ve yavru iyonlarının her seferinde düzgün pik grafikleri verdiği görülmüştür. Bu yüzden bu peptitler analiz sonuçlarında ayırt edici belirteç peptitler olarak kullanılmışlardır.

4.2. Metod Validasyonu

Metodun cihaza tanımlama çalışmaları yapılırken elde edilen MS/MS datalarının peptit dizilimleri öncü iyon m/z (precursor), yavru iyon m/z (product), alıkonma zamanı http://www.matrixscience.com/search_form_select.html veri tabanından ulaşılan Tablo 3.2.'deki bilgilerle uyumlu olmalıdır.

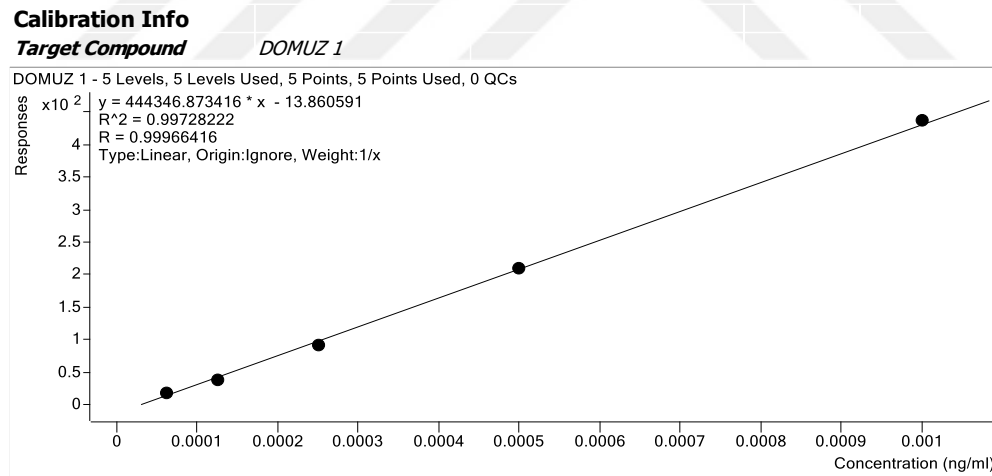
Çalışılan tüm numunelerde net bir şekilde tespit edilebilen Tablo 3.2.'de bilgileri verilen domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 iki belirteç peptitlere üzerinden çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda elde edilen analitlerin molekül kütleleri, öncü

(precursor) ve yavru (product) iyonları ve analiz alıkonma zamanları göstermiştir ki elde edilen analiz sonuçları her bir jelatin türü için uygun ve olumlu olduğu görülmüştür.

Metot validasyon çalışmaları için 6 adet numune ile çalışılmıştır. Domuz jelatini içeren yumuşak şeker, gıda katkı maddesi numuneleri, sığır jelatini numunesi, domuz jelatini numunesi, bitkisel jelleştirici numunesi ve sığır kapsülü numuneleri ile iki ayrı kişi tarafından çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Tespit Limiti (LOD) çalışmaları

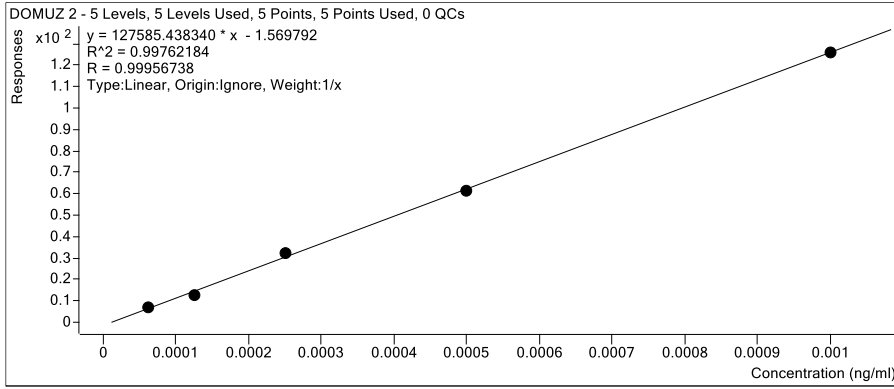
Bu çalışmada tespit limitini bulabilmek için öncelikle domuz ve sığır jelatini standartlarından aynı oranda tartılarak %0.5'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan %0.1, %0.05, %0.025, %0.012, %0.005 konsantrasyonlarda seyreltmeler yapılmıştır. LC-TQ cihazında okumaları yapılan standartlardan kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 belirteç peptitlerine ait 5 ayrı kalibrasyon noktası ile çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\% 0.005 STD.d	Calibration	1	☒	17	0,0001	278609,7557
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.012 STD.d	Calibration	2	☒	37	0,0001	295930,3935
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.025 STD.d	Calibration	3	☒	91	0,0003	362043,6612
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.05. STD.d	Calibration	4	☒	209	0,0005	417536,8883
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.1. STD.d	Calibration	5	☒	438	0,0010	437935,3432

Şekil 4.1. Domuz1 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.

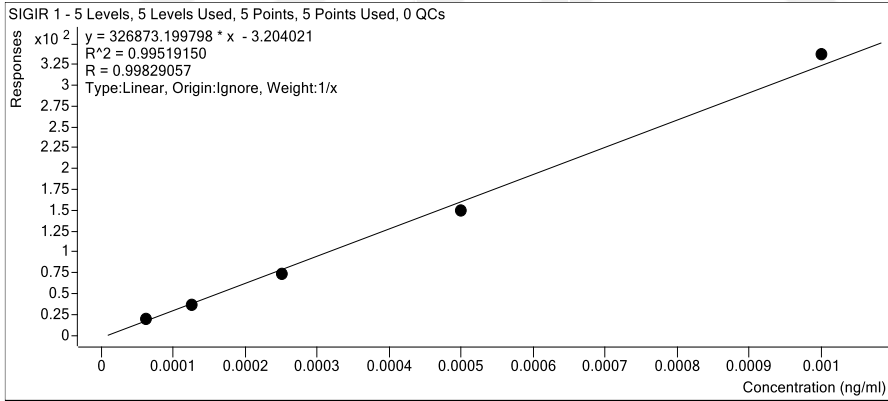
Target Compound *DOMUZ 2*



Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\% 0.005 STD.d	Calibration	1	☒	7	0,0001	109129,9065
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.025 STD.d	Calibration	3	☒	32	0,0003	129665,2595
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.05. STD.d	Calibration	4	☒	61	0,0005	122539,5664
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.1. STD.d	Calibration	5	☒	126	0,0010	126114,2810

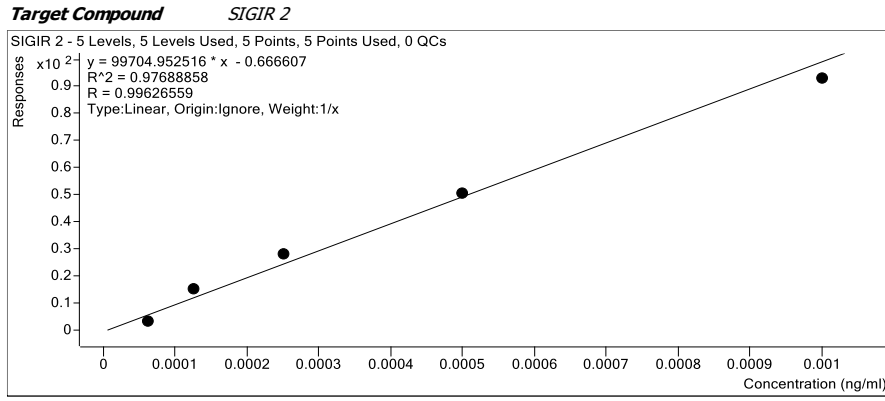
Şekil 4.2. Domuz2 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.

Target Compound *SIGIR 1*



Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\% 0.005 STD.d	Calibration	1	☒	19	0,0001	308377,3753
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.012 STD.d	Calibration	2	☒	37	0,0001	295691,2628
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.025 STD.d	Calibration	3	☒	73	0,0003	293110,3874
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.05. STD.d	Calibration	4	☒	150	0,0005	300156,4042
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.1. STD.d	Calibration	5	☒	338	0,0010	337705,9285

Şekil 4.3. Sığır1 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.



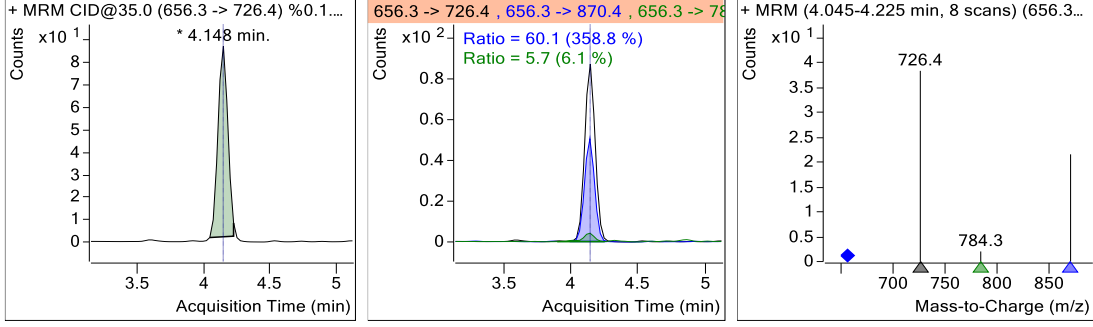
Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\% 0.005 STD.d	Calibration	1	☒	3	0,0001	51424,6218
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.012 STD.d	Calibration	2	☒	15	0,0001	120727,5343
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.025 STD.d	Calibration	3	☒	28	0,0003	111577,1540
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.05. STD.d	Calibration	4	☒	50	0,0005	100969,1680
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250314\%0.1. STD.d	Calibration	5	☒	93	0,0010	93161,4554

Şekil 4.4. Sığır2 peptidine ait kalibrasyon eğrisi.

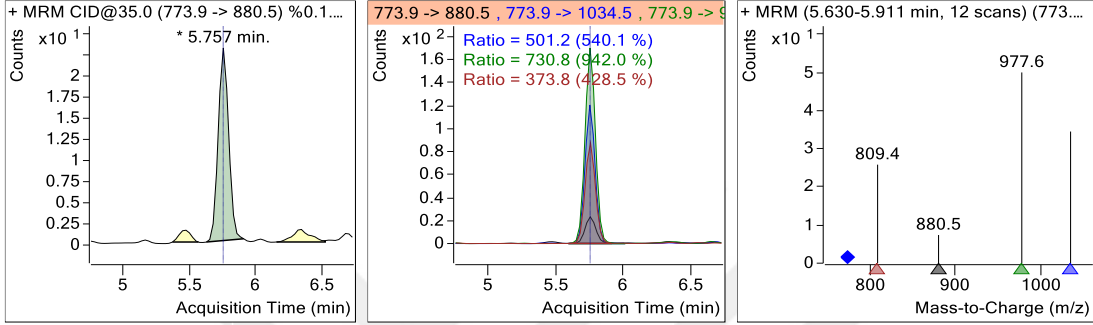
Domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 belirteç peptitlerinin pik grafikleri incelendiğinde %0.1, %0.05, %0.025 noktalarında pikler net bir şekilde görülmüştür. %0.012 düzeyinde piklerin ayırt edilebildiği ancak %0.005 düzeyinde gürültü pikleri ile jelatin iç içe geçmesi dolayısıyla ayırımının net bir şekilde yapılamadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde tespit edilen limit her bir parametre için % 0,012 olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin %0.1 düzeyine ait domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 belirteç peptitlerinin öncü iyon ve yavru iyon pik grafikleri Şekil 4.5.'te, %0.012 düzeyine ait grafikler ise Şekil 4.6.'da verilmiştir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde Shimadzu'nun "Targeted Proteomics Approach for Sensitive Detection of Bovine and Porcine Gelatin in Food, Pharmaceutical Capsules and Personal Care Products" Shimadzu Application News No. AD-0179 metodunda tespit limiti %0.1 olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Xiao- Mei ve ark. (2020) LC-MS/MS ile miktar tayini çalışmaları yapmış ve LOD değerini %0.06-0.48 aralığında bulmuştur. Çavuş (2018)'un LC-QTOF ile yaptığı tez çalışmasında ise tespit limitinin %1 olarak saptanmıştır. Bu çalışmalar ile kıyaslandığında bizim çalışmamızda bulunan %0.012 tespit limitinin oldukça düşük bir düzey olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada çok düşük düzeylerde bile domuz ve sığır piklerinin ayırt edilebildiği anlaşılmıştır.

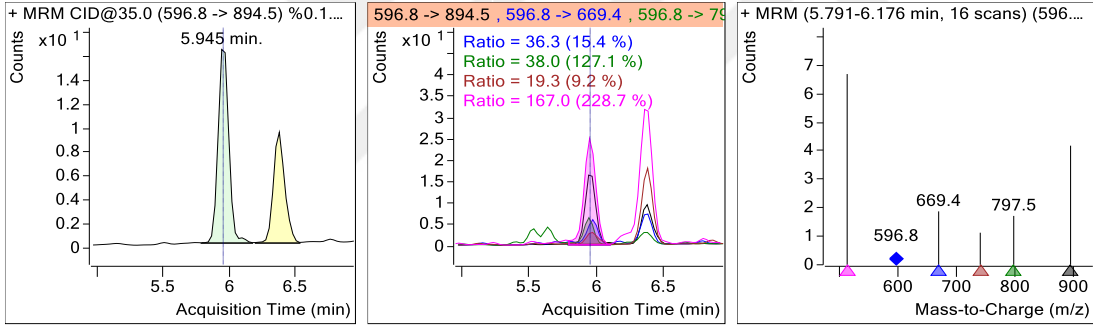
Target Compound DOMUZ 1



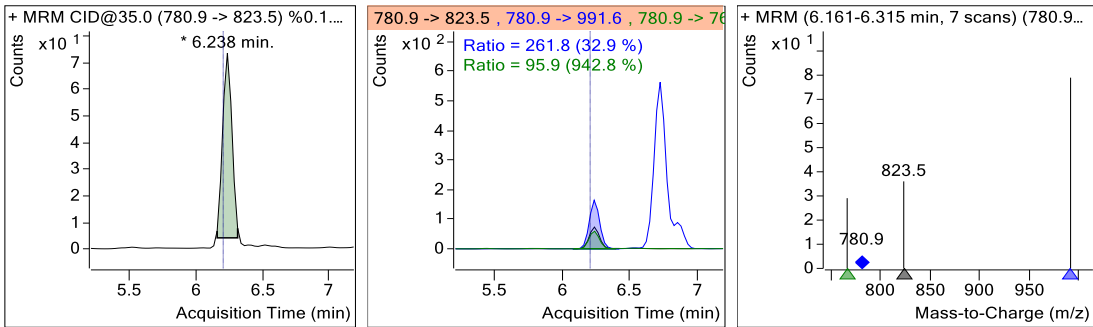
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2

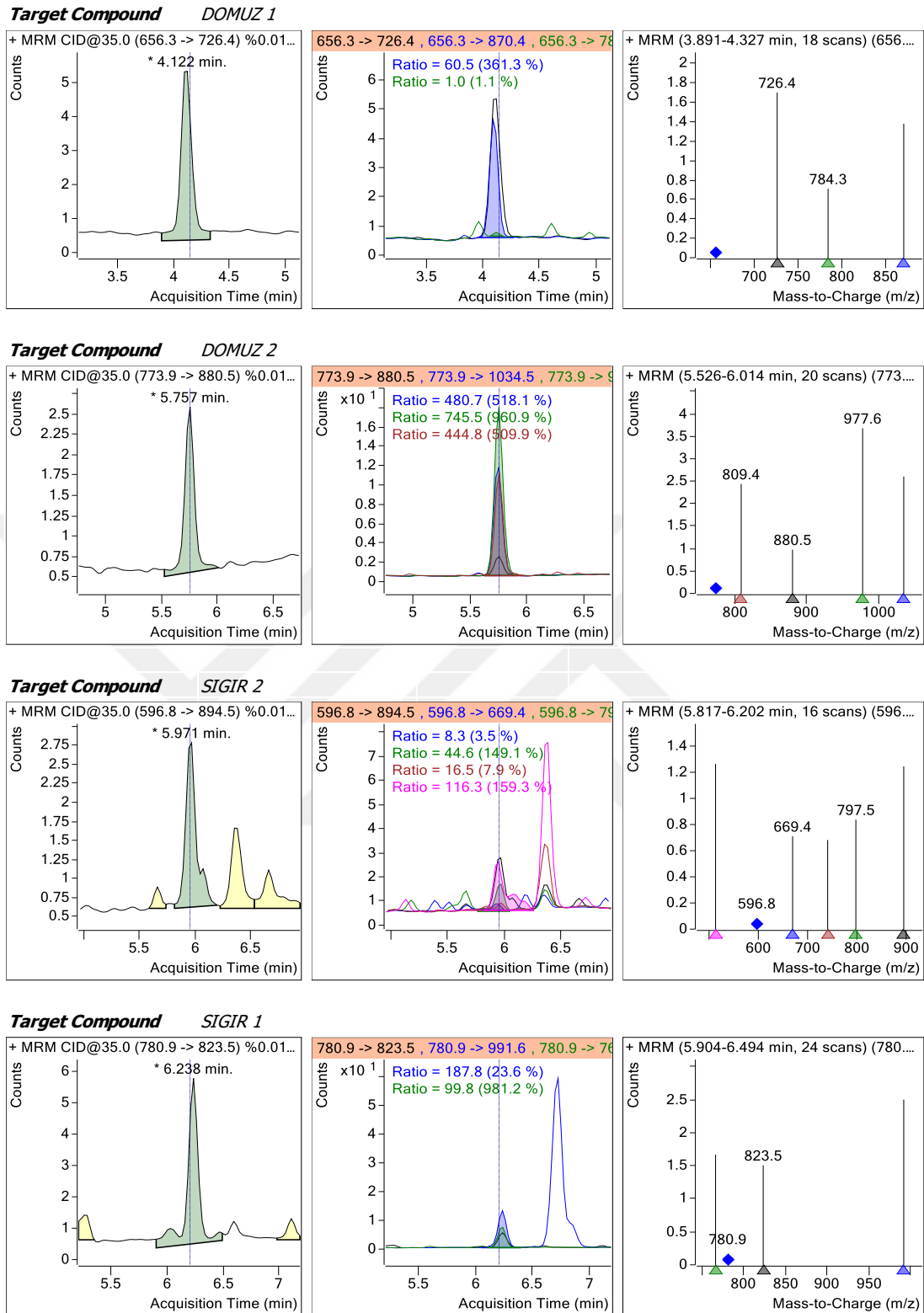


Target Compound SIGIR 1



Şekil 4.5. Kalibrasyon eğrisinde %0.1 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerinin öncü iyon ve yavru iyon pik grafikleri.

Benzer şekilde %0.05, %0.025 noktalarının da pik grafikleri incelendiğinde belirteç peptitlerine ait piklerin net bir şekilde ayrıldığı görülmüştür.

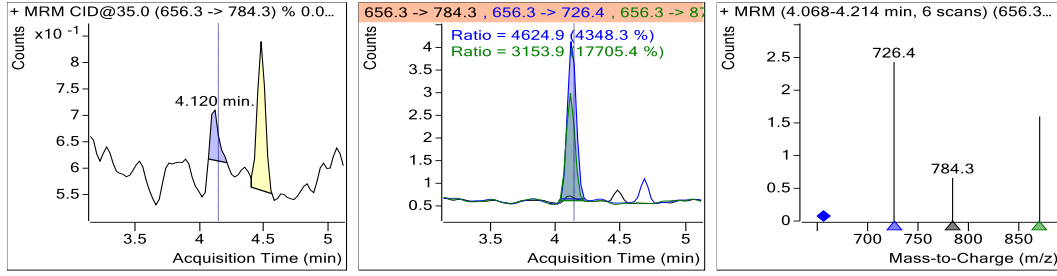


Şekil 4.6. Kalibrasyon eğrisinde %0.012 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerinin öncü iyon ve yavru iyon pik grafikleri.

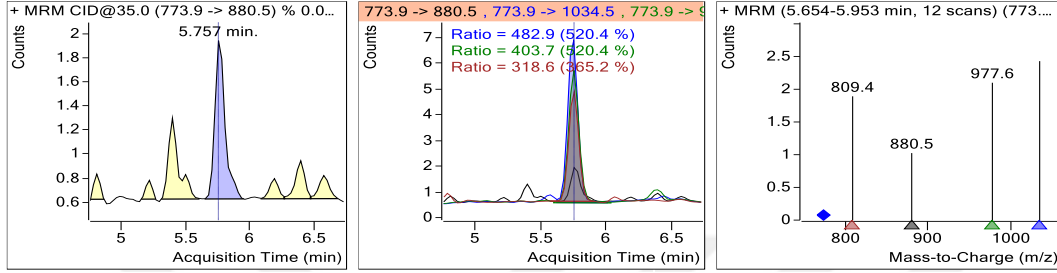
Şekil 4.6.'daki %0.012 noktasının pik grafikleri incelendiğinde özellikle sığır2 pikinin ayrımının yapılabildiği ancak gürültü piklerine yaklaştığı görülmüştür.

Compound Graphics

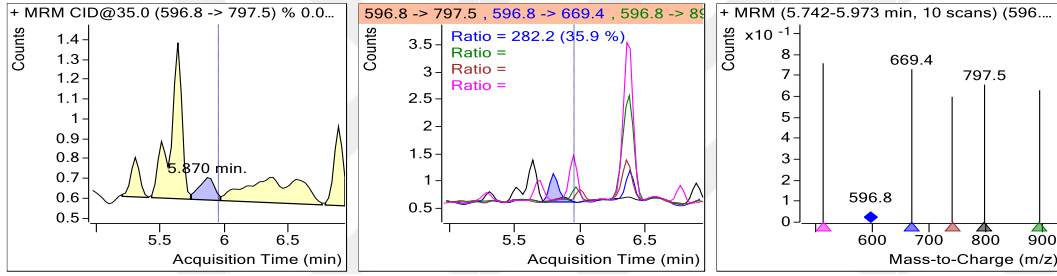
Target Compound DOMUZ 1



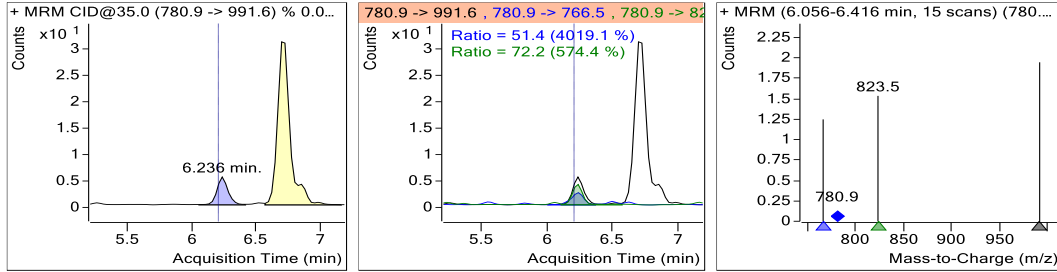
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SİĞİR 2



Target Compound SİĞİR 1



Şekil 4.7. Kalibrasyon eğrisinde %0.005 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerinin öncü iyon ve yavru iyon pik grafikleri.

Şekil 4.7.'de kalibrasyon eğrisinin %0.005 konsantrasyon pik grafikleri incelendiğinde artık belirteç peptitlerine ait tespitin doğru bir şekilde yapılamadığı görülmektedir.

Kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra içerisinde domuz ve sığır jelatini bulunmayan bitkisel jelleştirici numunesine, domuz jelatini ve sığır jelatininden % 0,012 oranında olacak şekilde eklenerek numune hazırlanmıştır ve homojenize edilmiştir. Hazır hale getirilen numunelerden çalışmalar yapılmış olup, çalışma sonuçları ve değerlendirmeleri aşağıda verilmiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Jelatin tespit limiti çalışmaları (% 0,012).

	1. Kişi		2. Kişi	
	Domuz Jelatini	Sığır Jelatini	Domuz Jelatini	Sığır Jelatini
1	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
2	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
3	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
4	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
5	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
6	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
7	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
8	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
9	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
10	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi

Yukarıda ki tabloda elde edilen değerler sonunda % 0,012 lik domuz ve sığır jelatini içeren gıdalarda, jelatin türünün tespitinin yapılabildiği görülmüştür. İki ayrı kişiyle 20 numunede yapılan çalışmalarda bitkisel jelleştirici içerisine sığır ve domuz jelatini eklenmiş ve tüm numunelerde iki jelatin türü de tespit edilebilmiştir.

4.2.2. Hassasiyet çalışmaları

İki analist ile 6 farklı örnekte tespit limiti, doğruluk çalışmaları, yanlış pozitif ve yanlış negatif çalışmaları yapılmıştır. Domuz jelatini içeren yumuşak şeker, gıda katkı maddesi, sığır jelatini numunesi, domuz jelatini numunesi, bitkisel jelleştirici numunesi ve sığır kapsülü numuneleri ile çalışmalar yürütülmüştür.

Doğruluk çalışmalarında 20 numune ile çalışılmış olup hassasiyetin $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ olduğu tespit edilmiştir.

Bitkisel jelleştirici numunesinde 20 çalışma yapılmış olup hassasiyetin $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ olduğu tespit edilmiştir. Sığır kapsülü numunesinde 20 çalışma yapılmış olup hassasiyetin $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ olduğu tespit edilmiştir. Domuz jelatini numunesinde 20 çalışma yapılmış olup hassasiyetin $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ olduğu tespit edilmiştir.

Yumuşak şeker numunesinde 20 çalışma yapılmış olup hassasiyetin $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ olduğu tespit edilmiştir. Son olarak gıda katkı numunesinde 20 çalışma yapılmış olup hassasiyetin yine $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ olduğu tespit edilmiştir.

Toplam 140 örnek ile yapılan çalışmada pozitif çalışmaların tümü pozitif, negatif çalışmaların tümü de negatif bulunmuştur. Bu durumda testin hassasiyeti,

$140/140=1 \times 100=100$ yani $\%100$ 'dür.

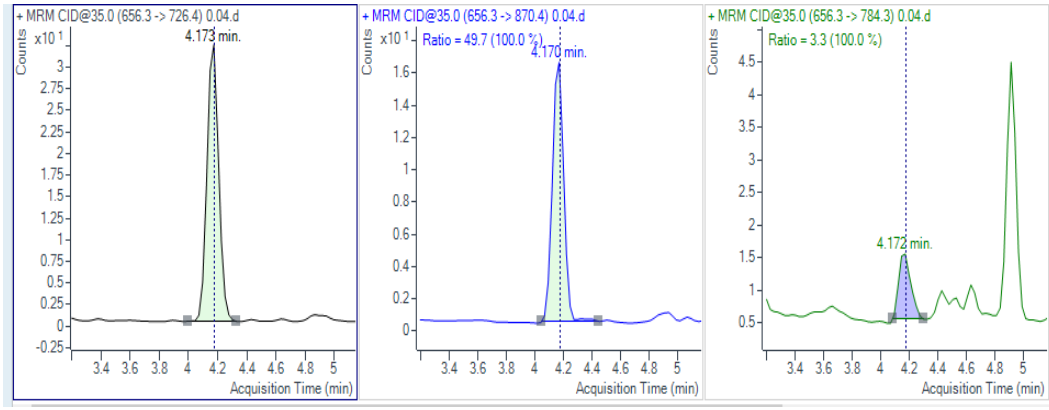
Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi dikkate alındığında metot hassasiyetleri $\%90$ veya daha yüksek olarak bulunmuşsa kabul edilebilir olarak değerlendirilir. Bu durumda testin seçiciliği: $\%100$ olduğu görüldüğünden çalışma sonuçları uygun bulunmuştur.

4.2.3. Doğruluk çalışmaları

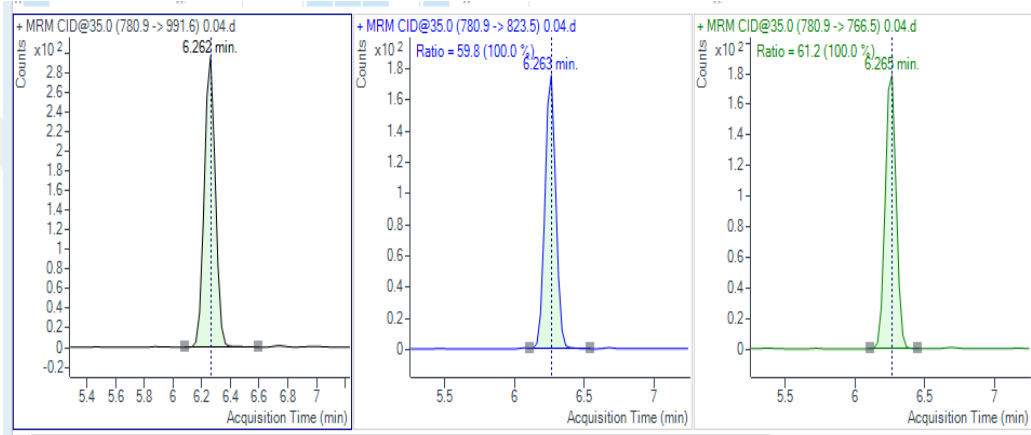
Doğruluk çalışmaları yapılırken Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi dikkate alınmıştır.

Bitkisel jelleştirici numunesine domuz jelatini ve sığır jelatini eklenmiştir. Numune $\% 0,03$ oranında domuz ve sığır jelatini eklenerek hazırlanmıştır ve homojenize edilmiştir. Hazırlanan numuneler LC-TQ cihazında okumaları yapılarak sonuçlar gözlemlenmiştir. Çalışmalar iki ayrı kişi tarafından yürütülmüştür. Her iki kişi de 10 adet numune hazırlayarak çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmalar sonunda her grup için verilen pozitif numunelerin sonuçlarının pozitif olduğu oransal olarak $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ doğruluk oranına ulaşıldığı görülmüştür. Yapılan çalışmada doğruluk oranının $\%100$ olduğu görülmüştür. Şekil 4.8. ve Şekil 4.9. da domuz ve sığır jelatinlerine ait kromatogram görseli verilmiştir.



Şekil 4.8. Domuz jelatini kromatogramı.



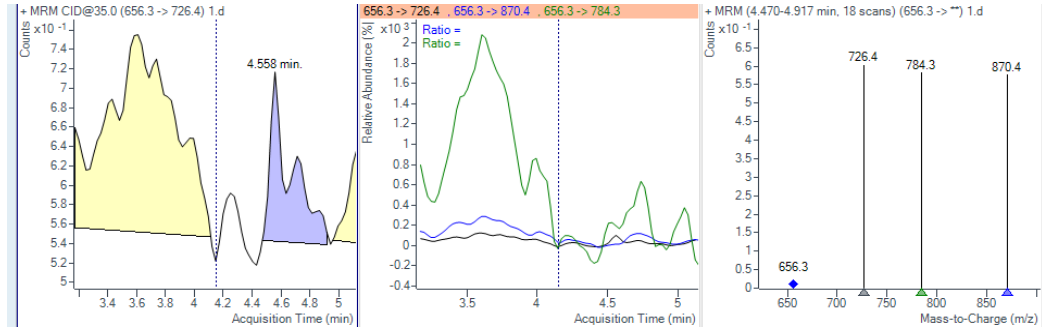
Şekil 4.9. Sığır jelatini kromatogramı.

4.2.4. Yanlış-Pozitif çalışmaları

Yanlış pozitif çalışmaları için iki ayrı kişi ile gerçekleştirilmiştir. İçerisinde domuz ve sığır jelatini bulunmayan bitkisel jelleştirici numunesi, domuz jelatini numunesi, sığır jelatini numunesi, yumuşak şeker numunesi (domuz jelatini içeren), gıda katkısı numunesi (domuz jelatini içeren) ve sığır kapsülü numunesinden çalışmalar yapılmıştır.

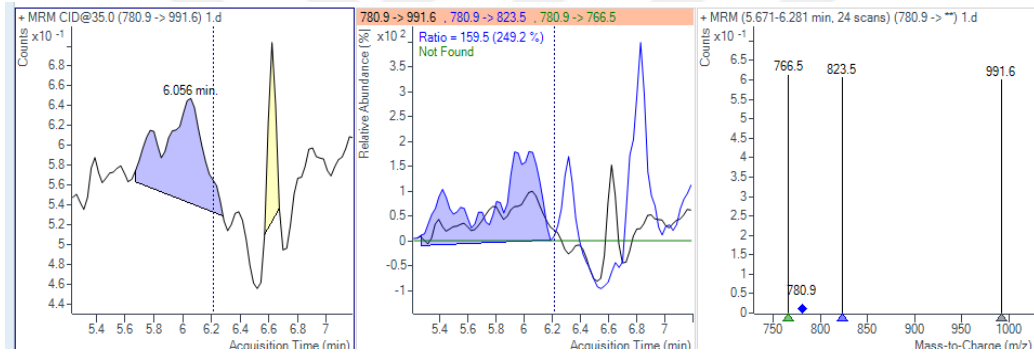
Bu çalışmalar iki ayrı kişi tarafından sığır jelatini, domuz jelatini, bitkisel jelleştirici ve sığır kapsülü numunelerinden 10'ar adet örnek hazırlanmıştır. Sığır jelatininde, domuz jelatini, bitkisel jelleştirici numunesinde sığır ve domuz jelatini, sığır kapsülünde domuz jelatini aranmıştır ve tüm numunelerin sonucunun negatif olduğu görülmüştür.

Örnek olarak sığır kapsülü numunesinde domuz jelatini aranmasına dair kromatogram görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Sığır kapsülünde domuz jelatini aranması çalışmasına ait kromatogramı.

Yumuşak şeker numuneleri ve gıda katkı numunesinde (domuz jelatini içeren örnekler) ise sığır jelatini aranması çalışmaları yapılmıştır. İki kişi tarafından her numuneden hazırlanan 10’ar adet örnekle yapılan bu çalışmalarda sığır jelatini tespit edilememiştir. Domuz jelatininde sığır jelatini aranmasına dair örnek kromatogram Şekil 4.11.’da verilmiştir.

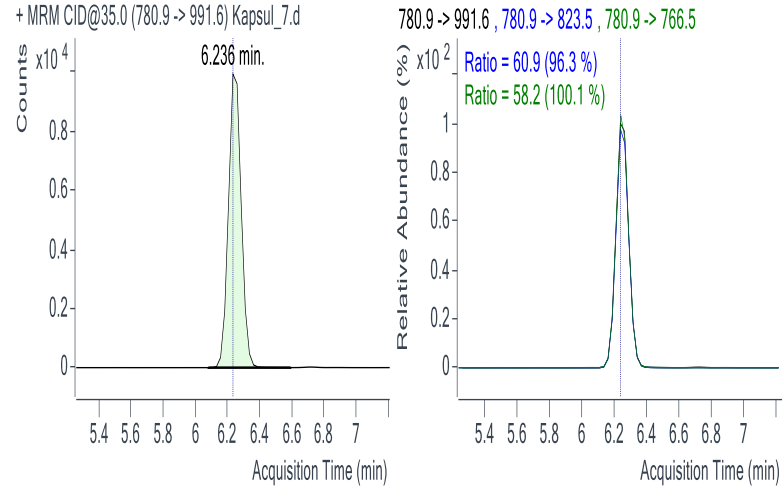


Şekil 4.11. Domuz jelatininde sığır jelatini aranması çalışmasına ait kromatogram

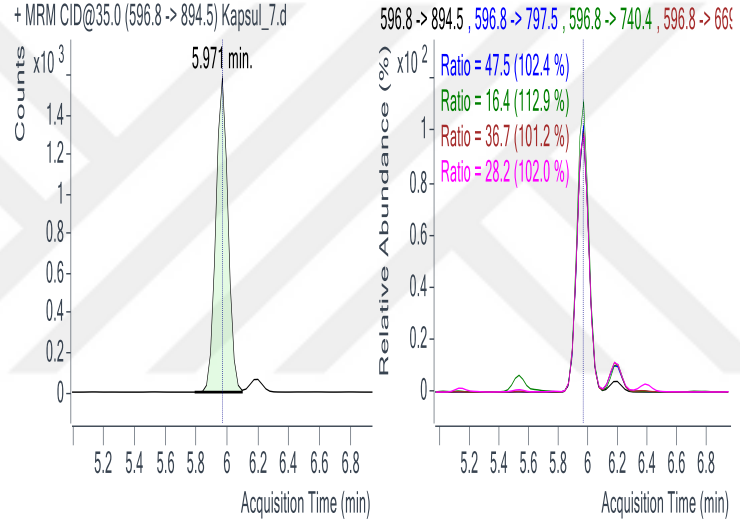
İki kişi tarafından yapılan çalışmalar sonunda her bir parametre için negatif çalışmaların sonucunun yine negatif bulunduğu, domuz jelatini için 60/60=1 oranında negatif örneğin çalışmalar sonucunda yine negatif, sığır jelatini için 80/80=1 oranında negatif örneğin çalışmalar sonucunda yine negatif tespit edilmiştir.

4.2.5. Yanlış-Negatif çalışmaları

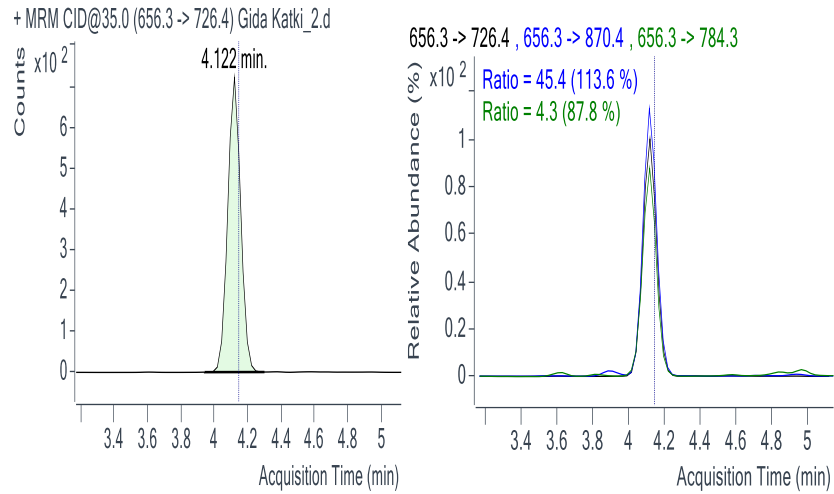
Yanlış negatif çalışmaları için iki ayrı personel ile, domuz jelatini, sığır jelatini, yumuşak şeker numunesi, gıda katkı numunesi ve sığır kapsülü numunelerinden çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda sığır jelatini numunelerinin hepsinde sığır pozitif, domuz içeren numunelerin hepsinde domuz pozitif olduğu görülmüştür. Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17. numunelere ait örnek kromatogram görselleri verilmiştir.



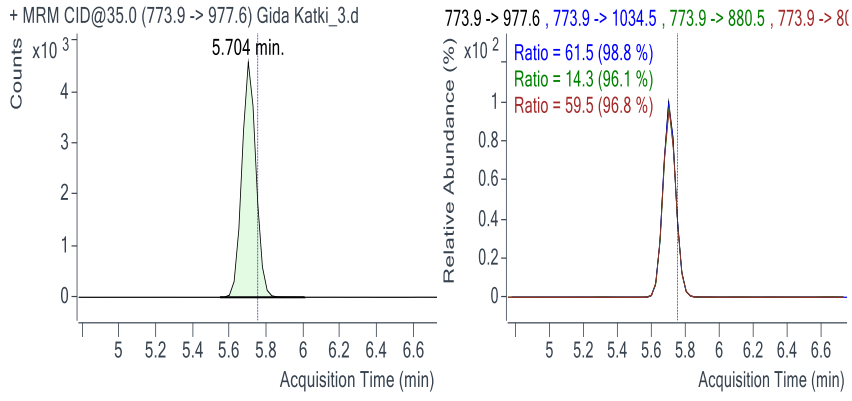
Şekil 4.12. Kapsül numunesi (Sığır 1).



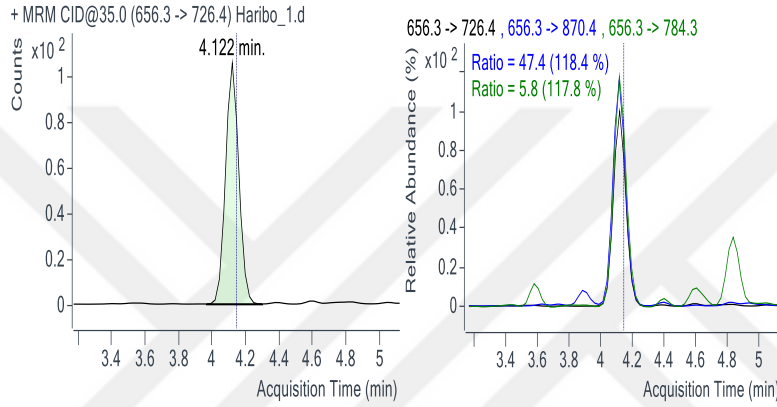
Şekil 4.13. Kapsül numunesi (Sığır 2).



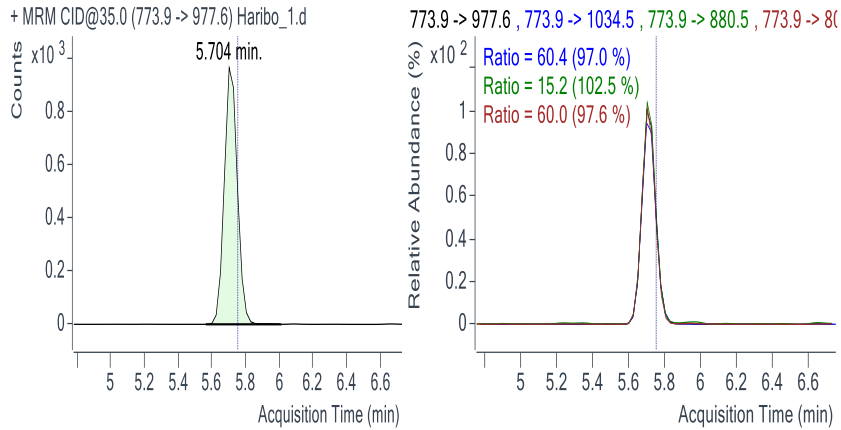
Şekil 4.14. Gıda katkı numunesi (Domuz 1).



Şekil 4.15. Gıda katkı numunesi (Domuz 2).



Şekil 4.16. Yumuşak şeker (Domuz 1).



Şekil 4.17. Yumuşak şeker (Domuz 2).

Yapılan çalışmalar sonunda her bir parametre için her pozitif çalışma örneğinin çalışmalar sonunda yine pozitif bulunduğu, domuz jelatini için 60/60=1 oranında pozitif örneği pozitif tespit edildiği, sığır jelatini için 40/40=1 oranında pozitif örneğin yine pozitif tespit edilmiştir. Yanlış negatif verme oranı hesaplandığında sıfır olduğu tespit edilmiştir.

Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi incelendiğinde metodun yanlış pozitif/negatif oranının %10'u aşmaması durumunda kabul edilebilir olarak değerlendirilebildiği görülmüştür. Yapılan çalışmada bu oran % 0 olduğundan çalışmalar uygun bulunmuştur.

4.2.6. Güvenirlilik çalışmaları

İki ayrı personel tarafından yapılan validasyon çalışmalarından elde edilen sonuçların hepsi hesaplanmıştır.

Sığır jelatini yanlış pozitif çalışması için yapılan 80 adet sığır jelatini çalışmasının 80 tanesi negatif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti: $80/80=1 \times 100=100$ yani %100 dür.

Domuz jelatini yanlış pozitif çalışması için yapılan 60 adet sığır jelatini çalışmasının 60 tanesi negatif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti: $60/60=1 \times 100=100$ yani %100 dür.

Sığır jelatini yanlış negatif çalışması için yapılan 40 adet sığır jelatini çalışmasının 40 tanesi pozitif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti: $40/40=1 \times 100=100$ yani %100 dür.

Domuz jelatini yanlış negatif çalışması için yapılan 60 adet sığır jelatini çalışmasının 60 tanesi pozitif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti: $60/60=1 \times 100=100$ yani %100 dür.

