

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**SALEBİN TAKLİT VE TAĞŞİSİNİN BELİRLENMESİNDE
KULLANILABİLECEK HIZLI ANALİZ YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşe Kevser BİLGİN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**SALEBİN TAKLİT VE TAĞŞIŞININ BELİRLENMESİNDE
KULLANILABİLECEK HIZLI ANALİZ YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşe Kevser BİLGİN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2019

ANTALYA

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

**SALEBİN TAKLİT VE TAĞŞIŞININ BELİRLENMESİNDE
KULLANILABİLECEK HIZLI ANALİZ YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşe Kevser BİLGİN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez TÜBİTAK tarafından 115O058 nolu proje ile desteklenmiştir.

OCAK 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALEBİN TAKLİT VE TAĞŞIŞININ BELİRLENMESİNDE
KULLANILABİLECEK HIZLI ANALİZ YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Ayşe Kevser BİLGİN
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez/....../201.... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

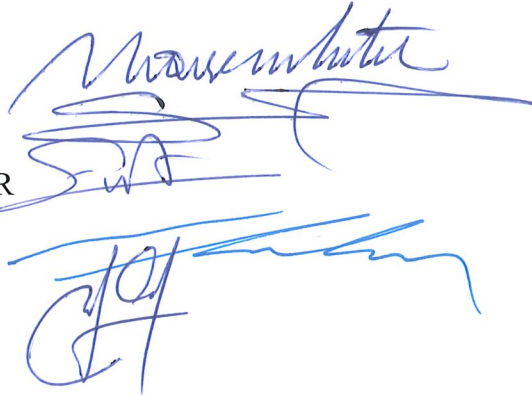
Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Sebahattin NAS

Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Doç.Dr. Mehmet Fatih CENGİZ



ÖZET

SALEBİN TAKLİT VE TAĞŞİŞİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILABİLECEK HIZLI ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Ayşe Kevser BİLGİN

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Ocak 2019; 139 sayfa

Salep, doğadan toplanan *Orchidaceae* ailesinin bazı cinslerinden elde edilen yumruların çeşitli işlemlerden geçirilmesinden sonra toz formda elde edilen bir gıda maddesidir. Üretimi için yeterli düzeyde bitkisel materyalin bulunamaması nedeniyle yüksek fiyatlarla tüketiciye sunulmaktadır. Bununla birlikte, salep bitkisinin endemik bir tür olması gerekçesiyle herhangi bir formda yurtdışına çıkarılması kanunen yasaklanmıştır. Buna rağmen, literatürde, ülkemizden önemli düzeylerde salebin yurtdışına çıkarıldığına yönelik bulgular mevcuttur. Ayrıca, piyasada “salep” ibaresiyle satışa çıkarılan ürünlerin içeriğinde salep bulunması halinde, miktarının etikette beyan edilmesi zorunluluğu da bulunmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, değişik ürünlerde salep olup olmadığını ve/veya hangi oranda salep içerdiğini ortaya koyacak analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; toz salep ürününün hakiki olup olmadığının veya tağşişe uğratılıp uğratılmadığının belirlenmesinde kullanılabilecek hızlı, güvenilir ve ekonomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Belirtilen hedefe ulaşabilmek için, ülkemizde yetişen gerçek salep numuneleri ve bu numunelerin taklit/tağşişe uğratılmasında kullanılan maddeler tedarik edilerek, valide edilen yöntemlerle analiz edilmişlerdir. Bu kapsamda numunelerdeki temel bileşenleri belirlemek üzere kimyasal yöntemler; glukomannan ve nişasta içeriğini belirlemek üzere enzimatik yöntemler; karbonhidrat bileşenlerini belirlemek üzere kromatografik yöntemler; izotop oranlarını, elementel düzeylerini, organik asit ve amino asit içeriklerini belirlemek üzere kütle spektrometrik yöntemler; erime sıcaklığı, termal geçiş ve entalpi düzeylerini belirlemek için kalorimetrik yöntemler kullanılmıştır. Veriler istatistiksel ve kemometrik yöntemlerle değerlendirilerek incelenen parametrelerde, salep ve taklit/tağşiş maddeleri ayrımı için önemli bulunan analiz yöntemleri belirlenmiştir.

Bu kapsamda; sırasıyla amino asit analizleri, elementel analizler, enzimatik analizler, izotop analizleri, karbonhidrat bileşenleri, organik asit analizleri ve anabileşen analizlerinin salep ve taklit/tağşiş maddeleri arası ayırmada önemli yöntemler oldukları tespit edilmiştir. Belirlenen yöntemler % 0-10 ve % 0-100 aralıklarında farklı oranlarda

salep içerecek şekilde hazırlanmış reçetelerle test edilmiş ve yöntemlerdeki parametrelerin karışımlardaki salep oranını belirleyebilme düzeyleri araştırılmıştır.

% 0-10 aralığında gerçek salep içeren reçetelerde glukomannan, toplam nişasta, malik asit, fenilalanin, arjinin, lösin+izolösin, lizin, histidin, tirozin değerlerinin karışımdaki gerçek salep oranıyla yüksek düzeyde korelasyon ve doğrusallık gösterdiği belirlenmiştir. % 0-100 aralığında gerçek salep içeren reçetelerde ise glukomannan, toplam nişasta, bakır, demir, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranı, malik asit, valin, fenilalanin, lizin, arjinin, lösin + izolösin, tirozin, treonin, prolin, glutamik asit, aspartik asit, metiyonin ve histidinin karışımdaki gerçek salep oranıyla yüksek düzeyde korelasyon ve doğrusallık gösterdiği belirlenmiştir. Taklit/tağşiş maddelerinin ayırımı öne çıkan en önemli parametrenin hem % 0-10 hemde % 0-100 salep içeren karışımlar için glukomannan olduğu sonucuna varılmıştır.

Araştırma sonucunda, ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen salep numunelerinin analiz edilen parametreler yönünden kapsamlı bileşimleri tespit edilmiş ve salep ile taklit/tağşiş maddelerinin ayırımı konusunda önemli bulunan analitik parametreler belirlenerek yöntemler valide edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Analiz, Bileşen, Kromatografi, Kütle spektrometri, Salep, Taklit, Tağşiş.

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Sebahattin NAS

Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF FAST ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF SALEP AND ITS ADULTERATION

Ayşe Kevser BİLGİN

PhD. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

January 2019; 139 pages

Salep is a foodstuff obtained in powder form after a variety of treatments of tubers obtained from some species of the *Orchidaceae* family collected from the nature. Due to the lack of sufficient plant material for its production, it is offered to the consumers at high prices. If the products are sold in the market contain the word "salep", it is mandatory to declare the amount in the label. In addition, it is forbidden by law to remove it in any form of salep forms the country due to salep plant is an endemic species. However, in the literature, there are findings in the literature that significant levels of salep have been taken out of our country. Due to these reasons, a need arises for analytical methods to determine whether salep is present and/or to what extent it contains salep.

The aim of this study is to develop fast, reliable and economical methods of analysis which can be used in determining salep adulteration. In order to reach the stated target, by supplying the salep samples grown in our country and the substances, which specified as adulterant in the literature, were analyzed by validated methods. In this context, chemical methods to determine the basic compounds; enzymatic methods to determine glucomannan and starch content; chromatographic methods for determining carbohydrate compounds; mass spectrometric methods to determine isotope ratios, elemental levels, organic acid and amino acid contents; calorimetric methods to determine melting temperature, thermal transition, and enthalpy levels were used. The data were evaluated by statistics and chemometric methods and important analysis methods were determined for the discrimination between salep and adulterants at the investigated parameters.

In this context, amino acid analyzes, elemental analyzes, enzymatic analyzes, isotope analysis, carbohydrate components, organic acid analysis and parent analysis were found to be important for distinction. Determined methods, in the mixtures which between 0-10 % and 0-100 % of different ratios of contain salep were tested and the determination level of the ratio of salep in mixtures were investigated in the parameters of determined the methods. Glucomannan and total starch, malic acids, lysine, histidine,

arginine, tyrosine, leucine+isoleucine and phenylalanine contents were determined as parameters which resulted in high level of correlation and linearity with salep levels in the range 0-10 %.

Glucomannan and total starch, iron, copper, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio, malic acid, lysine, valine, threonine, proline, glutamic acid, aspartic acid, methionine, histidine, arginine, tyrosine, leucine+isoleucine and phenylalanine which resulted in high level of correlation and linearity with salep levels in the range 0-100 %. It was concluded to be critical, the most important parameters that distinguishes the adulteration substances is glucomannan for in the mixtures which contain both 0-10 % and 0-100 % of different ratios of salep.

As a result of the study, comprehensive compositions of salep samples obtained from different regions of our country in terms of analyzed parameters were determined, analytical parameters which are important in the distinction of between salep and adulterants were determined.

KEYWORDS: Analysis, Component, Chromatography, Mass spectrometry, Salep, Adulteration.

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Sebahattin NAS

Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

ÖNSÖZ

Salep, çiçeklenmesini tamamlamış *Orchidaceae* ailesine dahil olan yumru bağlayan farklı cins ve türlere ait toprak orkidelerinin yumrularının tekniğine uygun olarak temizlenip, su veya sütte haşlandıktan sonra kurutulup, öğütülmüş veya öğütülmemiş halde bulunan bir gıda maddesidir. Salep elde edilen orkide cinslerin ticari ölçekte yetiştiriciliğinin halen yapılamamasından dolayıda, salep tozu yüksek fiyatlarla tüketiciye sunulmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda endüstriyel yetiştiriciliği konusunda bölgesel çalışmalar yapıldığı ve önemli gelişmeler kaydedildiği bildirilmektedir. Salep, değerli bir gıda maddesi olmasının yanında, bileşiminde kolay taklit edilebilir bazı bileşenlerin olması nedeniyle hilelere açık bir ürün haline gelmesine sebep olmuştur. Ayrıca salebin herhangi bir formda yurtdışına çıkarılması yasak olması nedeniyle farklı isimlerde bu yasağın delinebilme ihtimali bulunmaktadır. Tüm bunlara karşın günümüzde herhangi toz ürünün salep olup olmadığını ve/veya hangi oranda salep içerdiğini tespit edebilen bir analiz yöntemi mevcut değildir. TÜBİTAK tarafından 115O058 numaralı proje numarası ile desteklenen bu tez kapsamında, toz salep ürününün taklit ve tağşiş durumlarının belirlenebilmesinde kullanılmak üzere hızlı, güvenilir ve ekonomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmış ve bu çerçevede gıda endüstrisinin, gıda kontrolü ile yetkili kurum ve kuruluşların ve de ihracat birimlerinin ihtiyacının karşılanması hedeflenmiştir.

Bu kapsamda, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki salep toplama alanlarından salep yumruları toplanılmış ve tekniğine uygun olarak hazırlanarak gerçek olduğundan emin olunan salep tozları elde edilmiştir. Taklit ve tağşiş malzemelerin ise her biri üç farklı tedarikçiden temin edilmiştir. Hazırlanan gerçek salep tozları ve taklit/tağşiş maddeleri temel analizler (rutubet, kül, protein ve indirgen şeker), enzimatik analizler (glukomannan ve toplam nişasta) ve aletsel analizler (elementel bileşenler, izotop oranları, karbonhidrat bileşenleri, organik asit bileşenleri ve amino asit bileşenleri) açısından analizlere tabi tutulmuş ve elde edilen sonuçlar istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek incelenen parametrelerin salep ve taklit/tağşiş maddeleri arasındaki farkta etkinlikleri belirlenmiştir.

Projenin sonraki aşamasında ayırım konusunda önemli bulunan yöntemler % 0 - % 10 ve % 0 - % 100 aralıklarında farklı oranlarda salep içerecek şekilde hazırlanmış karışımlarla denenerek yöntemlerdeki parametrelerin hangi düzeyde tespit sağlayabildiği ve tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Son olarak salebin taklit ve tağşişinin belirlenmesinde kullanılmasına karar verilen yöntemler ile piyasa örnekleri analiz edilmiştir. Elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde; glukomannandüzeyine bakılarak hem tüketime hazır toz formdaki salebin hemde saf salep olarak tüketime sunulan ürünlerdeki salebin taklit tağşişin tanımlanmasında kullanılabileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışması ile salepte taklit ve tağşiş uygulamalarını ortaya çıkarabilecek yöntemler geliştirilmiştir. Bilim çevrelerinin yanı sıra yasal yaptırımların uygulanmasını sağlayan kamu kuruluşlarının, salep ticareti ile uğraşan kuruluşların, salep içerikli ürünleri toplu olarak tedarik etmek durumunda olan işletmecilerin ve gıda analizleri yapan merkezlerin hizmetine sunulmaktadır.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde bana bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan, desteğini esirgemeyen her zaman fikirleriyle beni aydınlatan hocalarım sayın Prof. Dr. Muharrem CERTEL ve Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e, yanımda olup çalışmalarda bana destek olan Onur BASANELEBİ'ye ve manevi olarak daima yanımda bulunan sevgili arkadaşım Nisa DURAK'a, kromatografik cihaz kullanımında yardımcı olan Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'ndeki uzmanlara, çalışmaya maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bana yardımcı olan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Son olarak hayatım boyunca desteğini her zaman hissettiğim, güçlenmemde ve en zor durumlarda bile dimdik ayakta durmama yardımcı olan, doğruyu yanlışı ayırt etmemde bana yol gösteren ve başarılarımda büyük paya sahip olan sevgili anneannem Emine şayeğan TEZSÖZ ve teyzem şerife Gülçin TEZSÖZ'e, ne olursa olsun beni seven annem Meliha Gökşin BİLGİN ve babam Kemal BİLGİN'e, doğduğu ilk günden itibaren varlığından hep mutluluk duyduğum, beni her zaman neşelendiren, benimle aynı duyguları paylaşan, iyi ve kötü günümde daima yanımda olup ne olursa olsun beni seven ve daima beni gururlandıran kız kardeşim şerife BİLGİN'e ve ismini sayamadığım TEZSÖZ ve BİLGİN ailesinin tüm fertlerine çok teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Salep ile İlgili Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. Salebin kimyasal yapısı	5
2.1.1.1. Glukomannan.....	6
2.1.1.2. Nişasta.....	8
2.1.1.3. Minör bileşenler.....	9
2.1.2. Yasal düzenlemeler.....	10
2.1.3. Salep içeceği formülasyonları	10
2.2. Taklit ve Tağşişin Belirlenmesinde Yöntem Geliştirme Çalışmaları.....	11
2.2.1. Gıda maddelerinde taklit ve tağşişin tespiti ve kullanılan teknikler.....	12
2.2.1.1. İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS).....	13
2.2.1.2. İzotop oranı kütle spektrometresi (IR-MS).....	14
2.2.1.3. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC).....	17
2.2.1.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC).....	19
2.2.1.5. Orbitrap kütle spektrometresi (ORBITRAP-MS).....	20
2.2.1.6. Sıvı kromatografi kütle kütle spektrometresi (LC-MS/MS).....	21
2.2.2. Veri analizleri	24
2.2.2.1. Çok değişkenli sınıflandırma teknikleri.....	24
2.3. Metot Validasyonu	25
2.3.1. Doğrusallık	26
2.3.2. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	26
2.3.3. Doğruluk.....	26
2.3.4. Doğrusal/Ölçüm aralığı	28
3. MATERYAL VE METOT	29

3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Salep, taklit, tağış ve katkı maddelerinin toplanması	29
3.1.2. Salep örneklerin analize hazırlanması	31
3.1.3. Salep içeren toz karışımların oluşturulması.....	32
3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar	35
3.2. Metot	37
3.2.1. Anabileşen analizleri	37
3.2.1.1. Protein miktarlarının belirlenmesi	37
3.2.1.2. Kül miktarlarının belirlenmesi.....	38
3.2.1.3. % 10 Hidroklorik asitte çözünmeyen madde miktarının belirlenmesi.....	39
3.2.1.4. Rutubet miktarının belirlenmesi	39
3.2.1.5. İndirgen şeker düzeylerinin belirlenmesi.....	39
3.2.2. Enzimatik analizler	39
3.2.2.1. Glukomannan düzeyinin belirlenmesi	39
3.2.2.2. Toplam nişasta düzeyinin belirlenmesi	41
3.2.3. Aletsel analizler	43
3.2.3.1. Elementel bileşen analizleri.....	43
3.2.3.2. İzotop oranları analizleri.....	44
3.2.3.3. Kalorimetrik analizler	45
3.2.3.4. Karbonhidrat bileşenleri analizleri	45
3.2.3.5. Organik asit bileşenleri analizleri	46
3.2.3.6. Amino asit bileşenleri analizleri	47
3.3. Yöntemlerin Doğrulanması	47
3.3.1. Doğrusallık	48
3.3.2. Tespit sınırı ve ölçüm sınırı (LOD ve LOQ)	48
3.3.3. Doğruluk.....	48
3.3.3.1. Gerçeklik.....	48
3.3.3.2. Kesinlik.....	48
3.4. İstatiksel ve Kemometrik Değerlendirmeler	48
3.4.1. İstatiksel değerlendirmeler	48
3.4.2. Kemometrik değerlendirmeler.....	49
3.4.2.1. Yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmaları	50
3.4.2.2. Yönlendirmeli sınıflandırma çalışmaları	50

3.5. Piyasa İzleme Çalışmaları	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. Yöntem Doğrulama Çalışmaları.....	53
4.1.1. Anabileşenlere ait yöntem doğrulama çalışmaları.....	53
4.1.2. Enzimatik analizlere ait yöntem doğrulama çalışmaları.....	53
4.1.3. Aletsel analizlere ait yöntem doğrulama çalışmaları.....	54
4.1.3.1. Elementel analizlerin yöntem doğrulama çalışmaları.....	54
4.1.3.2. İzotop oranları analizleri yöntem doğrulama çalışmaları	56
4.1.3.3. Kalorimetrik analizler yöntem doğrulama çalışmaları	56
4.1.3.4. Karbonhidrat analizleri yöntem doğrulama çalışmaları	58
4.1.3.5. Organik asit analizlerinin yöntem doğrulama çalışmaları	59
4.1.3.6. Amino asit analizlerinin yöntem doğrulama çalışmaları	59
4.2. Salep Örneklerine Ait Analiz Sonuçları	61
4.2.1. Anabileşen analizleri	61
4.2.2. Enzimatik analizler	63
4.2.3. Aletsel analizler	65
4.2.3.1. Elementel bileşen analizleri.....	65
4.2.3.2. İzotop oranları analizleri.....	71
4.2.3.3. Kalorimetrik analizler	72
4.2.3.4. Karbonhidrat bileşenleri analizi.....	73
4.2.3.5. Organik asit bileşenleri analizleri	75
4.2.3.6. Amino asit bileşenleri analizleri	77
4.3. Taklit, Tağşiş, Katkı Maddelerine Ait Analiz Sonuçları.....	80
4.3.1. Anabileşen analizleri	80
4.3.2. Enzimatik analizler	82
4.3.3. Aletsel analizleri	84
4.3.3.1. Elementel bileşen analizleri.....	84
4.3.3.2. İzotop oranları analizleri.....	88
4.3.3.3. Kalorimetrik analizler	90
4.3.3.4. Karbonhidrat bileşenleri analizleri	91
4.3.3.5. Organik asit bileşenleri analizleri	91
4.3.3.6. Amino asit bileşenleri analizleri	93
4.4. Kemometrik Yöntemler.....	98
4.4.1. Yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmaları.....	98

4.4.2. Yönlendirmeli sınıflandırma çalışmaları	99
4.4.3. TTK maddelerinin tespitine yönelik en uygun metot kombinasyonlarının belirlenmesi	101
4.5. Karışımlardaki Salep Miktarlarının Belirlenmesi Çalışmaları	104
4.5.1. Enzimatik analizler	104
4.5.2. Aletsel analizler	106
4.5.3. Salep miktarlarının belirlenmesinde kullanılacak yöntemin seçimi.....	118
4.6. Piyasa İzleme Çalışmaları	119
5. SONUÇLAR	122
6. KAYNAKLAR	127
7. EKLER.....	137
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Salebin Taklit ve Tağışının Belirlenmesinde Kullanılabilecek Hızlı Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