Güvenirlilik çalışmaları yapılırken beklenen (gerçek sonuçlar) sonuçlar ile gözlenen (verifikasyon çalışmasında elde edilen sonuçlar) sonuçların istatistiksel olarak %90 güven aralığında ne oranda uyumlu olduğunu belirlemek için “Cohen's Kappa Coefficient Test” kullanılmıştır (4.1.). Kappa değeri %90 güven aralığında hesaplandığında;

$$\text{Kappa (K)} = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e} \quad (4.1)$$

$$p_0 = \frac{(N_{11} + N_{22})}{N} \quad (4.2)$$

$$p_e = \frac{(N_{1-} \times N_{-1}) + (N_{2-} \times N_{-2})}{(N \times N)} \quad (4.3)$$

N11: 140

N22: 140

N1_: 140

N2_: 140

N_1: 140

N_2: 140

N: 280

Bu durumda Kappa değeri hesaplandığında $K=1$ olmaktadır. Cohen'nin Kappa Katsayısı Testi (Cohen's Kappa Coefficient Test)'ine göre;

Kappa (K) $\leq 0.20 \rightarrow$ Zayıf uyum

Kappa (K) 0.21-0.40 $\rightarrow$ Kötü uyum

Kappa (K) 0.41-0.60 $\rightarrow$ Orta uyum

Kappa (K) 0.61-0.80 $\rightarrow$ İyi uyum

Kappa (K) $\geq 0.80 \rightarrow$ Çok iyi uyum

Yapılan metot validasyon çalışmasının "Çok iyi uyum" olduğu görülmüştür.

Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberinde belirtilen çalışma değerlendirme parametreleri göz önüne alındığında LOD (Limit of Detection- Tespit Limiti), Hassasiyet, Doğruluk, Yanlış pozitif/negatif çalışması, Güvenilirlik parametrelerine göre yapılan validasyon çalışmasının uygun olduğu görülmüştür.

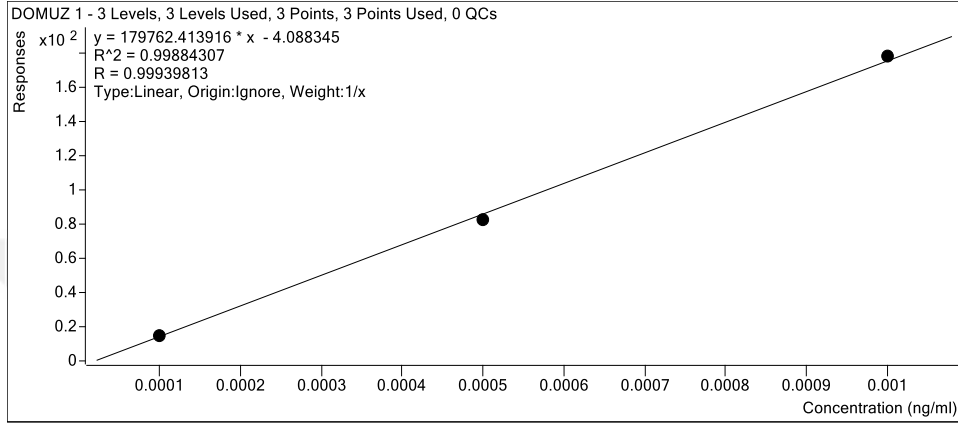
4.3. Takviye Edici Gıda Örneklerinin Analizi

Yurtdışından temin edilen ve Türkiye'de üretilen takviye edici gıda numunelerinden toplam 25 adet örnek çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlandı. Bu numuneler belirli bir sıra olmaksızın 1'den 25'e kadar kodlandı. Etiket bilgileri incelenen numunelerin bir kısmında sığır jelatini bir kısmında bitkisel jelleştirici ve bazılarında balık jelatini

kullanıldığına dair etiket beyanı verildiği gözlemlendi. Numuneler cihaza verilmeden önce metoda uygun olarak hazırlandı. Tespit limiti dikkate alınarak %0.1, 0.05 ve %0.012 düzeyinde standartlar hazırlandı ve bu standartlar cihaza verilerek okumalar gerçekleştirildi. Standartlardan bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Çizilen bu kalibrasyon eğrisi Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'da gösterilmiştir.

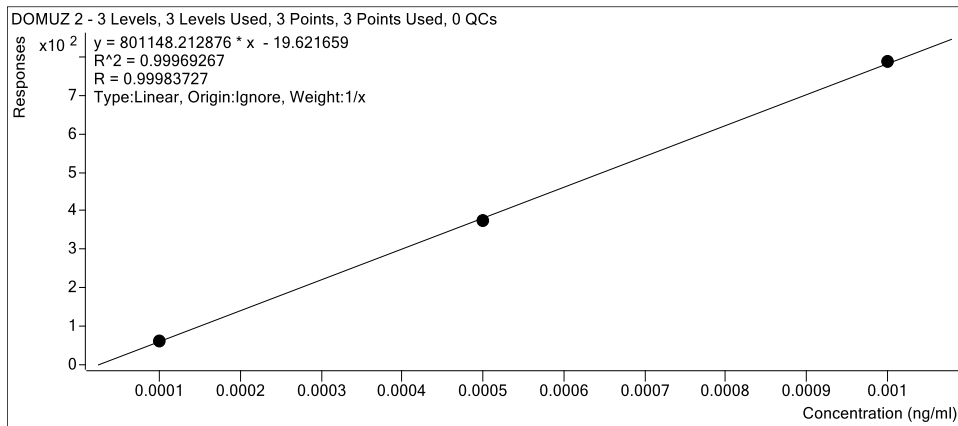
Calibration Info

Target Compound DOMUZ 1



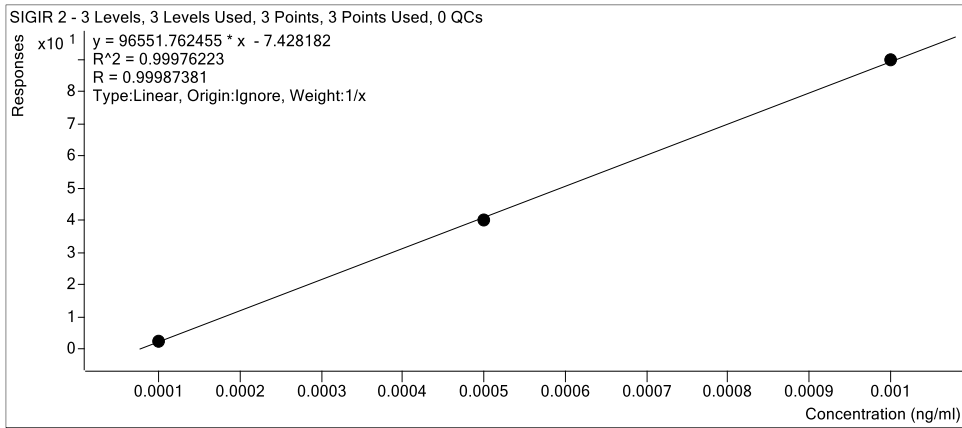
Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0001 STD..d	Calibration	1	☒	14	0,0001	142673,1272
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0005 STD..d	Calibration	2	☒	82	0,0005	164756,2207
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.001 STD..d	Calibration	3	☒	179	0,0010	178709,4028

Target Compound DOMUZ 2

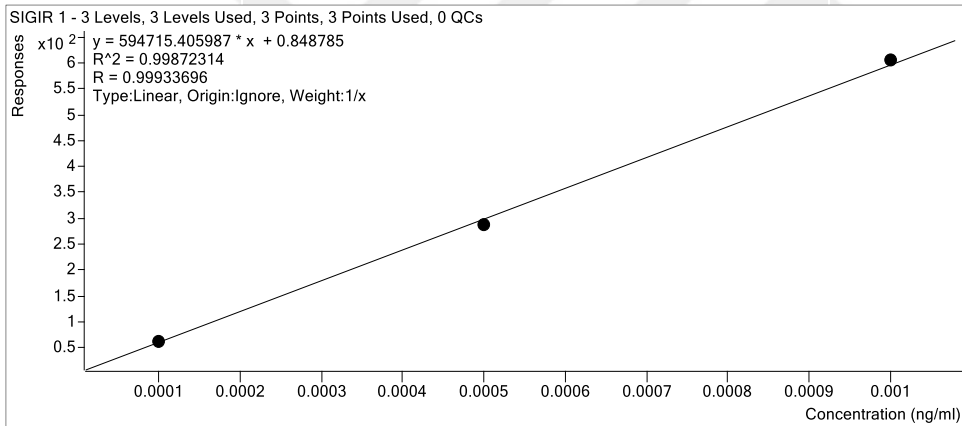


Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0001 STD..d	Calibration	1	☒	61	0,0001	613643,1147
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0005 STD..d	Calibration	2	☒	373	0,0005	746224,2133
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.001 STD..d	Calibration	3	☒	788	0,0010	788495,7460

Şekil 4.18. Standart karışımı ait domuz1, domuz2 peptitlerinin kalibrasyon eğrisi.

Target Compound**SIGIR 2**

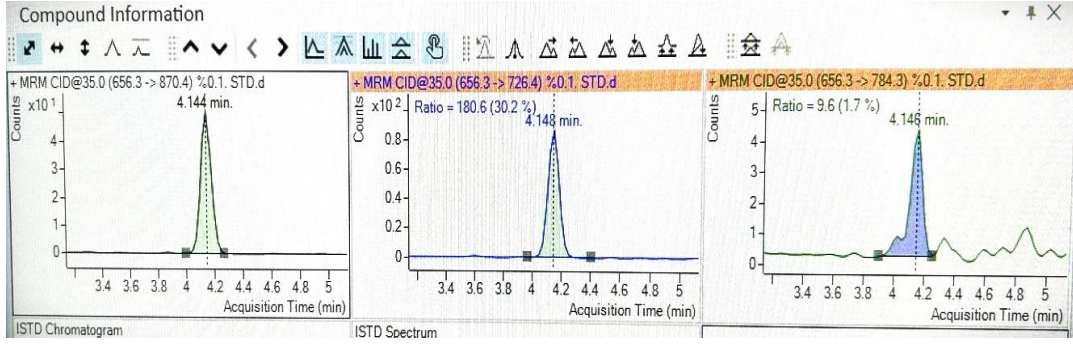
Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0001 STD.d	Calibration	1	☒	2	0,0001	23193,3627
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0005 STD.d	Calibration	2	☒	40	0,0005	80033,2368
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.001 STD.d	Calibration	3	☒	90	0,0010	89862,3185

Target Compound**SIGIR 1**

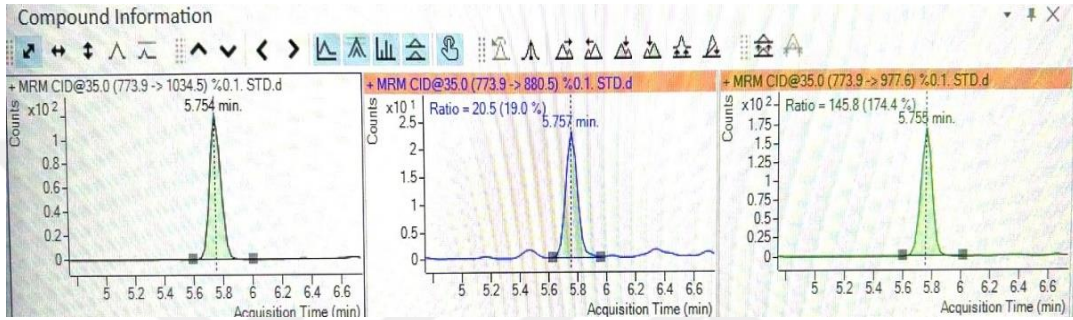
Calibration STD	Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0001 STD.d	Calibration	1	☒	62	0,0001	616391,0101
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.0005 STD.d	Calibration	2	☒	286	0,0005	572675,0113
D:\Projects\LCMSMS\Data\JELA TIN\20250319\0.001 STD.d	Calibration	3	☒	606	0,0010	606114,3968

Şekil 4.19. Standart karışımşarına ait sığır1, sığır2 peptitlerinin kalibrasyon eğrisi.

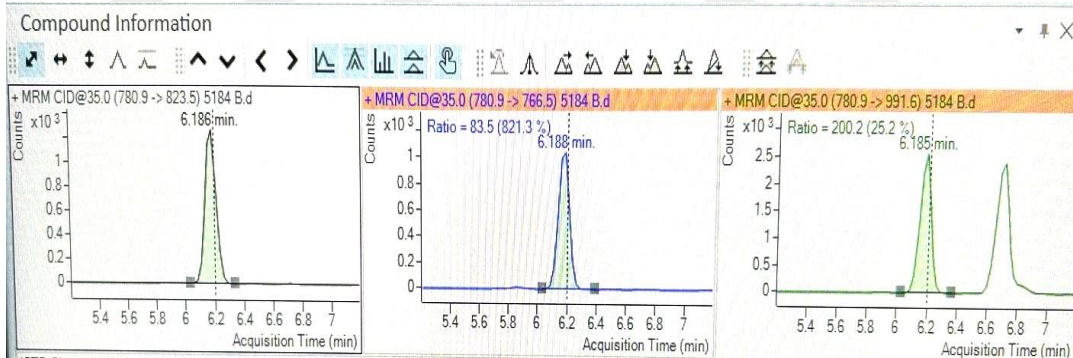
Cihaza standartların ardından numuneler verilerek okuma gerçekleştirildi. Çıkan sonuçlar standart eğrisine göre incelendi. Her numune için domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 peptit iyonlarının kromotagram üzerinde okumaları gözlemlendi ve miktarsal olarak tespitleri yapıldı. Her belirteç peptide ait iyonlar (precursor ion) ve bu iyonların yavru iyonları (product ion) incelenmiştir. Bu iyonlar ve iyonlara ait görseller Şekil 4.20, Şekil 4.21., Şekil 4.22. ve Şekil 4.23.'te verilmiştir.



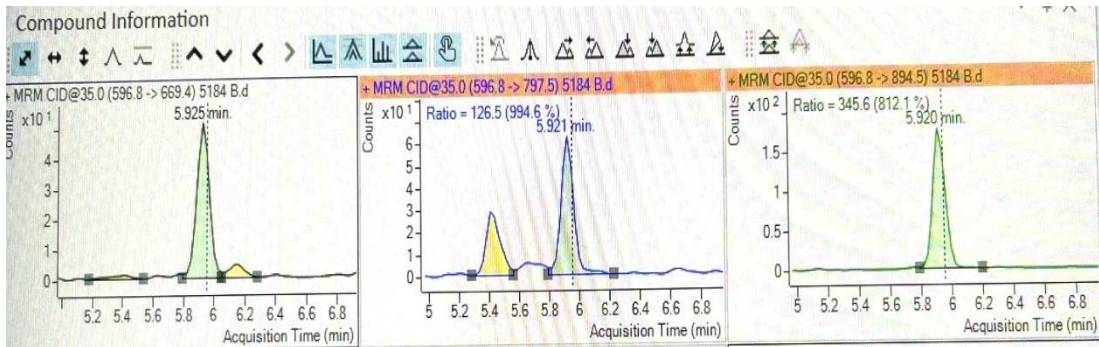
Şekil 4.20. Domuz1 belirteç peptiti öncü iyon (kütle/yük oranı 656.3) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 726.4, 784.3, 870.4).



Şekil 4.21. Domuz2 belirteç peptiti öncü iyon (kütle/yük oranı 773,9) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 809.4, 880.5,977.6).



Şekil 4.22. Sığır1 belirteç peptiti öncü iyon (kütle/yük oranı 780.9) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 766.5, 823.5,991.6).



Şekil 4.23. Sığır2 belirteç peptidi öncü iyon (kütle/yük oranı 596.8) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 669.4, 740.4,797.5).

Tüm bu belirteç peptitler ile ilgili kromatogram üzerinde pikler incelendi. Her numune için ayrı ayrı iyonların nitel ve nicel analiz sonuçları kıyaslandı.

Numuneler TEG-1 'den TEG-25'e kadar isimlendirildi. Numunelerin nereden temin edildiği ve jelatin türü ile ilgili bilgiler Tablo 4.2.' de verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan 25 adet TEG numunesine ait bilgiler.

Numune No:	Temin edildiği yer	Sığır Jelatini	Domuz Jelatini
TEG-1	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-2	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-3	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-4	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edildi
TEG-5	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-6	Türkiye	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-7	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-8	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-9	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edildi
TEG-10	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-11	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-12	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-13	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-14	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edildi
TEG-15	Türkiye	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-16	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-17	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-18	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-19	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-20	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit edildi
TEG-21	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-22	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-23	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-24	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-25	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit edildi

Türkiyede üretilen 8 numuneden 6'inde sadece sığır jelatinine rastlanırken 1 tanesinde domuz jelatinine rastlandı ve 1 tanesinde ise her ikisine de rastlanmadı. Yurtdışından temin edilen 17 numunenin 5 tanesinde hem domuz hem sığır, 3 tanesinde sadece domuz, 1 tanesinde sadece sığır jelatini tespit edilirken 8 tanesinde hem sığır hem de domuz jelatinine rastlanmadı. Ayrıca numunelerin tespit edilen miktarları incelendiğinde değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

Xiao-Mei ve ark. (2020) çalışmalarında bazı sığır jelatini peptitlerini tespit etmişlerdir. Bu peptitler tespit edilen en düşük düzeyler kıyaslandığında 0.48-0.06 düzeyleri arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Ayrıca çalışma incelendiğinde çalışılan peptitler arasında GETGPAGPAGPIGPVGAR (öncü iyon - kütle/yük oranı 780.9) belirteç peptiti ve IDQPGAVGPAGIR (öncü iyon - kütle/yük oranı 596.8) belirteç peptiti olduğu görülmüştür. Bu peptitler için LOD değerleri %0.14 ve %0.16 olduğu anlaşılmıştır. Bizim çalışmamızda ise 780.9 m/z öncü iyon (sığır1) ve 596.8 m/z öncü iyon (sığır2) peptitleri için LOD değeri %0.012 düzeyinde tespit edilebilmiştir. Yine başka bir çalışmada Çavuş (2018), sığır ve domuz jelatini peptitleri ile çalışmalar yapmıştır. GETGPSGPAGPTGAR (öncü iyon - kütle/yük oranı 656.3), SAGISVPGPMGPSGPR (öncü iyon - kütle/yük oranı 773,9) ve GETGPAGPAGPIGPVGAR (öncü iyon - kütle/yük oranı 780.9) belirteç peptitleri ile yapılan tespit limiti çalışmalarında en düşük düzeyin %1 olduğunu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise aynı peptitler için LOD değeri %0.012 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda hem ülkemizde hem de dünyada oldukça yaygın olarak kullanılan takviye edici gıdalar kullanılmıştır. Hem gıda endüstrisinde hem de eczacılıkta çok fazla kullanılmasına rağmen içerisindeki jelatinin tespiti noktasında çalışmaların eksik olduğu görülmüş olup bu konu üzerinde özellikle durulmuştur. Türkiye'de üretimi çok fazla olmayan özellikle yurt dışından ithal edilen birçok takviye edici gıda bulunmaktadır. Yurtdışından temin edilen numunelerde domuz jelatini küçümsenmeyecek sayıda fazla bulunmuştur. Dolayısıyla bu çalışma göstermiştir ki, yurtdışından ithal edilecek takviye edici gıdalarda jelatin tür tayini analizinin yapılması oldukça önem arz etmektedir.

Çalışılan numunelerde içerisinde hem domuz hem sığır jelatini tespit edilen, sadece sığır jelatini içeren, sadece domuz jelatini içeren ve her ikisini de içermeyen numunelere ait kromatogram görüntüleri sırasıyla Şekil 4.24., Şekil 4.26., Şekil 4.28. ve Şekil 4.30.' da verilmiştir.

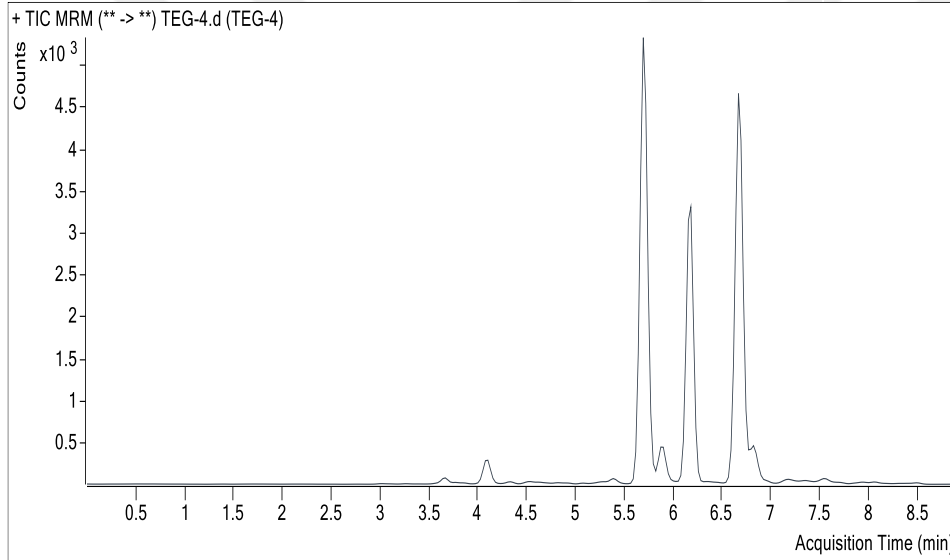
Tüm numunelere ait kromatogram görüntüleri ve tüm belirteç peptitlere ait pik alanlarını içeren bilgiler ise ekler kısmında verilmiştir.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 15:57 **Data File** TEG-4.d
Position P1-C4 **Sample Name** TEG-4
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



Quantitation Results

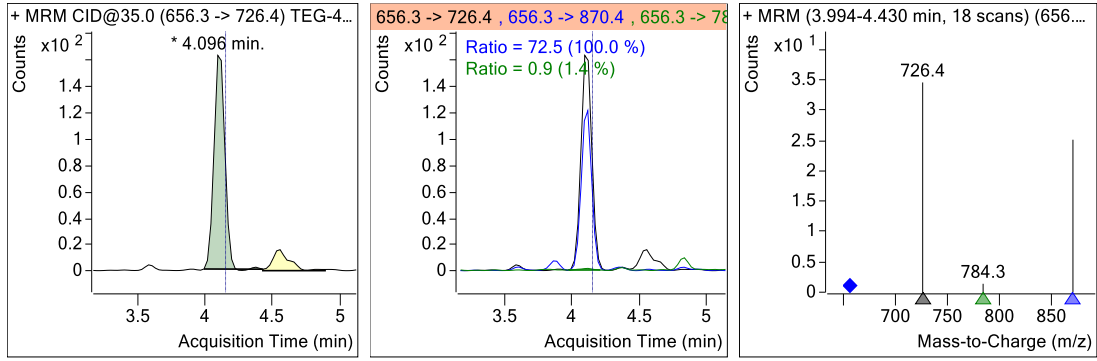
Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,096	915			0,6620	
DOMUZ 2		5,704	12418			2,9527	
SIGIR 2		5,901	763			3,7242	
SIGIR 1		6,185	9404			3,3422	

Şekil 4.24. İçerisinde hem sığır hem domuz jelatini olan numuneye ait kromatogram görüntüsü.

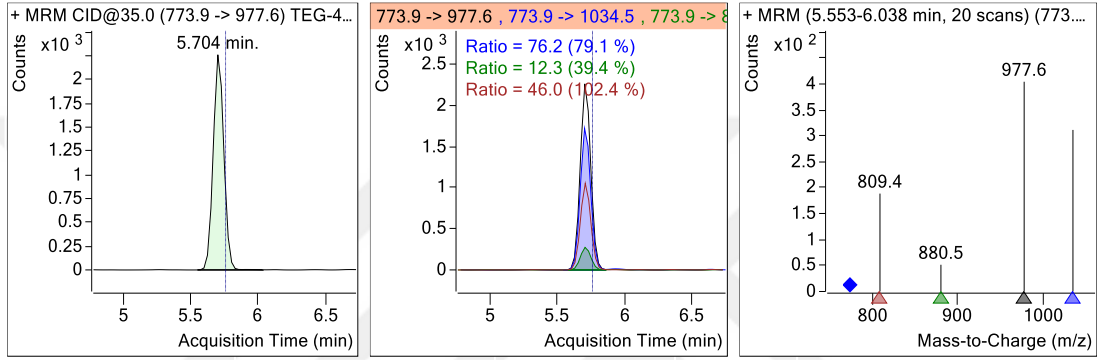
Kromatogram incelendiğinde domuz ve sığır piklerinin yüksek konsantrasyon verdiği görülmüştür. Domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 peptitlerine ait öncü ve yavru iyon pik grafikleri de Şekil 4.25.'te verilmiştir. Bu pik grafikleri incelendiğinde hangi iyonun daha yüksek alan verdiği ayrıntılı şekilde görülmüştür.

Compound Graphics

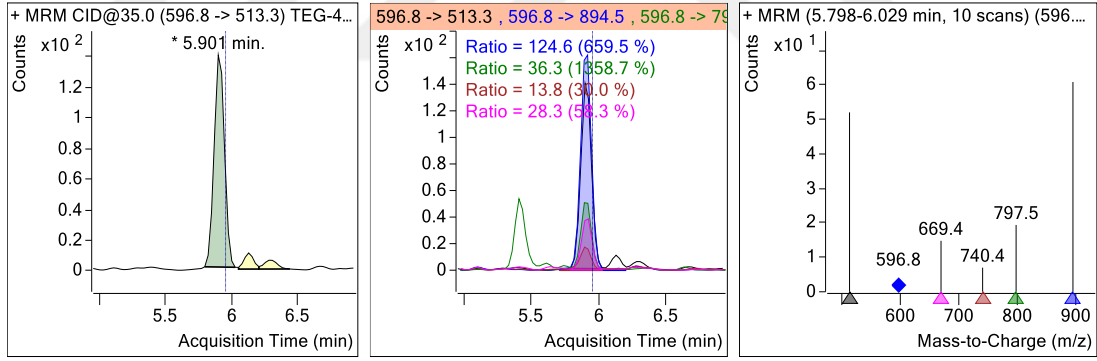
Target Compound DOMUZ 1



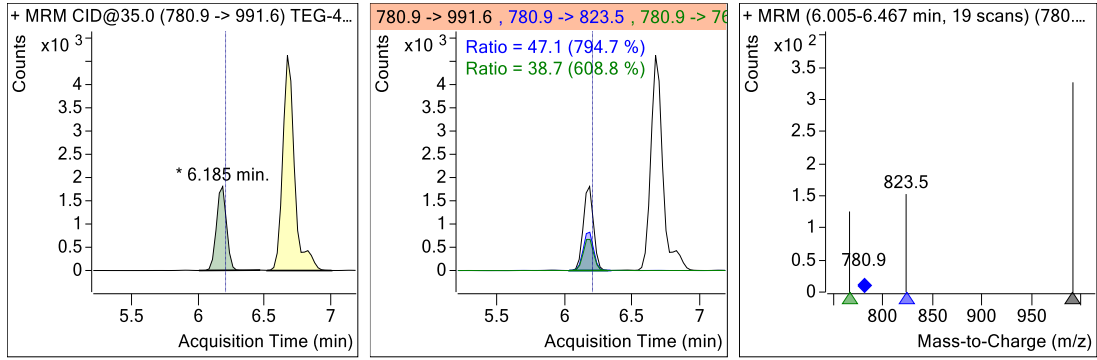
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



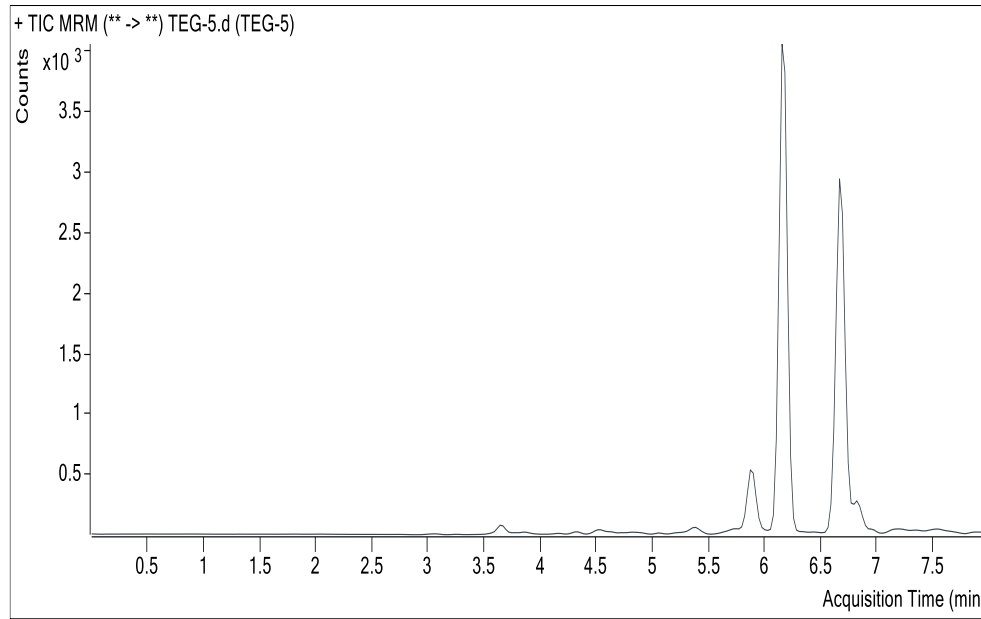
Şekil 4.25. İçerisinde hem sığır hem domuz jelatini olan numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 16:19 **Data File** TEG-5.d
Position P1-D1 **Sample Name** TEG-5
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



Quantitation Results

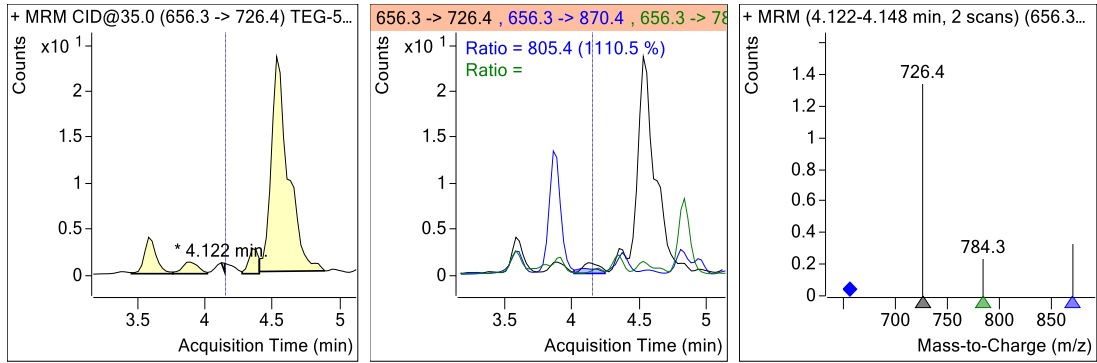
Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	1			0,0015	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	1014			4,9537	
SIGIR 1		6,159	11556			4,1066	

Şekil 4.26. İçerisinde sadece sığır jelatin olan numuneye ait kromatogram görüntüsü.

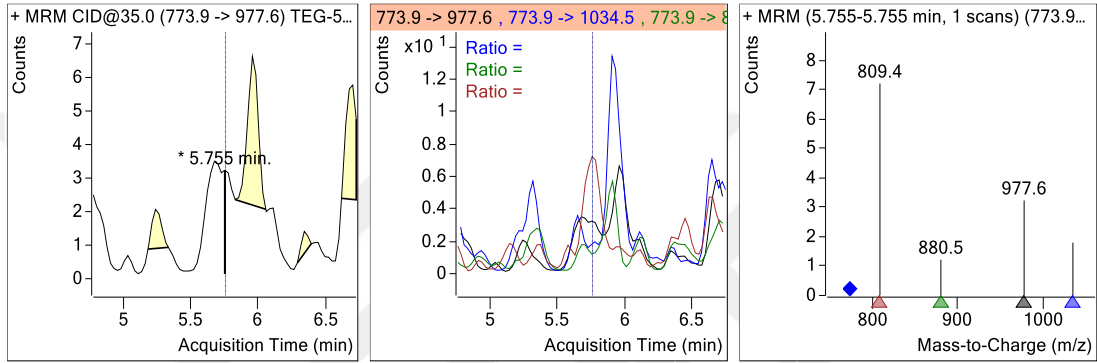
Kromatogram incelendiğinde sığır piklerinin oldukça yüksek konsantrasyon verdiği görülmüştür. Domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 peptitlerine ait öncü ve yavru iyon pik grafikleri de Şekil 4.27.'de verilmiştir. Bu pik grafikleri incelendiğinde hangi iyonun daha yüksek alan verdiği ayrıntılı şekilde görülmüştür.

Compound Graphics

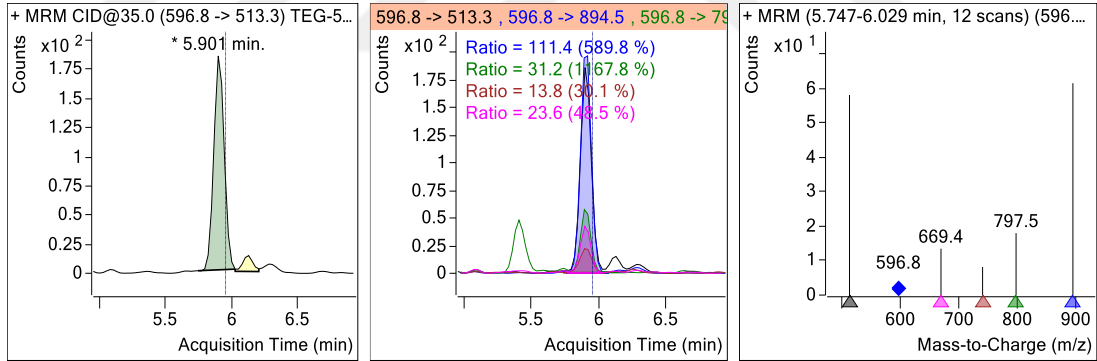
Target Compound DOMUZ 1



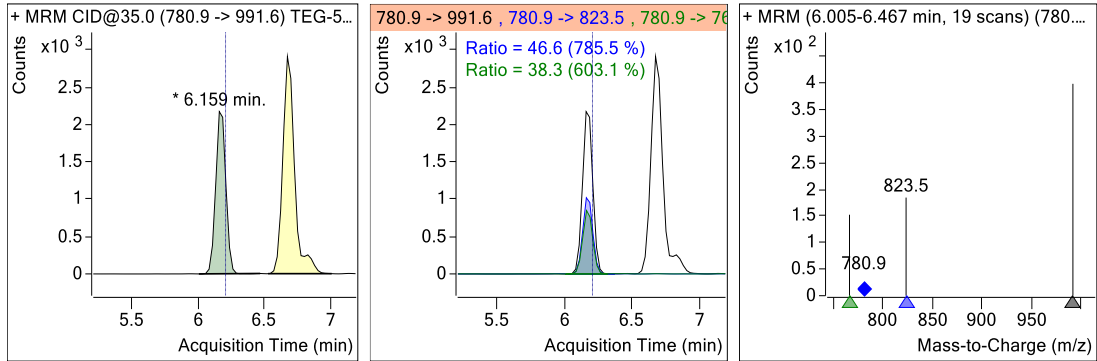
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



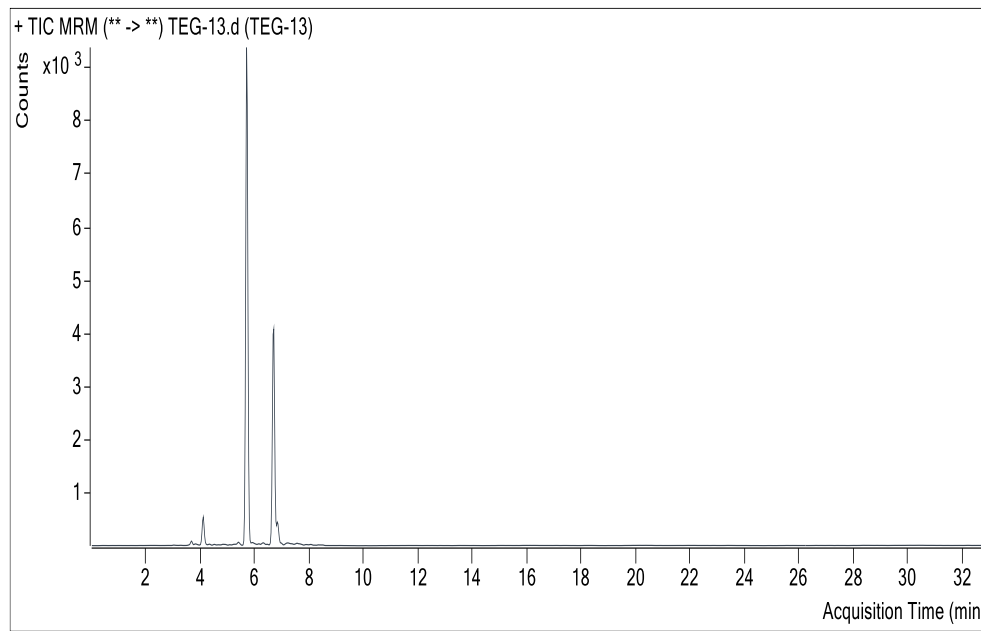
Şekil 4.27. Sadece sığır jelatini içeren numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 19:12 **Data File** TEG-13.d
Position P1-F1 **Sample Name** TEG-13
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



Quantitation Results

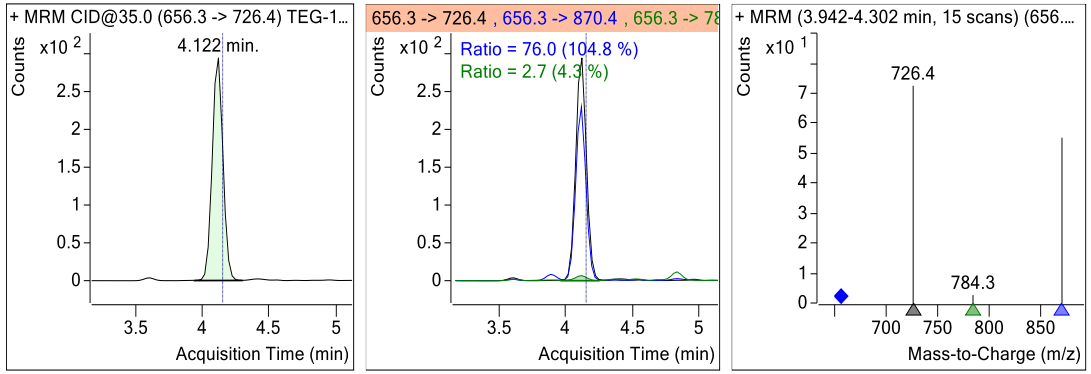
Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	1651			1,1942	
DOMUZ 2		5,704	21979			5,2249	
SIGIR 2		5,952	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

Şekil 4.28. İçerisinde sadece domuz jelatini olan numuneye ait kromatogram görüntüsü.

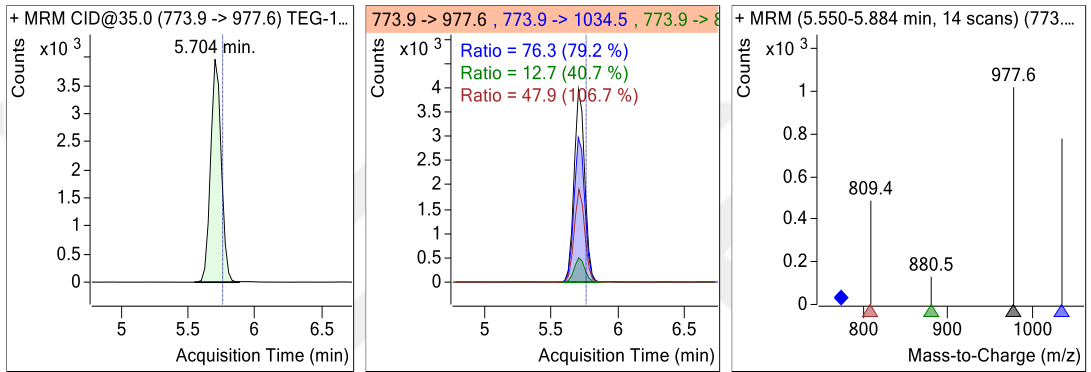
Kromatogram incelendiğinde domuz piklerinin oldukça yüksek konsantrasyon verdiği görülmüştür. Domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 peptitlerine ait öncü ve yavru iyon pik grafikleri de Şekil 4.29.'da verilmiştir. Bu pik grafikleri incelendiğinde hangi iyonun daha yüksek alan verdiği ayrıntılı şekilde görülmüştür.

Compound Graphics

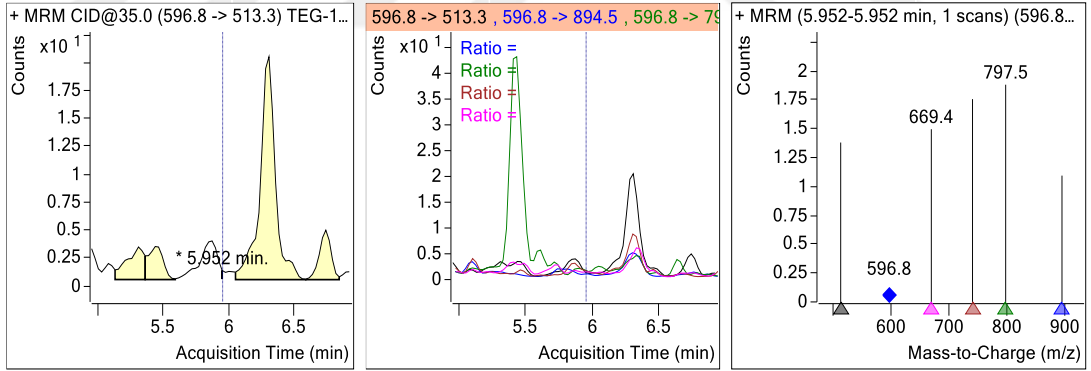
Target Compound DOMUZ 1



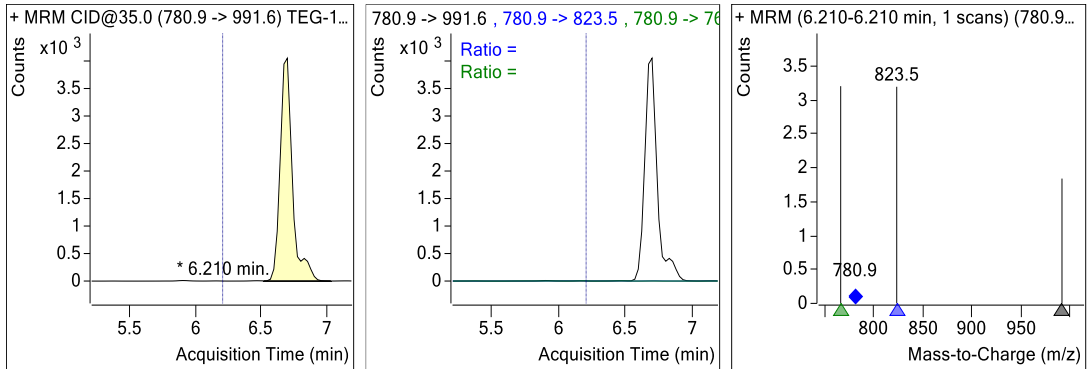
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



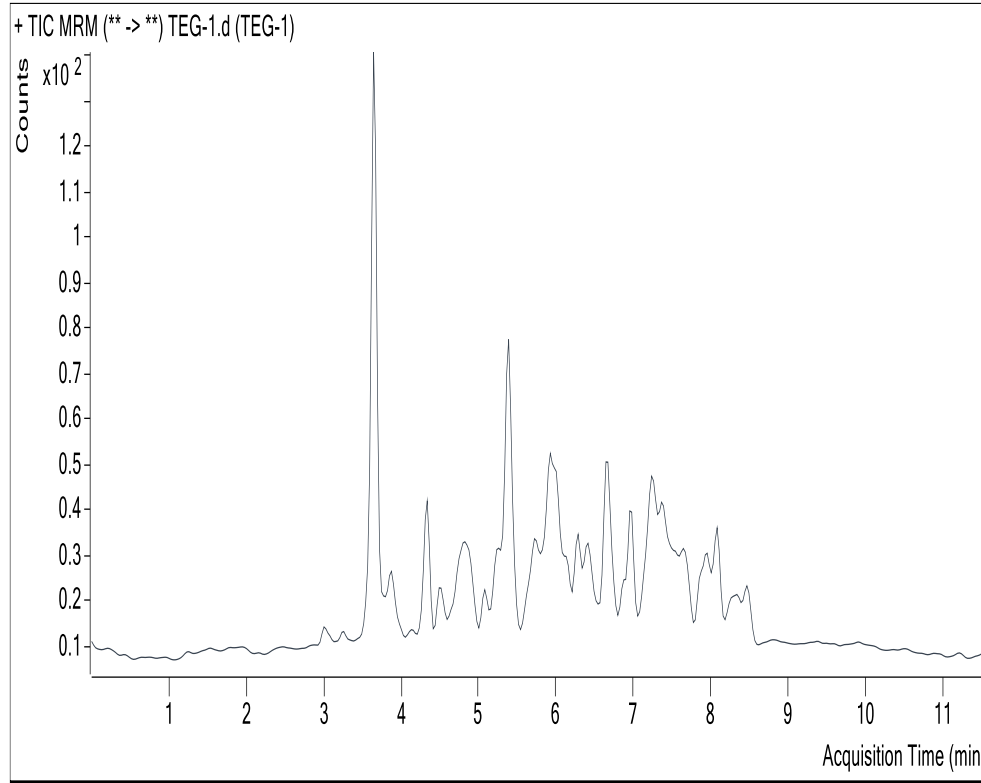
Target Compound SIGIR 1



Şekil 4.29. Sadece domuz jelatini içeren numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.