18 / 01 / 2019

Ayşe Kevser BİLGİN



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μg : Mikrogram

μm : Mikrometre

cm : Santimetre

g : Gram

J : Joule

kg : Kilogram

L : Litre

m : Kütle

M : Mol

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimol

mV : Milivolt

M Ω : Mikrosimens

N : Normalite

n : Örnek Sayısı

nm : Nanometre

°C : Santigrat Derece

v : Hacim

z : Yük

Kısaltmalar

% RSD: Yüzde Bağıl Standart Sapma

A. :Asit

AAS :Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi

ANNs : Yapay Sinir Ağları

ANOVA: Tek Değişkenli Varyans Analizi

ATP : Adenozin Trifosfat

BNT : Buğday Nişastası

BUN : Buğday Unu

C : Konsantrasyon

C_{CRM} : Sertifikalı Referans Maddenin Konsantrasyon Değeri

cm : Santimetre

CMC : Karboksimetil Selüloz

C_{met} : Metotla Gözlemlenen Konsantrasyon

C_{obs} : Gözlemlenen Konsantrasyon

C_{ref} : Referans Metotla Bulunan Konsantrasyon

C_{samp} : Örneğin Konsantrasyonu

ÇF : Çevirme Faktörü

dk. : Dakika

DSC : Diferansiyel Tarama Kalorimetresi

FSA : Gıda Standartları Ajansı

FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre

GA : Genetik Algoritma

GAR : Arap Sakızı

GC : Gaz Kromatografisi

GILS : Genetik Ters En Küçük Kareler

GLT : Galeta Unu

GUM : Guar Sakızı

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ICP-MS : İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi

ICP-OES: İndüktif Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi

ICR : İyon Siklotron Rezonans

ILS : Ters En Küçük Kareler

IR-MS : İzotop Oranı Kütle Spektrometrisi

İTK : İnce Tabaka Kromatografisi

İYTE : İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

KBG : Keçiboynuzu Sakızı

KJG : Konyak Sakızı

KSG : Ksantan Sakızı

LC : Likit Kromatografisi

LIBS : Lazer İndüklenmiş Plazma Spektroskopisi

LOD : Tespit Sınırı

LOOCV: Bir Örneği Dışarıda Bırakan Çapraz Doğrulama

LOQ : Ölçüm Sınırı

LV : Gizli Değişken

MIR : Orta Kızılötesi Spektroskopisi

MNT : Mısır Nişastası

MS : Kütle Spektrometrisi

MS/MS: Sıralı Kütle Spektrometrisi

NADP+: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

OBL : Öğütülmüş Bulgur

OMK : Öğütülmüş Makarna

OPR : Öğütölmüş Pirinç

PAN : Patates Nişastası

PC : Temel Bileşen

PCA : Temel Bileşenler Analizi

PIN : Pirinç Nişastası

PLS : Kısmi En Küçük Kareler

PLS-DA: Kısmi En Küçük Kareler Ayırıcı Analizi

Q : Kuadrupol

QIT : Kuadrupol İyon Tuzağı

r : Korelasyon Katsayısı

R² : Regresyon Katsayısı

sn : Saniye

SD : Standart Sapması

Sig : Signifikant Değeri

SKA : Salep Katı Aroma Verici

SKR : Şeker

SSA : Salep Sıvı Aroma Verici

TOF : Uçuş Zamanlı Analizör

TRC : Tarçın

TTK : Taklit, Tağşiş ve Katkı Maddesi

UPLC : Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi

UV : Ultraviole

VNL : Vanilya

x : İlgilenilen Örnek

$\bar{x}$: Ortalama

YST : Yağsız Süt Tozu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tez kapsamında kullanılan yumru örnekleri	4
Şekil 2.2. Gıda analizlerinde kullanılabilecek ‘parmak izi yöntemi’ işlem basamakları	12
Şekil 2.3. 2009-2015 yıllarında Scopus yayınlanmış olan, gıdalardaki taklit ve tağşişin belirlenmesine yönelik yapılmış çalışmalarda kullanılan tekniklerin dağılımı	13
Şekil 2.4. Oksijen ve hidrojen elementlerinin izotopik fraksiyonlanması üzerine iklimsel ve coğrafik etkileri	15
Şekil 2.5. Isı akışlı DSC sistemi.....	17
Şekil 2.6. Örnek DSC termogramı	18
Şekil 2.7. Orbitrap MS sistemindeki iyon hareketleri.....	20
Şekil 3.1. Tez kapsamında ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen ve analizler için uygun hale getirilen salep örnekleri	30
Şekil 3.2. Salebin ön hazırlık işlemleri	31
Şekil 3.3. Kül fırını çalışma koşulları	38
Şekil 3.4. PCA akış şeması	50
Şekil 4.1. -80 °C ile +300 °C tarama sıcaklık aralığına ait DSC termogramları.....	57
Şekil 4.2. Salep örnekleri elementel bileşenlerinin bölgelere göre değişimi	70
Şekil 4.3. Salep örnekleri karbonhidrat bileşenlerinin bölgelere göre değişimi	75
Şekil 4.4. Salep örnekleri organik asit bileşenlerinin bölgelere göre değişimi.....	76
Şekil 4.5. Salep örnekleri amino asit bileşenlerinin bölgelere göre değişimi.....	79
Şekil 4.6. Enzimatik analizler kullanılarak salepte taklit ve tağşişinin karar verilmesinde izlenebilecek olası prosedür	84
Şekil 4.7. Enzimatik analiz sonuçlarına uygulanan iki boyutlu saçılma grafiği.....	84
Şekil 4.8. Salep örnekleri ve taklit/tağşiş maddelerine uygulanan PCA sonuçları	98
Şekil 4.9. Çapraz doğrulama ile elde edilen yanlış sınıflandırma yüzdesine karşılık bileşen sayısı sonuçları.....	99
Şekil 4.10. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile model setinin tahmin sonuçları.....	100
Şekil 4.11. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile validasyon setinin tahmin sonuçları	100
Şekil 4.12. Hatalı örnekler ayıklandıktan sonra elde edilen PLS-DA modeli ile validasyon tahminleri grafiği	101
Şekil 4.13. PLS-DA modelinden elde edilen, analiz adlarına karşı sınıflandırmada kullanılan katsayılar grafiği	101

Şekil 4.14. Salep içecek tozu reçetelerindeki % salep miktarları ile enzimatik analiz sonuçları arasındaki doğrusallık	105
Şekil 4.15. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren elementler arasındaki doğrusallık	107
Şekil 4.16. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren elementler arasındaki doğrusallık	108
Şekil 4.17. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren izotop oranları arasındaki doğrusallık	110
Şekil 4.18. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren izotop oranları arasındaki doğrusallık	110
Şekil 4.19. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile malik asit arasındaki doğrusallık.....	112
Şekil 4.20. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren organik asitler arasındaki doğrusallık	112
Şekil 4.21. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren amino asit arasındaki doğrusallık	115
Şekil 4.22. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren amino asit arasındaki doğrusallık.....	117

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ülkemizde salep toplama bölgeleri	3
Çizelge 2.2. 2006 yılında salep toplanan bölgeler ve miktarları	5
Çizelge 2.3. Farklı cinslere ait salep yumrularının glukomannan oranları	7
Çizelge 2.4. Farklı cinslere ait salep yumrularının nişasta oranları	9
Çizelge 2.5. Salebin minör bileşenlerine (rutubet, kül, protein) ait literatür bulguları	9
Çizelge 2.6. Ticari saleplerde katkı maddesi, taklit ve tağşiş amaçlı katılan bazı materyaller ve fiyatları	11
Çizelge 2.7. Bazı kararlı izotopların doğal bolluk oranları	14
Çizelge 2.8. Son 20 yıla ait Türkiye’de gıdalarda taklit ve tağşişin belirlenmesine yönelik yapılmış olan içeriğine ulaşılabilmiş çalışmalar	22
Çizelge 2.9. Metotlara göre validasyon parametreleri	25
Çizelge 2.10. Analit konsantrasyonuna bağlı olarak olması gereken geri kazanım oranları	27
Çizelge 2.11. Analit konsantrasyonuna bağlı olarak olması gereken tekrarlanabilirlik kesinliği	28
Çizelge 3.1. Tez kapsamında salep örnekleri toplanan iller	29
Çizelge 3.2. Taklit, tağşiş, katkı maddesi (TTK) olarak izlenilen maddeler	30
Çizelge 3.3. Farklı gözenek çapına sahip eleklerden geçirilen salep örneklerinin elek üstü yüzdesel dağılımı	32
Çizelge 3.4. Farklı oranlarda salep içeren homojen toz karışım reçeteleri	33
Çizelge 3.5. Kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar	35
Çizelge 3.6. Analizler kapsamında kullanılan laboratuvar cihazları ve yardımcı malzemeler	36
Çizelge 3.7. Karl Fischer titrasyon cihazı çalışma koşulları	39
Çizelge 3.8. ICP-MS çalışma koşulları	43
Çizelge 3.9. IR-MS çalışma koşulları	44
Çizelge 3.10. HPLC-RID çalışma koşulları	45
Çizelge 3.11. ORBITRAP-MS çalışma koşulları	46
Çizelge 3.12. Organik asitlerin kütle değerleri	46
Çizelge 3.13. LC-MS/MS çalışma koşulları	47
Çizelge 3.14. Korelasyon katsayısının (r) yorumlanması	49
Çizelge 3.15. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında tedarik edilen salep içecek tozu örnekleri	51
Çizelge 4.1. Anabileşen analizlerine ait tekrarlanabilirlik sonuçları	53