Position	P1-C1	Sample Name	TEG-1
Dilution	120	Sample Info	
Inj Vol	2	Acq Method File	Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type	Sample	Comment	

Sample Chromatogram



Quantitation Results

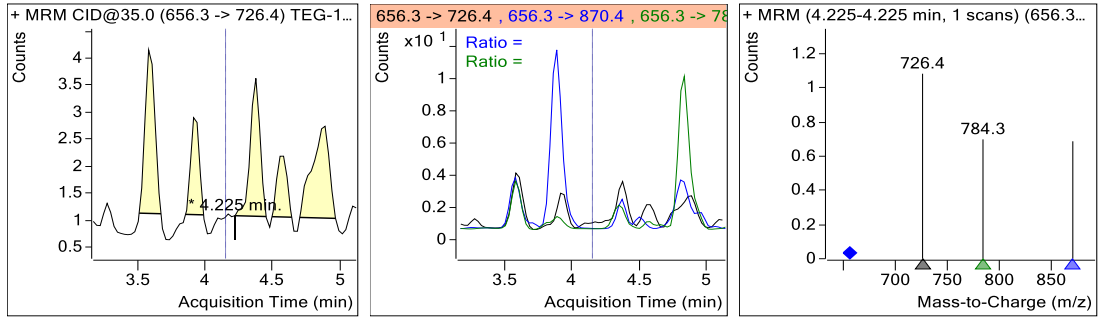
Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,225	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,730	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,952	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

Şekil 4.30. İçerisinde hem domuz hem de sığır jelatini bulundurmeyen numuneye ait kromatogram görüntüsü.

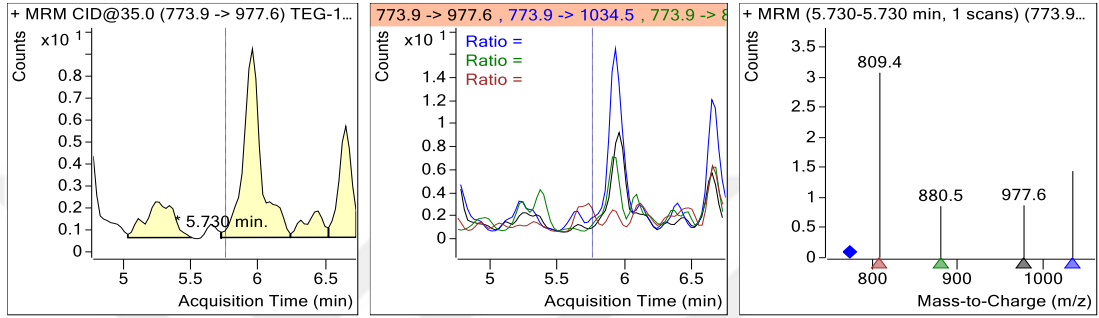
Kromatogram incelendiğinde domuz ve sığır piklerinin tespit edilemediği görülmüştür. Domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 peptitlerine ait öncü ve yavru iyon pik grafikleri de Şekil 4.31.'da verilmiştir. Bu pik grafikleri incelendiğinde hiçbir iyonun pik alanı vermediği ayrıntılı şekilde görülmüştür.

Compound Graphics

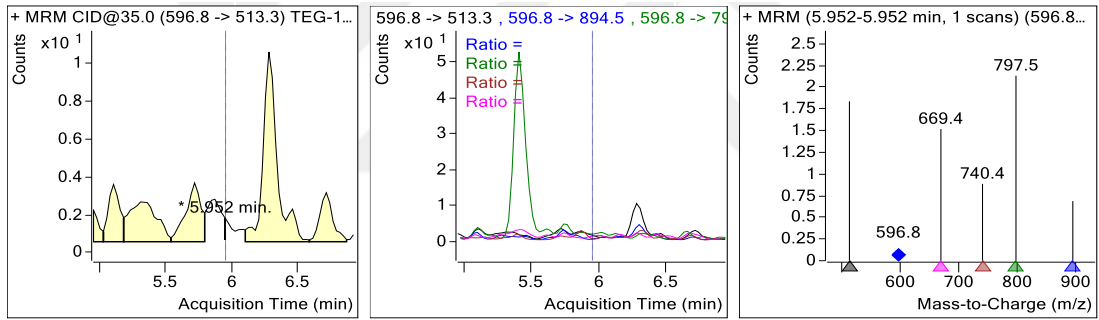
Target Compound DOMUZ 1



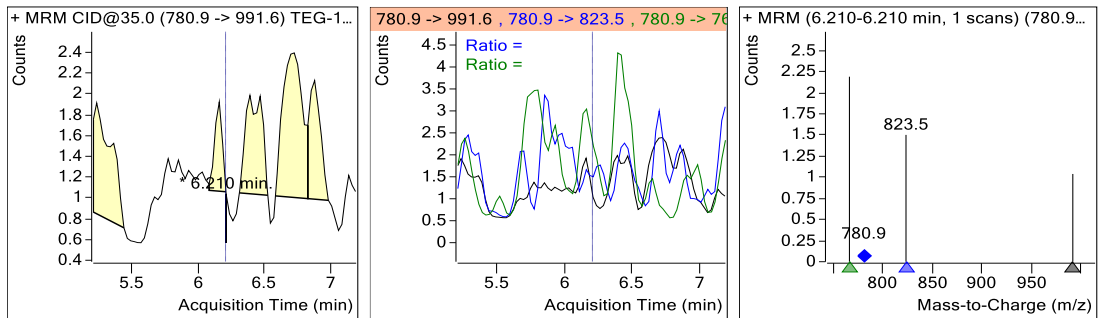
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



Şekil 4.31. Hem domuz hem de sığır jelatini içermeyen numuneye ait pik grafikleri görüntüsü.

4.4. Analiz Süresinin Kısaltılması ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Çalışma boyunca uygulanan metotta numuneler amonyum bikarbonat ile çözündürüldükten sonra tripsin enzimi eklenerek 37°C etüvde 15-16 saat bekletilerek

hazırlanmıştır. Jelatin tür tayini ile ilgili LC-MS/MS yöntemiyle yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde numune hazırlama esnasında enzim ve numunenin birleştirilmesinden sonra etüvde 37°C’de, çeşitli farklı sürelerde bekletilerek çalışıldığı görülmüştür. Bu çalışmaların birinde optimum sürenin 15-16 saat olduğu tespit edilmiştir (Çavuş, 2018). Yapılan bu çalışmada sığır ve domuz peptitlerinin etüvde farklı bekleme sıcaklıklarında farklı pik alanları olduğunu gözlemlemiş ve optimum sürenin 16 saat olduğunu belirlemiştir (Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.).

Tablo 4.3. Farklı bekleme sürelerinde sığır jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları (Çavuş, 2018).

Marker iyonları (m/z)	Etüvde bekleme süresi (saat)							
	4	7	10	12	16	18	20	21
641,314	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	6x10 ⁶	4x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁶
785,4259	5x10 ⁶	6x10 ⁶	7x10 ⁶	8x10 ⁶	11x10 ⁶	9x10 ⁶	9x10 ⁶	5x10 ⁶
945,4365	9x10 ⁵	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	5x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	0,5x10 ⁶
767,4029	1x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁶	5x10 ⁶	1x10 ⁷	7x10 ⁶	6x10 ⁶	1x10 ⁶
780,9105	2x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵	4x10 ⁵	1x10 ⁶	6x10 ⁵	6x10 ⁵	2x10 ⁵
988,4987	5x10 ⁶	6x10 ⁶	7x10 ⁶	8x10 ⁶	1,4x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷	6x10 ⁶
597,3339	1x10 ⁶	4x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶	9x10 ⁷	8x10 ⁶	4x10 ⁶	2x10 ⁶

Tablo 4.4. Farklı bekleme sürelerinde domuz jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları (Çavuş, 2018).

Marker iyonları (m/z)	Etüvde bekleme süresi(saatt)							
	4	7	10	12	16	18	20	21
656,3184	3x10 ⁵	1x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁶
811,442	6x10 ⁶	6x10 ⁶	8x10 ⁶	8x10 ⁶	1,2x10 ⁷	1x10 ⁷	9x10 ⁶	7x10 ⁶
971,4536	9x10 ⁵	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	5x10 ⁵
842,4099	1x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁶	5x10 ⁶	1x10 ⁷	7x10 ⁶	6x10 ⁶	1x10 ⁶
733,8751	2x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵	3x10 ⁵	8x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	2x10 ⁵
773,9138	5x10 ⁶	6x10 ⁶	7x10 ⁶	8x10 ⁶	1,5x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷	6x10 ⁶

15 saat sürenin biraz uzun olması sebebiyle bu çalışmada farklı yöntemler denenmiştir. Yöntemde ultrasonik su banyosundan faydalanılarak etüvde uzun saatler bekletilmeden enzimasyonun hızlandırılması ile ilgili denemeler yapılmıştır. Numune ve enzim metotta anlatıldığı gibi tartım yapılarak amonyum bikarbonat çözeltisi eklenmiştir. Çözünmenin iyi bir şekilde sağlanması için 37°C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Çözünen numune ve enzim çözeltilerinden 300 µl alınarak başka bir santrifüj tüpünde birleştirilmiştir. Daha sonra hızlı vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 37°C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 15 dakika daha bekletilmiştir. Sonraki kısımlar tekrar metottaki gibi yapılarak numuneler bu haliyle cihazda okutulmuştur. Sonuçların etüvde bekletilerek uygulanan yöntemle aynı sonuç verdiği gözlenmiştir. Yapılan denemelerde var/yok olarak %100 aynı sonuçlar elde edilirken miktarsal olarak farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar tespit edildi/tespit edilemedi olarak verildiğinde uygulamanın başarılı olduğu görülmektedir.

Numune enzim ile birleştirildikten sonra ultrasonik su banyosunda önce sıcaklık ayarı yapılmadan çalışılmıştır. Ancak bu durumda başarılı sonuç elde edilememiştir. Sıcaklık ayarı yapılmadan, 15 dak., 20 dak., 30 dak., 45 dak. ve 1 saat bekletilerek yapılan çalışmalarda başarılı sonuç elde edilememiştir. Ultrasonik su banyosunun sıcaklığı 37°C'ye ayarlandıktan sonra 15 dak., 20 dak., 30 dak., 45 dak. ve 1 saat bekletilerek yapılan sonuçlarda ise etüvde 16 saat bekletilerek çalışılan numuneler ile benzer sonuçlara ulaşıldığı görülmüştür. Bu durumda numune ve enzim birleştirildikten sonra 15 dak. 37°C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda bekletilerek de başarılı sonuçlar elde edilebileceği görülmüştür. Böylece enerjiden ve zamandan tasarruf sağlanabilir.

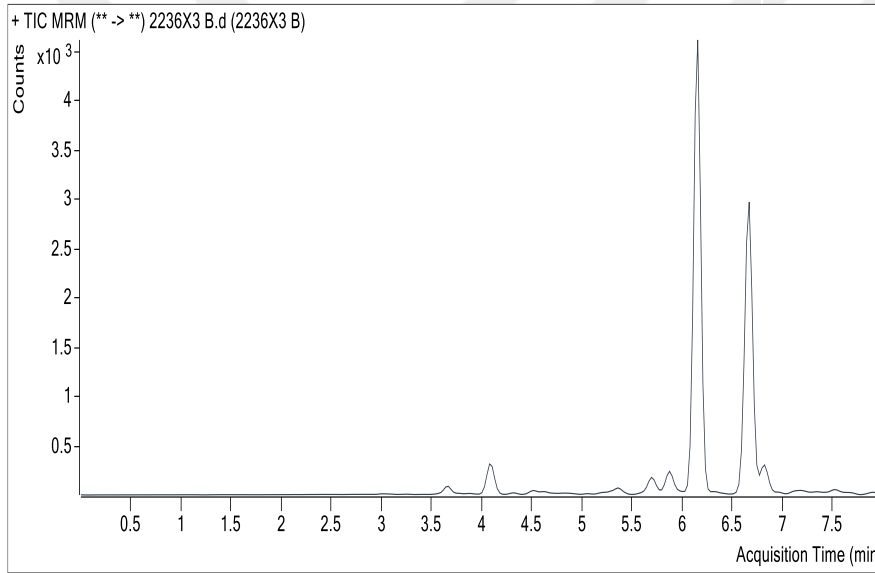
5 adet örnek ile çalışmalar yapılmıştır. Bu numuneler önce metottaki gibi hazırlanarak çalışılmıştır. Tüm datalar elde edilmiştir. Daha sonra aynı numuneler etüvde bekletme süresine kadar aynı işlemler uygulanmış ve ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilerek analize alınmıştır. 5 numunede de jelatin türünün ne olduğu ile ilgili aynı sonuçlara ulaşılmıştır (Tablo 4.5.). Ancak Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 belirteç peptilerine ait pik alanları birbirinden farklı çıkmıştır.

Şekil 4.33., Şekil 4.34., Şekil 4.35., Şekil 4.36.'da bu pik grafiklerine ait görseller verilmiştir.

Tablo 4.5. Enzimatik reaksiyon için etüvde bekletilerek hazırlanan ve ultrasonik su banyosunda bekletilerek hazırlanan örneklerin sonuçlarının kıyaslanması.

	Etüvde 16 saat bekletilen		Ultrasonik su banyosunda 15 dk	
	Domuz Jelatini	Sığır Jelatini	Domuz Jelatini	Sığır Jelatini
Örnek-1	Tespit edildi	Tespit edilemedi	Tespit edildi	Tespit edilemedi
Örnek-2	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
Örnek-3	Tespit edilemedi	Tespit edildi	Tespit edilemedi	Tespit edildi
Örnek-4	Tespit edilemedi	Tespit edildi	Tespit edilemedi	Tespit edildi
Örnek-5	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi

Sample Chromatogram

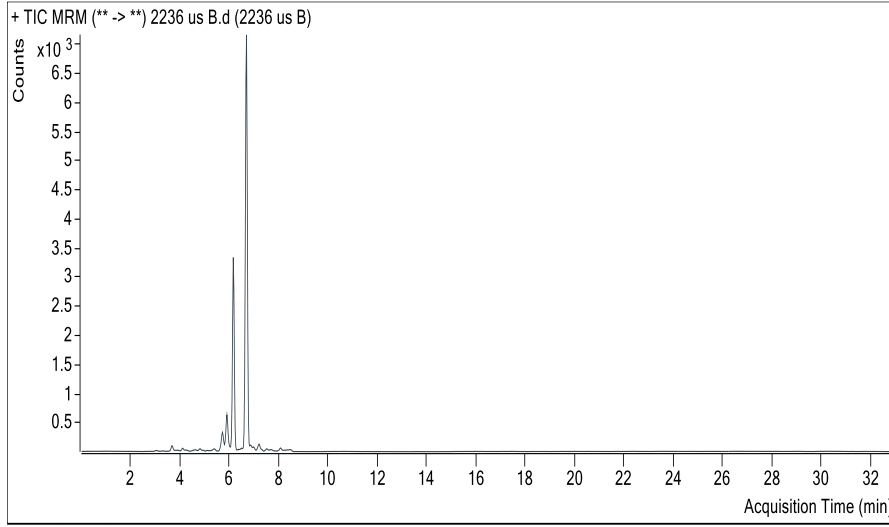


Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,096	945			0,4214	
DOMUZ 2		5,702	275			0,0587	
SIGIR 2		5,901	388			0,5615	
SIGIR 1		6,159	12797			2,1752	

Şekil 4.32. Etüvde bekletilerek çalışılan numuneye (Örnek-2) ait kromatogram görüntüsü.

Sample Chromatogram

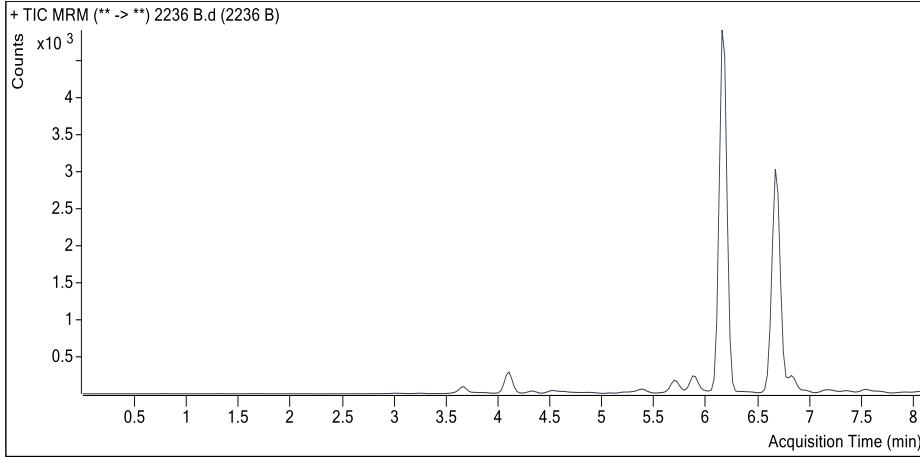


Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	170			0,0788	
DOMUZ 2		5,728	396			0,0869	
SIGIR 2		5,926	1013			1,5600	
SIGIR 1		6,159	9275			1,5758	

Şekil 4.33. Ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilerek hazırlanan numuneye (Örnek-2) ait kromatogram görüntüsü.

Sample Chromatogram

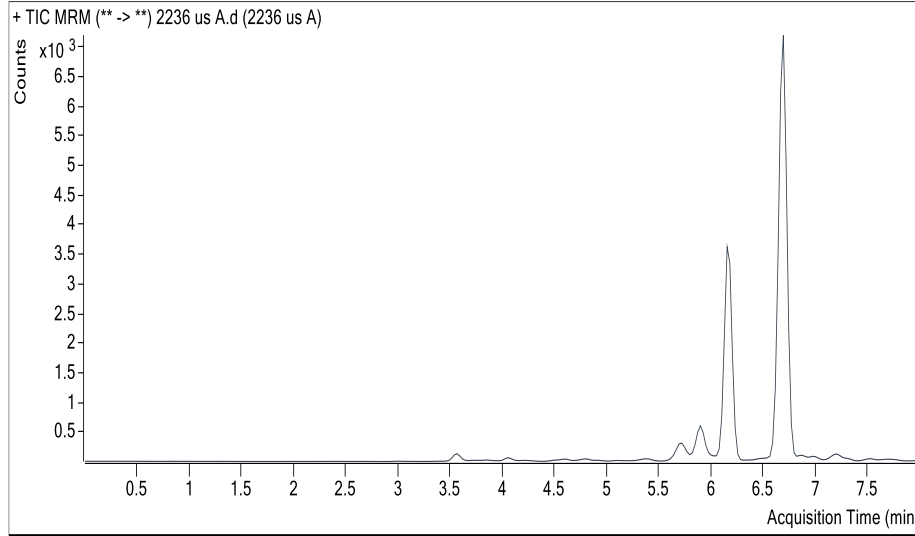


Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	809			0,3614	
DOMUZ 2		5,702	287			0,0615	
SIGIR 2		5,901	386			0,5579	
SIGIR 1		6,159	13955			2,3723	

Şekil 4.34. Etüvde bekletilerek çalışılan numuneye (Örnek-5) ait kromatogram görüntüsü.

Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,071	195			0,0901	
DOMUZ 2		5,728	378			0,0826	
SIGIR 2		5,926	960			1,4764	
SIGIR 1		6,159	10239			1,7398	

Şekil 4.35. Ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilerek hazırlanan numuneye (Örnek-5) ait kromatogram görüntüsü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Gıda endüstrisinde oldukça yaygın kullanım alanlarının olması sebebiyle jelatine olan talebin her zaman olacağı anlaşılmış olup bu ilginin neticesinde gıda analizlerinde yeniliğe açık bir ürün grubu olduğu görülmüştür. Jelatin kökenine ilişkin hassasiyetin tüketiciler için çok önemli bir yerinin olması bu konudaki çalışmaların önemini açık şekilde ortaya koymuştur. Tüketicilerin hassasiyeti düşünüldüğünde mutlaka kaynağı bilinen ve sertifikalı jelatinlerin gıda endüstrisinde kullanılması gerektiğinin önemi anlaşılmıştır.

2. Jelatinin gıda endüstrisinde birçok alanda kullanılmasının yanında takviye edici gıda grubunda yenilebilir gıda ambalajı olarak kullanımı yaygındır. Bu ürün grubunun ülkemizde tüketimi oldukça artarken üretiminin henüz yaygınlaşmaya başladığı ve çoğunlukla ithal edildiği görülmüştür. Ülkemizde domuz ve domuz ürünlerinin tüketimi konusundaki hassasiyet sebebiyle ithal edilen bu takviye edici gıdaların kapsül formlarında kullanılan jelatin türünün tayini önemli bir konu haline geldiği anlaşılmıştır.

3. Jelatin türlerinin çeşitli yönlerden birbirlerine yakın olması sebebiyle tespitinde sürekli farklı metotlar geliştirilmekte olup bu metotların daha güvenilir sonuçlar veren analiz yöntemlerinin LC-MS/MS sistemleri ile yapılanlar olması dolayısıyla dünyada bu konudaki çalışmalara olan ilginin yoğunlaştığı bilinmektedir. Ülkemizde de çeşitli yöntemlerle jelatin tür tayini yapılmaktadır ancak LC-MS/MS sistemleri ile ilgili çalışmalar henüz yeterince gelişme kaydedemediği görülmüştür.

4. LC-MS/MS sistemlerinden uçuş zamanlı kütle kromatografisi (QTOF) ile yapılan jelatin tür tayini analizlerinin etkili sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarda görülmüştür. Ancak bu çalışmada kullanılan LC-TQ sistemi ile çok daha hassas düzeylerde tespitler yapılmıştır. Kantitatif olarak da sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu sonuçlar arasında tam bir stabilite sağlanamamıştır. Yaptığımız çalışmada jelatin türü ile ilgili var/yok analizleri olarak kesin sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar bize eser miktarda dahi katılabilecek jelatinin tür tayininde etkili sonuçlar alınabileceğini göstermiştir.

5. Ayrıca bu çalışmada domuz ve sığır jelatin standartlarından standart karışımı hazırlanarak %0.5, %0.1, %0.05, %0.025, %0.012, %0.005 düzeylerinde standartlara seyreltilip kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde en düşük düzeylerin %0.06 civarlarında olduğu ancak bizim çalışmamızda tespit limiti %0.012 olarak daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bu tespit düzeyi oldukça düşük bir düzey olması sebebiyle önem arz etmektedir.

6. Literatürlerde tripsin enzimi ile muamele sonrasında etüvde farklı sürelerde 37°C’de bekletilerek yapılan çalışmalarda optimum sürenin 15-16 saat olduğu görülmüştür. Bu çalışmada 16 saat sürenin uzun olması sebebiyle farklı denemeler yapılarak bu sürenin kısaltılması için çalışmalar yapılmıştır. Numuneye enzim ile muamele sonrasında belli bir süre vorteks karıştırıcıda hızlı bir karışım yapıldıktan sonra 37°C’ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 15 dk bekletilerek numune hazır hale getirilmiştir. Bu işlem ile tespit edilen pik aralıklarının da benzer sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

7. Yapılan analizler sonucunda Türkiye’de üretilen 8 numuneden 6 tanesinde sığır jelatini tespit edilirken 1 tanesinde domuz jelatini tespit edildi ve 1 tanesinde ise her iki jelatin türüne de rastlanmadı. Yurt dışından temin edilen 17 numunenin 5 tanesinde domuz ve sığır jelatini, 3 tanesinde sadece domuz jelatini, 1 tanesinde sadece sığır jelatini tespit edildi. 8 tanesinde ise hem domuz hemde sığır jelatini tespit edilemedi. Bu analiz sonuçlarına göre takviye edici gıdaların jelatin tür tayininde analiz sıklığının, denetim ve kontrollerin artırılması gerektiği anlaşılmıştır.

Elde edilen tüm bu sonuçlar sonunda şunlar önerilebilir;

1. Jelatinin gıda endüstrisinde oldukça fazla kullanılmaktadır. Ülkemizde domuz ürünlerinin tüketimi ile ilgili hassasiyet düşünüldüğünde yeterince kontrol ve analizlerin yapılmadığı görülmektedir. Gelişen teknolojilerle birlikte kolaylıkla jelatin tür tayinin yapılabildiği anlaşılmıştır. Dolayısıyla bu konudaki kontrol ve analiz sıklığının artırılması önerilebilir.
2. LC-MS/MS yöntemleri ile jelatin tür tayini yapılmakta ve çok düşük düzeylerde dahi jelatinin varlığı tespit edilebilmektedir. Var/yok testlerinin yanında yapılacak hassas çalışmalarla kantitatif sonuçlara da ulaşılabilir.
3. Numunenin enzimasyon işleminde etüvde bekletme süreleri ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda optimum süre 16 saat olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada

ultrasonik su banyosundan faydalanılarak çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Daha kısa sürelerde analizler sonuçlandırmak amacıyla ultrasonik su banyosu ile ilgili çalışmaların artırılması önerilebilir.

4. Bu alışma görülmüştür ki, LC-MS/MS -TQ yöntemiyle çalışılacak jelatin tür tayininde oluşturulan bu metot kullanılmaya uygundur. Domuz ve sığır jelatini ayırt etmek amacıyla oluşturulan metotta diğer jelatin türlerinin de tespit edilebilmesi için çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.





KAYNAKLAR

- Anonim (2014), Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods)
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_TR.pdf
- Anonim (2016), Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu
https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf
- Anonim, (2018 Nisan 5) TOB Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi.
https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf
- Anonim, (2021) Gıda ve Yemde Pestisit Kalıntıları Analizi için Analitik Kalite Kontrol ve Metot Validasyonu Prosedürleri (Sante/11312/2021 V2)
https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Pestisit_El_Kitabi.pdf
- Anonim, (2022) <https://medium.com/@hqlmania/encapsulation-nedir-encapsulation-neden-kullan%C4%B1%C4%B1r-3030fea8c40c>
- Anonim, (2025a, Mart 14). Kolajenin sarmal yapısı, view-source:<https://www.collagendailyplus.com/iletisim/>
- Anonim, (2025, Nisan 19). FT-IR spektroskopisi ve pik grafiği, <https://www.ism.cnr.it/en/tempism/analysis/spettroscopia/laboratory-spectroscopies/fourier-transform-infrared-spectroscopy-ftir.html>
- Anonim, (2025c, Nisan 19). Raman spektroskopi cihazının şematik görünümü; Rayleigh saçılma (mavi) ve Raman saçılma (kırmızı), <https://bilsenbesergil.blogspot.com/p/raman-saclma-spektroskopisi-raman.html>
- Anonim, (2025d, Nisan 19). Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu şematik gösterimi, <https://quizlet.com/pl/921124251/baza-pato-kolos-1-zaaklaadowaa-flash-cards/>
- Anonim, (2025e, Nisan 19). Sıvı kromatografisi kısımları, <https://jru.edu.in/studentcorner/lab-manual/bpharm/7th-sem/INSTRUMENTAL%20METHODS%20OF%20ANALYSIS.pdf>
- Anonim, (2025f, Nisan 20). Kütle spektrometresi şematik gösterimi. <https://medium.com/technical-library/k%C3%BCtle-spektrometresi-ms-nedir-1347ffc22ff>
- Anonim, (2025g, Nisan 20) Dört kutuplu kütle spektrometresi. <https://www.horiba.com/int/products/by-technique/mass-spectrometry/quadrupole-mass-spectrometry/>

- Anonim, (2024a, Mayıs 1). Jel elektrofezi şematik gösterimi
<https://tr.wikipedia.org/wiki/Elektroforez>
- Anonim, (2024b, Mart 20) Uçuş zamanlı kütle spektrometresi şematik gösterimi.
<https://www.newport.com/n/maldi>
- Anonim, (2024c, Mayıs 25) Üçlü kuadropol sistemi şematik gösterimi.
https://en.wikipedia.org/wiki/Triple_quadrupole_mass_spectrometer
- Anonim, (2018 Nisan 5) TOB Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi.
https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf
- Anonim, (2017, Kasım 23). Tip II kolajenin kimyasal formülü,
<https://supplementansiklopedisi.com/type-ii-collagen-tip-2-kollajen-nedir/>
- Anonim, (2013, Ağustos 16). Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği
<https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=18729&MevzuatTur=9&MevzuatTertip=5>
- Acuna-soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate L, Schoolnik G, Wirth D., (1993). Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* Am J Trop Med Hyg 48:58-78
- Açu, M., Kınık, Ö., & Yerlikaya, O., (2014). Mikroenkapsülasyon ve Süt Teknolojisindeki Yeri, Akademik Gıda, 12(1), 97- 107.
- Aday, S., Aday, M. S., (2020). Impact of COVID19 on the food supply chain. Food Qual Saf, 4(4): 167-180. doi: 10.1093/fqsafe/fyaa024.
- Aguilar, M.I., (2004). HPLC of Peptides and Proteins Methods and Protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc
- Akagündüz Y, Mosquera M, Giménez B, Alemán A, Montero P, Gómez-Guillén MC., (2014). Sea bream bones and scales as a source of gelatin and ACE inhibitory peptides. LWT - Food Sci Technol, 55, 579-585.
- Altun, H. K., Ermumcu, M. S. K., Kurklu, N. S., (2021). Evaluation of dietary supplement, functional food and herbal medicine use by dietitians during the COVID-19 pandemic. Public Health Nutr, 24(5): 861-869. doi:10.1017/S1368980020005297.
- Alvarez-Ordóñez, A., ve Prieto, M., (2012). "Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology". New York: Springer.
- Atalay, D., Erge, H.S., (2018). Gıda takviyeleri ve sağlık üzerine etkileri. Food and Health, 4(2): 98- 111, doi: 10.3153/FH18010
- Azilawati, M. I., Hashim, D. M., Jamilah, B., ve Amin, I., (2015). "RP-HPLC Method Using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate Incorporated with Normalization Technique in Principal Component Analysis to Differentiate the Bovine, Porcine and Fish Gelatins", Food Chemistry, 172:368–376.
- Baltacıoğlu, M. S., (2019). Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Aile Hekimliği Polikliniğine Başvuran 18 Yaş ve Üzeri Hastalarda Gıda Takviyesi Kullanımı ve Hastaların Bu Konudaki Bilinç Düzeyi. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Antalya, Türkiye, 137 s.

- Baziwane, D. and He Q., (2003). "Gelatin: The Paramount Food Additive", *Food Rev Int.*, 19 (4): 423-435
- Beynen AC, van Geene HW, Grim HV, Jacobs P, van der Vlerk T., (2010). Oral administration of gelatin hydrolysate reduces clinical signs of canine osteoarthritis in a double blind, placebo-controlled trial. *Am J Anim Vet Sci*, 5(2), 95-99.
- Biberoğlu G., (2003). Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. *T Klin Tıp Bilimleri* 23:491-498
- Boran, G., (2011). "Bir Gıda Katkısı Olarak Jelatin:Yapısı, Özellikleri, Üretimi, Kullanımı ve Kalitesi", *Gıda*, 36:97–104.
- Boran, G., Lawless, H. T., ve Regenstein, J. M., (2010). "Effects of Extraction Conditions on the Sensory and Instrumental Characteristics of Fish Gelatin Gels", *Journal of Food Science*, 75(9):469-476
- Burtis CA, Ashwood RA., (2007). Çeviri Editörü: Prof.Dr.Diler Aslan. *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler*, 5.Baskıdan Çeviri (Palme).
- Cai, H., Gu, X., Scanlan, M. S., Ramatlapeng, D. H., ve Lively, C. R., (2012). "Realtime PCR Assays for Detection and Quantitation of Porcine and Bovine DNA in Gelatin Mixtures and Gelatin Capsules", *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1):83– 87.
- Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E., (2006). Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*. Feb;4(4):295-320. doi: 10.1093/bfpg/eli002. Epub 2006 Feb 3. PMID: 17202122.
- Cebi, N., Durak, M.Z., Toker, O.S., Sagdic, O., Arici, M., (2016). An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chemistry*, 190, 1109-1115
- Cheng FY, Wan TC, Liu YT, Chen CM, Lin LC, Sakata R., (2009). Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. *Anim Sci J*, 80, 91-97.
- Cheng, X. L., Wei, F., Xiao, X. Y., Zhao, Y. Y., Shi, Y., Liu, W., ve Lin, R. C., (2012). "Identification of Five Gelatins by Ultra Performance Liquid Chromatography/time-offlight Mass Spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) using principal component analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 62:191–195.
- Çavuş, F., (2018). Yumuşak Şekerlemelerde Kullanılan Yenilebilir Jelatin Orijininin Lc Q-Tof İle Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye.
- Dass, C., (2007). "Tandem Kütle Spektrometrisi".Tandem Kütle Spektrometrisi, Çağdaş Kütle Spektrometrisinin Temelleri'nde. Hoboken, NJ, ABD: John Wiley & Sons, Inc. s. 132–133.
- DeMan JM., (1999). Proteins: Animal Proteins. In: *The Principles of Food Chemistry*, Aspen Publishers, USA, pp. 147-149.

- Demir, G., Kılıçkalkan, B., Takak, M. K., (2021). COVID-19 Pandemisi Sürecinde Yetişkinlerin Besin Destekleri Kullanımlarının İncelenmesi. Genel Tıp Dergisi, 31(4): 430-439, doi: 10.54005/geneltip.988805
- Demirhan, Y., Ulca, P., ve Senyuva, H. Z., (2012). "Detection of Porcine DNA in Gelatine and Gelatine-Containing Processed Food Products—Halal/Kosher Authentication", Meat Science, 90(3):686–689.
- Deshmukh K., Basheer Ahamed M., Deshmukh R.R., S.K. Khadheer Pasha, P.R. Bhagat, K. Chidambaram, (2017). Biopolymer Composites With High Dielectric Performance: Interface Engineering, Pages 27-128, ISBN 9780128092613, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6>.
- Djaoudene, O.; Romano, A.; Bradai, Y.D.; Zebiri, F.; Ouchene, A.; Yousfi, Y.; Amrane-Abider, M.; Sahraoui-Remini, Y.; Madani, K., (2023). A Global Overview of Dietary Supplements: Regulation, Market Trends, Usage during the COVID-19 Pandemic, and Health Effects. Nutrients, 15, 3320. <https://doi.org/10.3390/nu15153320>
- Doğan, S., Okumuş, E., Bakkalbaşı, E., Cavidoğlu, İ., (2020a). Tüketicilerin takviye edici gıdaları kullanım amacı, satın alma tercihleri, ürünlere olan güveni ve yasal düzenlemeler hakkındaki düşünceleri: Van ili örneği. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 30(4): 821- 831, doi: 10.29133/yyutbd.733454
- Doi, H. I. D., Atanabe, E. R. W., Hibata, H. A. S., ve Anabe, S. O. T., (2009). "A Reliable Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Bovine and Porcine Gelatin in Processed Foods", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57:1721–1726.
- Duconseille A, Astruc T, Quintana N, Meersman F, Sante-Lhoutellier V., (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. Food Hydrocoll, 43, 360-376.
- Edman P., (1949). A method for the determination of amino acid sequence in peptides. Arch Biochem. Jul;22(3):475. PMID: 18134557.
- Eysturskarð, J., (2010a). Mechanical Properties of Gelatin Gels; Effect of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution. Doctoral thesis for the degree of Philosophiae Department of Biotechnology. Faculty of Natural Science and Technology at Norwegian University, 43 p.
- Fields S., (2001). Proteomics. Proteomics in genomeland. Science. Feb 16;291(5507):1221-4. doi: 10.1126/science.291.5507.1221. PMID: 11233445.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., ve Mulligan, C. N., (1999). "Encapsulation in the Food Industry: A Review", International Journal of Food Sciences and Nutrition, 50(3):213–224.
- GMIA, (2012). Gelatin Handbook, Gelatin Manufact. Inst. Am, New York.
- Gómez-Guillén MC, Giménez B, LópezCaballero ME, Montero MP., (2011), Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocoll, 25, 1813-1827.
- Gökçin M., (2013), Uskumru (*Scomber scombrus*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) kemiklerinden jelatin eldesi ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi

- Grundy H.H., Reece P., Buckley M., Solazza C.M., Dowle A.A., Ashford., Charlton, A.J., Wadsley M.K. and Collins M.J., (2016). "A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products", *Food Chemistry*, 190:276-284.
- Guifeng Z., Tao L., Qian W., Li C., Jiandu L., Guanghui M., Zhiguo S., (2009). Mass Spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A New Method to differentiate between bovine and porcine gelatin, *Food Hydrocolloids*, 23, 2001-2007.
- Hamulka J, Jeruszka-Bielak M, Górnicka M, Drywień ME, Zielinska-Pukos MA., (2020). Dietary Supplements during COVID-19 Outbreak. Results of Google Trends Analysis Supported by PLifeCOVID-19 Online Studies. *Nutrients*. Dec 27;13(1):54. doi: 10.3390/nu13010054. PMID: 33375422; PMCID: PMC7823317.
- Hashim, D. M., Man, Y. B. C., Norakasha, R., Shuhaimi, M., Salmah, Y., ve Syahariza, Z. A., (2010). "Potential use of Fourier transform Infrared Spectroscopy for Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins", *Food Chemistry*, 118(3):856–860.
- Hatsue M., Shigehiro N., (2007). "Agar And Gelatin Gel Flavor Release" *Journal of Texture Studies A Journal for Food Oral Processing Research* 0022-4901 , 1745-4603
- Hermanto, S., Sumarlin, L. O., ve Fatimah, W., (2013). "Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis", *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 1:68–73.
- Haug, I.J. and Draget, K.I., (2009). "Handbook of hydrocolloids", (Second edition) Edited by G O Phillips and P A Williams, Glyndwr University, UK. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, (173), 948.
- İşlekel H., (2011). LC-Tandem MS-MRM Temel Araştırma ve Klinik Laboratuvarında Kullanım. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (<http://www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/dosyalar/belgeler/kongre/huray-islekel.pdf>)
- Jannat B., Ghorbani K., Shafieyan H., Kouchaki S., Behfar A., Sadeghi A., Beyramysoltan S., Rabbani F., Dashtifard S., Sadeghi M., (2018). Gelatin speciation using real-time PCR and analysis of mass spectrometry-based proteomics datasets, *Food Control*, Volume 87, 2018, Pages 79-87, ISSN 0956-7135
- Jinju Z. ve ark., (2022). Species-Specific Identification Of Donkey-Hide Gelatin and Its Adulterants Using Marker Peptides
- Johnson, JV; Yost, RA; Kelley, PE; Bradford, DC., (1990). "Uzayda tandem ve zamanda tandem kütle spektrometrisi: Üçlü dört kutuplular ve dört kutuplu iyon tuzakları". *Analitik Kimya*. 62(20):2162–2172.
- Karaçıl Ermumcu, M.Ş.; Mengi Çelik, (2022). COVID-19 Tanısı Alan Bireylerin Hastalık Öncesi, Sırasında ve Sonrasında Beslenme Alışkanlıkları ile Besin Takviyeleri, Fonksiyonel Gıdalar ve Bitkisel Ürünlerin Kullanımının Değerlendirilmesi. *Klinik Bilimleri ve Nutr.* , 4 , 54–60.

- Karayannakidis, P.D., Zotos, A., (2014). Fish processing byproducts as a potential source of gelatin: A review. *Journal of Aquatic Food Product Technology* DOI: 10.1080/10498850.2013.827767
- Karim, A.A. and R. Bhat., (2008). "Gelatin alternatives for the food industry: Recent developments, challenges and prospects", *Trends Food Sci.. Technol*, 19: 644656
- Kazaz, A., Gençyürek Erdoğan, M., (2020). Takviye edici gıda reklamlarında aldatıcı unsurlar. *Gümüşhane Üniversitesi İletişim Fakültesi Elektronik Dergisi*, 8(2): 930-960, doi: 10.19145/egifder.722025
- Kobayashi, T., (1996). "Properties and Functions of Gelatin", *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, 170:82–88.
- Ledward, D.A., (2000). *Handbook of hydrocolloids*, Chapter-4, Edited by G. O. Philips and P. A. Williams. UK. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 450p.
- Li, J.H., Miao, J., Wu, J.L., Chen, S.F., Zhang, Q., (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37, 166-173.
- Mutalib, S. A., Muin, N. M., Abdullah, A., Hassan, O., Wan Mustapha, W. A., Abdullah Sani, N., ve Maskat, M. Y., (2015). "Sensitivity of Polymerase Chain Reaction (PCR)-Southern Hybridization and Conventional PCR Analysis for Halal Authentication of Gelatin Capsules", *LWT - Food Science and Technology*, 63(1):714– 719.
- Nair, Achuthsankar., (2007). *Computational Biology & Bioinformatics: A Gentle Overview*. Communications of the Computer Society of India.
- Nemati, M., Oveisi, M. R., Abdollahi, H., ve Sabzevari, O., (2004). "Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins Using Principal Component Analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(3):485–492.
- Nhari, R. M. H. R., Ismail, A., ve Che Man, Y. B., (2012). "Analytical Methods for Gelatin Differentiation from Bovine and Porcine Origins and Food Products", *Journal of Food Science*, 77(1):42-46
- Nikoo M, Benjakul S, Ehsani A, Li J, Wu F, Yang N, Xu B, Jin Z, Xu X., (2014). Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *J Funct Foods*, 7, 609-620.
- Nur Hanani ZA, Roos YH, Kerry JP., (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *Int J Biol Macromol*, 71, 94-102.
- O'Farrell PH., (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. May 25;250(10):4007-21. PMID: 236308; PMCID: PMC2874754.
- Okuyama K, Miyama K, Mizuno K, Bachinger HP., (2012). Crystal structure of (Gly-Pro-Hyp)9: implications for the collagen molecular model. *Biopolymers*, 97, 607-616.
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.T., (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis* (2nd ed.). Singapore: Longman Scientific and Technical.

- Özbekler, T.M., (2019). Değişen beslenme alışkanlıkları perspektifinde takviye edici gıdalar: Tüketiciler ne kadar bilinçli?. *International Social Sciences Studies Journal*, 5(51): 6866-6882, doi: 10.26449/sssj.1937
- Petkova-Gueorguieva ES, Getov IN, Ivanov KV, Ivanova SD, Gueorguiev SR, Getova VI, Mihaylova AA, Madzharov VG, Staynova RA., (2019). Regulatory Requirements for Food Supplements in the European Union and Bulgaria. *Folia Med (Plovdiv)*. Mar 1;61(1):41-48. doi: 10.2478/folmed-2018-0032. PMID: 31237857.
- Rodes, A., Perez, J. M., ve Aldaz, A., (2004). "Vibrational Spectroscopy", *Handbook of Fuel Cells: Fundamentals, Technology and Applications*, 2:191–219.
- Saito M, Kiyose C, Higuchi T, Uchida N, Suzuki H., (2009). Effect of colalgen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J Agr Food Chem*, 57(21), 10477-10482.
- Sarbon, N.M., Badii, F., Howell, N.K., (2013). Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids* 30: 143-151.
- Schrieber, R., Gareis, H., (2007). *Gelatin Handbook*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 331 p.
- Steen H, Mann M., (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Sep;5(9):699-711. doi: 10.1038/nrm1468. PMID: 15340378.
- Sun L, Zhang Y, Zhuang Y., (2013). Antiphotaging effect and purification of an antioxidant peptide from tilapia (*Oreochromis niloticus*) gelatin peptides. *J Funct Foods*, 5, 154-162.
- Sun, D.W., (2009). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control* (1st ed., pp. 146-173). Elsevier Inc.
- Tan Chor Teck and Stephen Lock, (2014). Are Pork Extracts Present in My Gummy Bears? Gelatin Speciation by LC-MS/MS , *Food end environmental*
- Tan, T., (2021). Fonksiyonel Gıdalar ve Gıda Destek Ürünleri ile İlgili Yasal Düzenlemelerin Analizi. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Mersin, Türkiye, 64 s.
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., ve Akiyama, H., (2007). "A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(12):3131– 95 3135.
- Tekle Ş, Sağdıç O, Nursaçan Ş, Yetim H, Erdem M., (2013). Ülkemizde ve Dünyada Helal Gıda Hususunda Karşılaşılan Problemler. *Eur J Sci Technol*, 1, 1, 1-6.
- Tukiran, N. A., Ismail, A., Mustafa, S., ve Hamid, M., (2016). "Development of Antipeptide Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Determination of Gelatin in Confectionery Products", *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1):54–60.
- Vékey K, Telekes A, and Vertes A., (2008). *Mass spectrometry instrumentation and techniques. Medical Applications of Mass Spectrometry*: 93

- Wang L, Liang Q, Chen Q, Xu J, Shi Z, Wang Z, Liu Y, Ma H., (2014). Hydrolysis kinetics and radical scavenging activity of gelatin under simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 163, 1-5.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, and Humphrey-Smith I., (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 16(1): 1090-1094.
- Xian-Long, C., Feng, W., Jia, C., Ming-hua, L., Lei, Z., Ying-Yong, Z., Xin-Yue, X., Shuang-cheng, M. and Rui-Chao, L., (2012). "Identification of five gelatins by ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/QTOF-MS) using principal component analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 62:191-195.
- Xiao-Mei Sha, Zi-Zi Hu, Yun-Hua Ye, Huang Xu, Zong-Cai Tu., (2019). Effect of extraction temperature on the gelling properties and identification of porcine gelatin, *Food Hydrocolloids*, Pages 163-172, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.059>.
- Xiao-Mei Sha, Guang-Yao Wang, Xin Li, Lu-Zheng Zhang, Zong-Cai Tu., (2020). Identification and quantification of gelatin by a high-resolution mass spectrometry-based label-free method, *Food Hydrocolloids*, Volume 101, 105476, ISSN 0268-005X
- Xiao-Mei Sha, Li-Jun Zhang, Wen-Mei Chen, Guang-Yao Wang, Jin-Lin Li, Zi-Zi Hu, Zong-Cai Tu, (2022). Islı etkiden etkilenen domuz derisi jelatininin karakteristik triptik peptitleri ve jel oluşturma özellikleri, *Uluslararası Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi*, Cilt 57, Sayı 3, Mart 2022, Sayfalar 1573–1586.
- Yang, D., ve Ying, Y., (2011). "Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis: A Review", *Applied Spectroscopy Reviews*, 46(7):539– 560.
- Yetim, H., (2011). "Jelatin Üretimi, Özellikleri ve Kullanımı", 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 19-20 Kasım 2011, Ankara.
- Yıldız A, Genç Ö, Bektaş S., (1997). Enstrümental Analiz Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara.
- Yilmaz, M. T., Kesmen, Z., Baykal, B., Sagdic, O., Kacar, O., Yetim, H., ve Baykal, A. T., (2013). "A Novel Method to Differentiate Bovine and Porcine Gelatins in Food Products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MSE Based Data Independent Acquisition Technique to Detect Marker Peptides in Gelatin", *Food Chemistry*, 141(3):2450–2458.
- Zhang Gui-Feng, Liu Tao, Wang Qian, Lei Jian-du, MA Guang-Hui, SU Zhi-Guo (2008). Identification of Marker Peptides in Digested Gelatins by High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Chinese journal of Analytical Chemistry*, 36(11), 1499-1504.
- Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., ve Su, Z., (2009). "Mass Spectrometric Detection of Marker Peptides in Tryptic Digests of Gelatin: A new Method to Differentiate Between Bovine and Porcine Gelatin", *Food Hydrocolloids*, 23(7):2001–2007.

EKLER

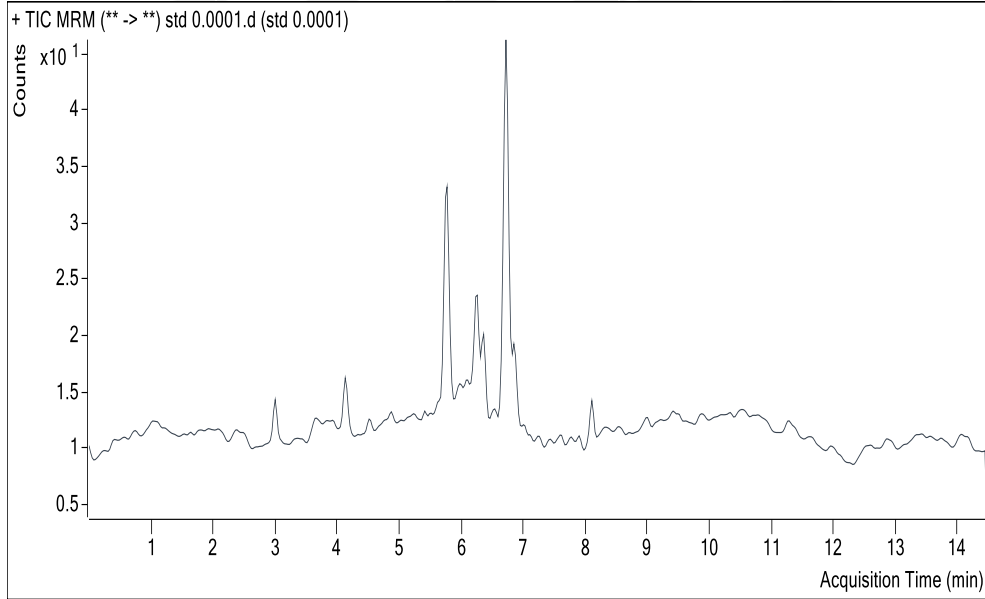
EK A. Şekiller

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 2.7.2025 4:40 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 2.7.2025 4:51 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 2.7.2025 4:40 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 13:06 **Data File** std 0.0001.d
Position P1-A1 **Sample Name** std 0.0001
Dilution 1 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Calibration **Comment**

Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	15			0,0001	100,00
DOMUZ 2		5,755	44			0,0001	100,00
SIGIR 2		5,978	3			0,0001	100,00
SIGIR 1		6,262	32			0,0001	100,00

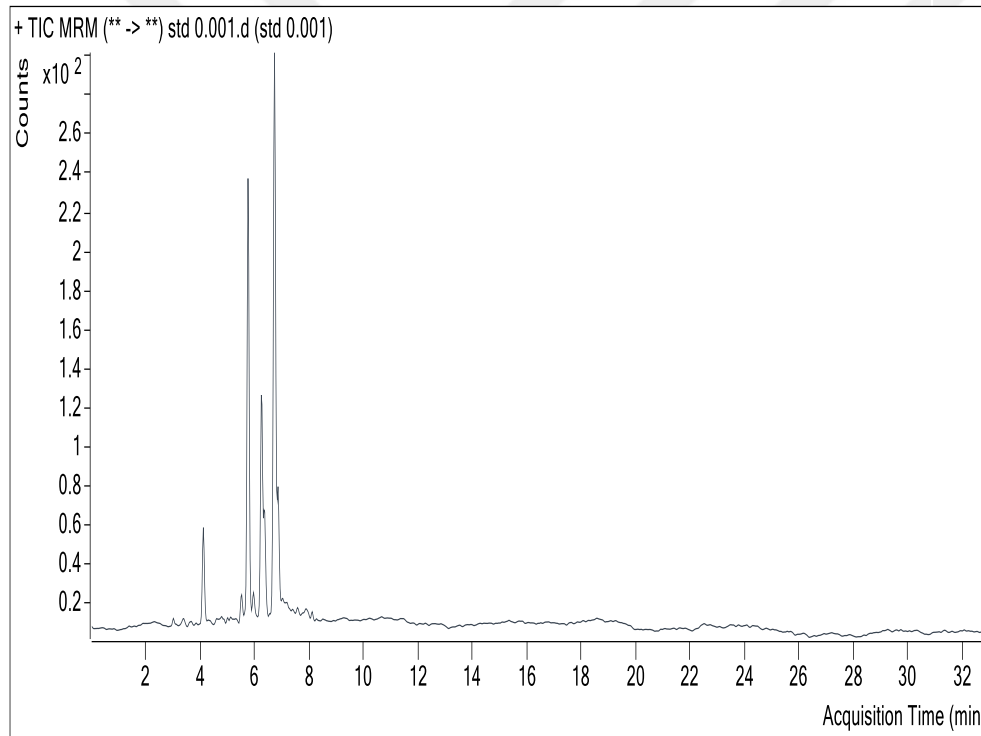
Şekil A.1. 0.0001 Domuz sığır karışım std. kromatogram görüntüsü.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 2.7.2025 4:40 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 2.7.2025 4:51 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 2.7.2025 4:40 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 13:21 **Data File** std 0.001.d
Position P1-A2 **Sample Name** std 0.001
Dilution 1 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Calibration **Comment**

Sample Chromatogram



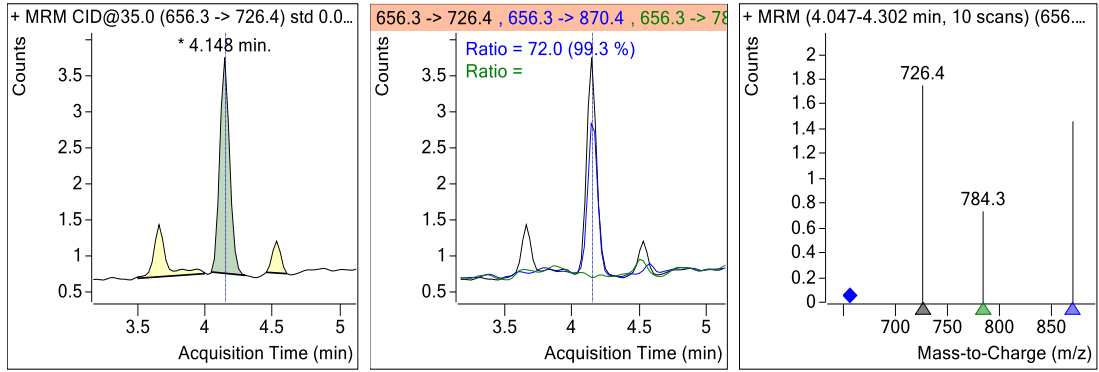
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	165			0,0010	100,00
DOMUZ 2		5,755	498			0,0010	100,00
SIGIR 2		5,952	25			0,0010	100,00
SIGIR 1		6,236	336			0,0010	100,00

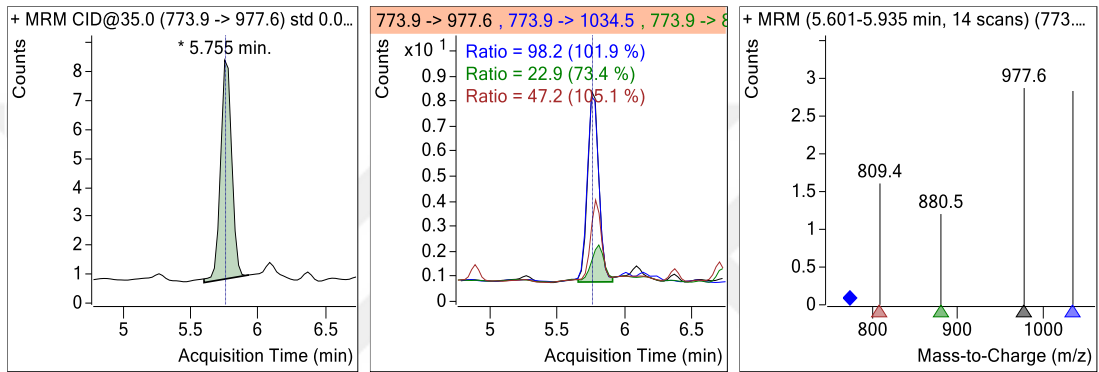
Şekil A.2. 0.001 Domuz sığır karışım std. kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

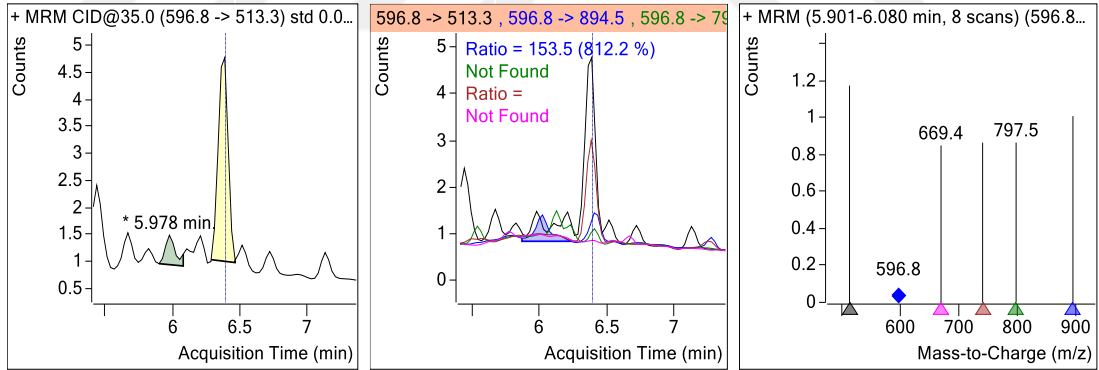
Target Compound DOMUZ 1



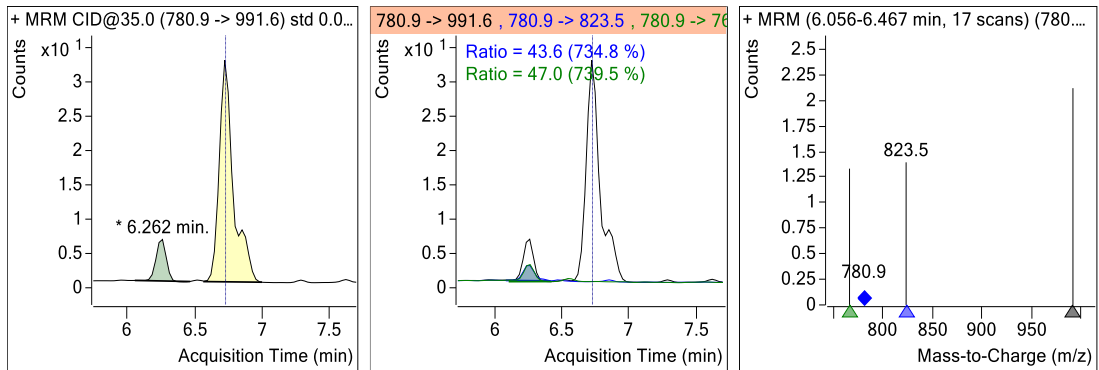
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



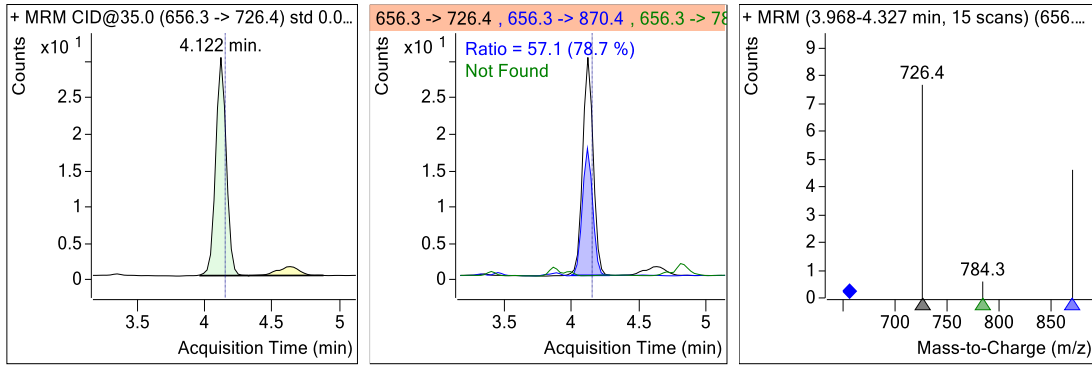
Target Compound SIGIR 1



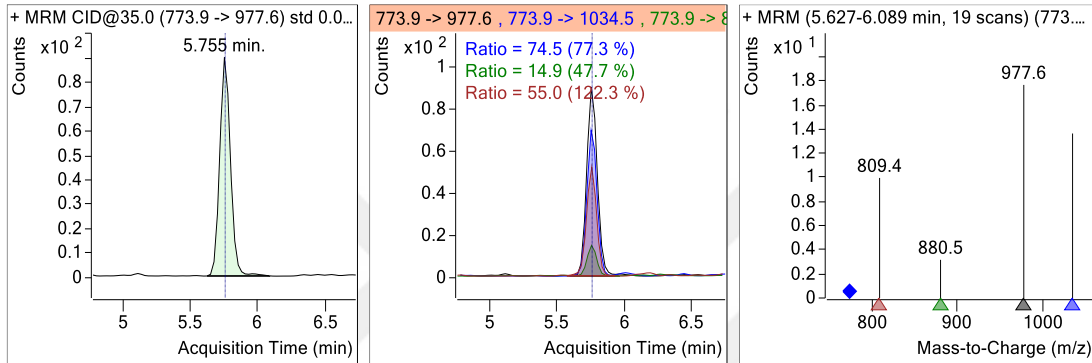
Şekil A.3. 0.0001 Karışım std. domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 pik grafikleri.

Compound Graphics

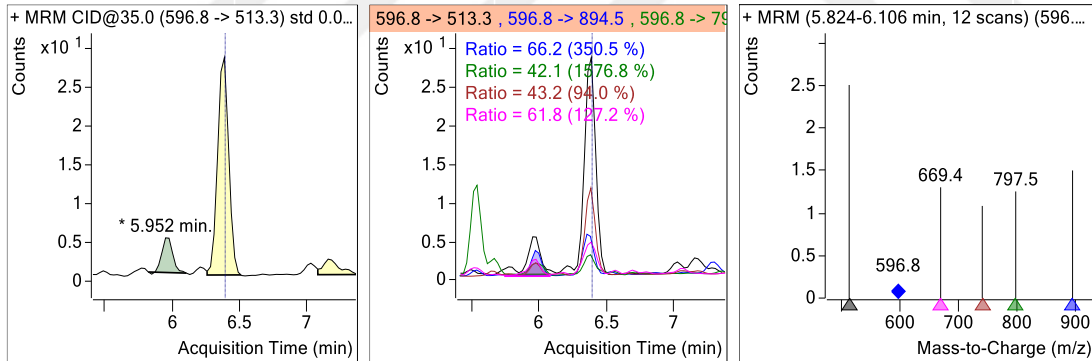
Target Compound DOMUZ 1



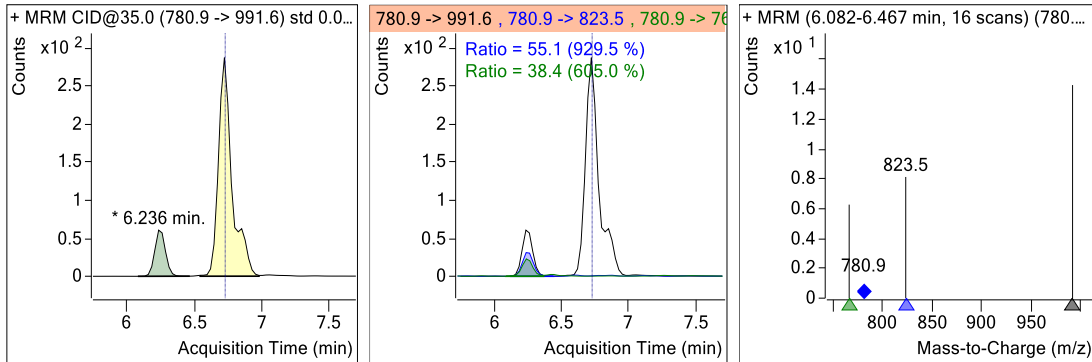
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



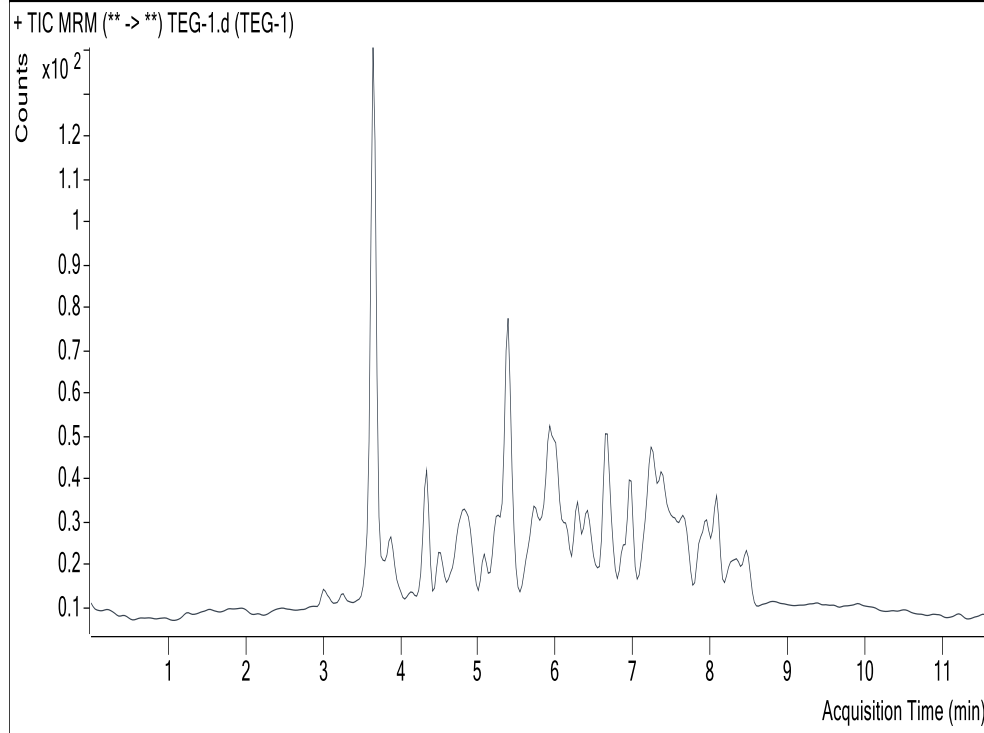
Şekil A.4. 0.001 Karışım std. domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 15:08 **Data File** TEG-1.d
Position P1-C1 **Sample Name** TEG-1
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



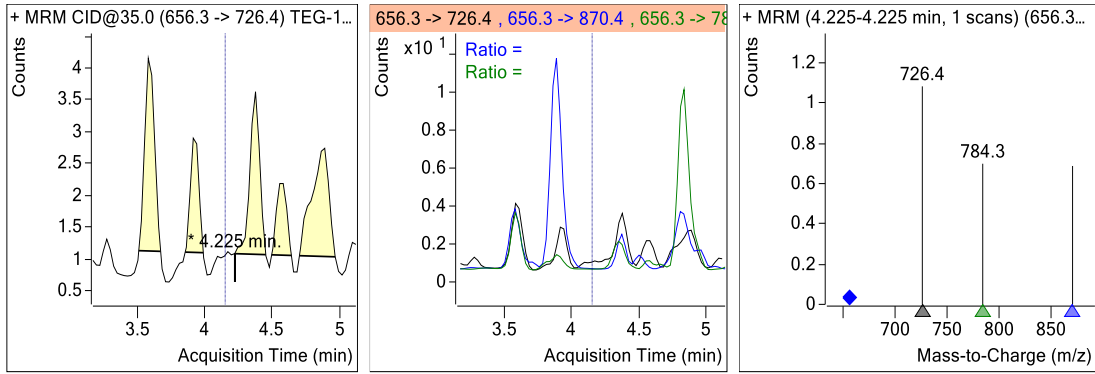
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,225	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,730	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,952	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

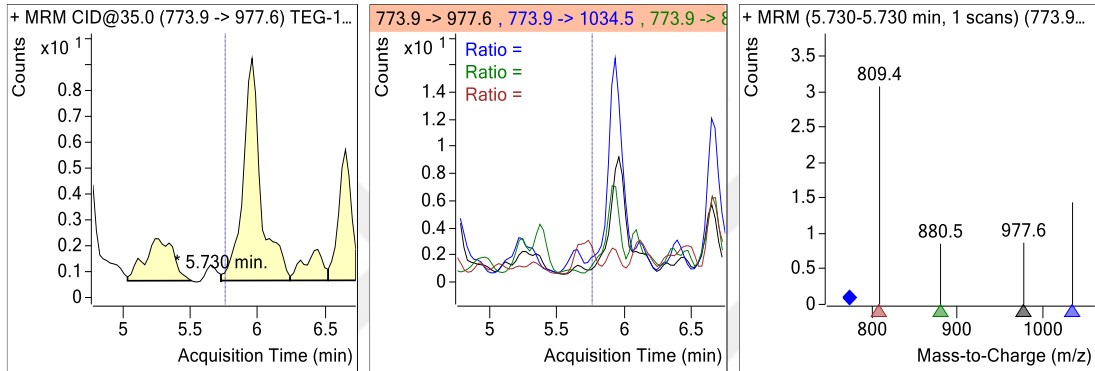
Şekil A.5. TEG-1 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

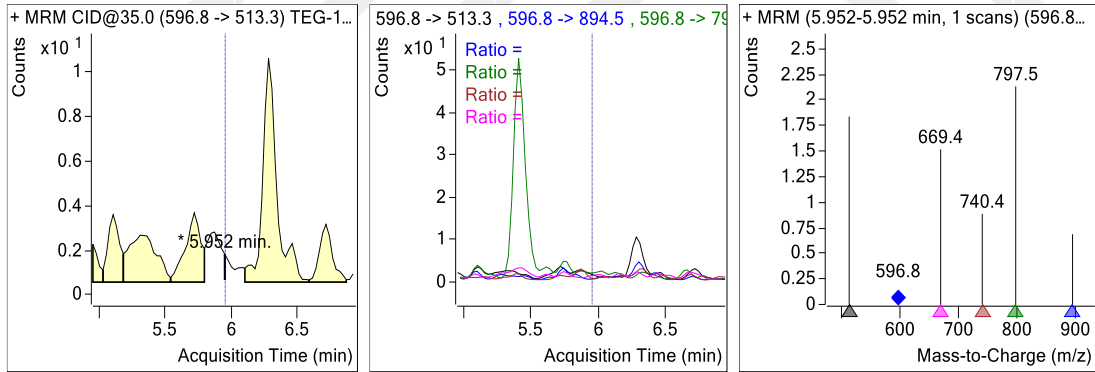
Target Compound DOMUZ 1



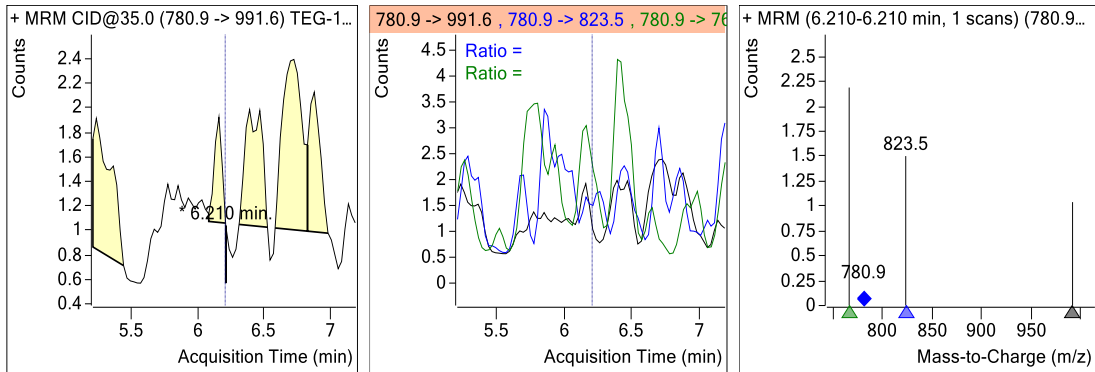
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SİĞIR 2



Target Compound SİĞIR 1



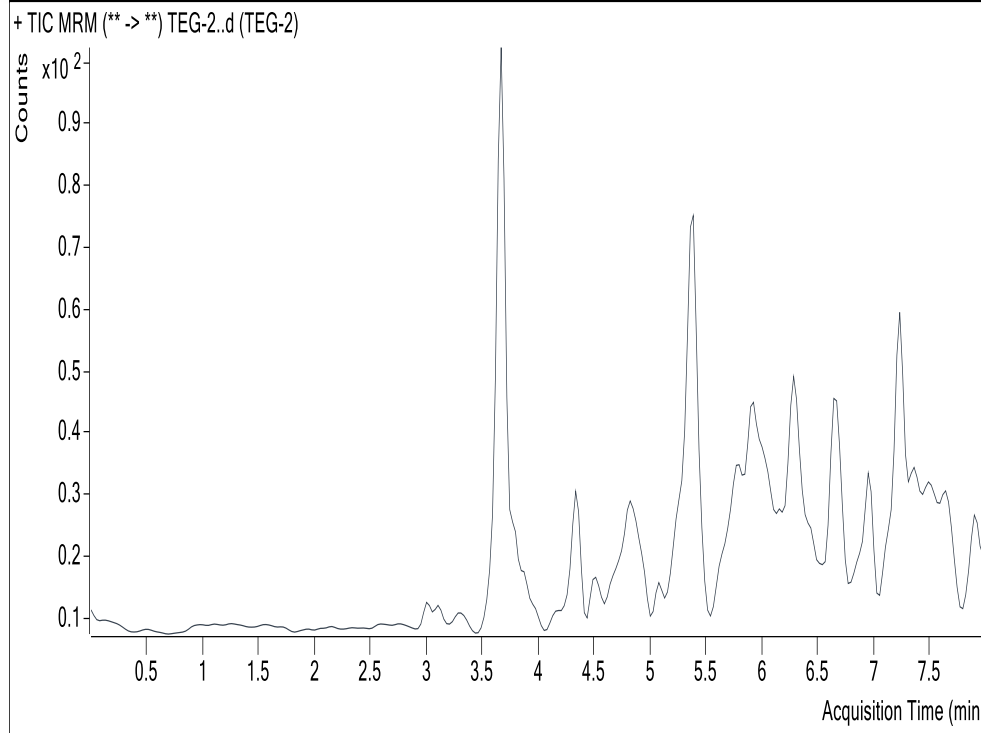
Şekil A.6. TEG-1 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 18:39 **Data File** TEG-2..d
Position P1-C2 **Sample Name** TEG-2
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



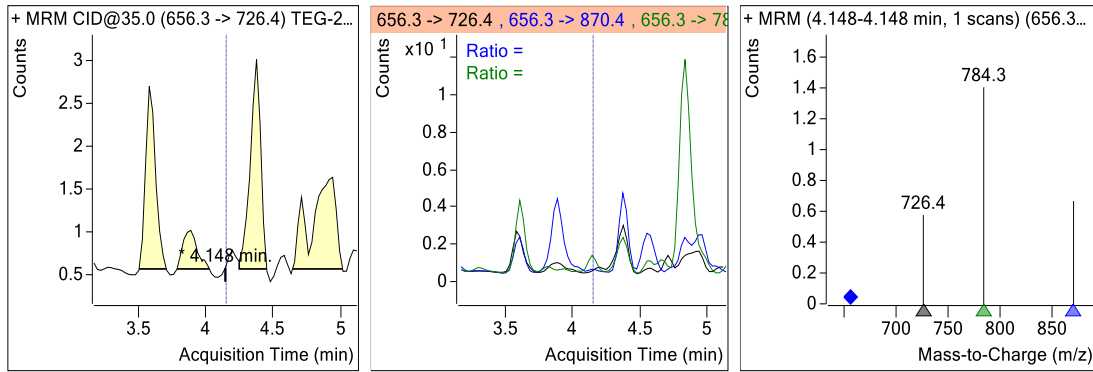
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,730	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,287	0		0,0000	0,0000	

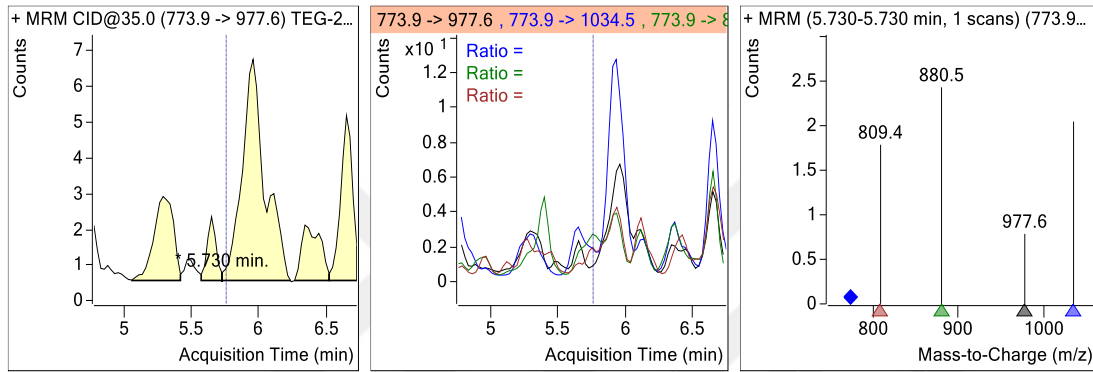
Şekil A.7. TEG-2 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

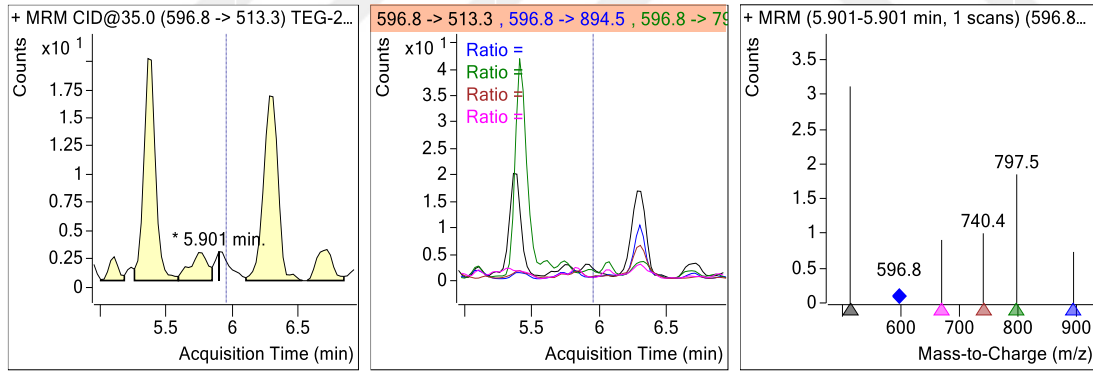
Target Compound DOMUZ 1



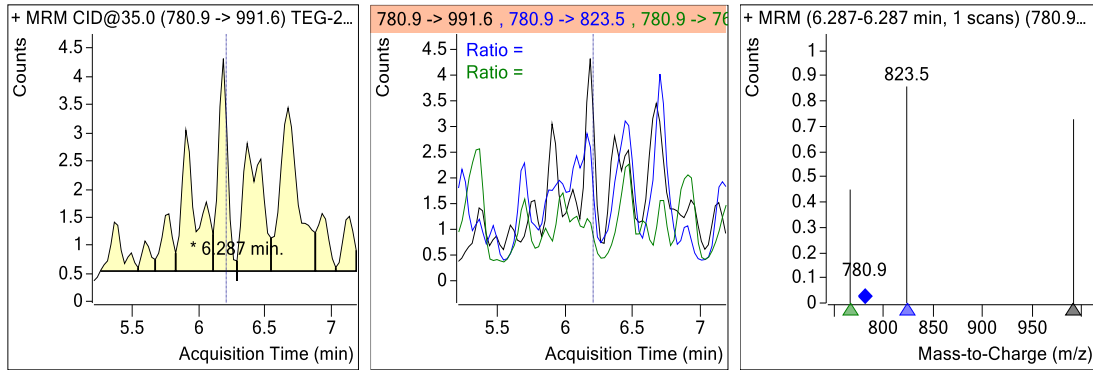
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



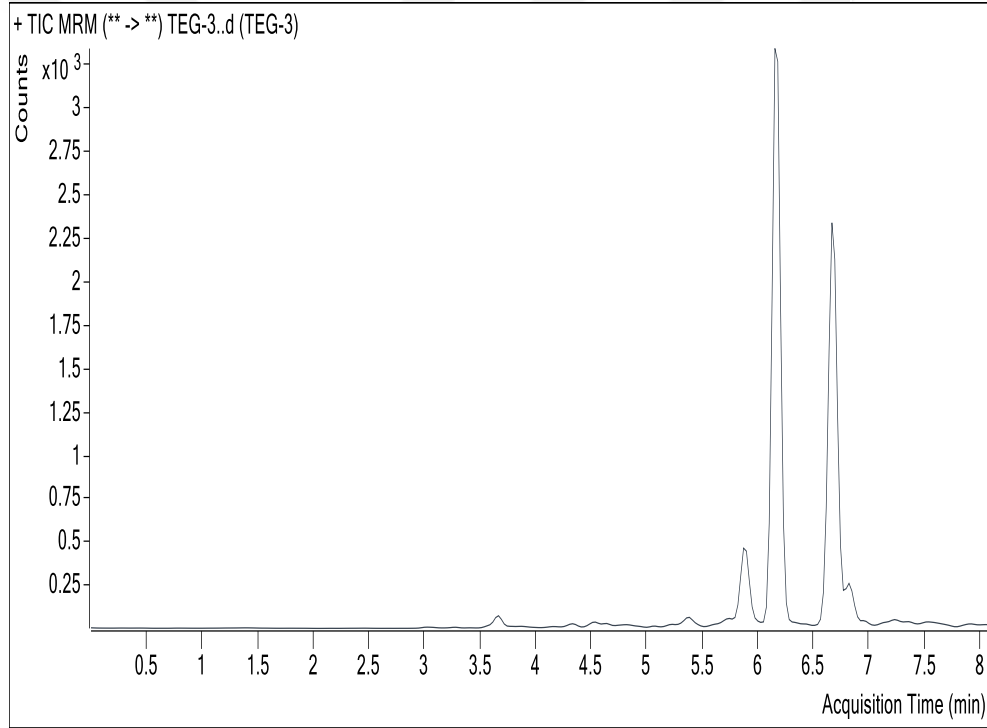
Şekil A.8. TEG-2 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 18:52 **Data File** TEG-3..d
Position P1-C3 **Sample Name** TEG-3
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



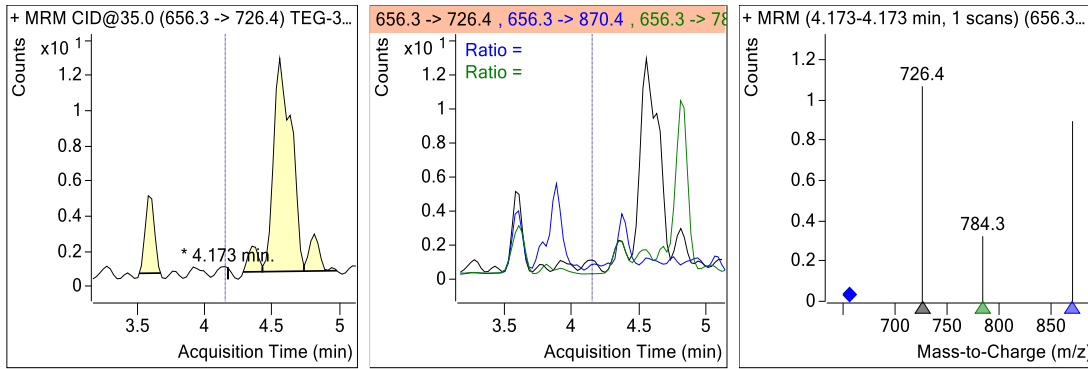
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,173	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	927			4,5264	
SIGIR 1		6,185	9604			3,4130	

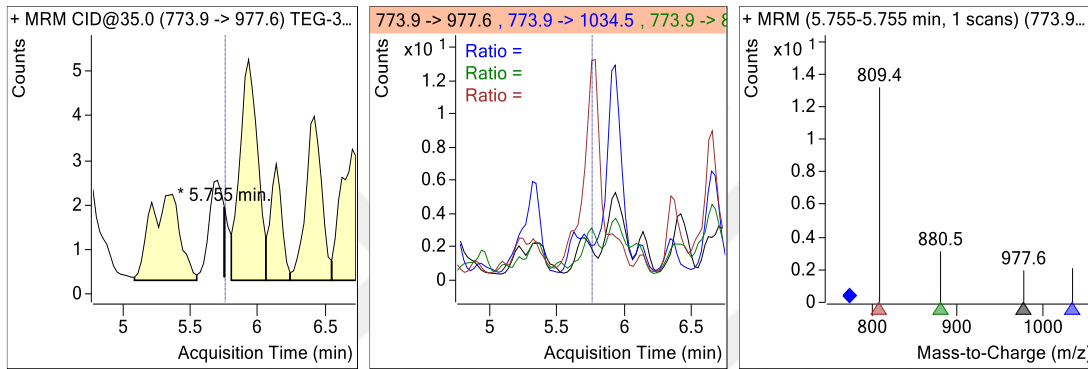
Şekil A.9. TEG-3 kromatogram görüntüsü

Compound Graphics

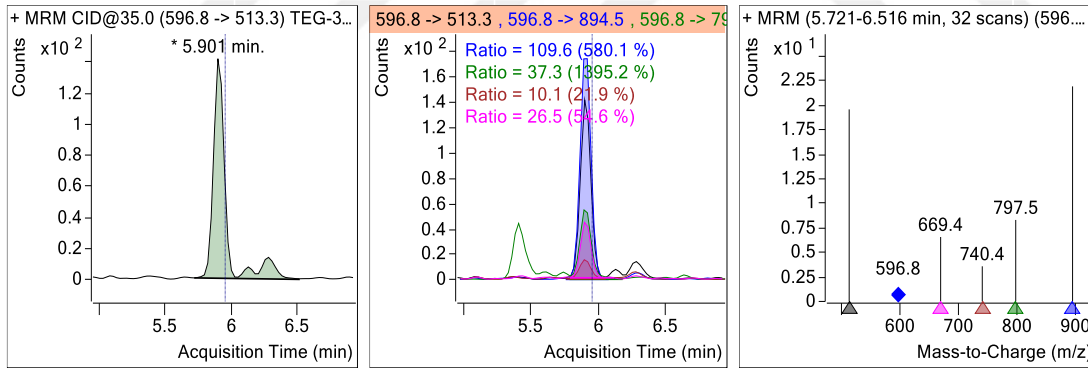
Target Compound DOMUZ 1



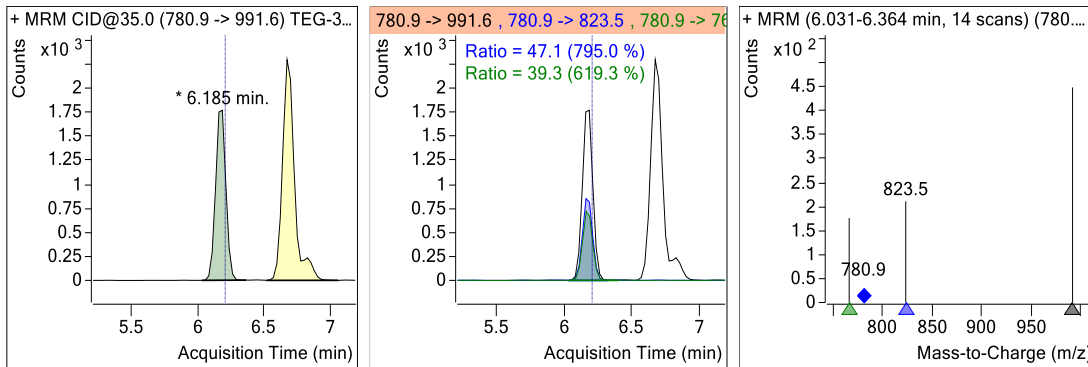
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