Çizelge 4.2. Enzimatik analizlere ait tekrarlanabilirlik sonuçları.....	54
Çizelge 4.3. Elementel analizlere ait yöntem doğrulama sonuçları.....	55
Çizelge 4.4. İzotop oranları analizlerine ait tekrarlanabilirlik sonuçları	56
Çizelge 4.5. Kalorimetrik ölçümlere ait tekrarlanabilirlik sonuçları	58
Çizelge 4.6. Karbonhidrat bileşenleri analizlerine ait yöntem doğrulama sonuçları.....	58
Çizelge 4.7. Organik asit bileşenleri analizlerine ait yöntem doğrulama sonuçları.....	59
Çizelge 4.8. Amino asit bileşenleri analizlerine ait yöntem doğrulama sonuçları.....	60
Çizelge 4.9. Anabileşen analizlerinin normalite testi sonuçları.....	61
Çizelge 4.10. Salep örneklerine ait anabileşen analizlerinin sonuçları.....	62
Çizelge 4.11. Enzimatik analizlerin normalite testi sonuçları	63
Çizelge 4.12. Salep örneklerine ait glukomannan ve toplam nişasta analizleri sonuçları.....	64
Çizelge 4.13. Farklı partikül çapına sahip salep örneklerinin glukomannan düzeyleri.....	65
Çizelge 4.14. Elementel analizlerin normalite testi sonuçları.....	66
Çizelge 4.15. Salep örneklerine ait elementel analiz sonuçları	67
Çizelge 4.16. İzotop oranları analizlerinin normalite testi sonuçları	71
Çizelge 4.17. Salep örneklerine ait izotop oranlarının analiz sonuçları	71
Çizelge 4.18. Kalorimetrik analizlerin normalite testi sonuçları	72
Çizelge 4.19. Salep örneklerine ait kalorimetrik analiz sonuçları	73
Çizelge 4.20. Karbonhidrat bileşenleri analizi normalite testi sonuçları	73
Çizelge 4.21. Salep örneklerine ait karbonhidrat bileşenlerinin analiz sonuçları.....	74
Çizelge 4.22. Salep örneklerine ait organik asit bileşenlerine ait analiz sonuçları.....	76
Çizelge 4.23. Amino asit analizlerinin normalite testi sonuçları.....	77
Çizelge 4.24. Salep örneklerine ait aminoasit bileşenleri analiz sonuçları.....	78
Çizelge 4.25. TTK maddelerine ait anabileşen analizlerinin sonuçları	81
Çizelge 4.26. TTK maddelerine ait enzimatik analizlerinin sonuçları	83
Çizelge 4.27. TTK maddelerine ait elementel analizlerinin sonuçları.....	85
Çizelge 4.28. TTK maddelerine ait izotop oranları analizlerinin sonuçları.....	88
Çizelge 4.29. TTK maddelerine ait kalorimetrik analizlerin sonuçları	90
Çizelge 4.30. TTK maddelerine ait karbonhidrat bileşenlerinin analiz sonuçları	91
Çizelge 4.31. TTK maddelerine ait organik asit bileşenlerinin analiz sonuçları	92

Çizelge 4.32. TTK maddelerine ait amino asit bileşenlerinin analiz sonuçları	94
Çizelge 4.33. Analiz grupları ile PLS-DA kullanılarak yapılan modelleme çalışmalarının başarı oranları	102
Çizelge 4.34. Her bir analiz grubuna ait kimyasal analiz sonuçlarının sınıflandırmaya katkılarını gösterir katsayılar	103
Çizelge 4.35. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile enzimatik bileşenler arasındaki korelasyon.....	104
Çizelge 4.36. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen (% 0-10) salep miktarları ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon.....	106
Çizelge 4.37. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen (% 0-100) salep miktarları ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon.....	107
Çizelge 4.38. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile izotop oranları arasındaki korelasyon.....	109
Çizelge 4.39. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon.....	111
Çizelge 4.40. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile amino asitler arasındaki korelasyon	113
Çizelge 4.41. % 0-10 oranında salep içeren karışımlarda yüksek korelasyon ve regresyon değeri tespit edilen parametreler ve bu parametrelere ait katsayıları.....	118
Çizelge 4.42. % 0-100 oranında salep içeren karışımlarda yüksek korelasyon ve regresyon değeri tespit edilen parametreler ve bu parametrelere ait katsayıları	118
Çizelge 4.43. Piyasadan temin edilen saf salep olduğu bildirilen örneklerde tespit edilen salep miktarı	120
Çizelge 4.44. Piyasadan temin edilen tüketime hazır toz salep karışımlarında tespit edilen salep miktarları	120

1. GİRİŞ

Salep, Türk Gıda Kodeksi 2013/12 baharat tebliğine göre; “çiçeklenmesini tamamlamış *Orchidaceae* ailesine dahil olan yumru bağlayan farklı cins ve türlere ait toprak orkidelerinin yumrularının tekniğine uygun olarak temizlenip, su veya sütte haşlandıktan sonra kurutulup, öğütülmüş veya öğütülmemiş hali” şeklinde tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi 2013). Farklı kaynaklarda salep, kurutulmuş ve toz haline getirilmiş salep bitkisi yumrusu ile üretilen geleneksel içeceğin adı olarakda kullanıldığı ifade edilmektedir (Hossain 2011; Türk Gıda Kodeksi 2013). İçecek olarak kullanımı dışında dondurma yapımında ve ilaç sanayinde de geniş bir kullanım alanlarına sahip olduğu görülmektedir (Farhoosh ve Riazi 2007; Tekinşen ve Güner 2010).

Salebin, geniş kullanım alanına sahip ve ekonomik açıdan pahalı bir madde olması sebebiyle, orkideler son yıllarda büyük önem taşımaktadır. Salep, yumrulu orkidelerden elde edilmesine karşın tüm yumrulu orkide cinsleri bu amaç için uygun değildir. En çok *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Platanthera*, *Dactylorhiza* türlerinden salebin elde edilebildiğine dair literatür bilgileri bulunmaktadır (Tekinşen ve Güner 2010; Erzurumlu ve Doran 2011). Ayrıca, 1 kilogram (kg) salep üretimi için yaklaşık 1000-4000 arasında değişen sayıda kuru yumru ihtiyacı söz konusu olduğu ve Türkiye’de salep toplayıcılığının bilinçsizce ve aşırı toplanması sonucunda çok ciddi miktarlarda orkide tahribatı söz konusu olduğu bildirilmiştir (Tekinşen ve Güner 2010). Bu sebeplerle 1974 yılından itibaren hem sökümler hem de ihracatta salep yumruları ve drogları (toz, tablet ve her türlü formda) belirli yasalarla koruma altına alınmıştır (Erzurumlu ve Doran 2011; Yaman 2013).

Ülkemizde salep üretimi ve ihracatı dışında yaşanan bir diğer sorun da, salep içerdiği bildirilen bir ürünün etiketlenmesi ile ilgilidir. 29.12.2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği gereğince gıda maddelerinin etiketlenmesinde uyulması gereken kurallar belirtilmiştir. Yönetmeliğe göre; ilgili bileşen veya bileşen grubu, gıdanın adında yer alıyorsa veya tüketici tarafından genellikle gıdanın adı ile ilişkilendiriliyorsa, etiket üzerinde kelimeler, resimler veya grafikler ile vurgulanıyorsa, gıdanın tanımlanması için ve adından veya görünüşünden dolayı karıştırılabileceği ürünlerden ayırt edilmesi için elzem ise, net miktarının etiket üzerinde belirtilmesi zorunludur” ifadesi yer almaktadır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2017). Tüm bu nedenlerden dolayı, belirtilen yasal zorunlulukların kontrol edilebilmesi ve tüketici haklarının korunması amacıyla, bir ürünün salep olup olmadığının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu tez kapsamında; toz salep ürününün hakiki olup olmadığının ortaya konulmasında veya tağşişe uğratılıp uğratılmadığının belirlenmesinde kullanılabilecek hızlı ve ekonomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için ülkemizde satışa sunulan gerçek salep örnekleri ile taklit ve tağşişte kullanılması muhtemel maddeler tedarik edilerek analiz edilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilecek analizlerde temel bileşenleri belirlemek üzere kimyasal yöntemler, glukomannan ve nişasta içeriğini belirlemek üzere enzimatik yöntemler, izotop oran kütle spektrometresi (IR-MS), indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi kütle kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ve ORBITRAP kütle

spektrometresi (ORBITRAP-MS) gibi aletsel teknikler kullanılmıştır. Elde edilen veriler kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilen parametreler üzerinden belirleyici yöntemler geliştirilmiştir. Piyasada satılan örnekler baz alınarak, laboratuvar ortamında, gerçek salep örnekleri kullanılarak farklı salep içeriğine sahip toz karışım grupları hazırlanmıştır. Karışımlar istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilen yöntemlerle analiz edilmiş ve salebin hangi düzeyde tespit edilebildiği araştırılmıştır. Son olarak, piyasadan temin edilen 40 farklı tüketime hazır toz salep karışım örnekleri ile saf olduğu bildirilen 20 toz salebin analizleri gerçekleştirilmiş ve bu ürünlerin salep içerikleri belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, salep üreticilerinin; salep tüketicilerini veya sanayi ölçeğinde salep kullananları yanıltmaya yönelik taklit ve tağşiş uygulamalarının ortaya konulmasını sağlayabilecek yöntemlerin geliştirilmesidir. Aynı zamanda, bu yöntemler yanlış beyan vererek gerçek salebi ihraç etme girişiminde bulunan ihracatçıların tespiti için görevli kamu kuruluşlarının hizmetine de sunulabilecektir. Salepte taklit ve tağşişin tespitinde kullanılabilecek yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanılması halinde doğrudan ve caydırıcı etki ile salebin yurt dışına çıkışı önlenerek, endemik olan veya olmayan Türkiye orkidelerinin korunmasına da katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Salep ile İlgili Genel Bilgiler

Salep, çiçeklenmesini tamamlamış *Orchidaceae* ailesine dahil olan yumru bağlayan farklı cins ve türlere ait toprak orkidelerinin yumrularının tekniğine uygun olarak temizlenip, su veya sütte haşlandıktan sonra kurutulup, öğütülmüş veya öğütülmemiş hali şeklinde tanımlanan, kış aylarında tüketilen ve yine aynı adla bilinen geleneksel içecek üretiminde ve dondurma sektöründe yaygın şekilde kullanılan, Yunanca “salapı”, Arapça “sahlab” olarak bilinen toz bir üründür (Tekinşen ve Güner 2010; Hossain 2011; Türk Gıda Kodeksi 2013). Türkiye’de 24 cins ve 140 orkide türü bulunmakta olup, bu orkidelerin %13’ü Türkiye için endemiktir (Gümüş 2009). Salep, orkidelerin yumrularından elde edilmesine karşın tüm orkide cinsleri salep tozu elde edilebilmesi için uygun değildir (Erzurumlu ve Doran 2011).

Türkiye’de salep elde edilebilen 11 cinse ait (*Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Aceras*, *Platanthera*, *Anacamptis*, *Barlia*, *Comperia*, *Neotinea*, *Himantoglossum* ve *Dactylorhiza*) orkide türlerinin yer aldığı belirtilmiştir (Sezik 2012). Bu kapsamda, Türkiye’nin Kuzey Anadolu (Kastamonu), Güney Anadolu (Antalya, Silifke), Güneybatı Anadolu (Muğla) Güneydoğu Anadolu, (Kahramanmaraş, Adıyaman, Malatya) ve Doğu Anadolu (Van, Muş, Bitlis) bölgelerinin zengin orkide çeşitliliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, orkideler bakımından en zengin bölgenin Muğla Bölgesi olduğuna dikkat çekilmiştir (Sezik 2002; Sandal ve Söğüt 2010; Sezik 2012). Türkiye’de salep elde edilen bölgeler detaylı olarak çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Sezik 2002).