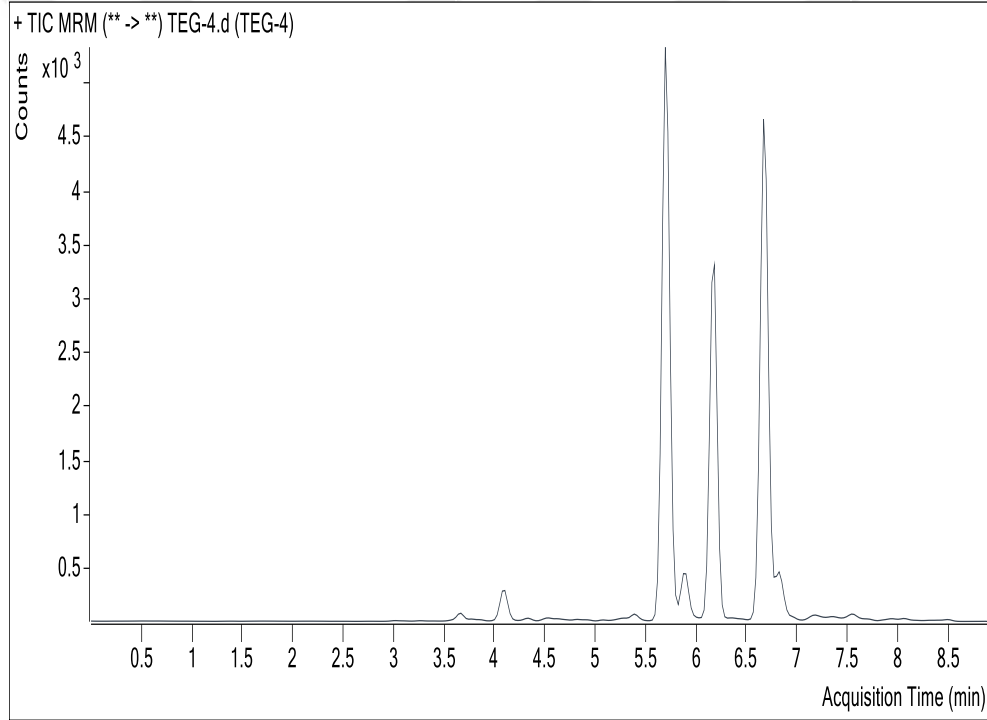
Şekil A.10. TEG-3 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 15:57 **Data File** TEG-4.d
Position P1-C4 **Sample Name** TEG-4
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



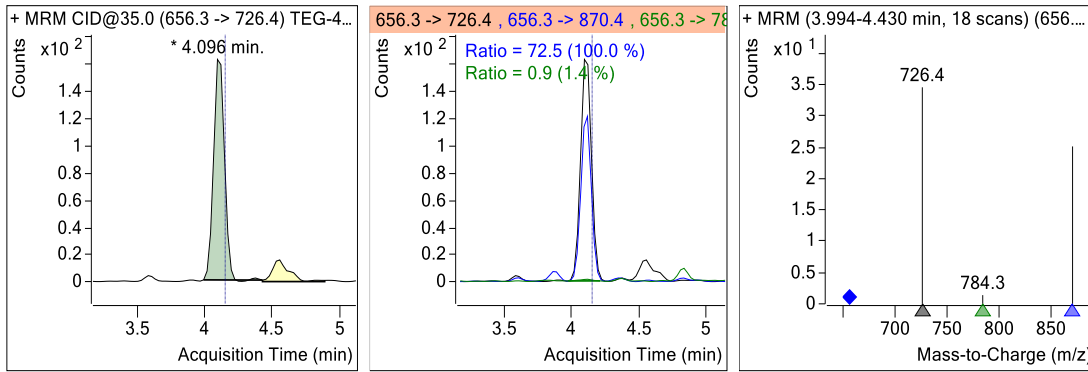
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,096	915			0,6620	
DOMUZ 2		5,704	12418			2,9527	
SIGIR 2		5,901	763			3,7242	
SIGIR 1		6,185	9404			3,3422	

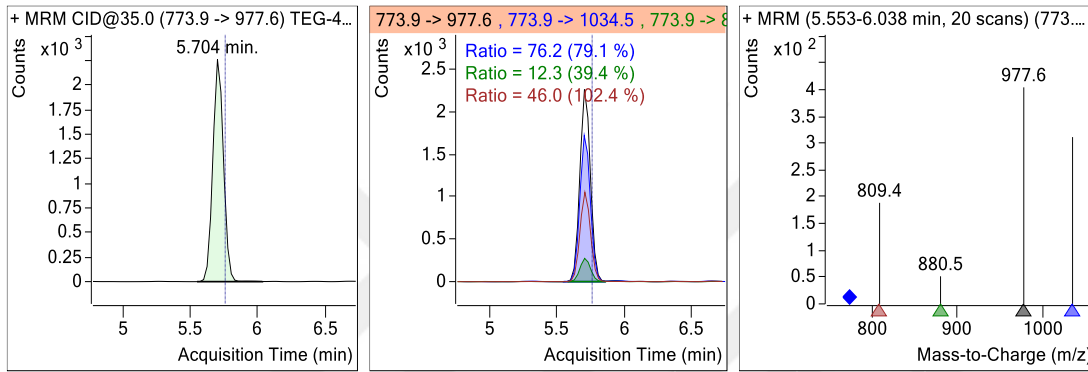
Şekil A.11. TEG-4 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

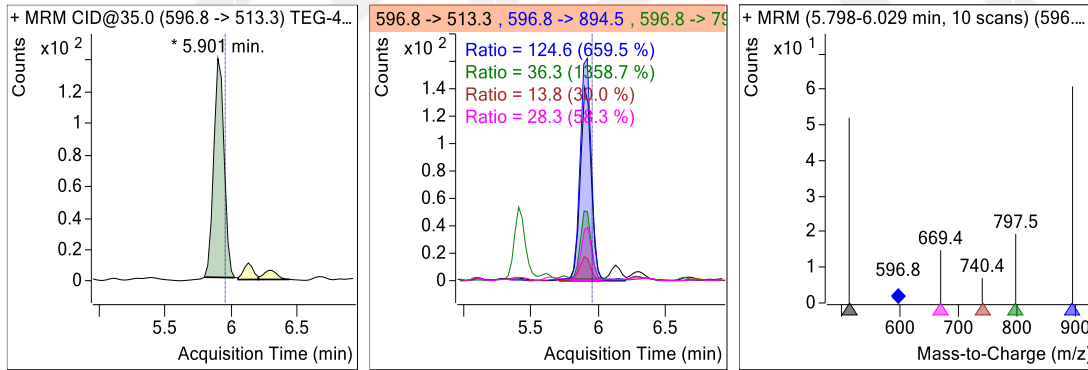
Target Compound DOMUZ 1



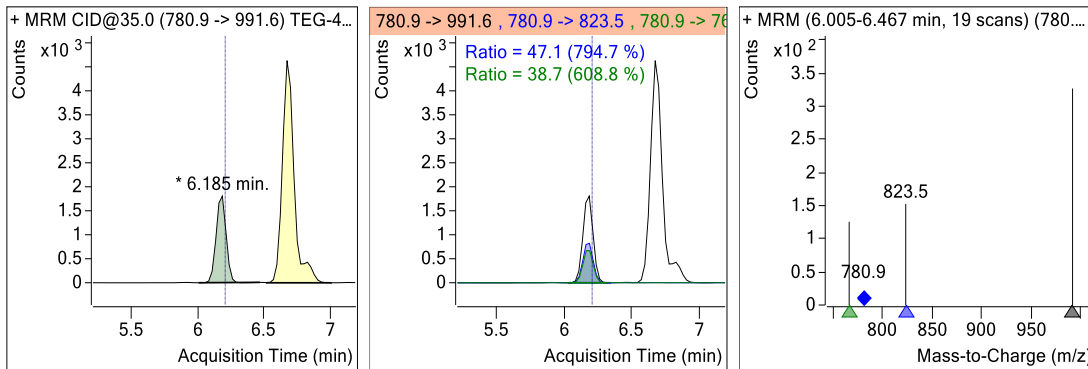
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



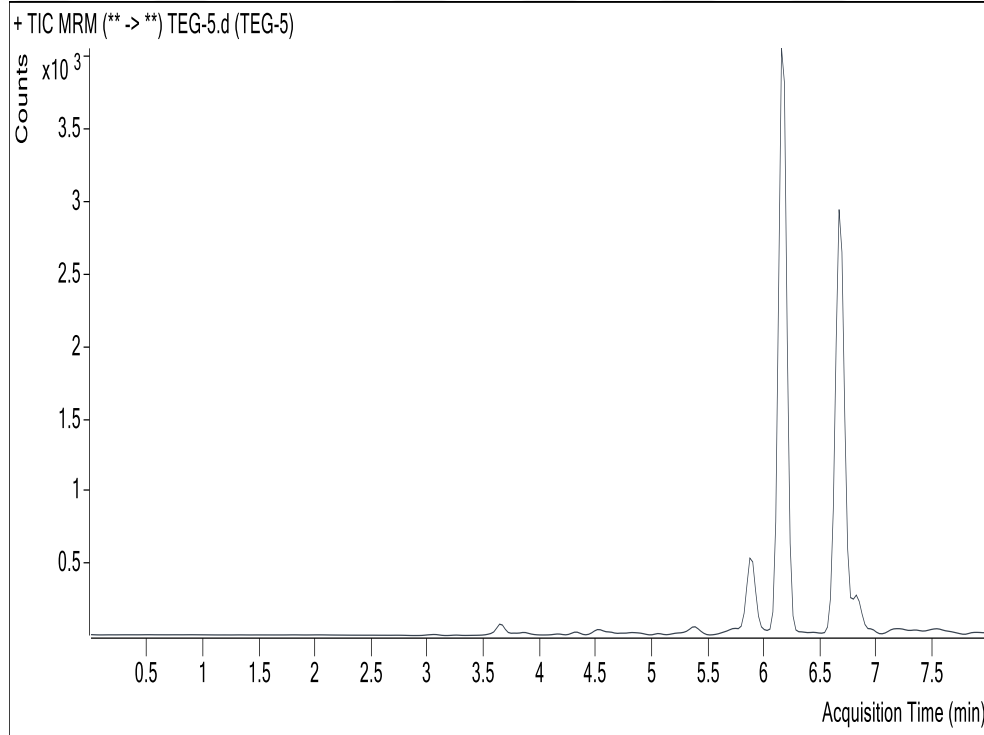
Şekil A.12. TEG-4 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 16:19 **Data File** TEG-5.d
Position P1-D1 **Sample Name** TEG-5
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



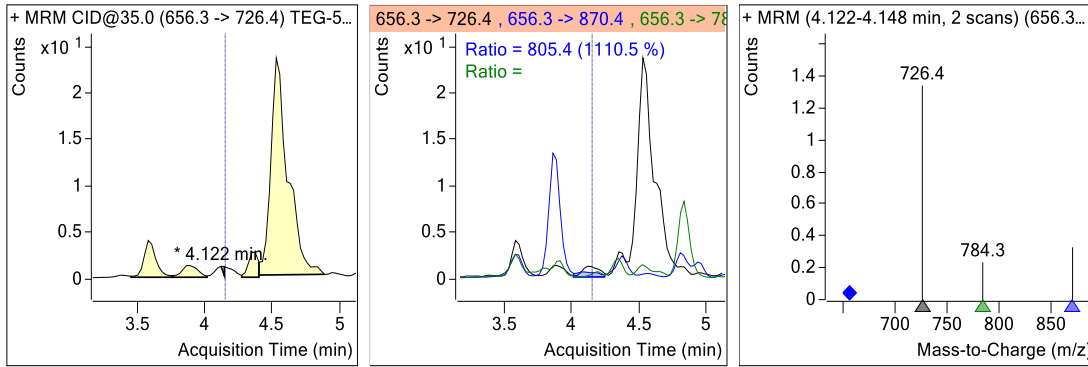
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	1			0,0015	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	1014			4,9537	
SIGIR 1		6,159	11556			4,1066	

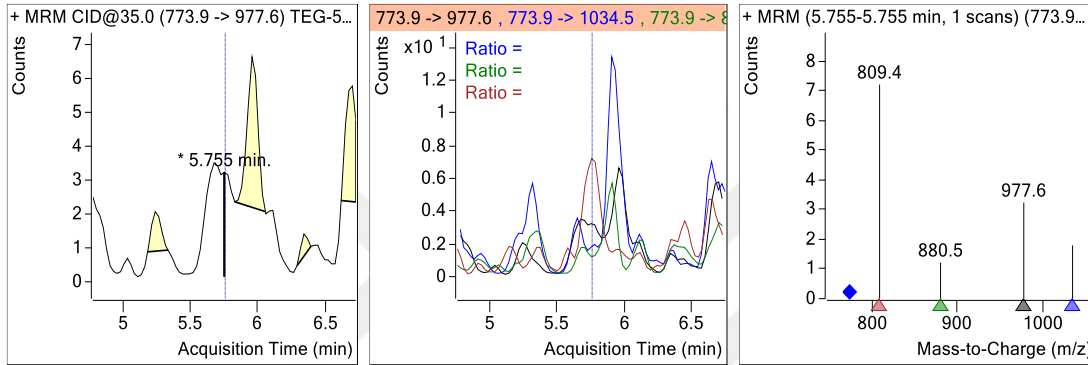
Şekil A.13. TEG-5 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

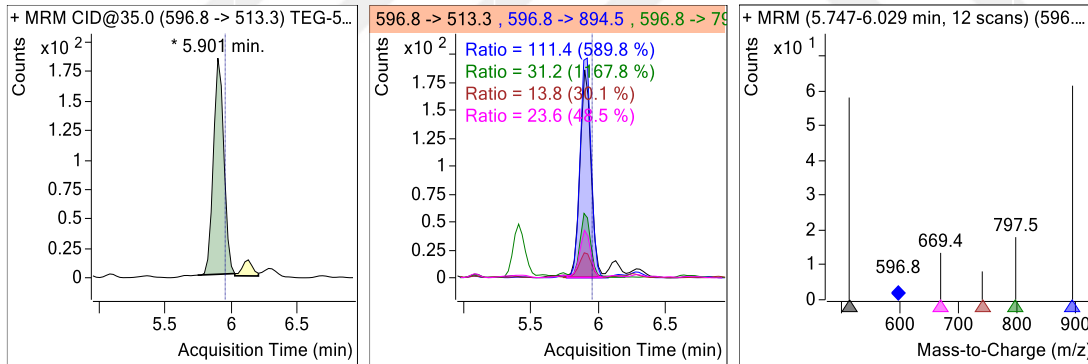
Target Compound DOMUZ 1



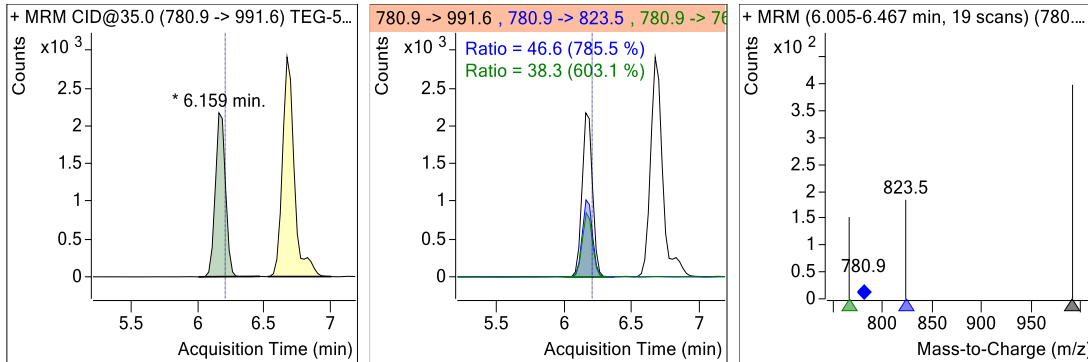
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SİĞİR 2



Target Compound SİĞİR 1



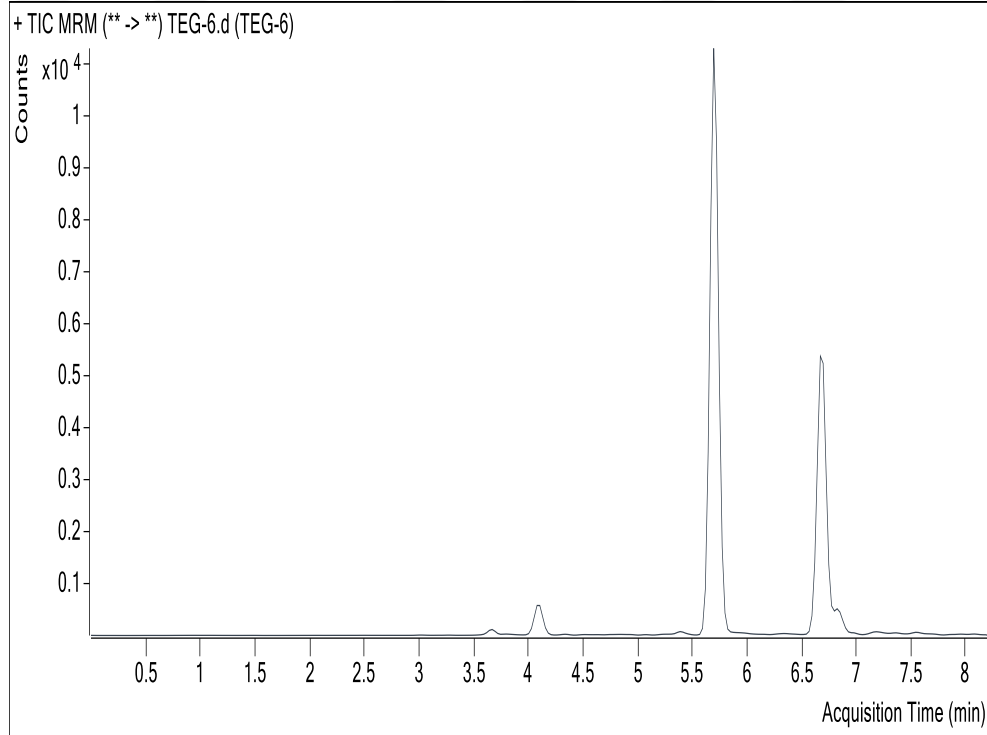
Şekil A.14. TEG-5 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 16:28 **Data File** TEG-6.d
Position P1-D2 **Sample Name** TEG-6
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



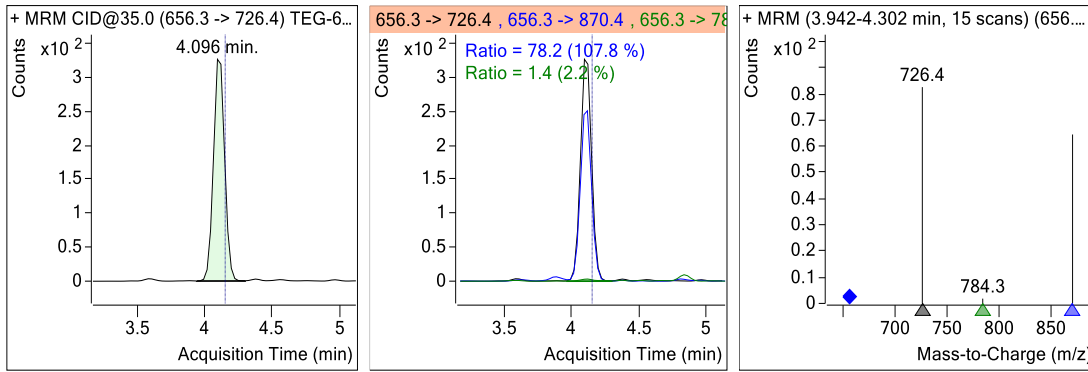
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,096	1884			1,3623	
DOMUZ 2		5,704	26769			6,3633	
SIGIR 2		5,901	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,133	0			0,0006	

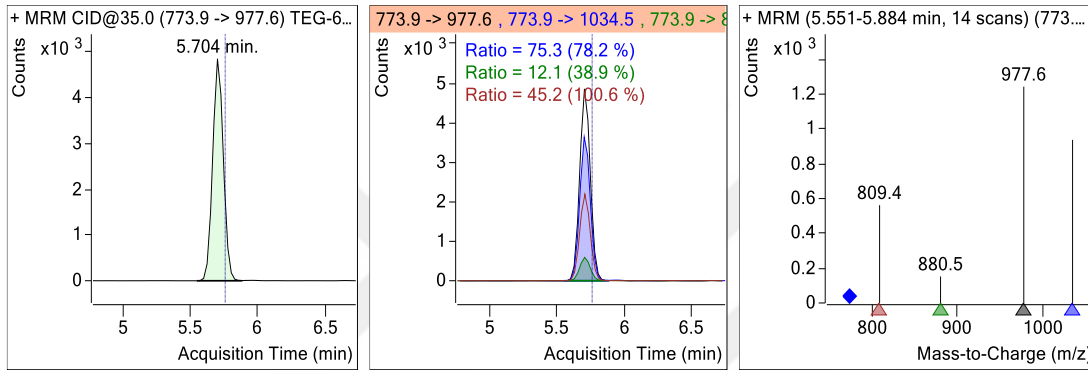
Şekil A.15. TEG-6 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

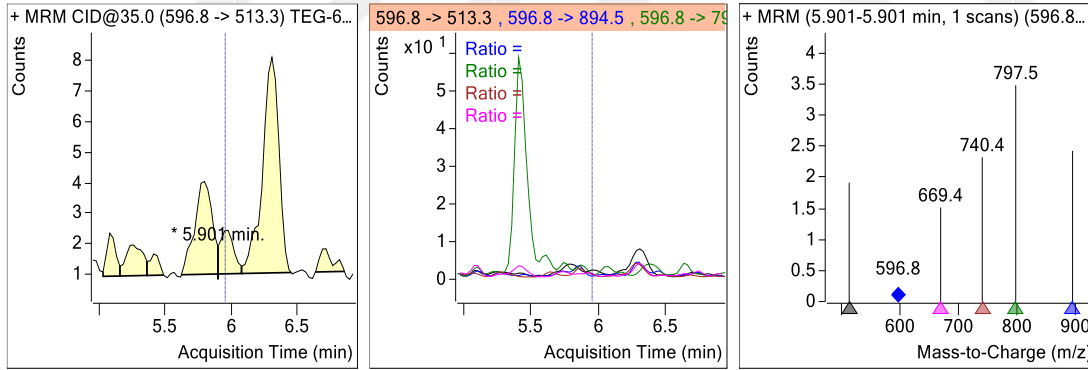
Target Compound DOMUZ 1



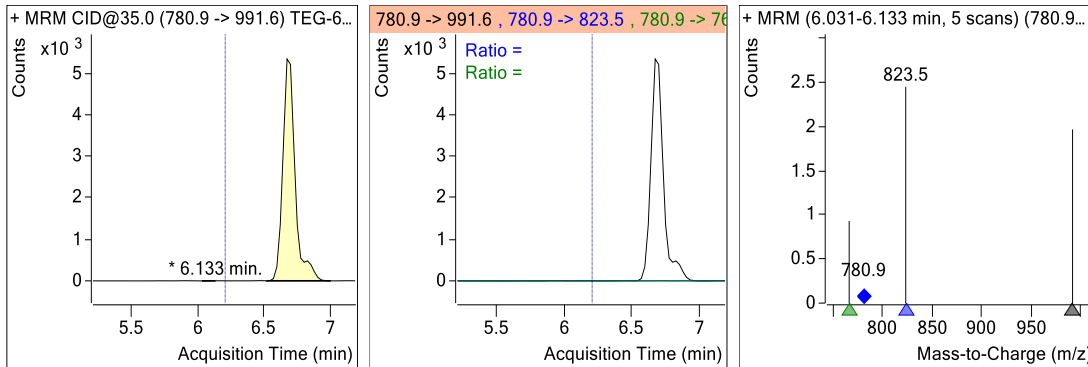
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



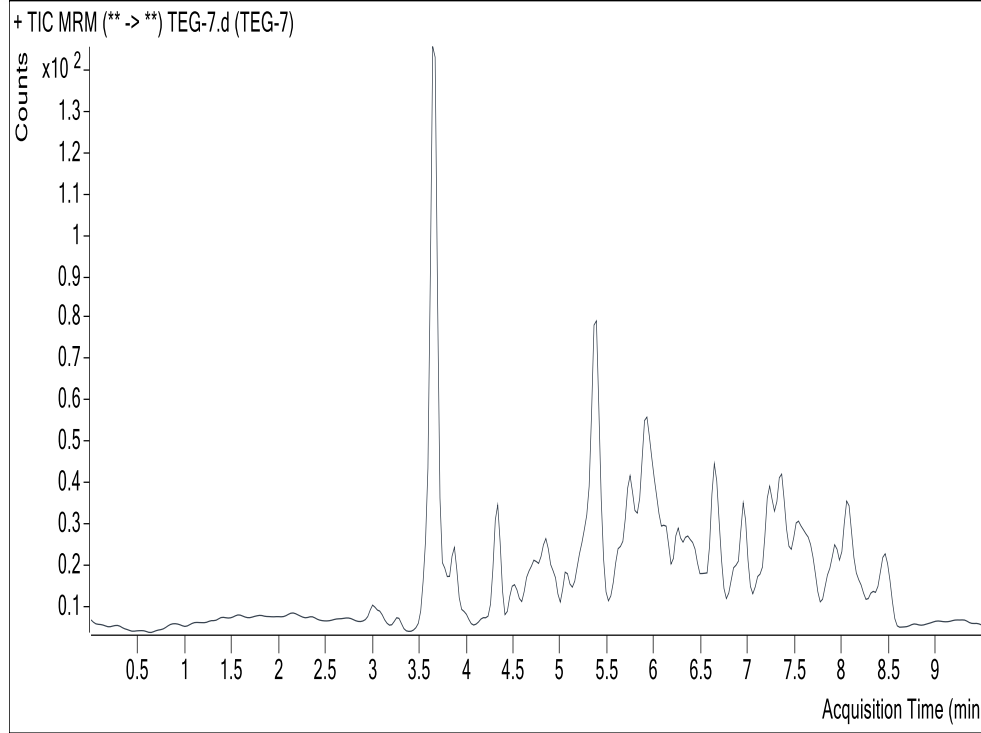
Şekil A.16. TEG-6 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 16:38 **Data File** TEG-7.d
Position P1-D3 **Sample Name** TEG-7
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



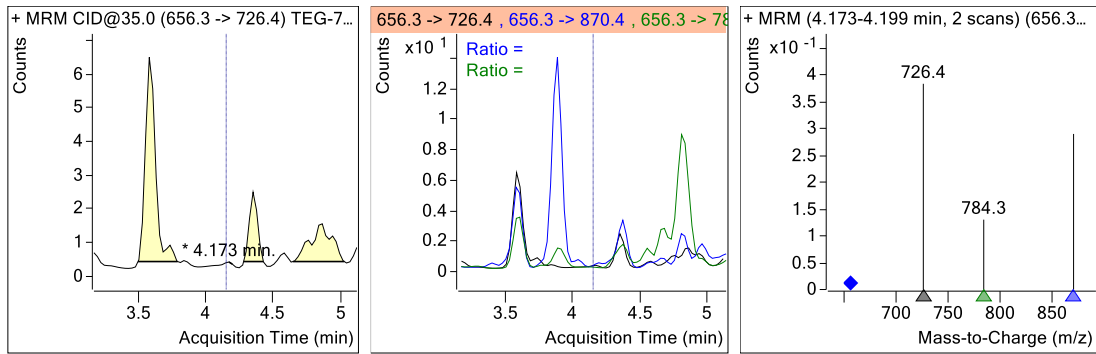
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,173	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,952	0			0,0000	
SIGIR 1		6,108	0		0,0000	0,0000	

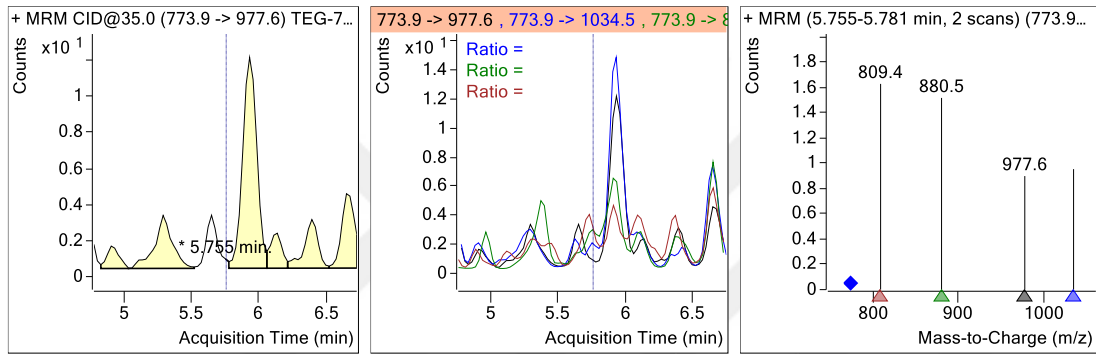
Şekil A.17. TEG-7 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

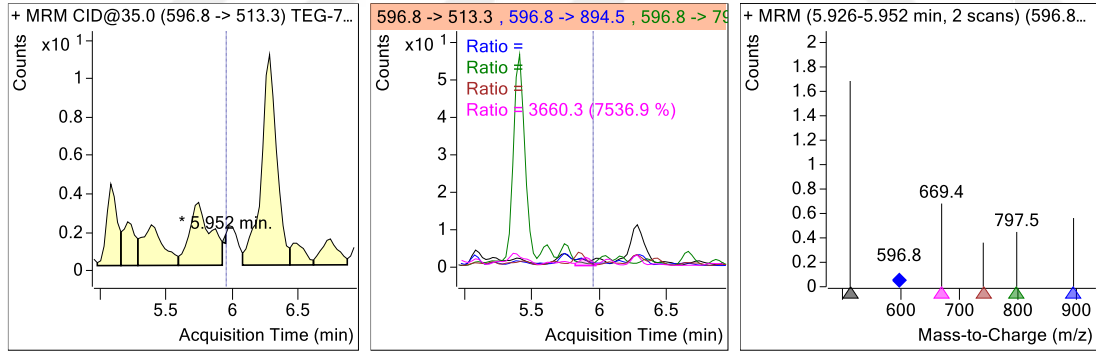
Target Compound DOMUZ 1



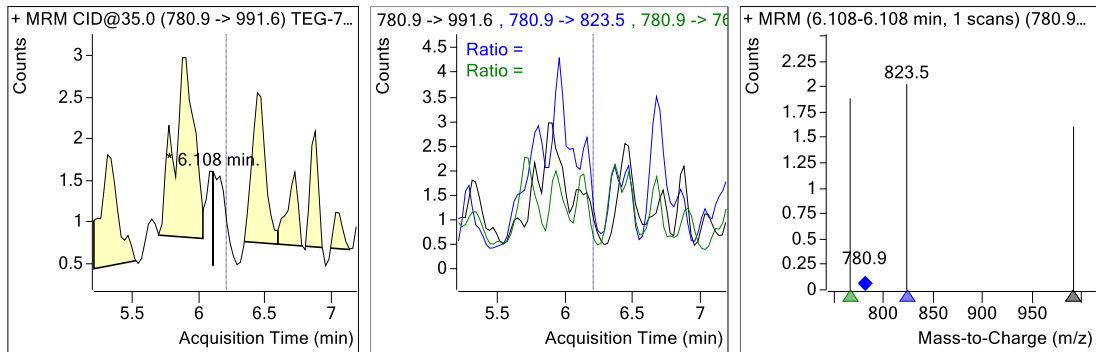
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



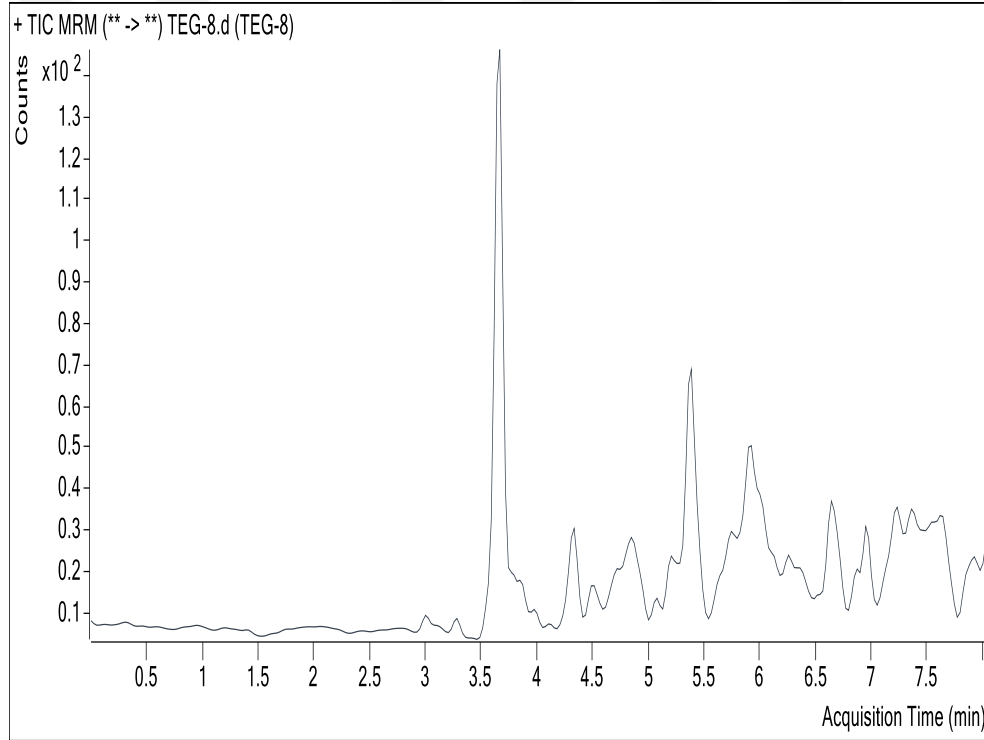
Şekil A.18. TEG-7 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 16:52 **Data File** TEG-8.d
Position P1-D4 **Sample Name** TEG-8
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



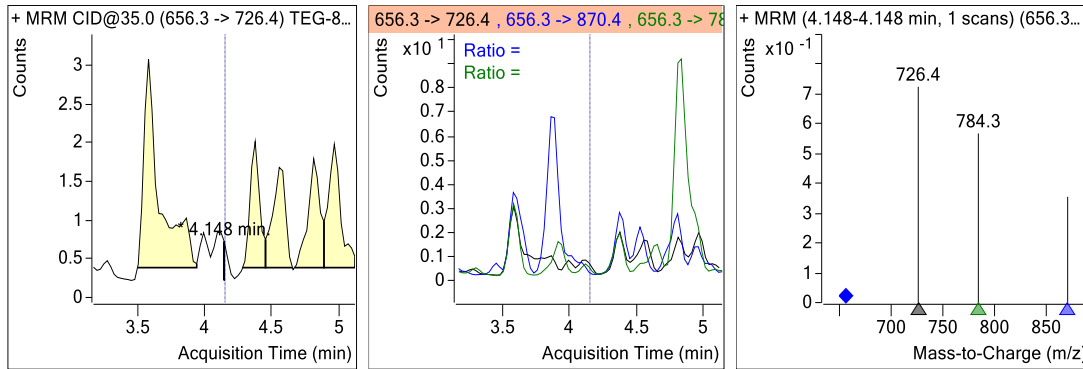
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,704	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,926	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

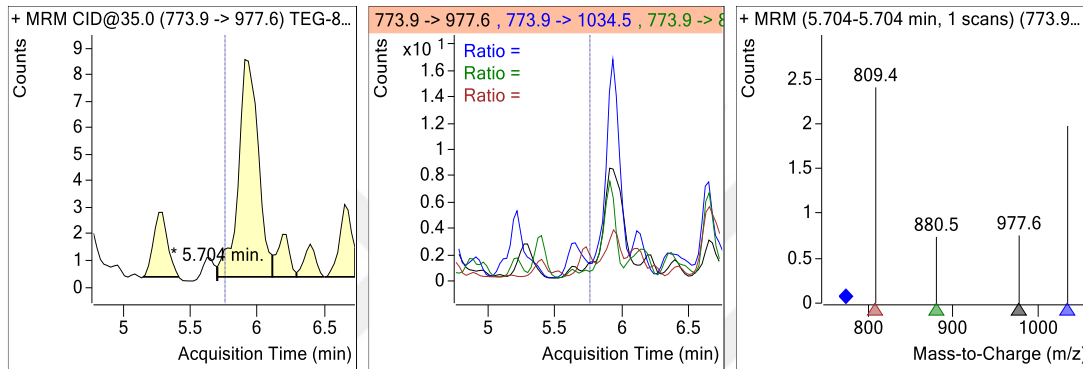
Şekil A.19. TEG-8 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

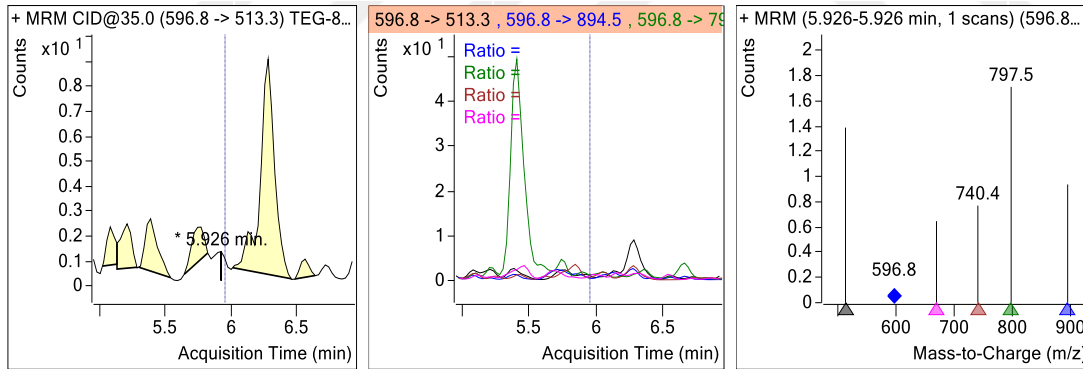
Target Compound DOMUZ 1



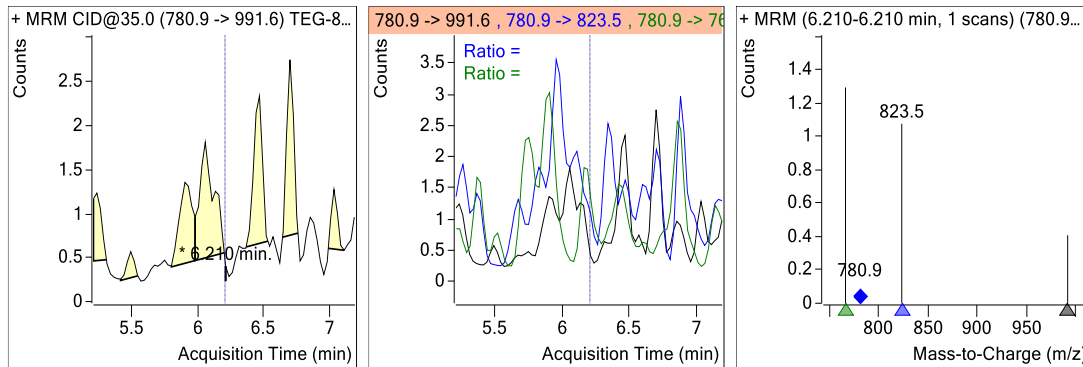
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



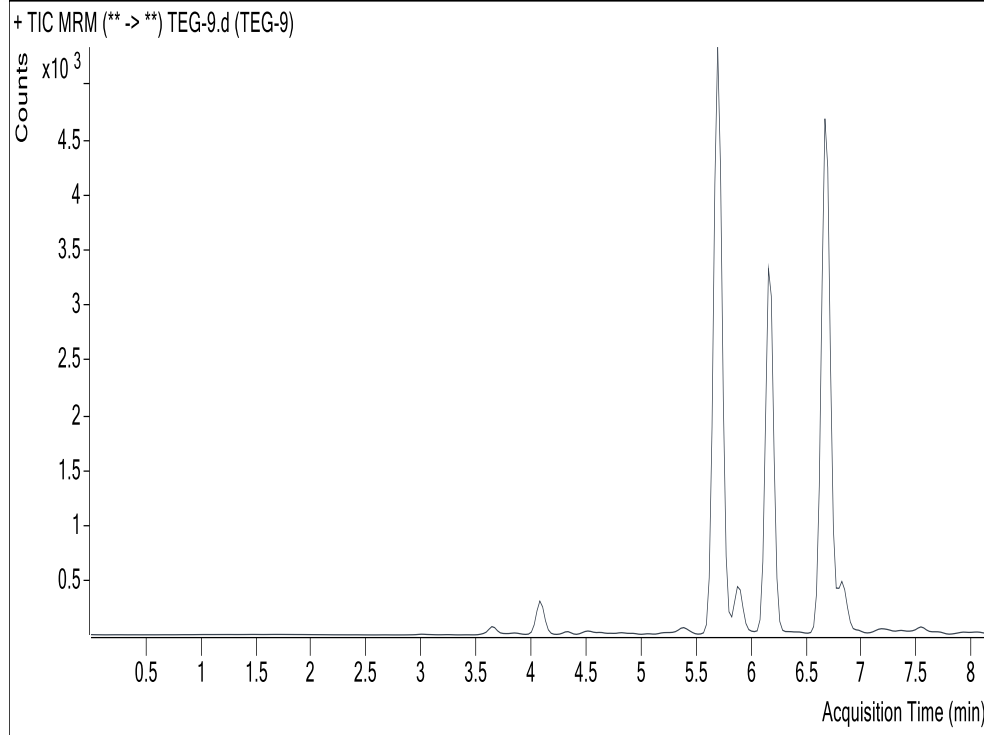
Şekil A.20. TEG-8 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 17:12 **Data File** TEG-9.d
Position P1-E1 **Sample Name** TEG-9
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



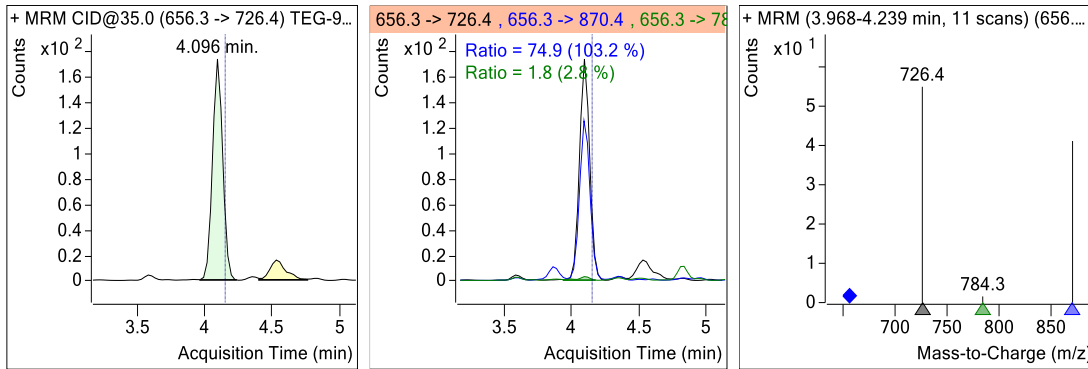
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,096	916			0,6627	
DOMUZ 2		5,704	12399			2,9483	
SIGIR 2		5,901	680			3,3191	
SIGIR 1		6,159	9443			3,3560	

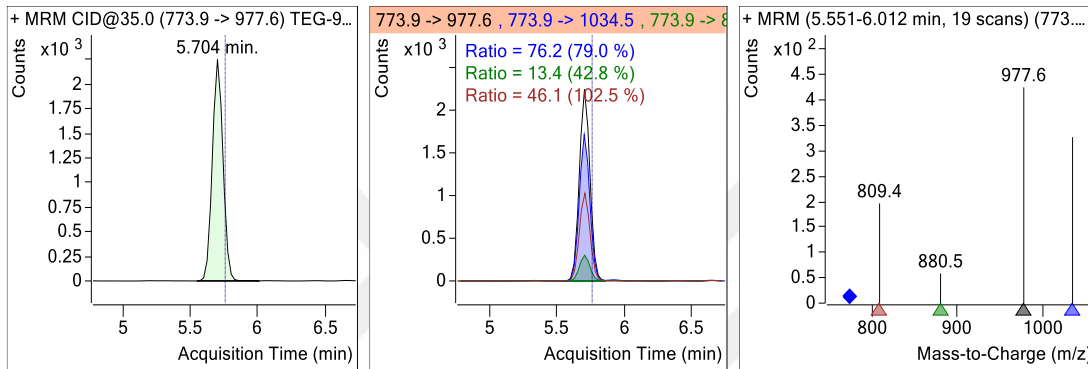
Şekil A.21. TEG-9 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

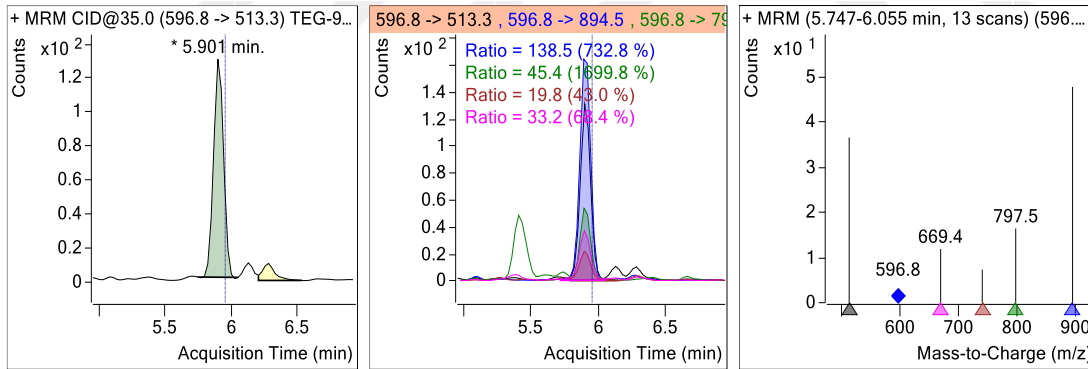
Target Compound DOMUZ 1



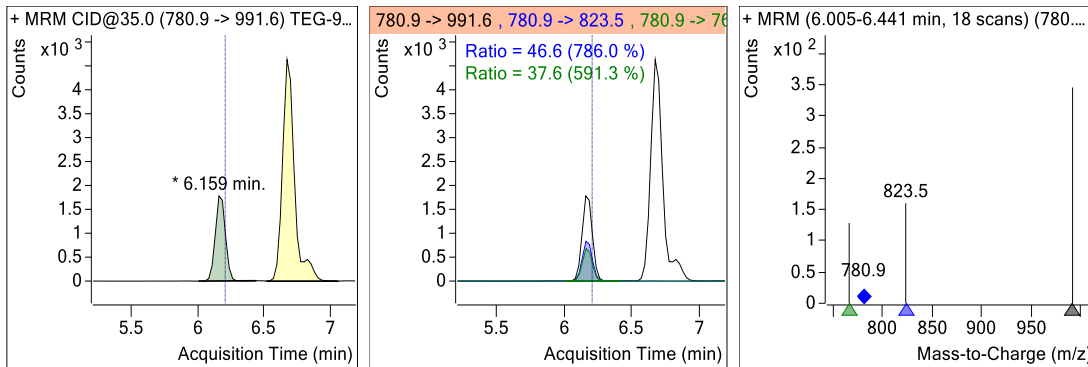
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SİĞİR 2



Target Compound SİĞİR 1



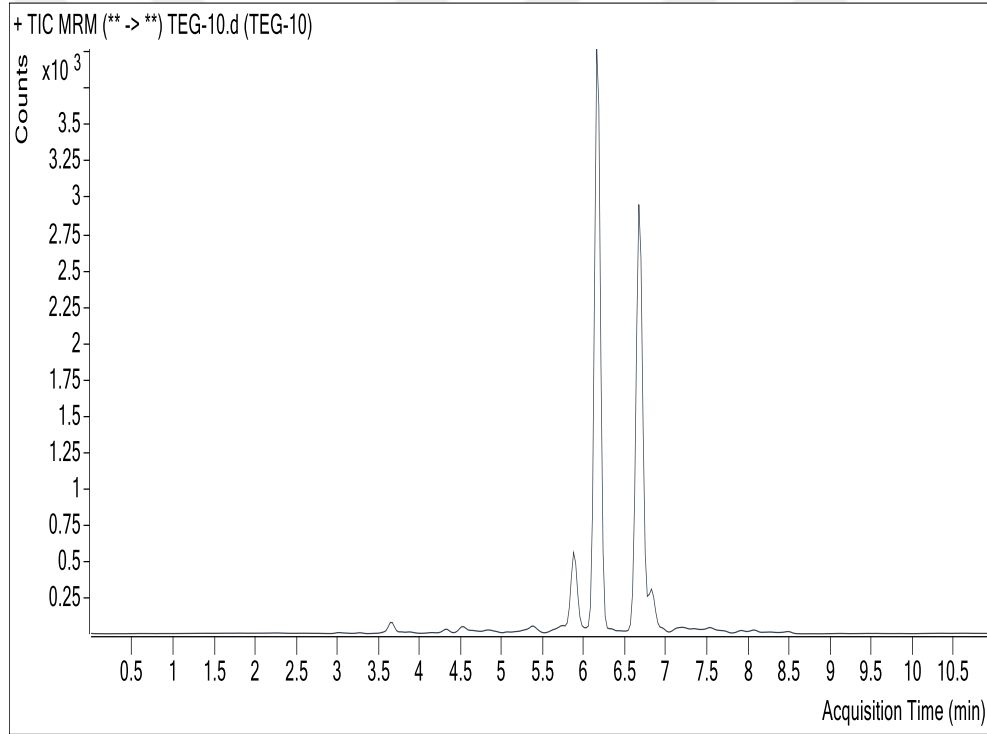
Şekil A.22. TEG-9 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 17:33 **Data File** TEG-10.d
Position P1-E2 **Sample Name** TEG-10
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



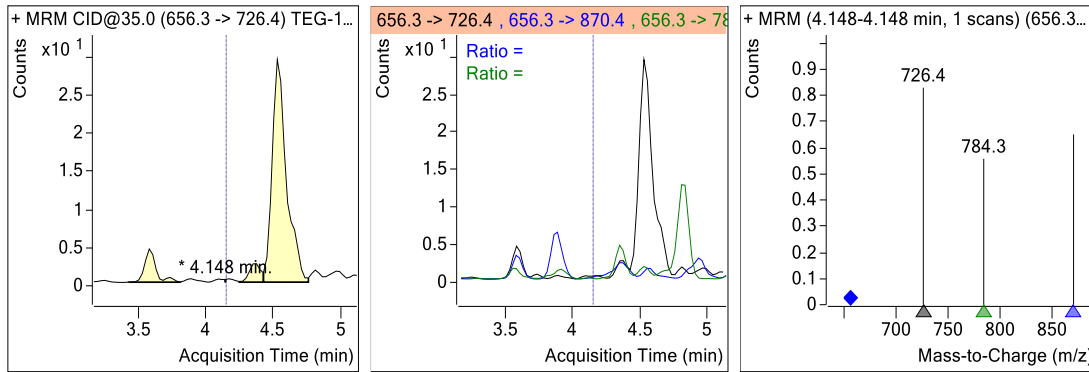
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	979			4,7807	
SIGIR 1		6,159	11369			4,0403	

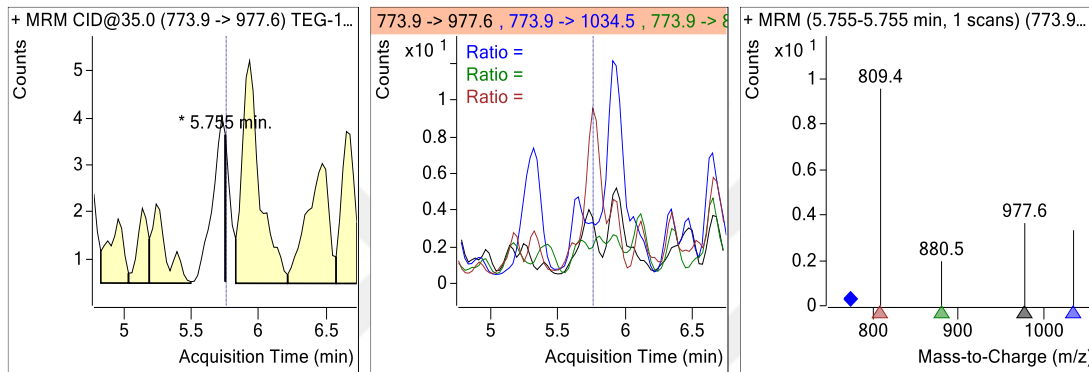
Şekil A.23. TEG-10 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

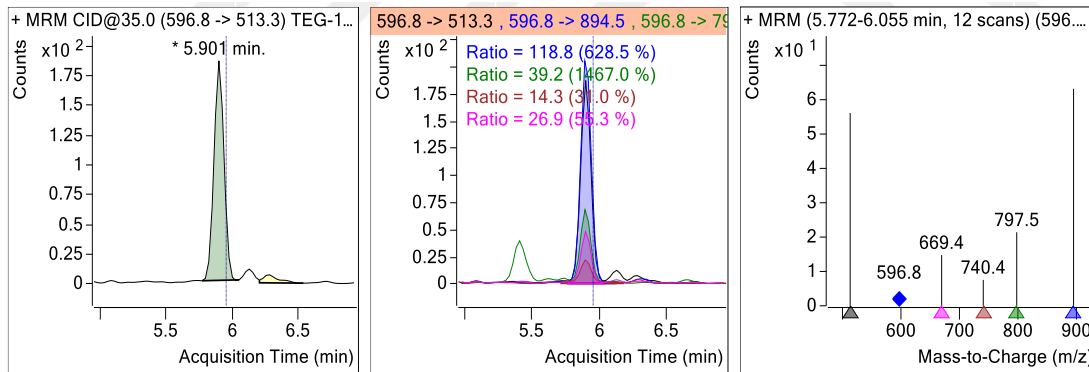
Target Compound DOMUZ 1



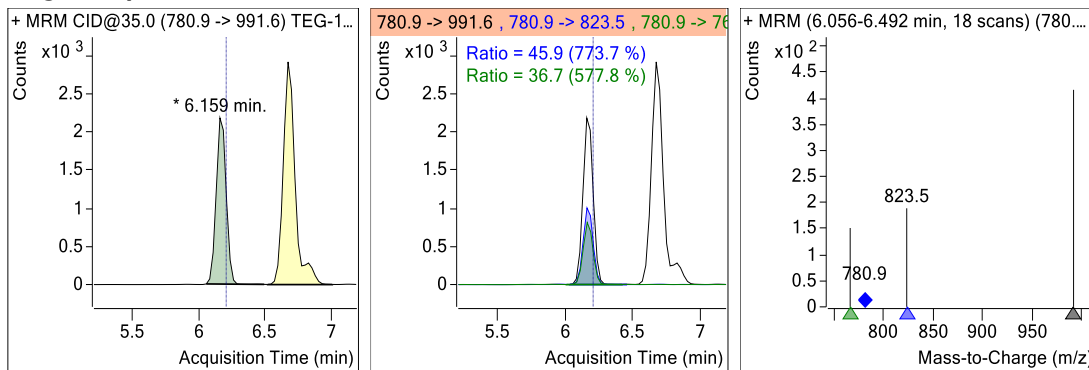
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



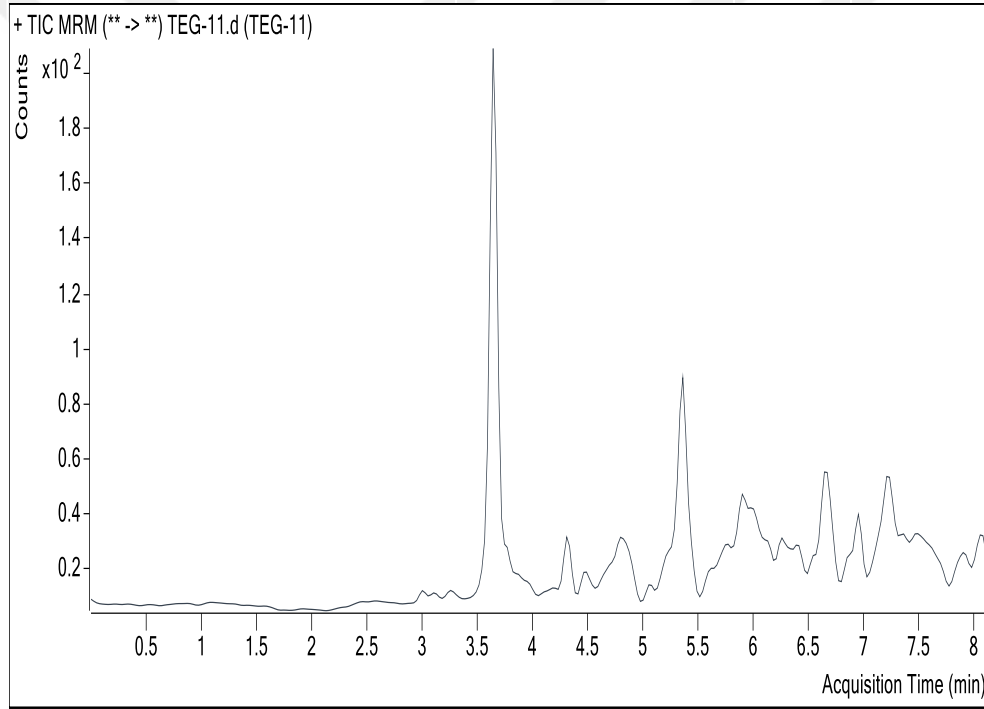
Şekil A.24. TEG-10 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 17:46 **Data File** TEG-11.d
Position P1-E3 **Sample Name** TEG-11
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



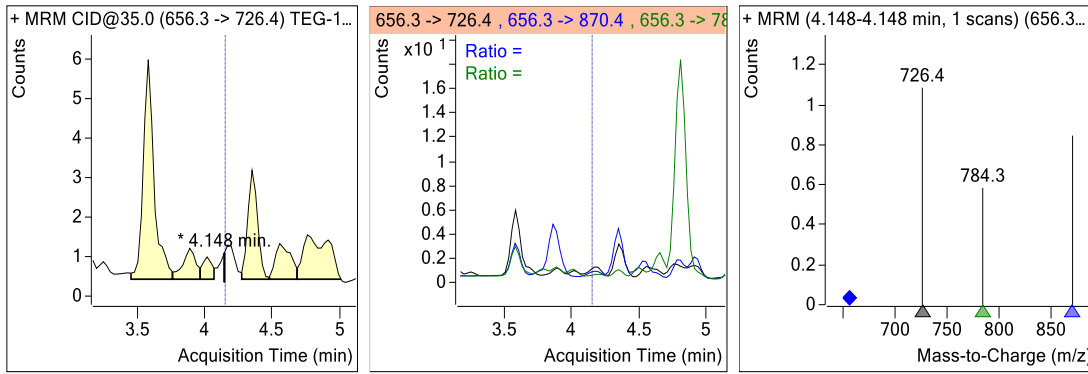
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,807	0			0,0016	
SIGIR 2		5,901	0			0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

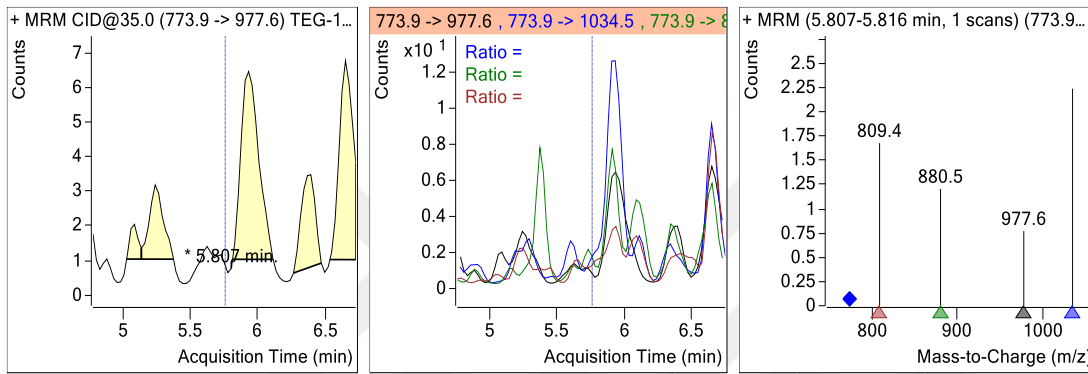
Şekil A.25. TEG-11 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

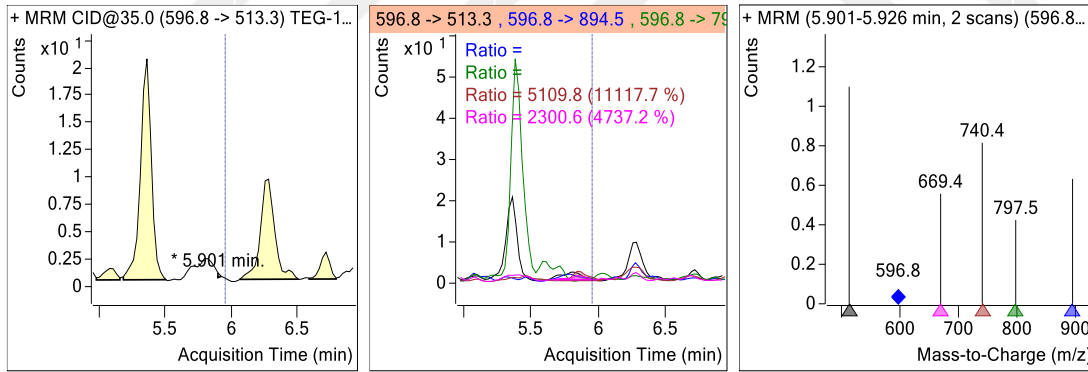
Target Compound DOMUZ 1



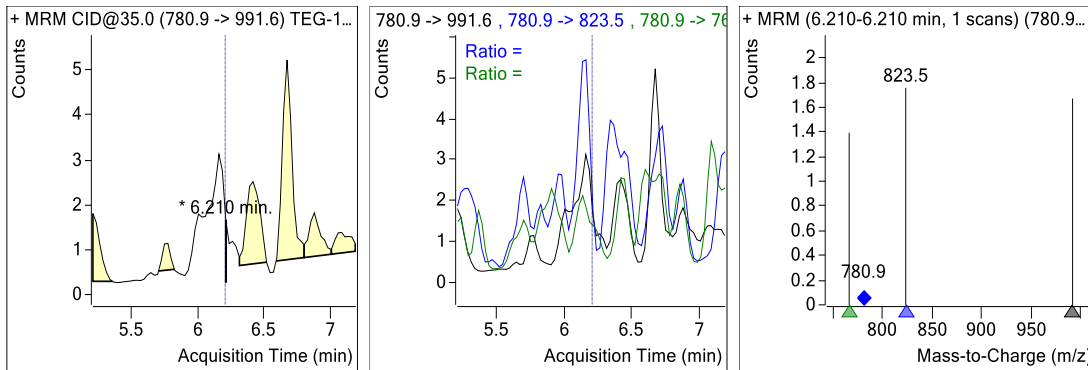
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



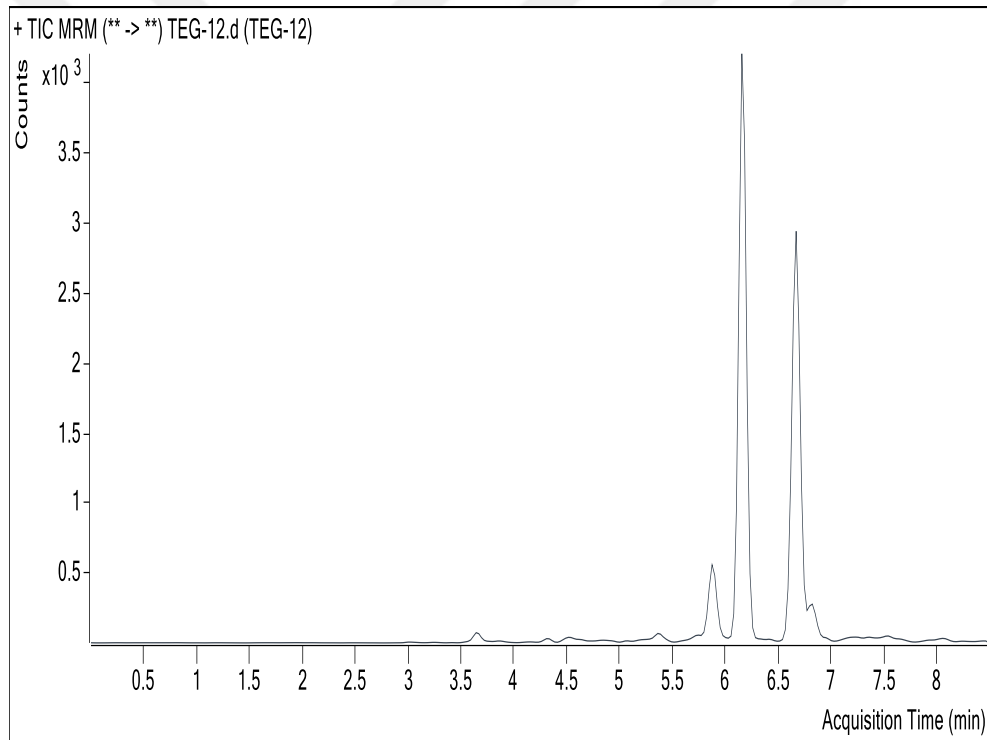
Şekil A.26. TEG-11 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 17:56 **Data File** TEG-12.d
Position P1-E4 **Sample Name** TEG-12
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



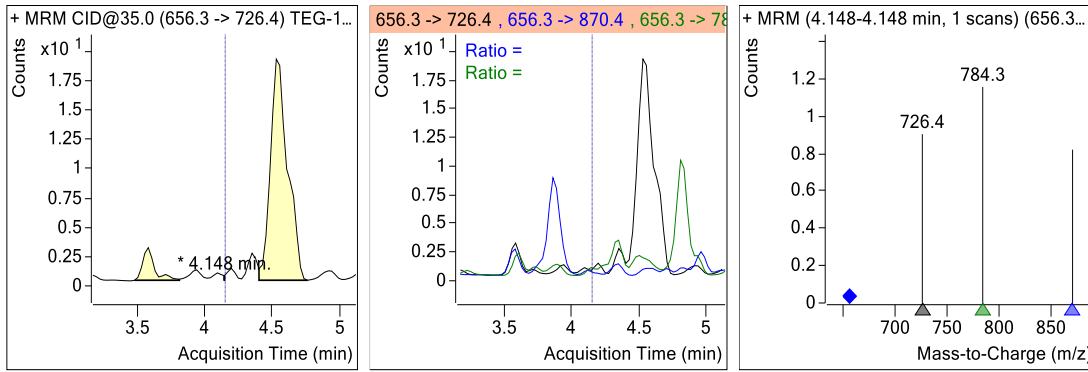
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	1032			5,0397	
SIGIR 1		6,159	11615			4,1276	

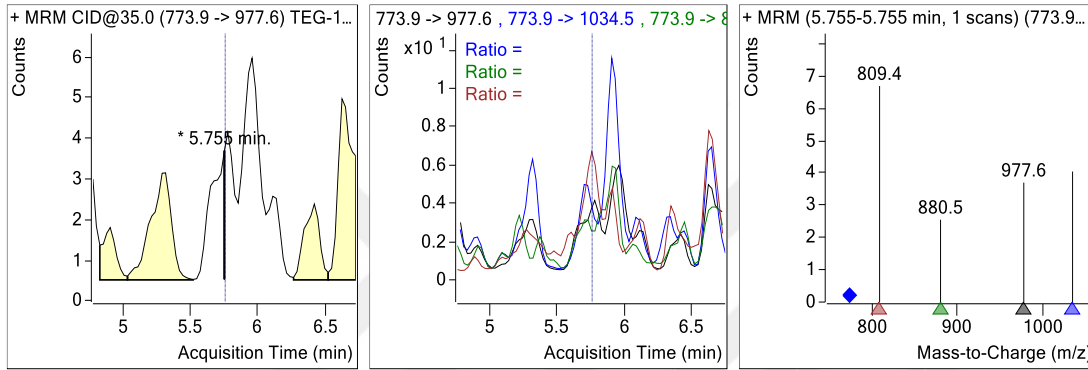
Şekil A.27. TEG-12 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

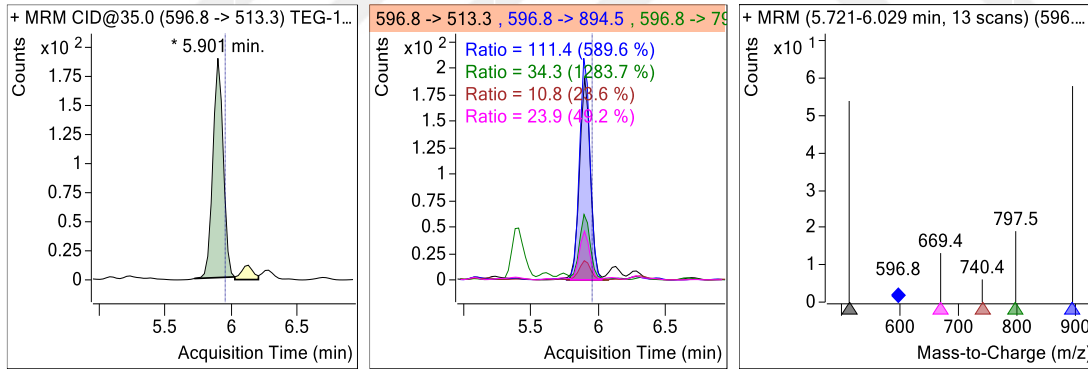
Target Compound DOMUZ 1



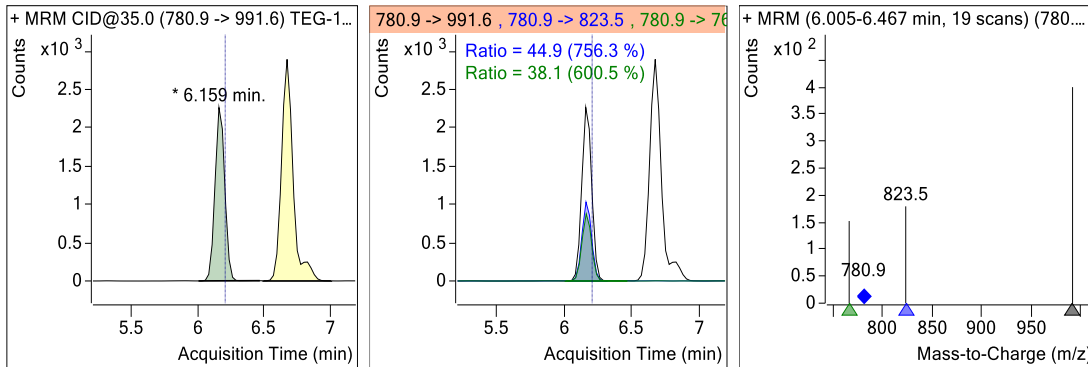
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



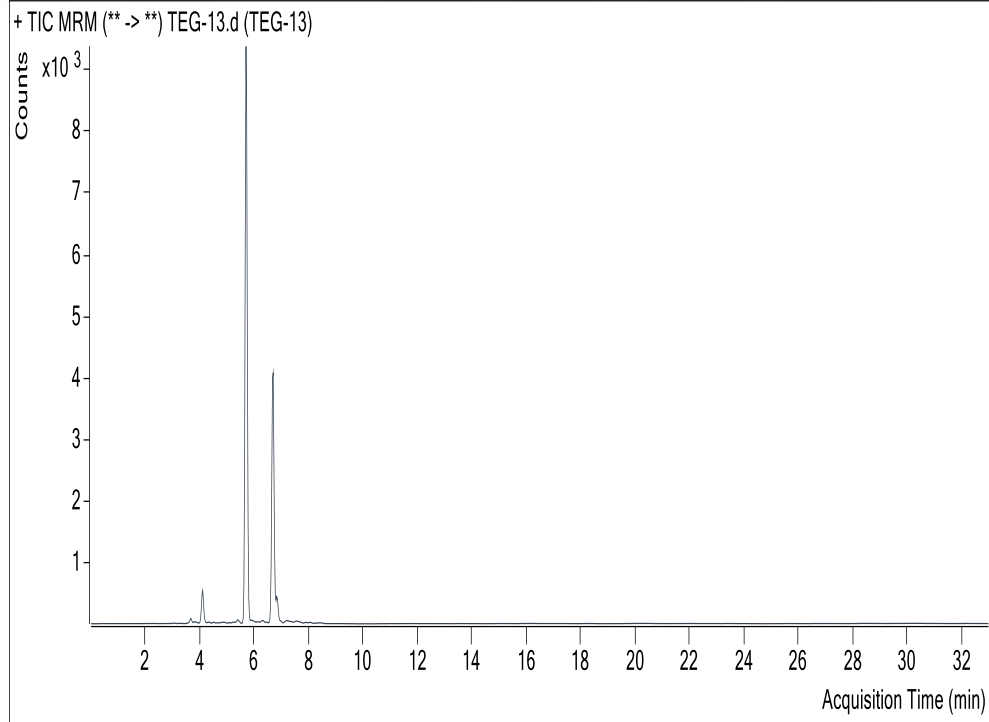
Şekil A.28. TEG-12 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 19:12 **Data File** TEG-13.d
Position P1-F1 **Sample Name** TEG-13
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



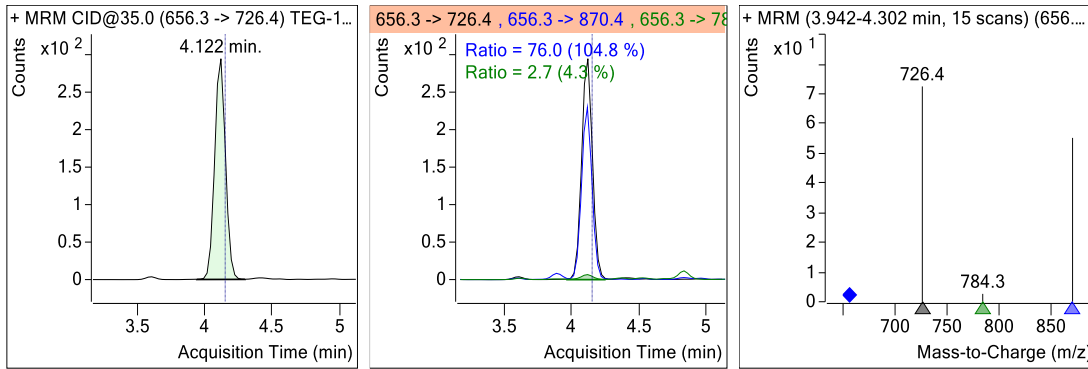
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	1651			1,1942	
DOMUZ 2		5,704	21979			5,2249	
SIGIR 2		5,952	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

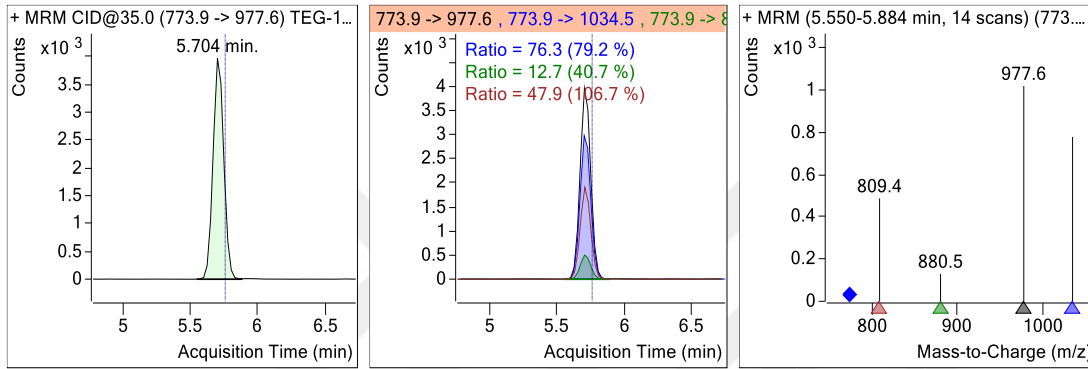
Şekil A.29. TEG-13 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

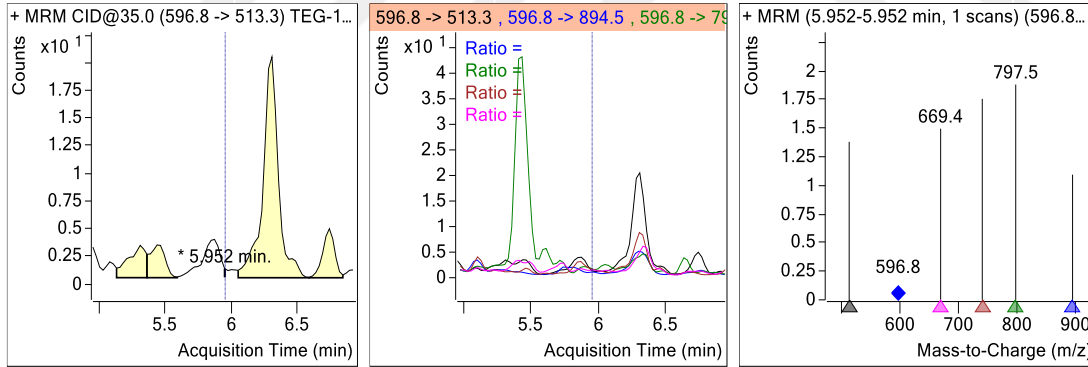
Target Compound DOMUZ 1



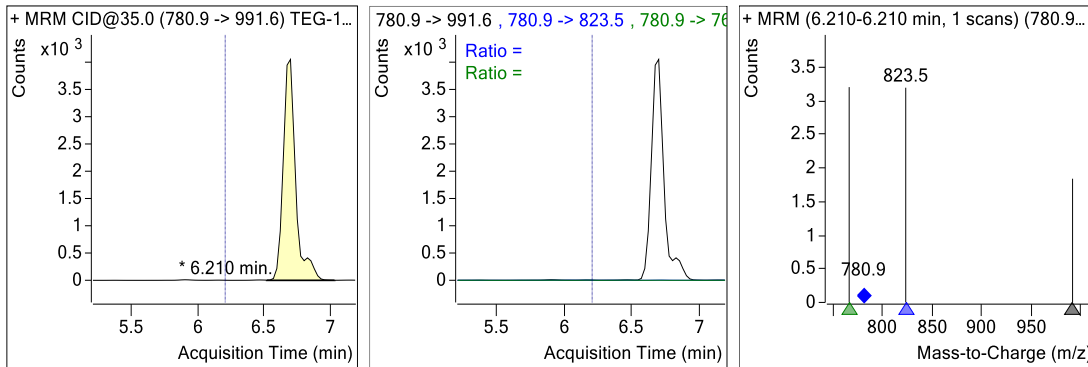
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



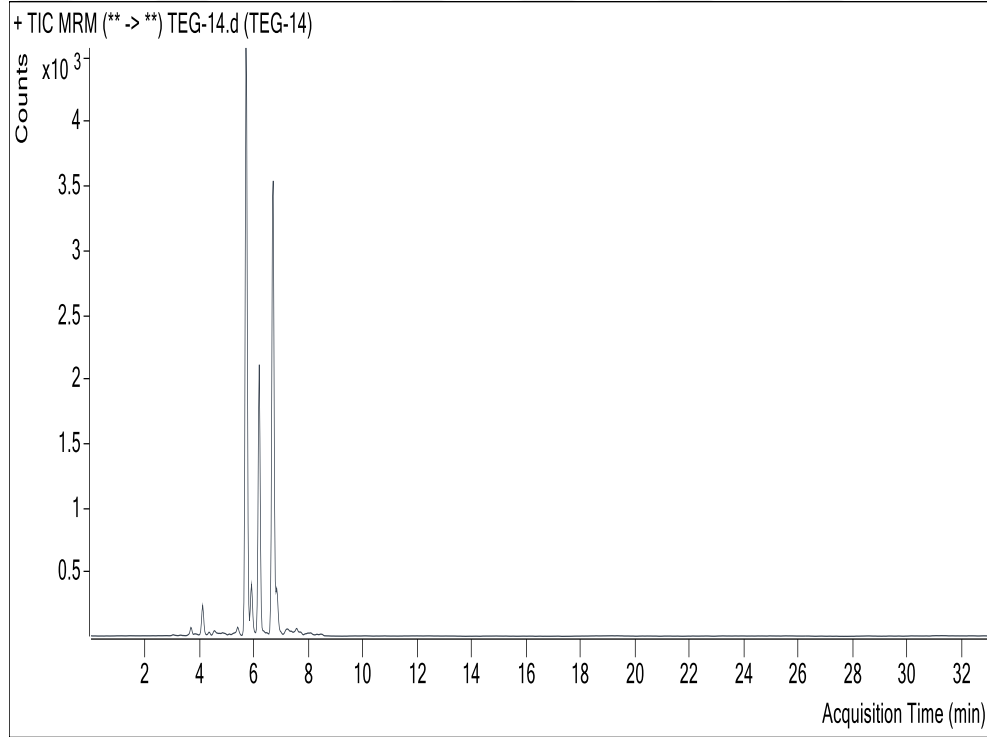
Şekil A.30. TEG-13 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 19:45 **Data File** TEG-14.d
Position P1-F2 **Sample Name** TEG-14
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



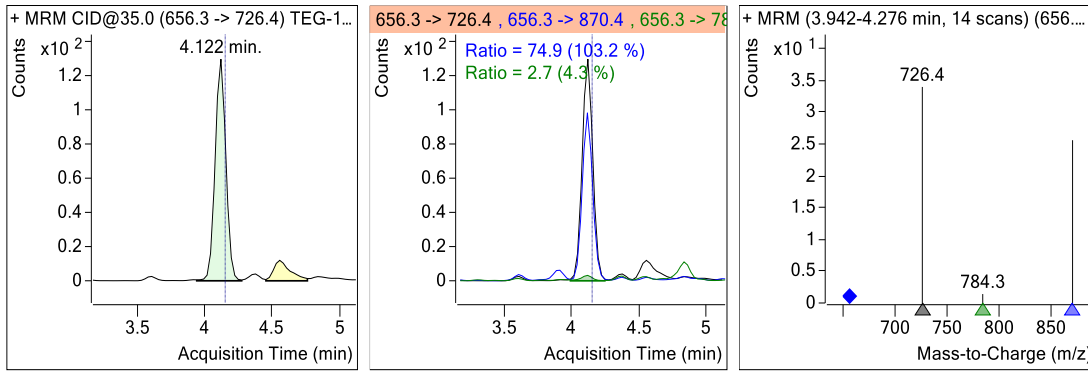
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	722			0,5225	
DOMUZ 2		5,704	10847			2,5794	
SIGIR 2		5,926	628			3,0661	
SIGIR 1		6,185	4028			1,4321	

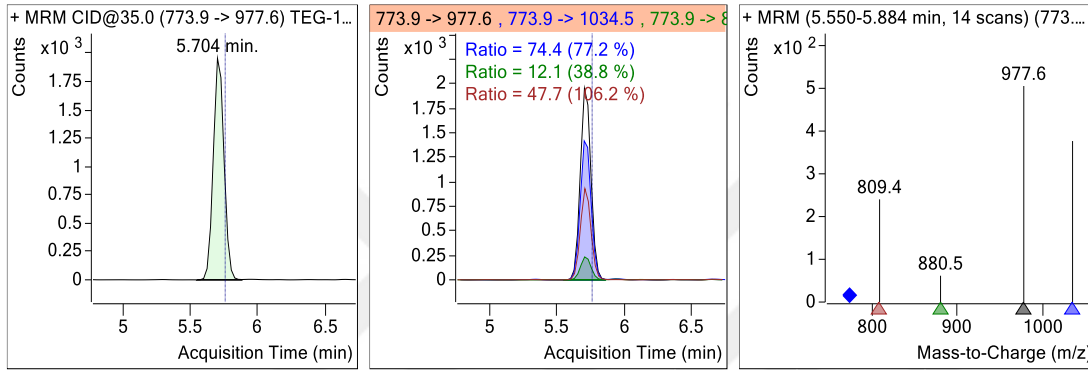
Şekil A.31. TEG-14 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

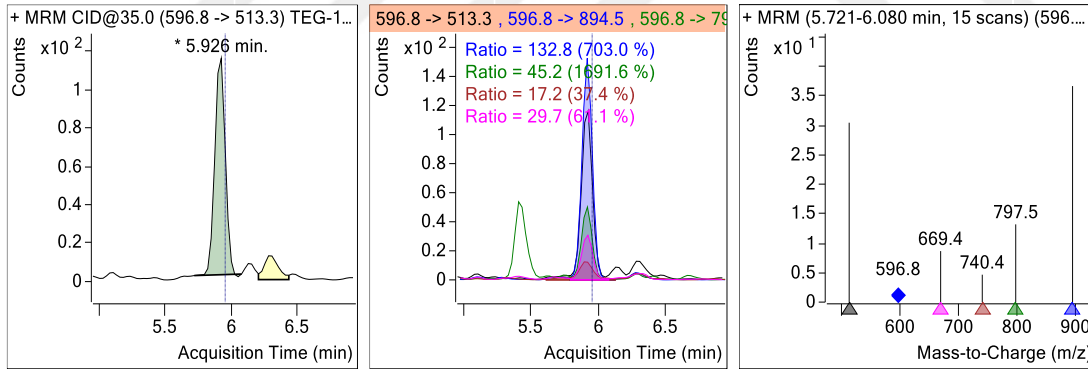
Target Compound DOMUZ 1



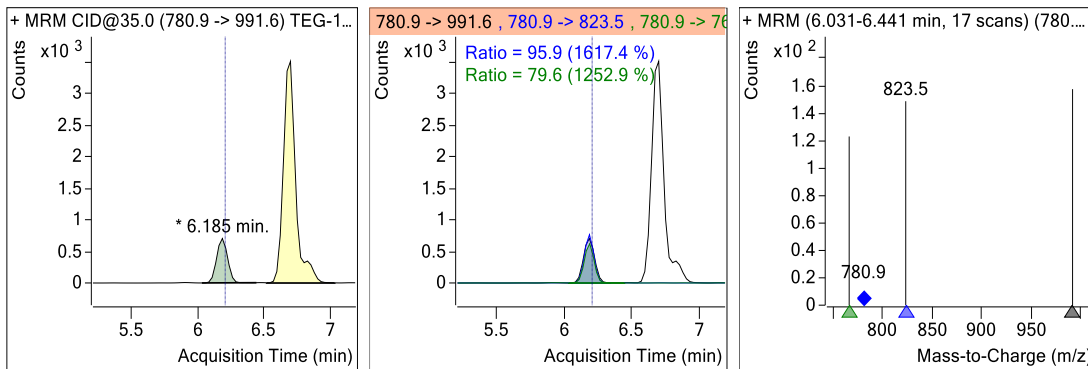
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