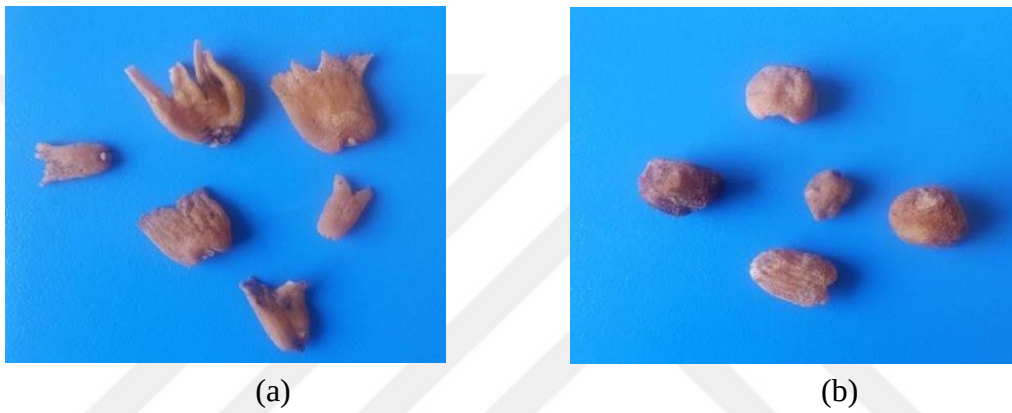
Çizelge 2.1. Ülkemizde salep toplama bölgeleri (Sezik 2002)

Bölge	İller
Kuzey Anadolu	Kastamonu ve civarı: Kastamonu salebi Akdağ Madeni–Tokat civarı: Akdağ Madeni salebi
Güneybatı Anadolu	Muğla salebi
Güney Anadolu	Elmalı’dan Gazipaşa civarına kadar olan bölge: Antalya salebi Mersin bölgesinden elde edilen: Silifke salebi
Güneydoğu Anadolu	Maraş, Adıyaman ve Malatya civarı
Doğu Anadolu	Van, Muş, Siirt, Hakkâri ve Bitlis civarı

Dünyada orkide bitkileri; gıda uygulamaları, tıbbi amaçlar, kozmetik uygulamalar ve süs bitkisi olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Ülkemizde ise daha çok gıda sektöründe (kışın sıcak içecek olarak ve Kahramanmaraş tipi sert dondurma olarak bilinen geleneksel dondurmada stabilizör olarak) ve ilaç sektöründe (hammadde olarak) kullanıldığı belirtilmiştir (Ayar vd. 2009; Sandal ve Söğüt 2010).

Genellikle yumrulu orkideler, iki yumruya sahip olup, bunlar birbirine yapışık durumda bulunmaktadır. Kışı bir sene önceki yumru ile geçiren bitkinin, bahara doğru köklerinden birinin kalınlaşmaya başlamasıyla ucunda yeni bir yumru daha meydana gelmektedir (Sezik 2012). Orkide tahribatının engellenmesi için, salep tozu üretimi amacıyla toplanacak olan orkidenin iki yumrusundan sadece yan yumrunun (genç yumru) alınması gerekliliği bildirilmiştir (Erzurumlu ve Doran 2011; Sezik 2012).

Yumrular orkide cinsine bağlı olarak yuvarlak veya dallı bir yapıya sahip olup 0,70-3,60 cm çapında veya 0,30-1,20 cm eninde, 0,20 g ile 1,60 g arasında değişen ağırlıkta, yarı şeffaf, kirli sarı, pürüzlü, sert, kokusuz ve lezzetsiz yapıdadır (Tamer vd. 2006). Şekil 2.1’de tez kapsamında kullanılan orkide yumruları örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Tez kapsamında kullanılan yumru örnekleri; **(a)** Siirt salebi, **(b)** Bartın salebi

Toplanan yumrular fiziksel olarak su ve ovalama yoluyla iyice temizlenir, enzimatik aktiviteyi durdurmak ve salebin kendine has tadının ve kokusunun oluşması için su, ayran veya süt içinde 15-30 dakika (dk.) kaynatılıp, yumrular ya doğrudan güneşe serilir veya tespih dize gibi ipe dizildikten sonra kurutulmaktadır. Kuruyan yumrular oldukça serttir ve bu şekilde yıllarca bozulmadan depolanmaktadır (Sezik 2012). Soluk-sarımsı, kurutulmuş yumrular dövülerek veya bir değirmenden geçirilmesiyle yumrular toz haline getirilmektedir. Böylece çeşitli amaçlarda kullanılması için salep tozu elde edilmektedir (Kaya ve Tekin 2001; Tekinşen ve Güner 2010).

Ortalama 1000-4000 adet kurutulmuş salep yumrusundan 1 kg salep elde edilmektedir (Tekinşen ve Güner 2010). Orkide yetiştiriciliği bakımından dünya’da ikinci sırada yer alan Türkiye’de, salep tozu üretimi için her yıl yaklaşık 45 ile 180 milyon adet orkide yumrusunun toplandığı ve bu yumrulardan yaklaşık 30 ton salep tozu üretildiği bildirilmektedir (Şen vd. 2018). Başka bir çalışmada ise, büyük yumruların Türkiye’de azalması nedeniyle yılda yaklaşık 20 ton salep üretiminin olduğu ve bu miktarda salep üretimi için 40 milyon orkidenin tahrip edildiği ifade edilmektedir (Hossain 2011). “Salep ve Orkidelerin tahribi” adlı proje kapsamında belirlenmiş bölgelerdeki salep ticareti yapan belli başlı kişilerden alınan değerlerin toplanması ile elde edilen 2006 yılına ait veriler (salep toplanan bölgeler ve miktarları) çizelge 2.2’de gösterilmiştir (Sezik 2012).

Çizelge 2.2. 2006 yılında salep toplanan bölgeler ve miktarları (Sezik 2012)

Bölge	Miktar (kg)	Bölge	Miktar (kg)
Antalya	700	K.Maraş	500
Muğla	3000	Siirt	300
Aydın	2500-5000	Van	500
Kastamonu	4000	Siirt	1000
Akdağ Madeni	7000	Siirt-Van Çayır	20000

Eskiden Türkiye'deki salep ticaret merkezi sadece Bucak (Burdur) iken, günümüzde Siirt bölgesi de salep ticaretinin yapıldığı önemli bir merkez haline gelmiş durumdadır. Piyasada yer alan salepler, genellikle o bölgede bulunan orkide yumrularının karışımı olarak satılmaktadır. Buna ilave olarak, ticaret merkezlerine komşu ülkelerden illegal olarak getirilen saleplerin de (Irak, İran, Azerbaycan) satıldığı bildirilmektedir (Sezik 2012).

Salep çok eskiden beri besleyici ve teskin edici olmasından dolayı tercih edilen bir ürün olmuştur (Hossain 2011). Ortadoğu'ya özgü bir içecek olan salep Batı Avrupa'da kahvenin ve çayın yaygınlaşmasından önce özellikle Almanya ve İngiltere'de çok tercih edilen bir içecek olduğu bildirilmiştir (Georgiadis vd. 2012). Tarihte İbn-i Sina'nın El-Kanun Fi't-Tıbb eserinde salebin afrodizyak olduğu ve diğer iyileştirici özelliklerinden bahsettiği belirtilmiştir (Hossain 2011). Salebin kolay sindirilmesi ve zevkle tüketilmesi; kalsiyum, demir, çinko, fosfor gibi önemli mineralleri, A, C ve B1, B2, B3 vitaminlerini içermesi nedeniyle beslenme açısından da oldukça önemlidir (Tamer vd. 2006). Musilajlı bir yapıya sahip olmasından dolayı gastrointestinal hastalıklarda oluşan tahrişin azalmasını sağladığı, karaciğeri koruyucu etkisinin olduğu, ishal ve bronşit tedavisinde yardımcı madde olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Hatta, Alman farmakopisinde salep musilajının hazırlanmasına yönelik resmi kayıtların mevcut olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca gastroentestinal çalışmalarda salebin prebiyotik olduğu ve *Bifidobacterium* türlerinin gelişimine olanak sunduğu bildirilmiştir (Usta ve Yılmaz-Ersan 2017). Fareler üzerinde yapılan son çalışmalarda karaciğer fonksiyonlarında bozulmaya neden olan ancak tuberküloz hastalığının tedavisinde kullanımı zorunlu olan isoniazid ilacının olumsuz etkilerini engellediği bildirilmiştir (Jahromi vd. 2018).

2.1.1. Salebin kimyasal yapısı

Salebin kalitesi, salebin kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte, farklı bölgelerden, farklı türlerinden ve farklı dönemlerde toplanan salebin, standart bir kimyasal bileşimden bahsedilebilmesi söz konusu değildir (Kaya ve Tekin 2001; Tekinşen ve Güner 2010; Citil ve Tekinsen 2011). Literatürde yer alan bilgilere göre; salep bileşiminde % 55,10 glukomannan, % 2,80 nişasta, % 2,3 kül % 7,5 nem bulunmaktadır (Kaya ve Tekin 2001). Başka bir kaynakta ise yaklaşık % 7-61 glukomannan, % 8-19 nişasta, % 0,50-1,50 azotlu maddeler, % 1-4 şeker, % 6-12 nem ve % 0,20-6 kül içerdiği arasında değiştiği belirtilmektedir (Tekinşen ve Güner 2010; Şen vd. 2018).

Citil ve Tekinşen (2011), bazı *Orchidaceae* türlerinden elde edilen salebin yağ asidi bileşenlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarında yağ asidi içeriğinin ortalama % 2,02 olduğu ve salep bileşiminde 32 farklı yağ asidi belirledikleri ifade edilmiştir. *Orchis italica* için linoleik asidin, *O. anatolica* için palmitik asidin, *O. palustris* için oleik asidin, *O. anatolica* için miristik asidin ve *Serapia vomeracea ssp. orientalis* için stearik asidin salep bileşimlerinde yer alan en yüksek yağ asidi oranlarına sahip olduğu belirtilmiştir. Saleplerin toplam doymuş yağ asidi kompozisyonunun % 24,67-61,24 olduğu; çoklu doymamış yağ asidi kompozisyonunun % 9,27-66,04 arasında değiştiği bildirilmiştir (Citil ve Tekinşen 2011).