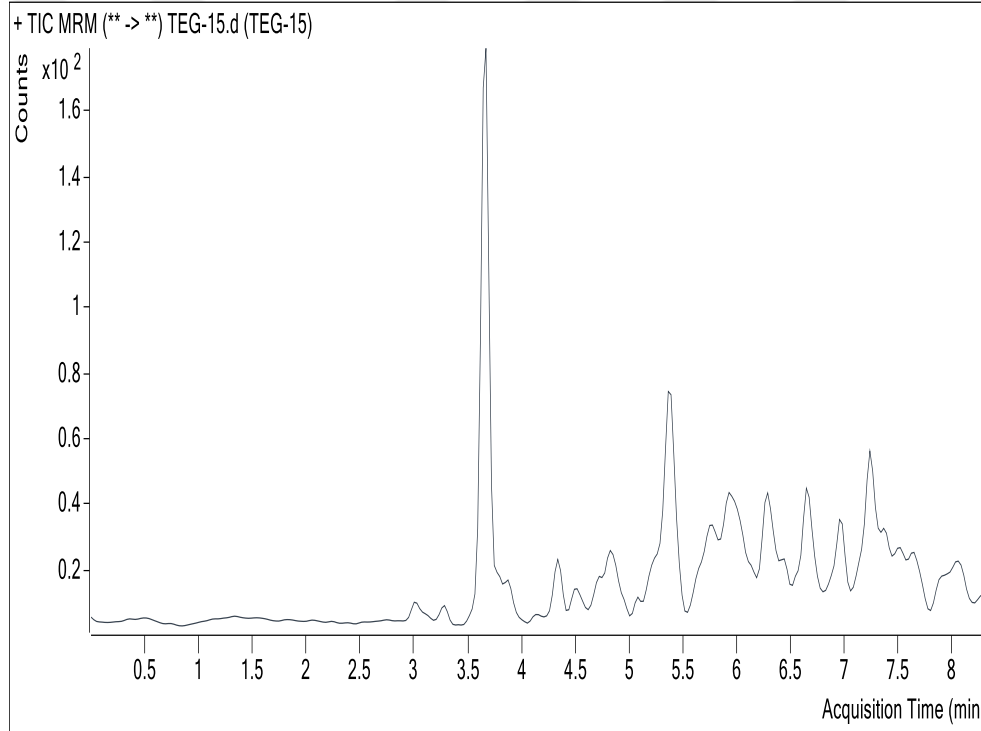
Şekil A.32. TEG-14 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 18:19 **Data File** TEG-15.d
Position P1-F3 **Sample Name** TEG-15
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



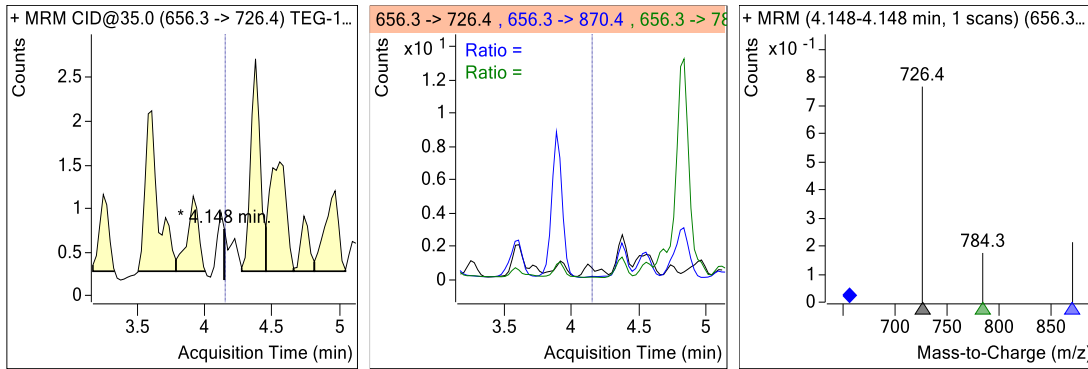
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

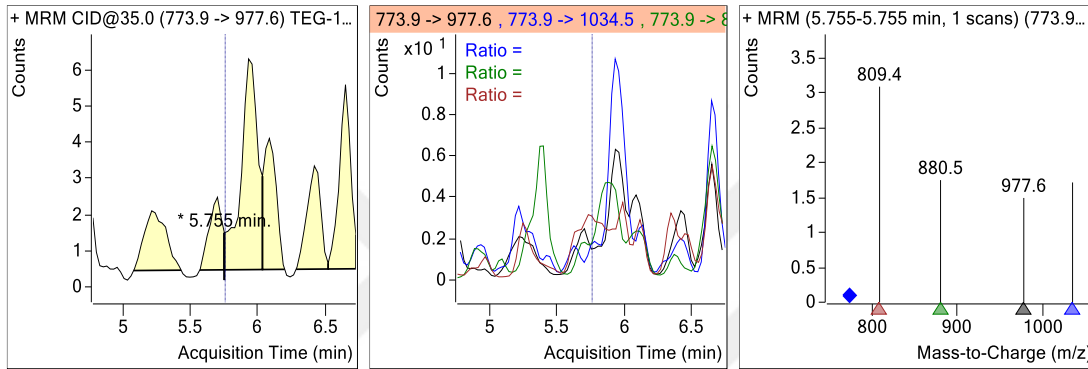
Şekil A.33. TEG-15 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

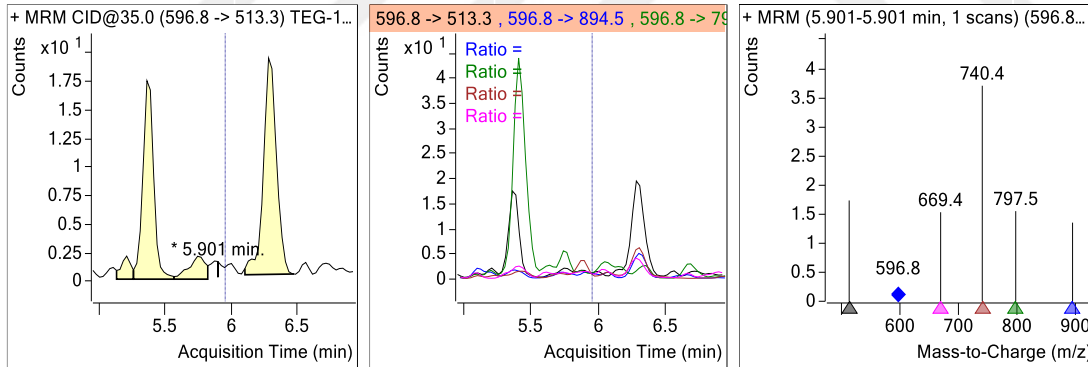
Target Compound DOMUZ 1



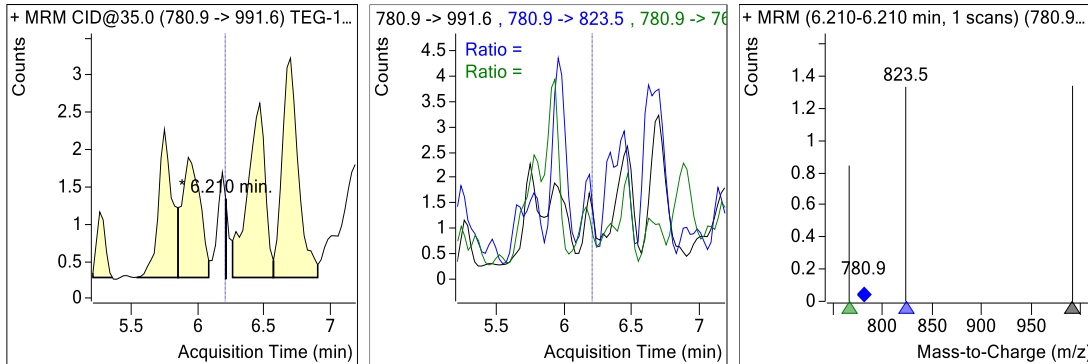
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



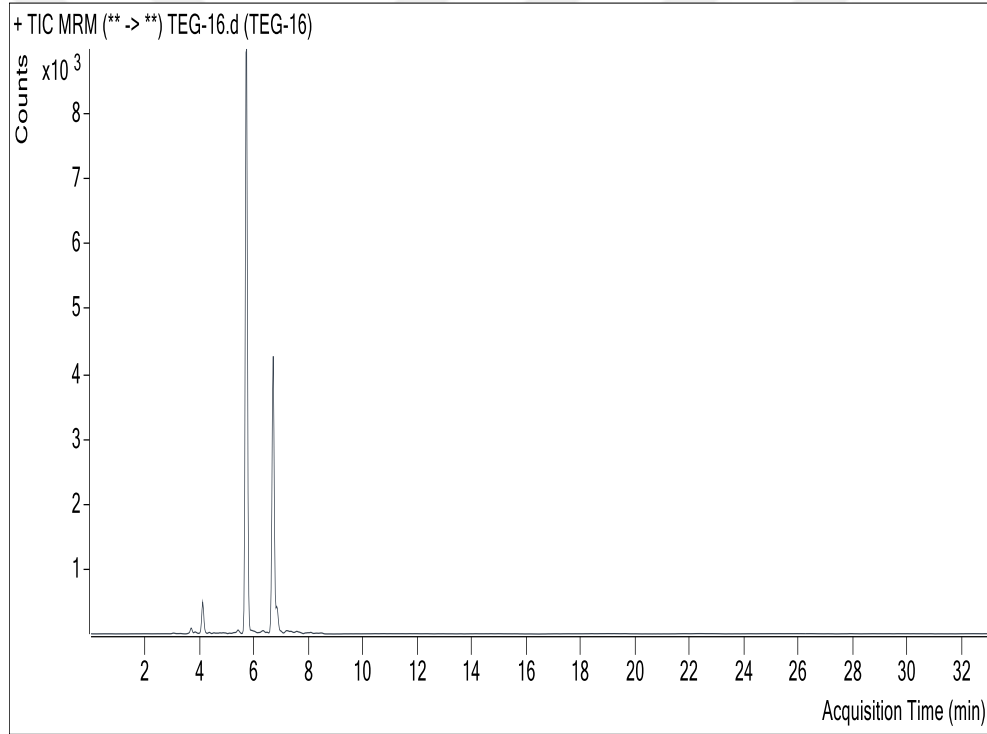
Şekil A.34. TEG-15 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 20:19 **Data File** TEG-16.d
Position P1-F4 **Sample Name** TEG-16
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



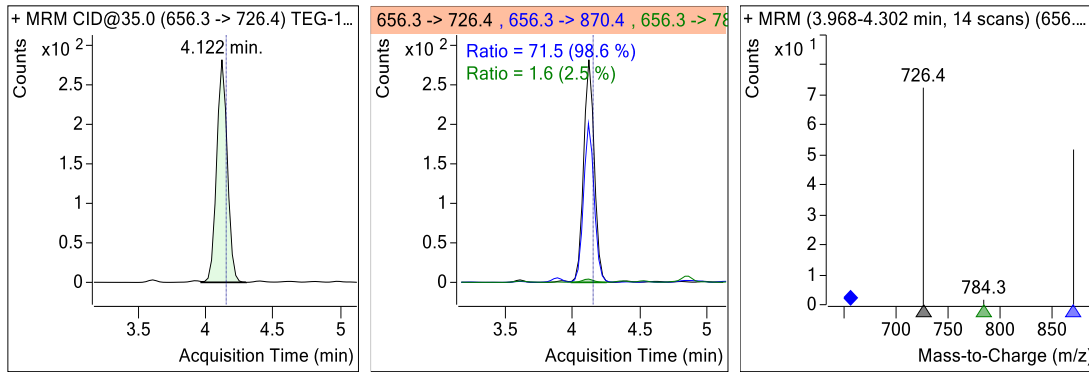
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	1549			1,1207	
DOMUZ 2		5,730	22199			5,2771	
SIGIR 2		5,926	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,185	1			0,0011	

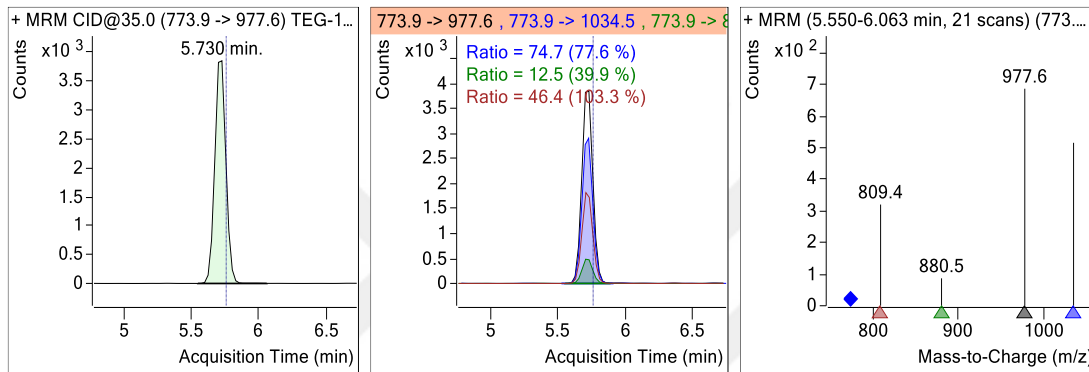
Şekil A.35. TEG-16 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

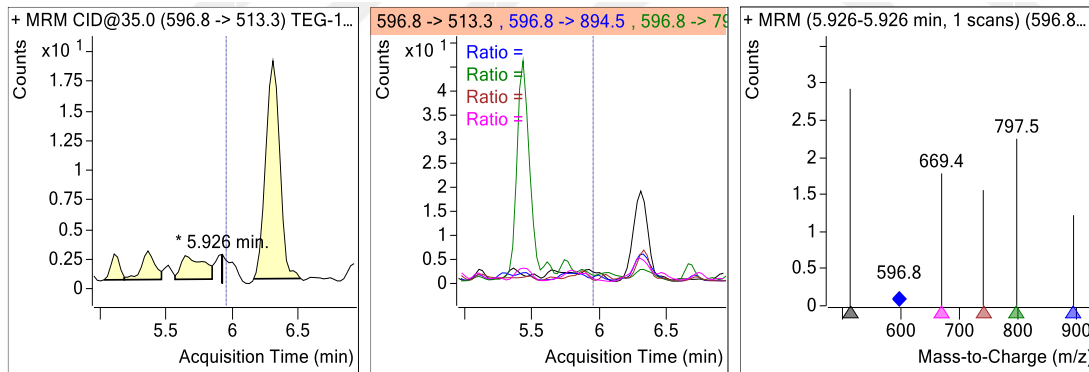
Target Compound DOMUZ 1



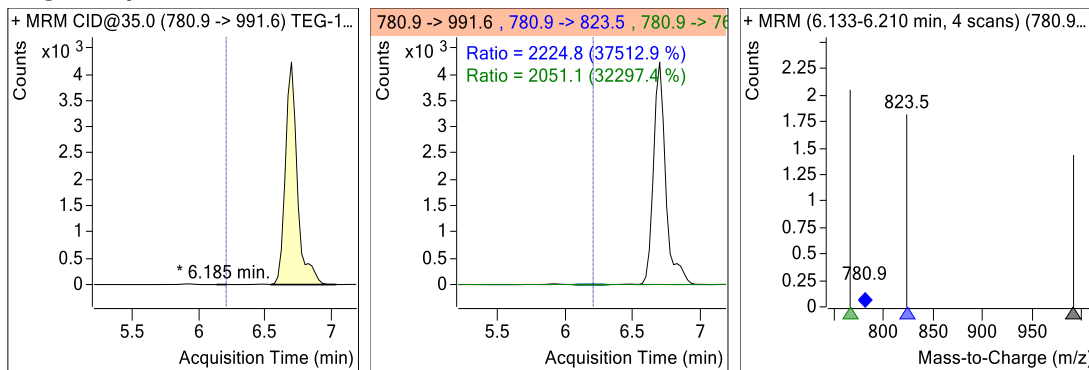
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



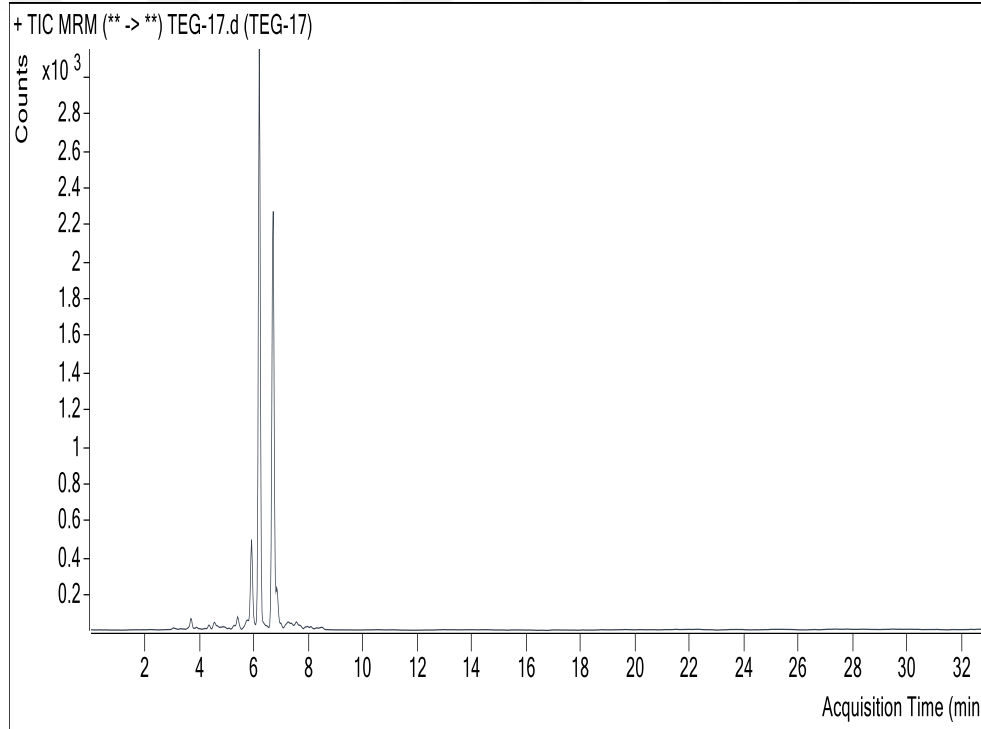
Şekil A.36. TEG-16 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 21:25 **Data File** TEG-17.d
Position P1-B1 **Sample Name** TEG-17
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



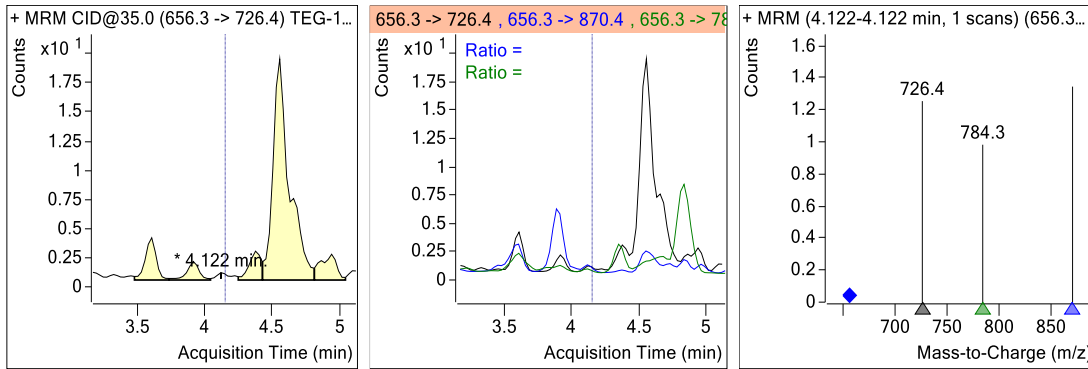
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,926	873			4,2648	
SIGIR 1		6,185	9847			3,4994	

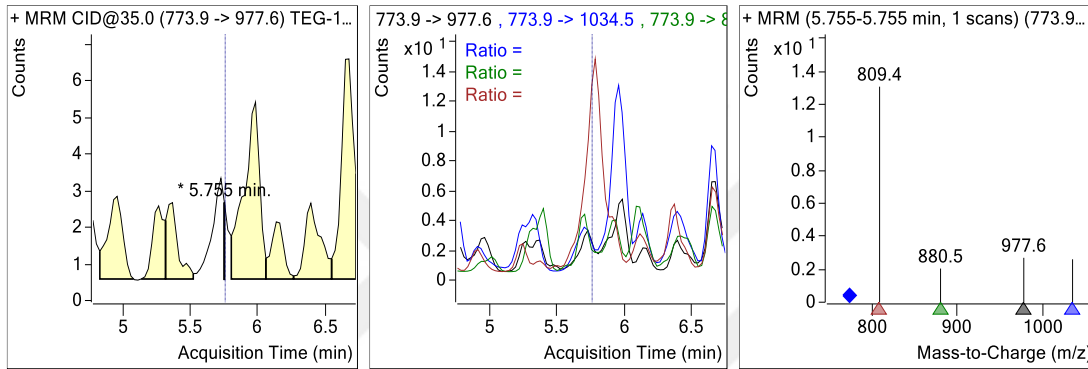
Şekil A.37. TEG-17 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

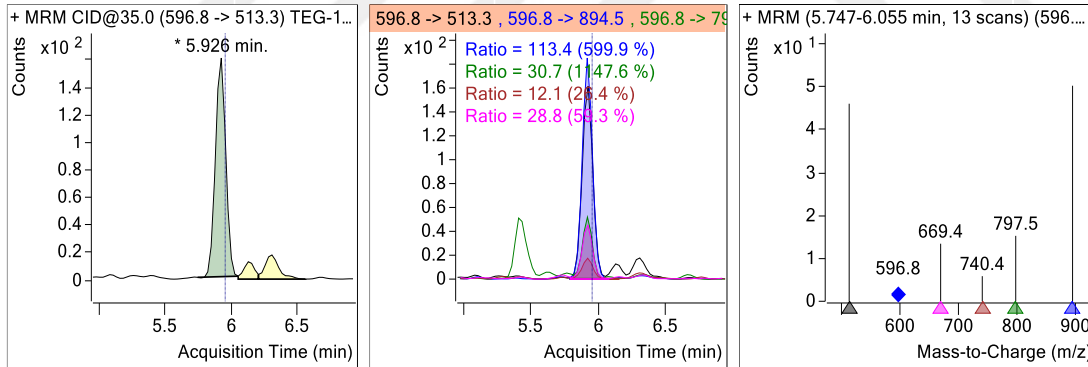
Target Compound DOMUZ 1



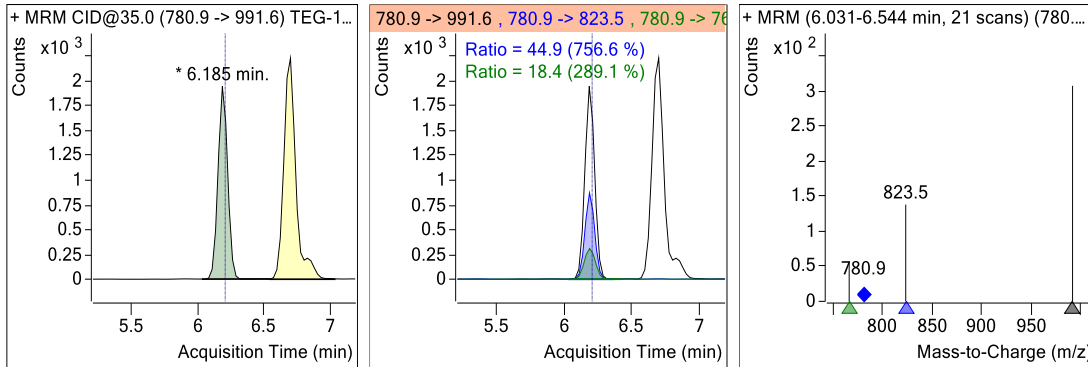
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



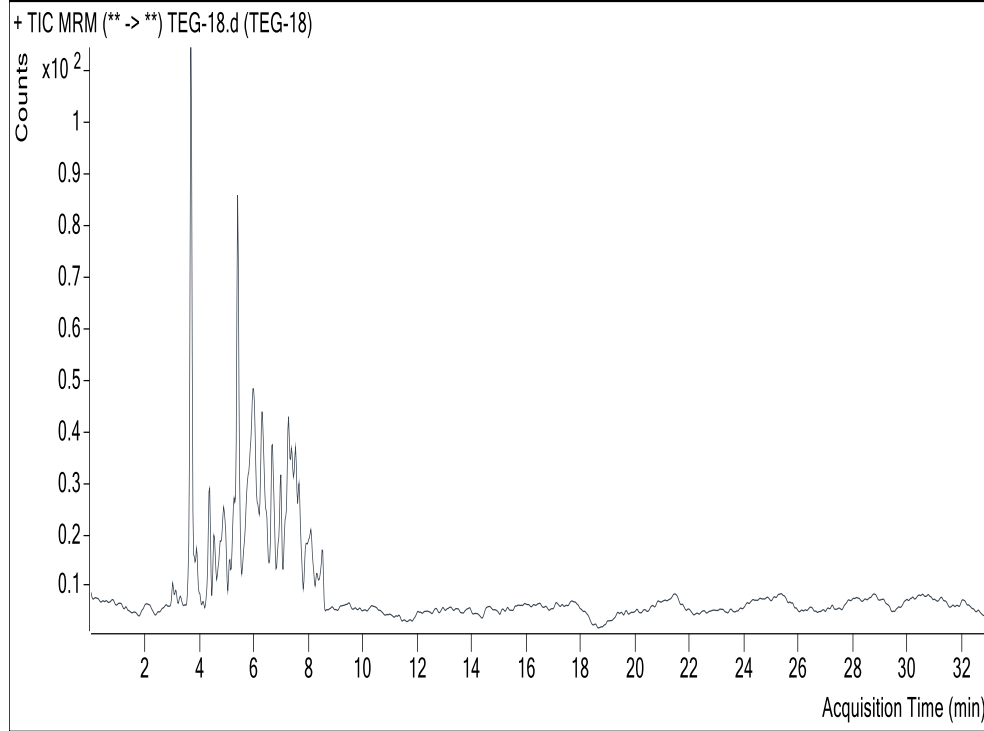
Şekil A.38. TEG-17 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 21:59 **Data File** TEG-18.d
Position P1-B2 **Sample Name** TEG-18
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



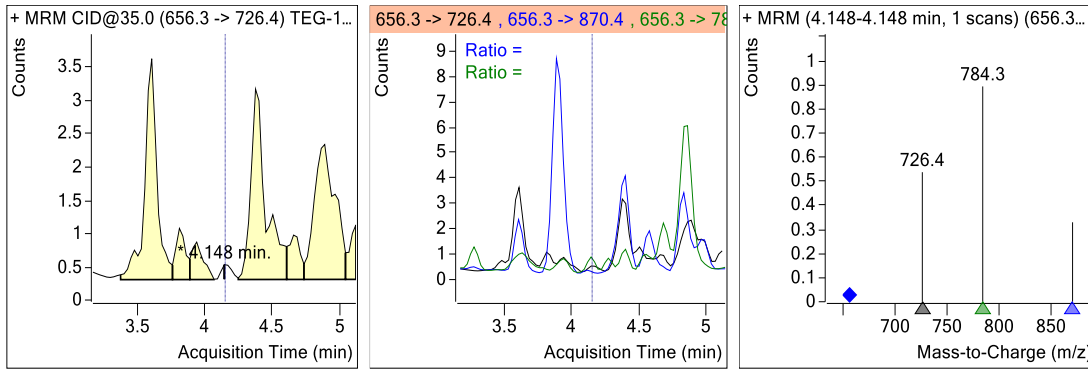
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,952	0			0,0000	
SIGIR 1		6,262	0		0,0000	0,0000	

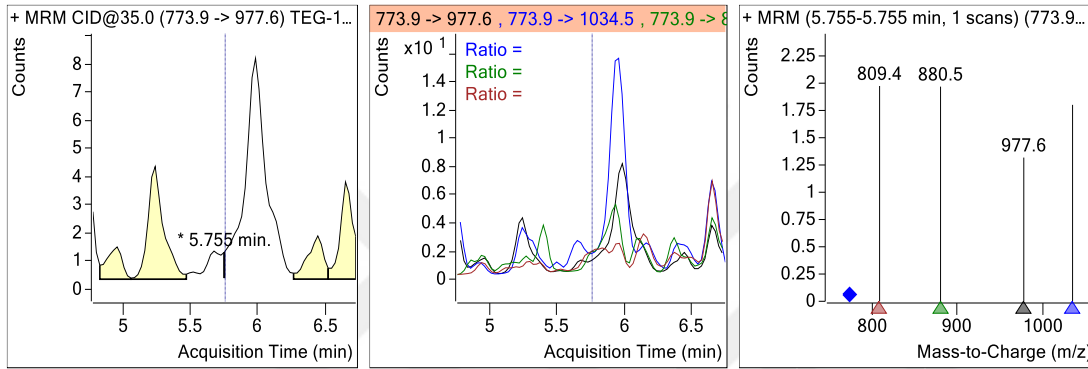
Şekil A.39. TEG-18 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

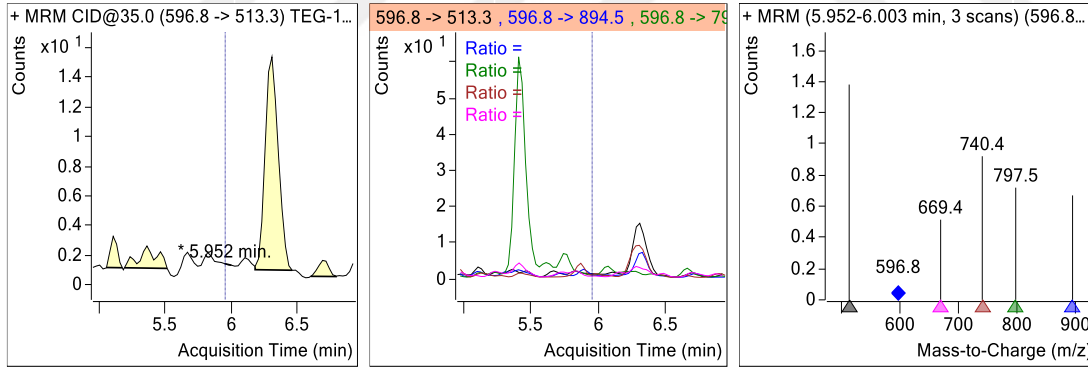
Target Compound DOMUZ 1



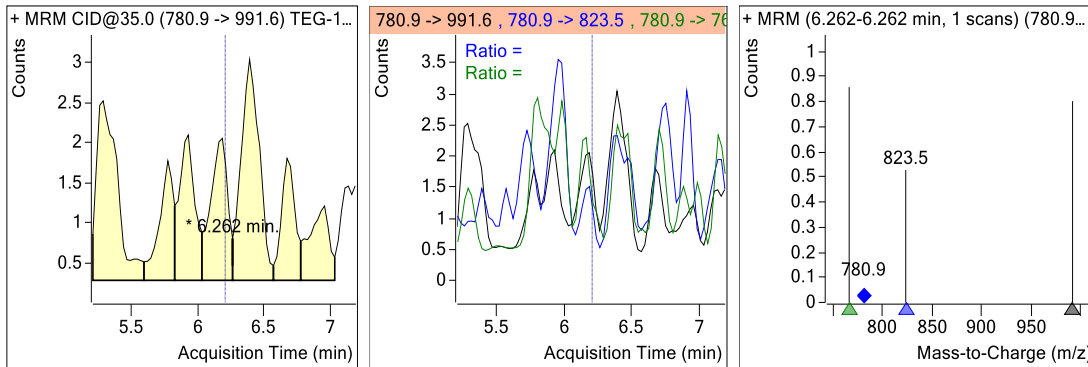
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



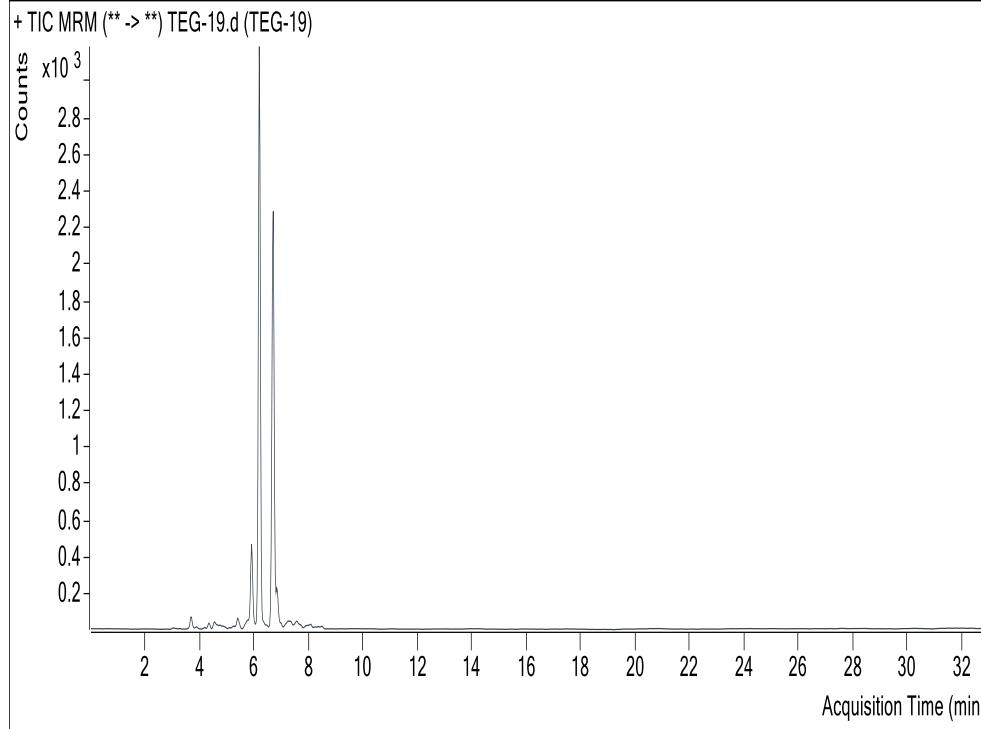
Şekil A.40. TEG-18 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 22:32 **Data File** TEG-19.d
Position P1-B3 **Sample Name** TEG-19
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



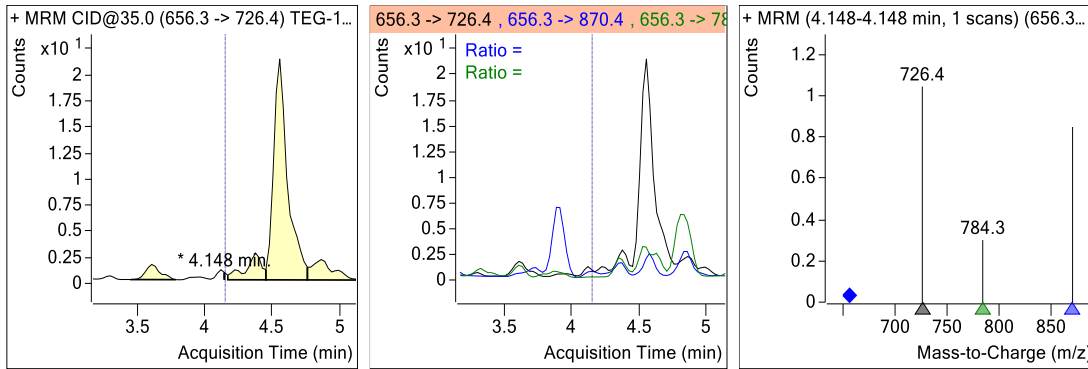
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,926	748			3,6536	
SIGIR 1		6,185	9783			3,4768	

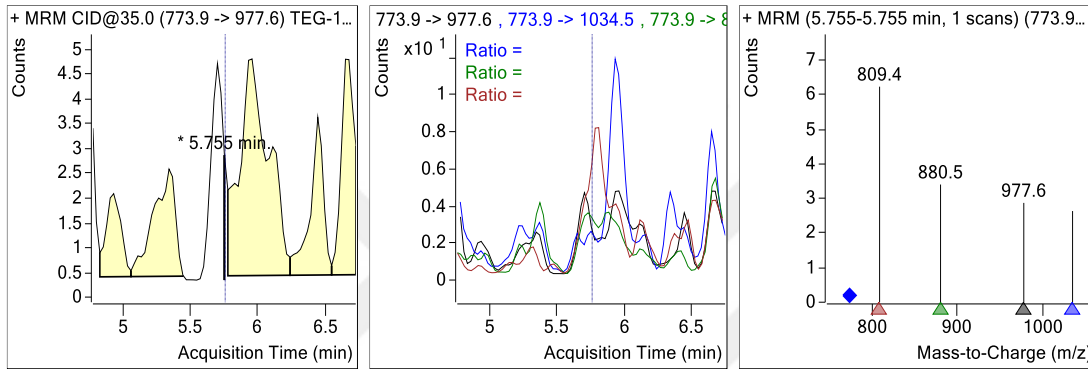
Şekil A.41. TEG-19 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

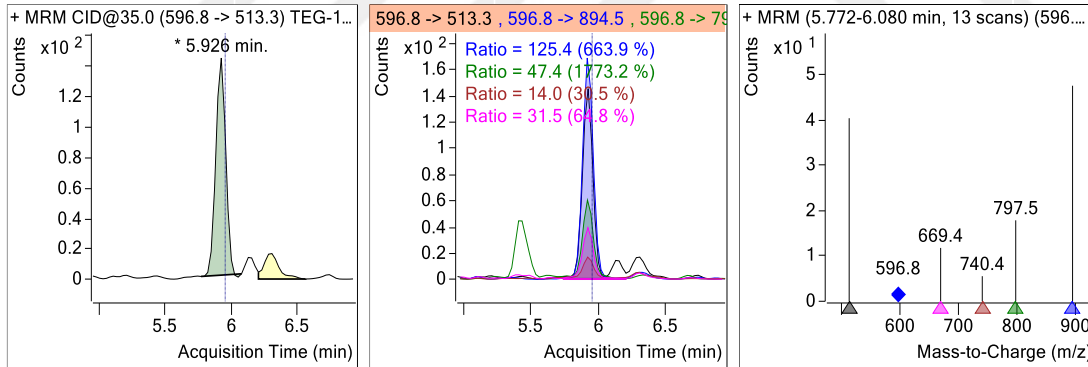
Target Compound DOMUZ 1



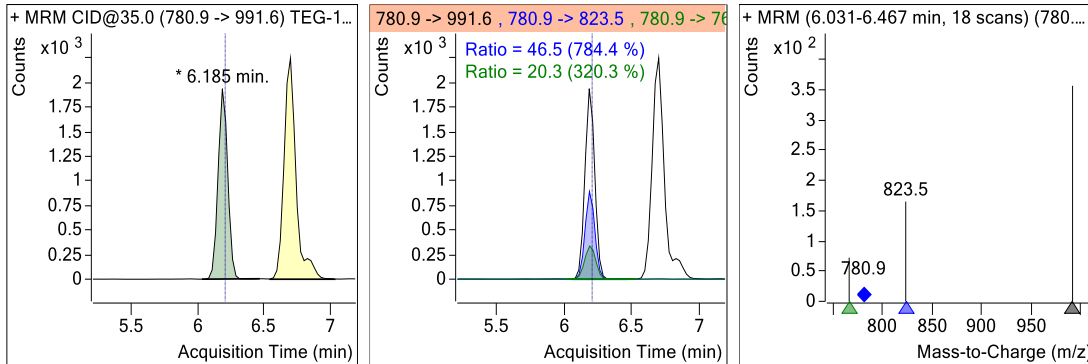
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



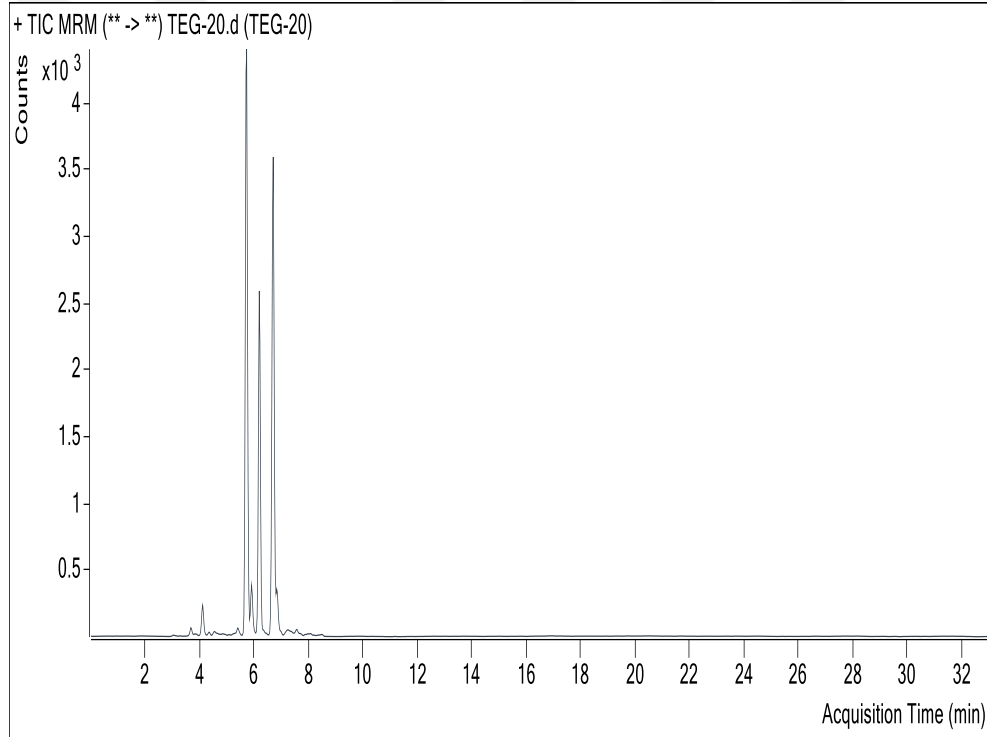
Şekil A.42. TEG-19 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-23 23:06 **Data File** TEG-20.d
Position P1-B4 **Sample Name** TEG-20
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



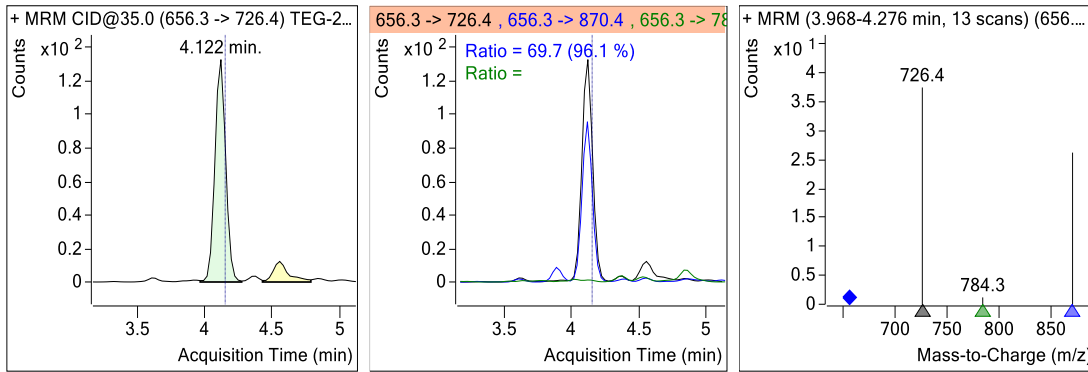
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	740			0,5358	
DOMUZ 2		5,730	10510			2,4994	
SIGIR 2		5,926	608			2,9681	
SIGIR 1		6,185	8063			2,8657	

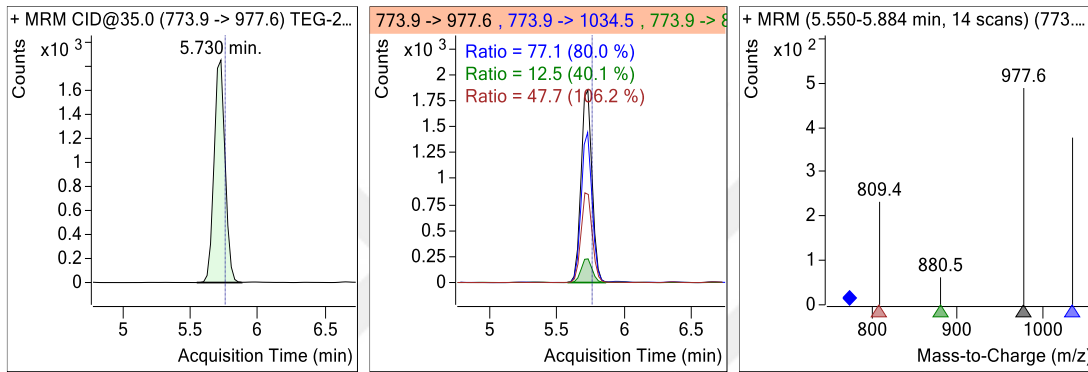
Şekil A.43. TEG-20 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

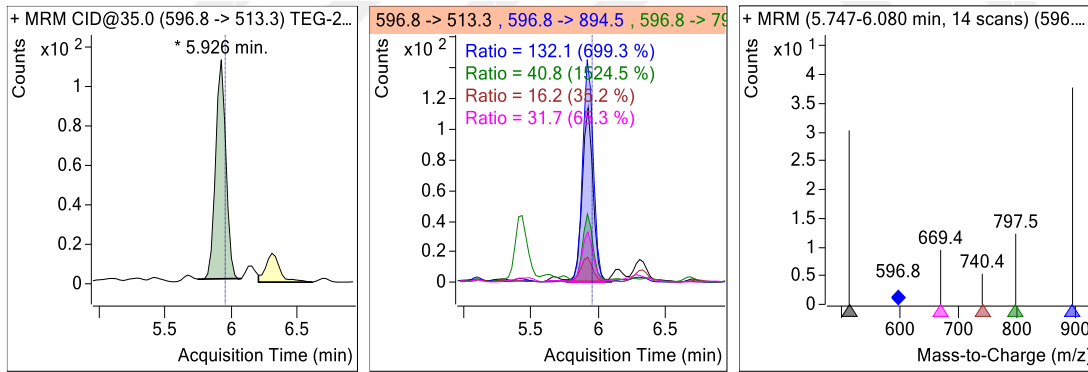
Target Compound DOMUZ 1



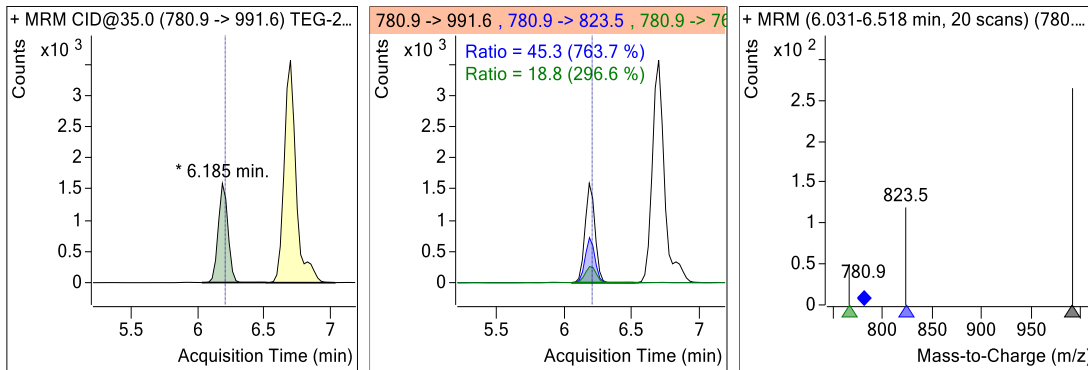
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



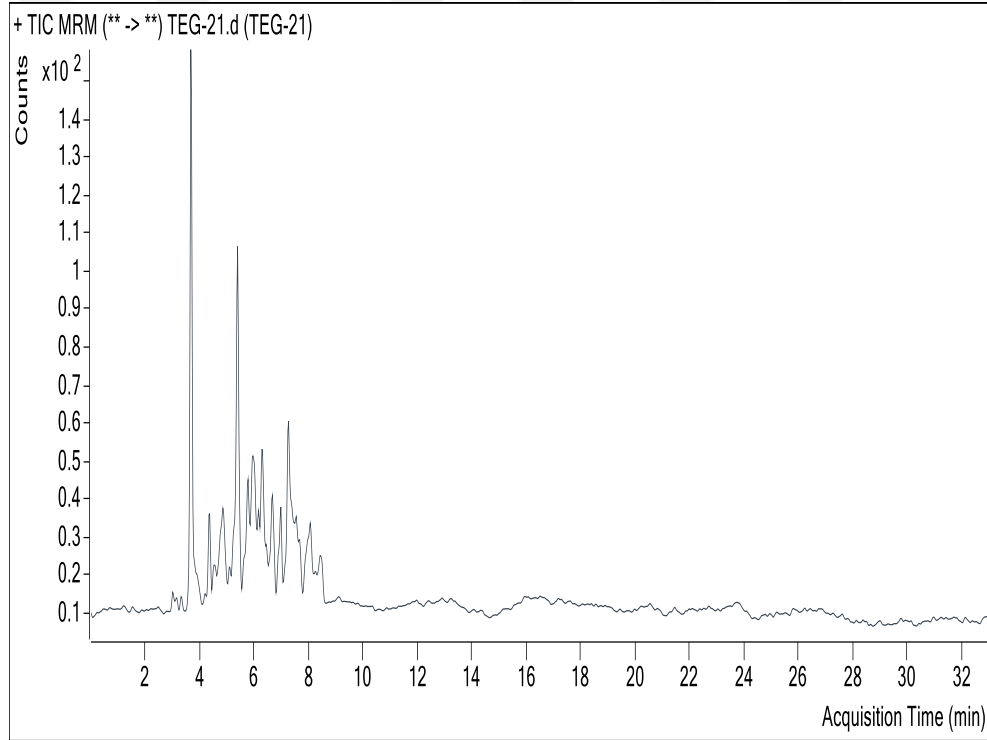
Şekil A.44. TEG-20 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-24 00:13 **Data File** TEG-21.d
Position P1-B5 **Sample Name** TEG-21
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



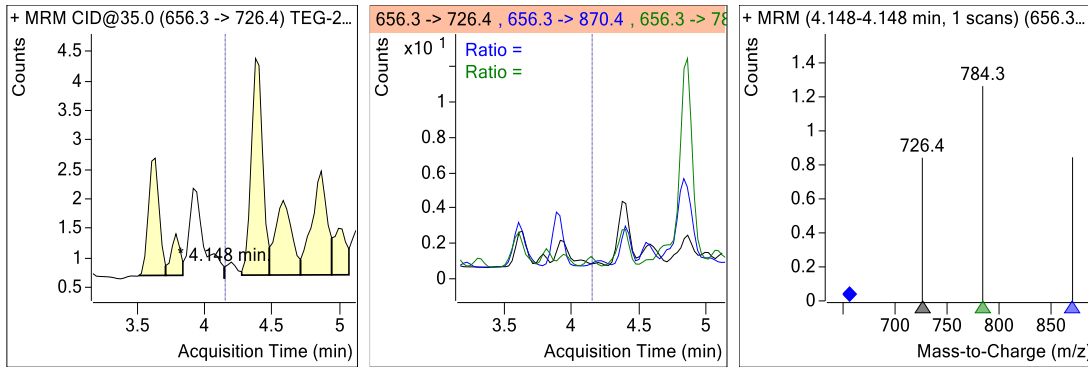
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	0			0,0000	
SIGIR 1		6,185	0		0,0000	0,0000	

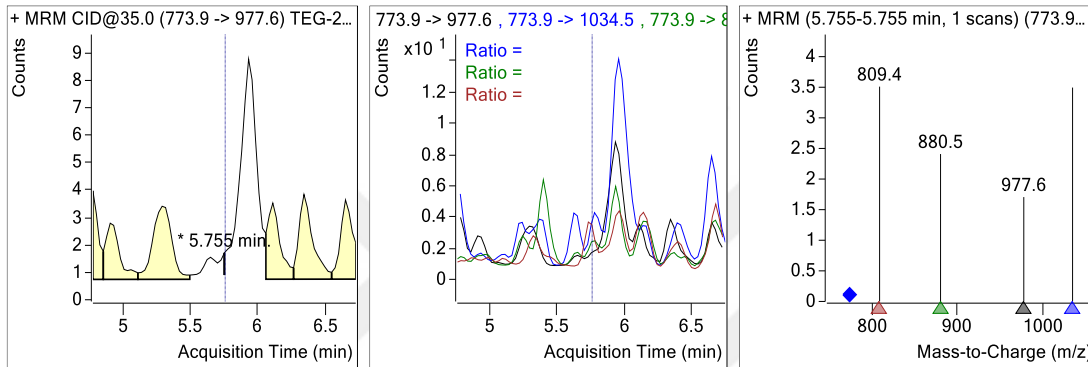
Şekil A.45. TEG-21 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

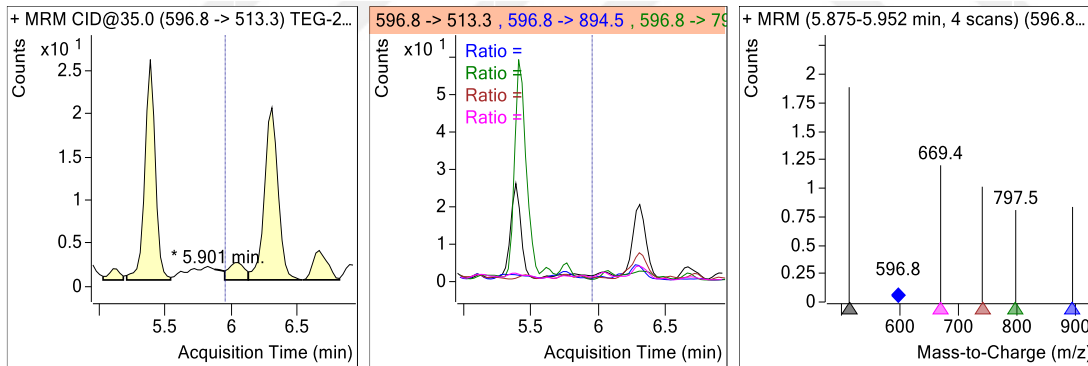
Target Compound DOMUZ 1



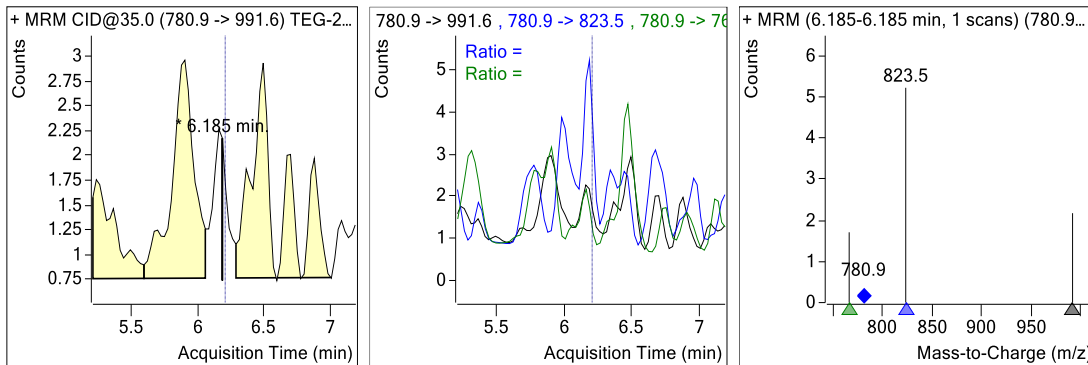
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



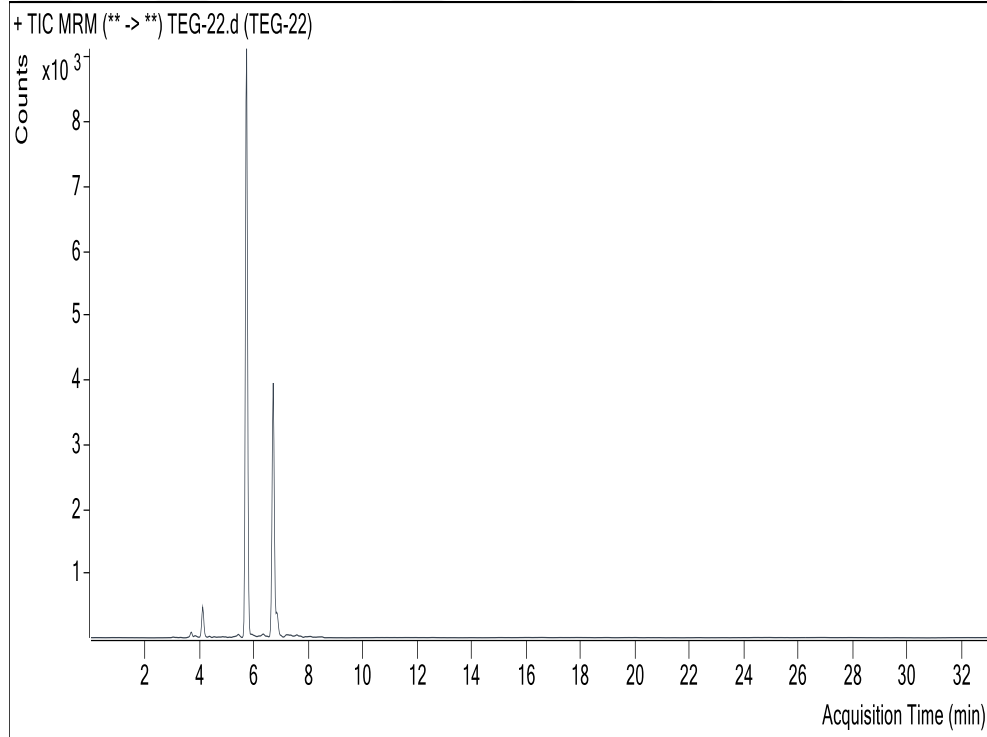
Şekil A.46. TEG-21 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-24 00:46 **Data File** TEG-22.d
Position P1-B6 **Sample Name** TEG-22
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



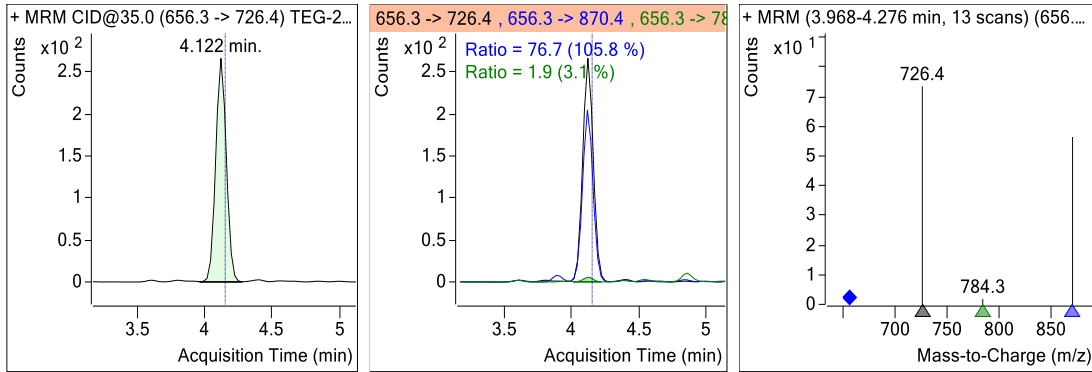
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	1462			1,0575	
DOMUZ 2		5,730	21499			5,1108	
SIGIR 2		5,926	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,185	0		0,0000	0,0000	

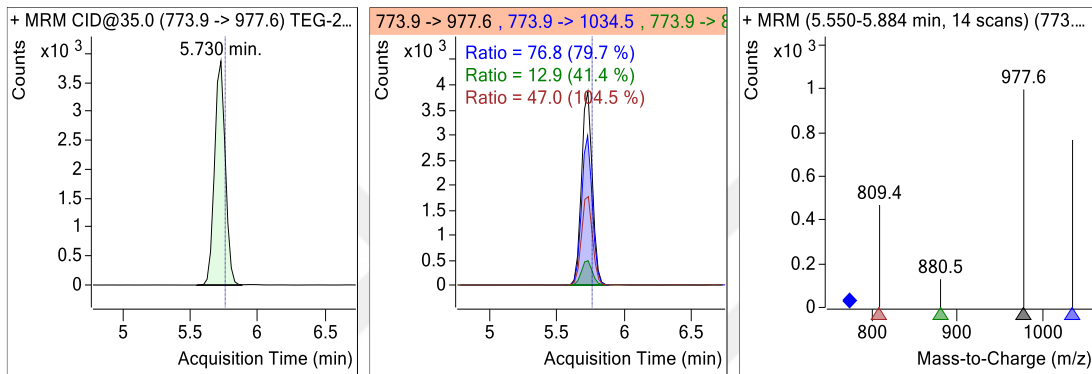
Şekil A.47. TEG-22 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

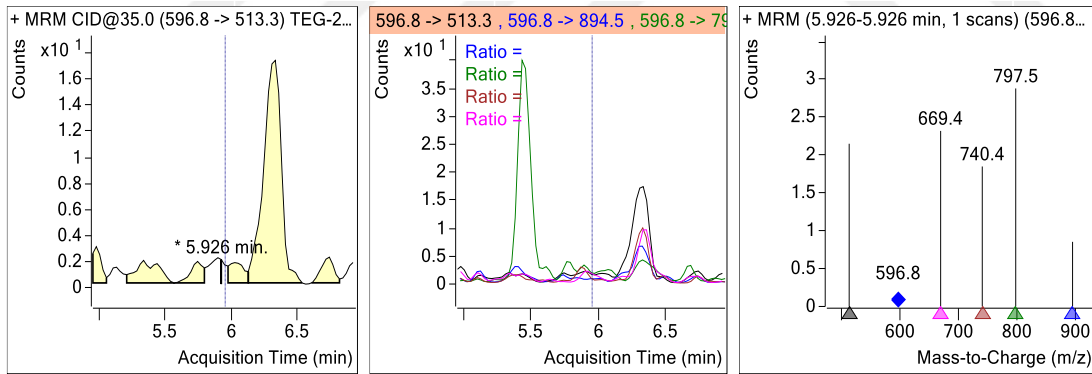
Target Compound DOMUZ 1



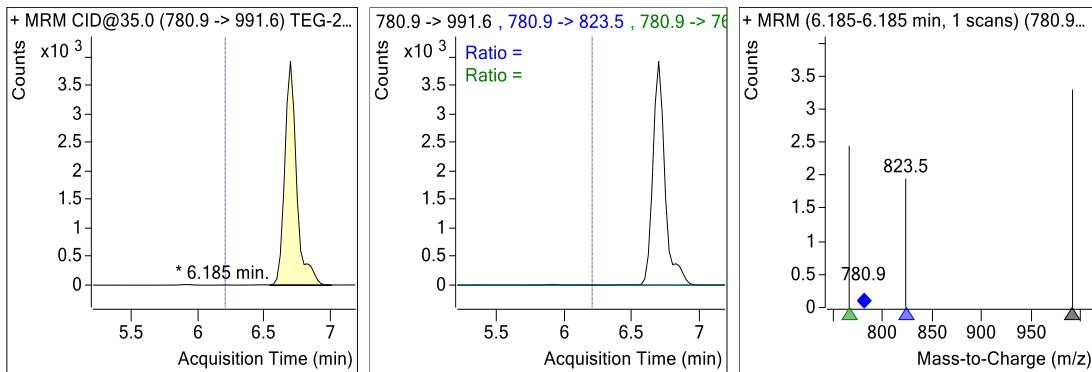
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



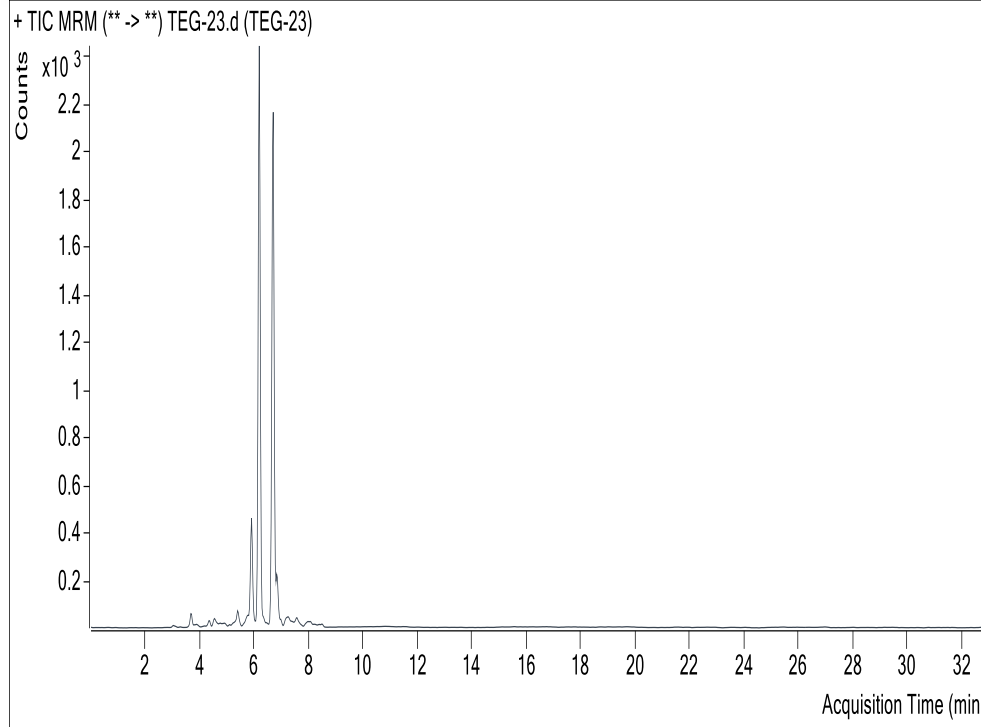
Şekil A.48. TEG-22 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-24 01:19 **Data File** TEG-23.d
Position P1-B7 **Sample Name** TEG-23
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



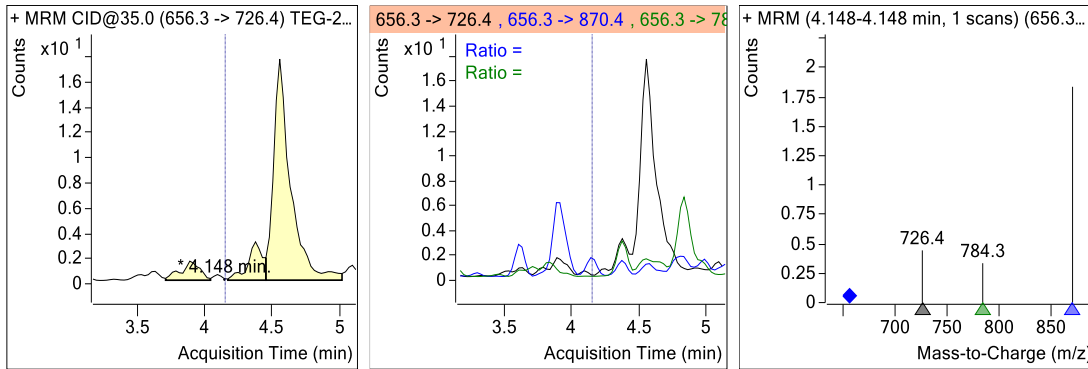
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,926	771			3,7670	
SIGIR 1		6,185	4738			1,6843	

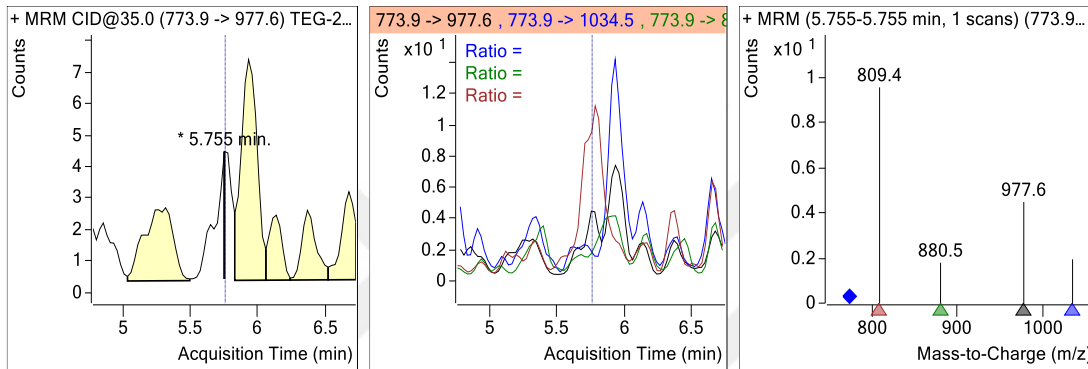
Şekil A.49. TEG-23 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

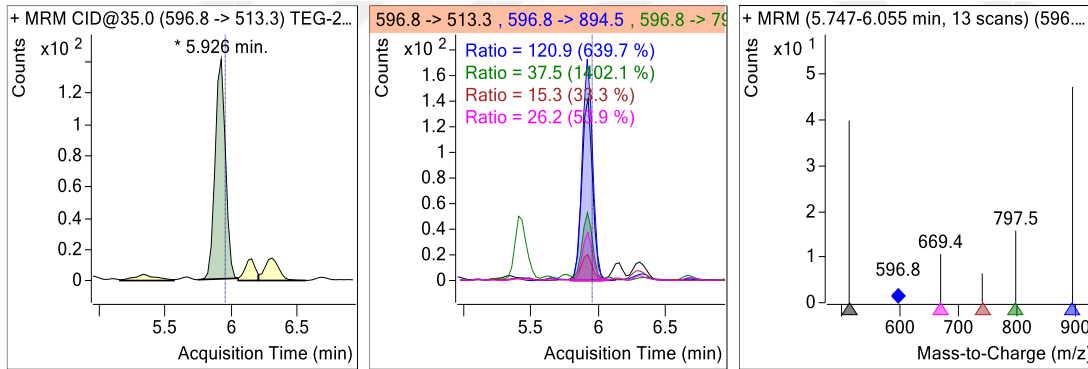
Target Compound DOMUZ 1



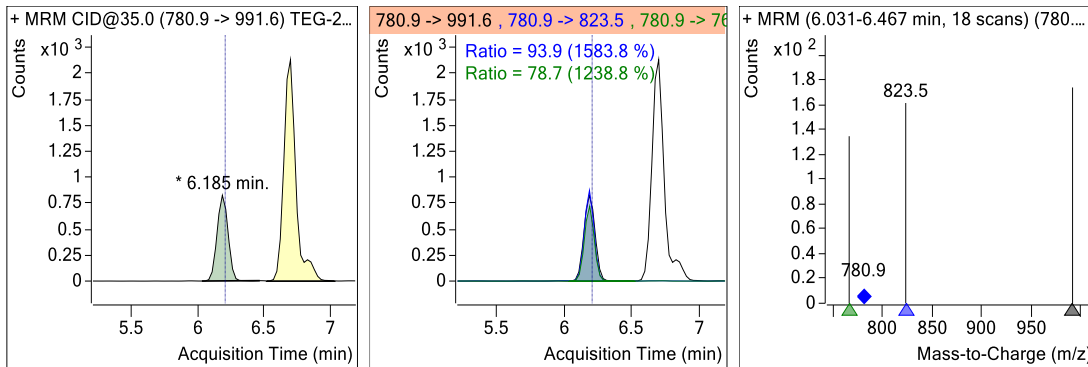
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



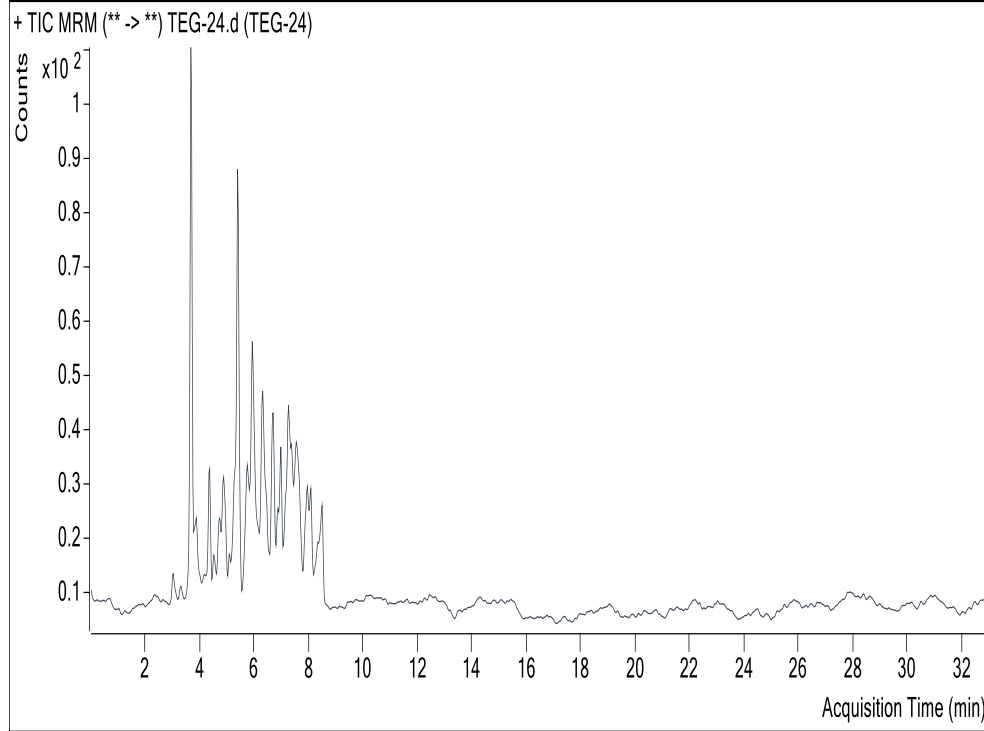
Şekil A.50. TEG-23 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-24 01:53 **Data File** TEG-24.d
Position P1-B8 **Sample Name** TEG-24
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



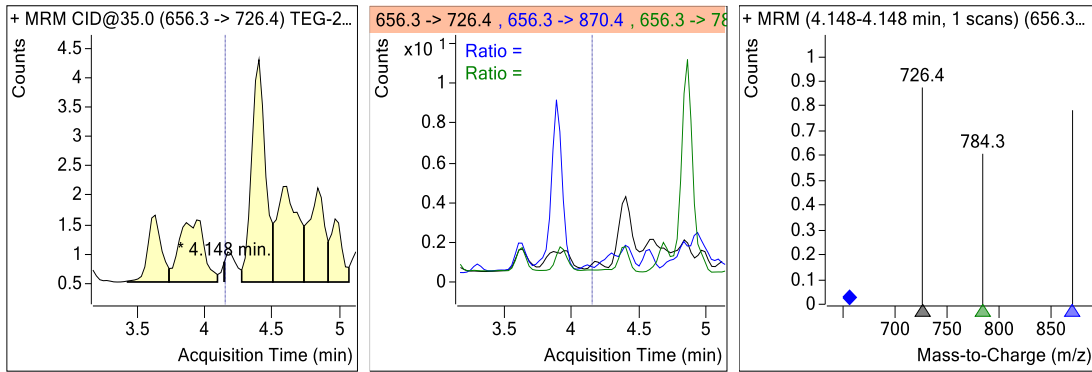
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,148	0		0,0000	0,0000	
DOMUZ 2		5,755	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 2		5,901	0		0,0000	0,0000	
SIGIR 1		6,210	0		0,0000	0,0000	

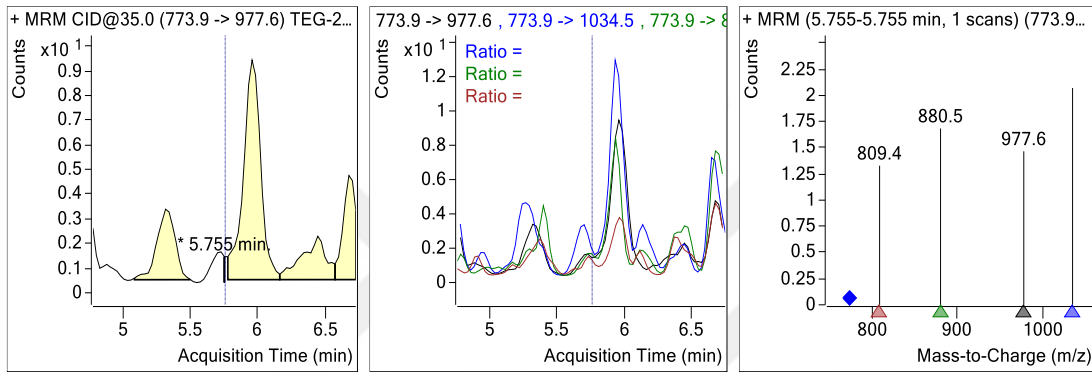
Şekil A.51. TEG-24 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

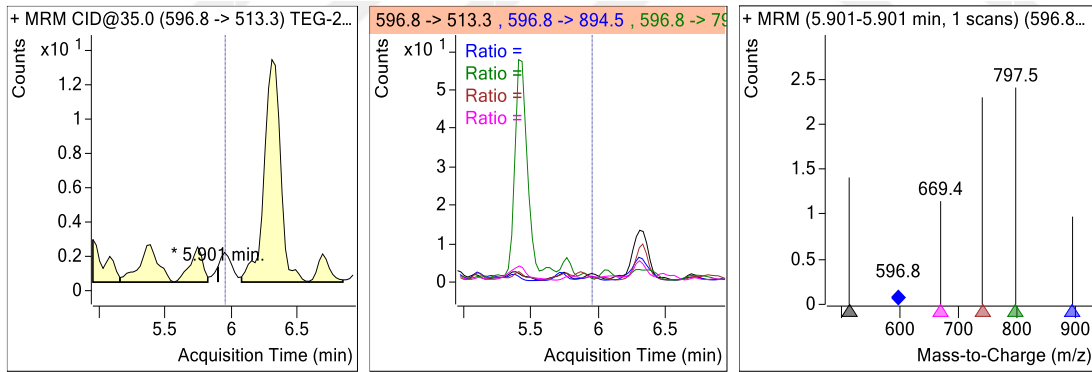
Target Compound DOMUZ 1



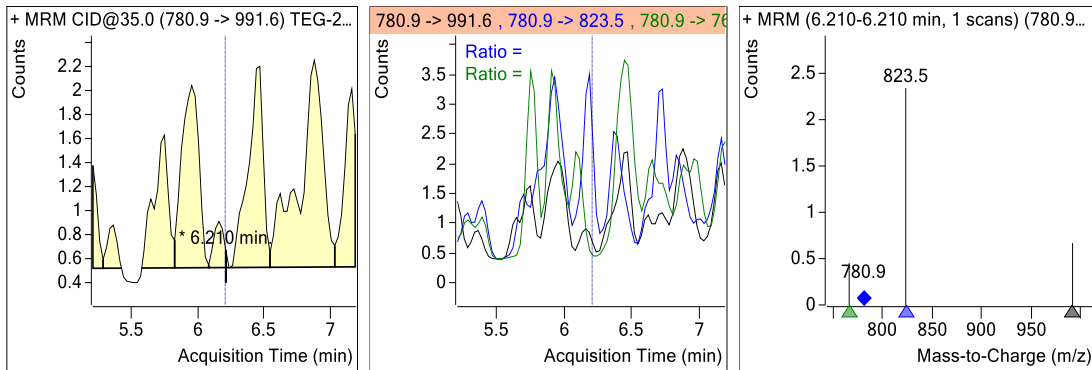
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



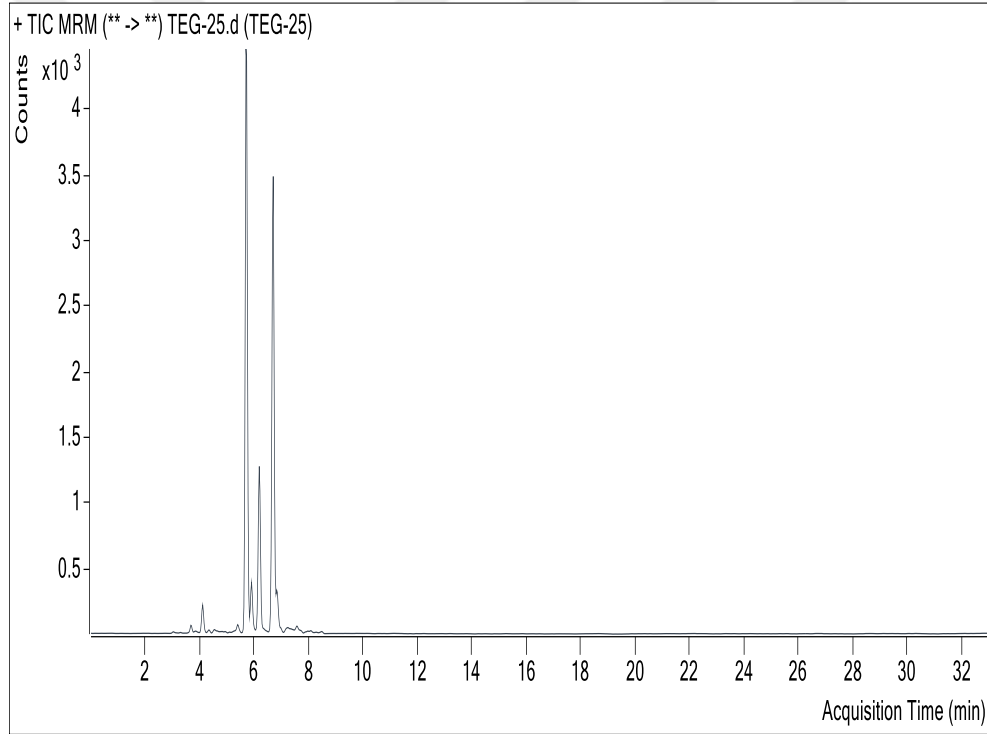
Şekil A.52. TEG-24 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

Batch Data Path D:\Projects\LCMSMS\Data\JELATIN\20250123\QuantResults\20250123.batch.bin
Analysis Time 3.24.2025 1:31 PM **Analyst Name** SYSTEM
Report Time 3.24.2025 1:31 PM **Reporter Name** SYSTEM
Last Calib Update 3.24.2025 1:31 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2025-01-24 02:26 **Data File** TEG-25.d
Position P1-B9 **Sample Name** TEG-25
Dilution 120 **Sample Info**
Inj Vol 2 **Acq Method File** Jelatin Tur Tayini20240919.m
Sample Type Sample **Comment**

Sample Chromatogram



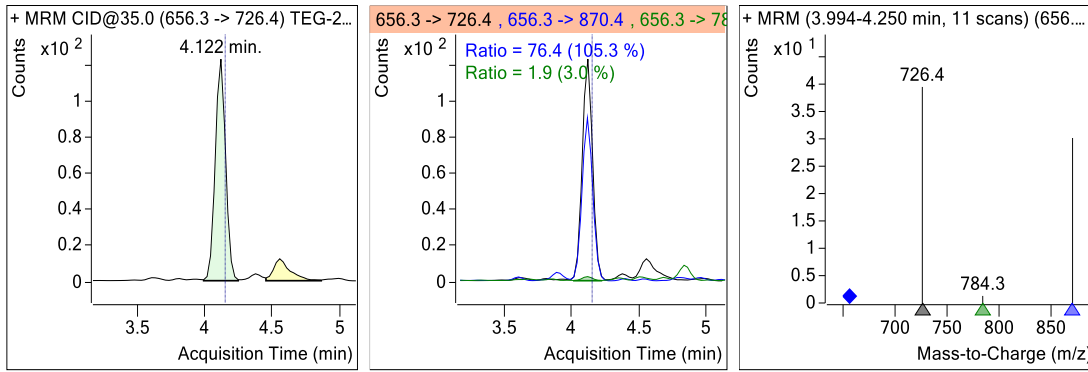
Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
DOMUZ 1		4,122	659			0,4772	
DOMUZ 2		5,704	10905			2,5932	
SIGIR 2		5,926	704			3,4393	
SIGIR 1		6,185	3845			1,3668	

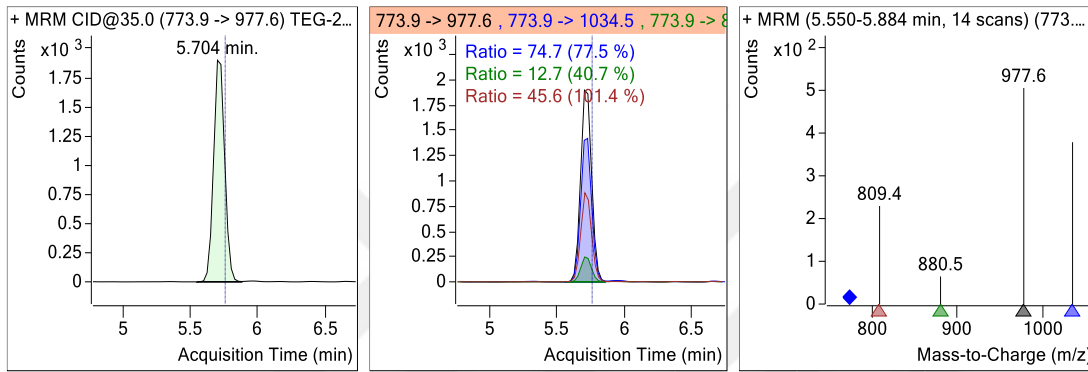
Şekil A.53. TEG-25 kromatogram görüntüsü.

Compound Graphics

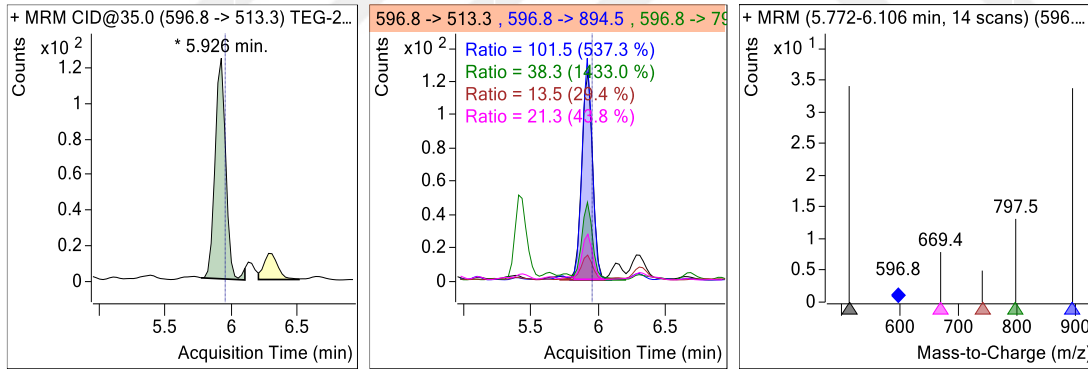
Target Compound DOMUZ 1



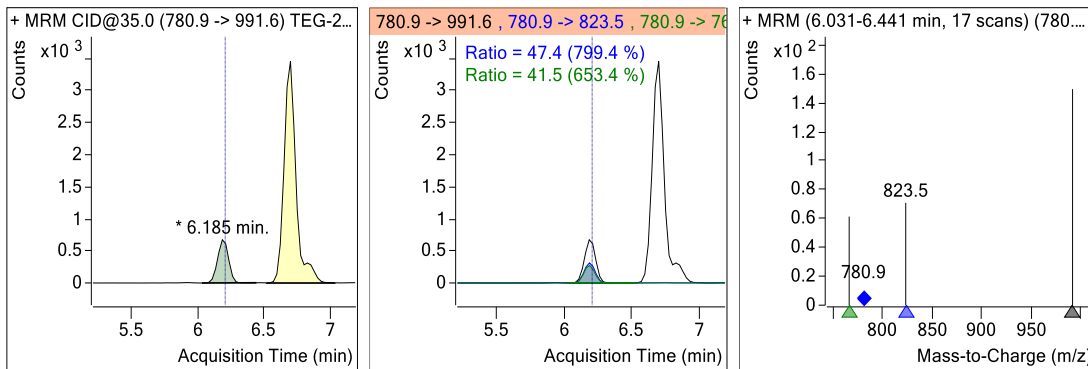
Target Compound DOMUZ 2



Target Compound SIGIR 2



Target Compound SIGIR 1



Şekil A.54. TEG-25 Domuz1, Domuz2, Sığır1, Sığır2 pik grafikleri.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Nazan BİNGÖL YILMAZ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2009-2013, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yüksek lisans** : 2022-2025, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM :

- Mühendis (Teknik Personel); 2023- Halen İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü -İSTANBUL
- Mühendis (Gıda Kontrol Görevlisi); 2020-2023 Kocaeli İl Tarım ve Orman Müdürlüğü -KOCAELİ
- Mühendis (Gıda Kontrol Görevlisi); 2016-2020 Bitlis İl Tarım ve Orman Müdürlüğü -BİTLİS
- Mühendis (Kalite Kontrol Mühendisi); 2014-2016 Tunay Gıda San. ve Tic. A.Ş. - ERZİNCAN

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- 1- Bingöl Yılmaz, N., Sünnetçi, S., Yemiş, O. (2025). Takviye edici gıdalarda LC-MS/MS-TQ yöntemi ile jelatin tür tayini, Gıda, Basımda
- 2- Bingöl Yılmaz, N., Yemiş, O. (2025). Türkiye’de satışa sunulan takviye edici gıdalarda jelatin kaynağının tespiti. Türkiye 15. Gıda Kongresi, 08-10 Ekim 2025, Sakarya (Nazan Bingöl Yılmaz tarafından sözlü olarak sunulmuştur).