Lalika ve arkadaşlarının (2013), Tanzania'nın güneyindeki iki bölgeden elde edilen salep örneklerinin besinsel kompozisyonlarının belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmalarında, örneklerin kimyasal kompozisyonlarında hakim bileşenlerin nem, protein, karbonhidrat, ham lif, kül ve kalsiyum olduğu ifade edilmiştir (Lalika vd. 2013). Bulut-Solak ve arkadaşları (2017), yapmış oldukları çalışmalarında, *Orchis anatolica* örneğinin kimyasal bileşimini benzersiz olarak nitelendirerek, nişasta, glukomannan ve diyet lifin *Orchis anatolica*'nın temel bileşenleri olduğu bildirilmiştir (Bulut-Solak vd. 2017).

2.1.1.1. Glukomannan

Salebin kimyasal bileşimi, türe ve yetiştirme şartlarına bağlı olarak farklılık gösterebilir en önemli ve aynı zamanda salebin kalitesi üzerinde doğrudan etkili olan bileşenin glukomannan olduğu bildirilmiştir (Kaya ve Tekin 2001). Glukomannan, su veya süt içinde çözünür, şekerli viskoz bir çözelti meydana getirmektedir. Salep içeceğinde istenen kıvamın oluşması, Maraş dondurmasının geç erimesi ve sert yapısı, glukomannanın bu özelliğinden kaynaklanmaktadır (Şen vd. 2018).

Glukomannan, bir polisakkarit olup bir çeşit hemiselüloz, aynı zamanda yüksek stabilizasyon kapasitesine sahip olan bir hidrokolloiddir (Ayar vd. 2009; Georgiadis vd. 2012). β -1-4 bağlarıyla bağlanmış, D-mannoz ve D-glikoz monomerlerinden oluşmaktadır (Alonso-Sanchez vd. 2009). Mannoz ve glikozun birleşme oranları elde edildiği kaynağa göre farklılık göstermektedir. Literatürde orkidelerdeki mannoz:glikoz oranının ortalama 3:1 olduğu ve mannazın baskın olduğu belirtilmiştir (Georgiadis vd. 2012; Sezik 2012; Tester ve Al-Ghazzewi 2017).

Glukomannanın, salebin yapısında yer alan en önemli bileşeni olması ve salebin kalitesini doğrudan etkilemesinden dolayı literatürde miktarının belirlenmesine yönelik birçok çalışma olduğu tespit edilmiştir. Kaya ve Tekin'in yaptığı çalışmada (2001), Gaziantep'ten temin edilen salep örneklerinin glukomannan miktarının ortalama % 55,10 olarak tespit ettiklerini ve dondurma reolojisi üzerinde glukomannanın önemli bir kalite parametresi olduğu ifade edilmiştir (Kaya ve Tekin 2001). Farhoosh ve Riazi (2007), İran'daki iki farklı salep örneklerinde yaptıkları çalışmada; yuvarlak tipli ve dallı tip yumrularda glukomannan miktarının sırasıyla % 22,13 ve % 58,22 olduğu, dallı tip yumruların glukomannan içeriğinin yuvarlak tipli yumrulara göre daha yüksek tespit edildiği ancak yuvarlak tipli yumruları glukomannan kalitesinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir. (Farhoosh ve Riazi 2007).

Tekinşen ve arkadaşları (2010) tarafından on farklı salep türünün fizikokimyasal özellikleri belirtilmektedir. Bu çalışmada, *Orchis* cinsinden elde edilen salep örneklerinde glukomannan miktarının % 38,30-54,60 arasında olduğu, *Serapias* cinsinden elde edilen salep örneklerinde glukomannan miktarının % 44,80'e, *Dactylorhiza* cinsinden elde edilen salep örneklerinde glukomannan miktarının % 22,50'e düştüğü ifade edilmektedir (Tekinşen ve Güner 2010). Ayrıca, kaliteli bir salebin yaklaşık % 40 oranında glukomannan içermesi gerektiği bildirilmiştir (Şen vd. 2018). Tekinşen'in yapmış olduğu çalışmada da elde ettiği bilgiler literatür bilgileriyle paralellik göstermekte olup, *Orchis italica*'nın en yüksek glukomannan içeriğine sahip olması sebebiyle (% 54,60) en kaliteli salebin bu türden elde edildiği belirtilmiştir (Tekinşen ve Güner 2010).

Vatansever (2016) çalışmasında kullanmak amacıyla piyasadan temin etmiş olduğu saf toz salep örneğinin glukomannan düzeyinin % 18,92 olduğunu bildirmiştir (Vatansever 2016). Bulut-Solak ve arkadaşları (2017), *Orchis anatolica* türü üzerinde yapmış oldukları çalışmada, *Orchis anatolica*'nın glukomannan içeriğini % 18,50 olarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir (Bulut-Solak vd. 2017). Şen ve arkadaşları (2018) Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin etmiş oldukları 8 farklı cinsten ait 20 farklı orkide türünün kompozisyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında *Dactylorhiza romana* ssp. *georgica*, *Orchis tridentata* ve *Serapias vomeracea* ssp. *vomeracea* türlerinden elde edilen glukomannan içeriğinin en yüksek sahip olan türler olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada farklı cinslere ait yumruların elde edilen glukomannan verileri çizelge 2.3'te sunulmaktadır (Şen vd. 2018).

Çizelge 2.3. Farklı cinslere ait salep yumrularının glukomannan oranları (Şen vd. 2018)

Cins	Glukomannan (%)
<i>Orchis</i>	7,84-45,53
<i>Ophry</i>	16,10
<i>Serapias</i>	35,66-47,76
<i>Dactylorhiza</i>	32,97- 48,54
<i>Anacamptis</i>	14,60- 25,08
<i>Comperia</i>	35,66
<i>Himantoglossum</i>	36,64
<i>Platanthera</i>	35,82

Sağlık açısından bakıldığında, suda çözünebilir doğal bir lif olması ve kendi ağırlığının 50 katı kadar su tutabilmesinden dolayı glukomannanın besleyici ve yatıştırıcı özelliği olduğu bildirilmektedir (Keithley ve Swanson 2005; Tamer vd. 2006). Literatürde glukomannanın serum kolesterol seviyesini düşürdüğü, sindirim sistemi fonksiyonlarını düzenlediği, kandaki glikoz düzeyini dengelediği, su tutma kapasitesinin yüksek olması sebebiyle tokluk hissi yarattığını ve kilo vermede etkili olduğu belirtilmektedir (Keithley ve Swanson 2005; Farhoosh ve Riazi 2007; Ayar vd. 2009; Tester ve Al-Ghazzewi 2017) İştah azaltması sebebiyle kilo kontrolü amacıyla uygulanan diyetlerde yardımcı madde olarak bu liften 2-3 g/gün tüketilmesi önerilmektedir (González vd. 2004).

Bununla birlikte olumsuz özellikleri olarak, karın ağrısı, gaz, alt sindirim sistemi ile ilgili sorunlar ve bazı ilaçların biyoyararlılığını azaltma etkileri olduğu bildirilmektedir. Ayrıca bazı ülkelerde glukomannan tabletlerinin tüketimine bağlı olarak yemek borusu tıkanıklığı vakaların görüldüğü belirtilmektedir (González vd. 2004; Keithley ve Swanson 2005).

2.1.1.2. Nişasta

Salep bileşiminde yer alan, en yüksek yüzdeye sahip ikinci bileşen nişastadır. Nişasta, doğal olarak bitkiler tarafından sentezlenen, bitkilerin tohum, kök, yumru, gövde, yaprak ve hatta polenlerinde de bulunabilen α -1,4-glikozidik bağları ile bağlı α -D-glikoz birimlerinden oluşan lineer bir polimer olan amiloz ile α -D-glikozun α -1-4 ve α -1-6 glikozidik bağları ile bağlanması sonucu oluşan dallanmış bir polimer olan amilopektinden oluşmuş bir polisakkarittir.

Nişasta ve nişasta ürünleri gıda sanayinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Beslenme açısından nişasta iyi bir karbonhidrat kaynağı olmak dışında gıdalarda çeşitli fonksiyonları olup, bunların başlıcaları; dokusal ve görünüş özelliklerin geliştirilmesi, kıvamı arttırması, nem tutucu olması ve stabilizatör olarak kullanılması şeklinde sıralanabilmektedir (Saldamlı 2007). Salebin yapısında bulunan nişasta ise, şişme özelliği olmasından dolayı glukomannanın kıvam oluşumunda yardımcı olarak görev yaptığı bildirilmektedir (Yılmaz 2015).

Kaya ve Tekin (2001) çalışmasında, saleplerdeki nişasta miktarını ortalama % 2,80 olduğu belirtilmiştir (Kaya ve Tekin 2001). 2007 yılında İran'da yapılan çalışmada dallı yumru şeklinde olan salep örneklerinin nişasta içeriği % 1,67 olduğu, yuvarlak yumru şekline sahip salep örneklerinin nişasta içeriğinin % 6,15 olduğu bildirilmiştir. Dallı yumru şeklinde olan salep örneklerinin yuvarlak yumru şekline sahip salep örneklerine göre daha az nişasta içerdiği, buna karşılık daha fazla glukomannan içerdiği ifade edilmiştir (Farhoosh ve Riazı 2007). Tekinşen ve Güner (2010) orkide cinsleri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, *Orchis* cinsinden elde edilen salep örneklerinde nişasta miktarının % 5,44 ile % 27,60 arasında olduğu, *Serapias* cinsinde elde edilen salep örneklerinde nişasta miktarının % 13,40 olduğu, *Dactylorhiza* cinsinden elde edilen salep örneklerinde nişasta miktarının % 38,70 olduğu ifade edilmiştir. Elde etmiş oldukları verilere göre salep içeriğindeki glukomannan ile nişasta oranının ters orantılı olduğunu bildirmektedir (Tekinşen ve Güner 2010).

Vatansever tarafından gerçekleştirilen çalışmada piyasadan elde edilen saf toz salep örneğinin nişasta düzeyini % 34,85 olarak tespit edildiği ifade edilmektedir (Vatansever 2016). Bulut-Solak ve arkadaşları (2017), *Orchis anatolica* türünden elde edilen salep örneği üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında nişasta içeriğinin % 5,40-38,70 arasında olduğu bildirilmektedir (Bulut-Solak vd. 2017).

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın ulusal gıda kompozisyon veri tabanında, Maraş toz salebinin nişasta içeriği % 22,32 olarak yayınlanmıştır (GTHB 2018). Şen ve arkadaşlarının (2018) 20 farklı orkide türünün kompozisyonun belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri nişasta verileri çizelge 2.4'te sunulmaktadır.

Çizelge 2.4. Farklı cinslere ait salep yumrularının nişasta oranları (Şen vd. 2018)

Cins	Nişasta (%)
<i>Orchis</i>	4,58-41,61
<i>Ophry</i>	40,07
<i>Serapias</i>	13,30-24,61
<i>Dactylorhiza</i>	13,50-43,98
<i>Anacamptis</i>	14,60-25,08
<i>Comperia</i>	35,66
<i>Himantoglossum</i>	35,00
<i>Platanthera</i>	5,96

2.1.1.3. Minör bileşenler

Literatür taramasında salebin bileşiminde yer alan minör bileşenlerin incelendiğinde genellikle rutubet, protein ve kül içeriğinden bahsedildiği belirlenmiştir. Salep minör bileşenlerine yönelik literatürde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Salebin minör bileşenlerine (rutubet, kül, protein) ait literatür bulguları

Rutubet (%)	Kül (%)	Protein (%)	Kaynak
7,5	2,3		(Kaya ve Tekin 2001)
12,85*	2,10*	7,32*	(Farhoosh ve Riazi 2007)
13,56**	3,84**	3,09**	
9,35-12,40	0,95-2,83	3,11-4,95	(Tekinşen ve Güner 2010)
	2,2	5,36	(Lalika vd. 2013)
12,23	0,95	3,51	(Vatansever 2016)
9,35-13,20	0,95-2,83	3,20-7,35	(Bulut-Solak vd. 2017)
	1,46-6,72	2,70-11,93	(Şen vd. 2018)
9,43	2,79	5,31	(GTHB 2018)

*: Yuvarlak tip yumru (YTP)

**: Dallı tip yumru (PTY)

Salebin kül içeriğinin farklılık göstermesinin sebebi olarak; elde edildiği türlere ve/veya türlerin yetiştiği toprağın bileşimine bağlı olabileceği ifade edilmektedir (Tekinşen ve Güner 2010). Başka bir çalışmada salebin bileşiminde yer alan külün, temel olarak potasyum ve kalsiyumun fosfat ve klorüründen oluştuğu bilgisine yer verilmektedir (Hossain 2011). Nem içeriğinin ise uzun süre depolanacak olan salep için önemli bir kalite parametresi olduğu ve % 10'un altında olması gerektiği bildirilmektedir (Tekinşen ve Güner 2010).

2.1.2. Yasal düzenlemeler

Türkiye’de yetişen orkidelerin yumrularından yıllarca salep elde edilmiş, hem yurt içinde kullanılmış hem de ihracatı gerçekleştirilmiştir (Çağlayan vd. 1998). Ancak salep tozunun, pahalı ve az bulunur olmasıyla sebebiyle tarihte salep ile ilgili bazı yasal düzenlemelerin yapılması zorunluluğu ortaya çıkmıştır. 09 Ekim 1991 tarihli ve 21016 sayılı Resmî Gazete’de yer alan Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından yayınlanan doğal çiçek soğanlarının sökümlü, üretimi ve ihracatına ait yönetmelikteki tebliğ’de endemik özellikte olan ve varlıkları tükenmekte olan orkide (salep) türlerinin ihracat amaçlı doğadan elde edilmesi yasaklanmıştır (Anonim 1991; Yaman 2013). 19 Temmuz 1998 tarihli ve 23407 sayılı Resmi Gazete’de Dış Ticaret Müsteşarlığı tarafından yayınlanan 96/31 sayılı ihracı yasak ve ön izne bağlı mallara ilişkin tebliğinde “*Orchidaceae* (salep) türlerinin yumru ve droglarının (toz, tablet ve her türlü formda) ihracatı yapılamaz” ifadesi yer aldığı belirtilmiştir (Anonim 1998; Yaman 2013; Anonim 2017). Salebin herhangi bir formda yurtdışına çıkarılması kanunen yasaklanmış olmasına rağmen, ülkemizden önemli düzeylerde salebin yurtdışına çıkarıldığına yönelik bulgular mevcuttur. Literatüre göre, Türkiye’de üretilen salebin, en iyi kalitede olduğu ve başta Almanya olmak üzere Avrupa ülkelerinin birçoğuna salep ihracatı yapan en önde gelen ülke olduğu bildirilmiştir (Hossain 2011). Yasal olarak yasak olmasına rağmen, 1991 yılında Almanya’ya ihraç edilen salebin 2,11 ton olduğu ve aynı yayında 1993 yılında Türkiye’nin toplam 75,12 ton salep ihraç ettiği bilgisine yer verilmiştir (Kasperek ve Grimm 1999).

2.1.3. Salep içeceği formülasyonları

Salep içeceği; süt, soya sütü veya suyun içersine ilave edilen, salep tozu ve şekerin birlikte kaynatılıp, üzerine tarçın serpilmesiyle hazırlanır. Bunun yanısıra günümüzde ticari olarak hızlı çözünebilir (instant) toz formunda veya yüksek sıcaklık uygulaması (UHT) tekniğiyle üretilmiş sıvı formda salepler de marketlerde bulunabilmektedir (Dogan ve Kayacier 2004; Georgiadis vd. 2012). Türkiye’de pazarlanan salep içeceklerinde kullanılan salepler, Türk Gıda Kodeksi 10.04.2013 tarihli 2013/12 nolu Baharat tebliği’ne uygun olmalı ve kodekste belirtilen tanımındaki özellikleri taşıması gerekmektedir (Türk Gıda Kodeksi 2013).

Salebin, pahalı bir baharat olmasından dolayı tadı ve kıvamının daha iyi ayarlanabilmesi için bir takım kıvam verici maddeler ve/veya nişasta ilavesi söz konusu olmaktadır. Genel olarak hızlı çözünebilir salebin içerisinde; şeker, nişasta, süttozu, salep tozu, kıvam artırıcı, stabilizatör, tarçın ve aroma vericiler bulunmaktadır (Dogan ve Kayacier 2004). Bununla birlikte değerli ve az bulunması, salep ihracatının yasak olması gibi temel sebeplerden dolayı günümüzde salep yerine bir takım ikame edici maddelerinde (karboksimetil selüloz (CMC), çözünen nişasta, pirinç nişastası, karragenler, konyak glukomannanı, guar sakızı, tara sakızı, ksantan sakızı, keçiyoynuzu özü) kullanıldığı literatürde bildirilmektedir (Kasperek ve Grimm 1999; Sezik 2012). Hatta bunların bir kısmının piyasada “suni salep” olarak 15 TL/kg civarındaki fiyatlarla satıldığı belirtilmektedir (Sezik 2012). Çizelge 2.6’da ticari saleplerde katkı maddesi olarak kullanılan, taklit ve taşıyıcı amaçlı katılması muhtemel bazı materyaller ve piyasa fiyatları gösterilmektedir (Anonim 2018a).

Çizelge 2.6. Ticari saleplerde katkı maddesi, taklit ve tağşiş amaçlı katılan bazı materyaller ve fiyatları (Anonim 2018a)

Materyal	Fiyat (TL/kg)	Materyal	Fiyat (TL/kg)
Guar sakız	22	Tarçın	50
Arabik sakızı	34	Öğütülmüş makarna	6
Keçiboynuzu sakızı	80	Galetu unu	6
Konjak sakız	50	Öğütülmüş pirinç	7
Buğday nişastası	8	Öğütülmüş bulgur	8
Mısır nişastası	14	Buğday unu	7
Patates nişastası	11	Ksantan sakız	24
Pirinç nişastası	20	Salep sıvı aroma verici	86
Şeker	5	Salep toz aroma verici	73
Yağsız süt tozu	20	Karboksimetil selüloz	35
Vanilya	90		

Türkiye’de piyasa saleplerinin gerçek olup olmadığını ve/veya hangi oranda salep içerdiğinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntem olmamasından dolayı, salebe fiziksel ve kimyasal olarak benzer yapıya sahip olan ucuz ve kolay bulunabilir toz gıda maddeleriyle salebin taklit ve tağşişe uğratıldığı literatürde belirtilmektedir (Tamer vd. 2006).

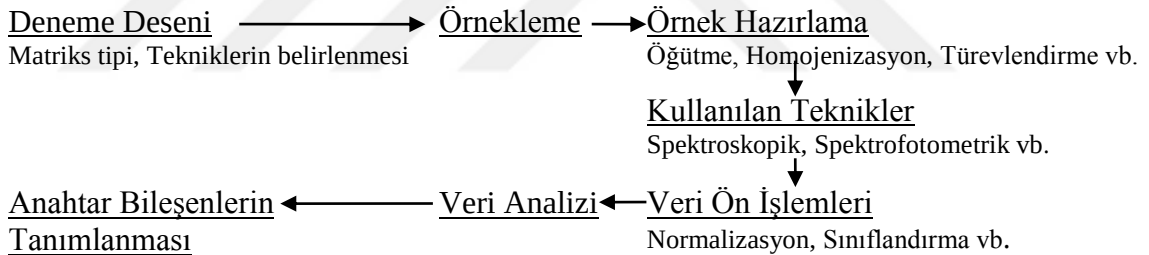
Literatürde açıkça belirtilmiş olmasına rağmen bugüne kadar salebin taklit ve tağşişinin belirlenmesine yönelik sadece Kabacaoğlu’nun (2018) yapmış olduğu çalışmaya ulaşılabilmektedir. Kabacaoğlu, moleküler yöntem kullanılarak salep miktarının tespitine yönelik yaptığı çalışmada, ticari bir kit yardımıyla yapılan izolasyon ile salep karışımı içinde cinse spesifik olabilecek bazı bantların gözlemlendiğini bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda cinse spesifik bantlar üzerinden marker geliştirilebileceği ve böylece farklı orkide cinslerine özgü primerler tasarlanarak spesifik orkide türlerinin tespit edilebilmesine yönelik yöntem geliştirilebileceği belirtilmektedir. Ancak çalışma kapsamında yürütülen DNA izolasyon çalışmalarında, materyal olarak salebin DNA izolasyonunda zorluklar yaşandığı, elde edilen DNA miktar ve kalitesinin diğer biyolojik materyallerden daha düşük olmasından dolayı ticari kit kullanılarak izolasyon yapmanın zorunluluğundan bahsedilmektedir (Kabacaoğlu 2018).

2.2. Taklit ve Tağşişin Belirlenmesinde Yöntem Geliştirme Çalışmaları

Gıdalarda yapılan hilelerin tespiti zor ancak bir o kadar büyük önem arz etmektedir. Hilelerin tespit edilmesi üretici ve tüketiciyi ekonomik ve sağlık bakımından korurken, kontrol mekanizmalarınca bu ürünün etiketlerinde beyan edilen bilginin doğru olup olmadığının belirlenebilmesi ve yasaların uygulanabilmesi açısından gereklidir (Primrose vd. 2010). Gıda ürünlerinde en çok karşılaşılan hile çeşidi taklit ve tağşiştir.

Türk Gıda Kodeksi 11.06.2010 tarihli 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu'nda taklit, “Ürünlerin şekil, bileşim ve nitelikleri itibarıyla yapısında bulunmayan özelliklere sahipmiş gibi veya başka bir ürünün aynısıymış gibi gösterilmesi” şeklinde tanımlanmaktadır. Tağşiş ise “Ürünlere temel özelliğini veren öğelerin ve besin değerlerinin tamamının veya bir bölümünün mevzuata aykırı olarak çıkarılması veya miktarının değiştirilmesi veya aynı değeri taşımayan bir başka maddenin, o madde yerine aynı maddeymiş gibi gösterilmesi” şeklinde ifade edilmektedir (Anonim 2010).

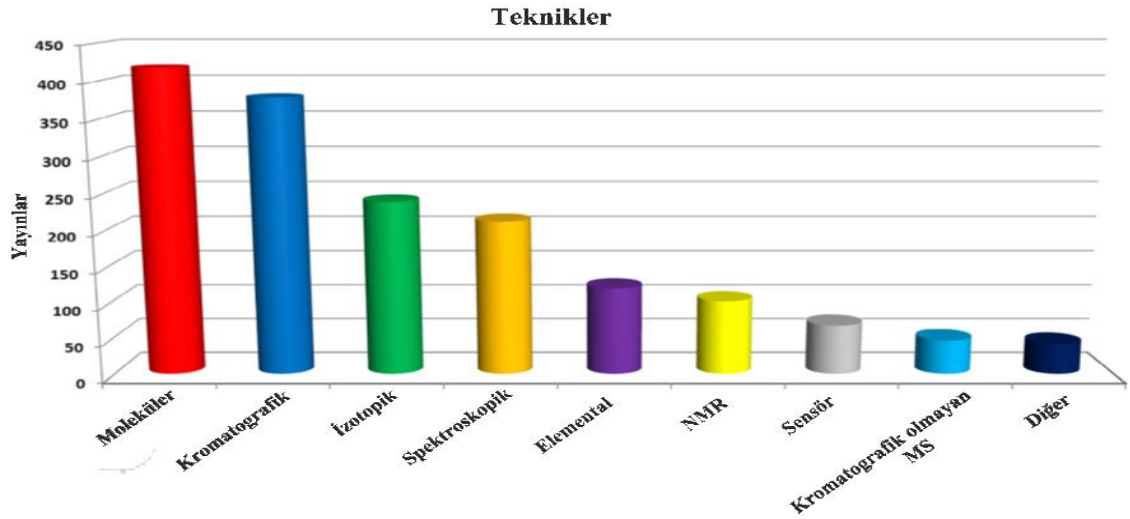
Gıda taklit ve tağşiş genellikle, tüketici tarafından fark edilmesi zor olan ve gıdaya ilave edilmesi ile ekonomik açıdan üreticiye büyük avantajlar sağlayan bir takım maddelerle yapılmaktadır. Bu nedenle taklit ve tağşiş materyalleri piyasada kolaylıkla bulunabilen maddelerden seçilmektedir. Belirli bir oranda orijinal gıdaya katılan bu maddeler çoğu zaman tüketiciler tarafından duysal olarak algılanamamaktadır. Bundan dolayı, Gıda Standartları Ajansı (FSA) tarafından finanse edilen orijinallik araştırmasında, gıdaların standartlara ve etiketleme mevzuatına uygunluğunun doğrulanması ve gıda sahtekarlığının tespit edilmesinin gerekliliği ifade edilmektedir (Primrose vd. 2010). Taklit ve tağşiş durumlarının belirlenmesi amacıyla günümüzde, orijinal ürünün parmak izi sayılabilecek bir takım kritik unsurlar belirlenmekte ve elde edilen verilere istatistiksel ve kemometrik yöntemler uygulanarak gıda maddesine uygulanan taklit ve/veya tağşiş durumu nitel ve/veya nicel olarak ortaya konulabilmektedir. Şekil 2.2’de gıda analizlerinde kullanılabilecek ‘parmak izi yöntem’ geliştirilmesinde izlenebilecek işlem basamakları sunulmaktadır (Esslinger vd. 2014).



Şekil 2.2. Gıda analizlerinde kullanılabilecek ‘parmak izi yöntemi’ işlem basamakları (Esslinger vd. 2014)

2.2.1. Gıda maddelerinde taklit ve tağşişin tespiti ve kullanılan teknikler

Taklit ve tağşiş maddeleri genellikle kimyasal açıdan orijinal ürünle benzerlikler göstermesinden dolayı, orijinal ürünle arasındaki farkın belirlenmesi, oldukça karmaşık süreçleri ve ileri analitik tekniklerin kullanılmasını gerektirmektedir. Tekniklerin uzmanlık gerektirmesi, kullanılan kimyasalların çevresel kirlilik etmeninin açığa çıkarması, zaman ve kimyasal malzeme sarfiyatının yüksek olması ve tüketicilerin gıda güvenliği konusunda gittikçe bilinçlenmesinden dolayı, bu alanda araştırma yapanları yeni teknikleri geliştirme konusunda çalışma yapmaya yöneltmektedir (Sun 2008; Danezis vd. 2016). Şekil 2.3’te Danezis vd. (2016)’nin sunduğu, 2009-2015 yılları arasında Scopus’ta yayınlanmış olan, gıdalardaki taklit ve tağşişin belirlenmesine yönelik yapılmış olan çalışmalarda kullanılan farklı tekniklerin dağılımı sunulmaktadır (Danezis vd. 2016).



Şekil 2.3. 2009-2015 yıllarında Scopus yayınlanmış olan, gıdalardaki taklit ve tağşişin belirlenmesine yönelik yapılmış çalışmalarda kullanılan tekniklerin dağılımı (Danezis vd. 2016)

Gıdanın kimyasal bileşenlerinin düzeylerinin belirlenmesi, hangi bileşenin o gıda maddesinde baskın olarak bulunduğu ve coğrafi olarak gıda bileşenlerinde görülebilecek farklılıklarının tespiti, parmak izi olarak nitelendirilebilecek kritik unsurların ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Farklılıkların tespitinde volumetrik ve gravimetrik analizler sonucunda da gıdayı tanımlayıcı bir takım bilgilere ulaşılsa bile bu çalışmalardan elde edilen bilgilerin kısıtlı olmasından dolayı, daha ileri tekniklerin tercih edildiği şekil 2.3'te görülmektedir. Literatürdeki çalışmalarda incelendiğinde moleküler, kromatografik, spektrometrik ve spektroskopik yöntemler çoğunlukla tercih edildiği tespit edilmiştir (Sun 2008; Danezis vd. 2016). Tez kapsamında kullanılacak olan teknikler ile ilgili bilgiler sunulmaktadır.

2.2.1.1. İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS)

İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) atomik emisyonu dayanan plazma kaynaklı elementel analiz tekniğidir. Analitik bir cihaz olarak, indüktif eşleşmiş plazma (ICP) ve kütle spektrometresi (MS) olmak üzere iki üniteden oluşmaktadır. ICP'de, sıvı haldeki numuneler sisteme bir enjektör yardımıyla enjekte edilir. Nebulizer yani püskürtücü, argon gazı yardımıyla sıvı numuneyi aerosol dediğimiz küçük damlacıklara çevirir ve yaklaşık 6000-10000 K sıcaklığında iyonizasyon kaynağı olan argon plazması denilen ortama ulaşır. Yüksek sıcaklığının etkisi ile madde atomlaşmaya başlar. Son yörüngesinden elektron koparılan atom tek pozitif yüklü hale gelir. Çift yüklü iyonların oluşması daha zor olduğundan ve girişim riskini arttırdığından çalışması pek doğru değildir. Bu arada sistemden istenmeyen iyonlar ayrılarak atılır. Örnek iyonları, plazmadaki atmosferik basınçtan bir pompa sistemi yardımıyla, bir vakum odası içerisinde bulunan kütle spektrometresine taşınır. Oluşan pozitif yüklü iyonlar MS'de, kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılıp, dedektöre gönderilir. Her element, örneğin içerisinde bulunduğu miktarla doğru orantılı olarak bir pik oluşturur; böylece örnek içerisindeki elementel derişimleri ölçülebilmektedir (Thomas 2013).

MS, diğer elementel analiz teknikleriyle (atomik absorpsiyon ve emisyon spektrometreleri) karşılaştırıldığında daha düşük tespit sınırına sahip olması (nanogram-pikogram/litre), yüksek seçiciliği, hassas ve hızlı olması, aynı anda çok sayıda elementi analiz edebilmesi, çalışma aralığının oldukça geniş olması, kimyasal girişimin çok düşük düzeyde olması gibi sebebler nedeniyle en çok tercih edilen elementel analiz tekniği olarak karşımıza çıkmaktadır (Skoog vd. 2007; Thomas 2013; Pico 2015).

Elementlerin gıda maddelerinde tespit edilen düzeyleri daha çok bitkinin yetiştirildiği toprak yapısı ile ilişkili olsa da botanik çeşitlilik de önemli parametrelerdendir. Ayrıca tağşiş için kullanılan bazı materyallerin sentetik olarak üretilmeleri elementel açıdan bu maddelerin kolaylıkla teşhis edilebilmesine yol açmaktadır. Literatürde, ICP-MS kullanılarak pirinçlerin coğrafi kökenlerinin belirlenmesi (Cheajesadagul vd. 2013), safranın sınıflandırılması (D'Archivio vd. 2014), şeker kamışı ve pancardan üretilen şekerlerin sınıflandırılması (Rodushkin vd. 2011) gibi çalışmalar literatürde bildirilmektedir. Gıda tağşişinin belirlenmesi çalışmalarında son yıllarda popüler bir yaklaşım olarak ICP-MS tekniği kullanılarak ballarda yapılan tağşişin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalara ulaşılmıştır (Chudzinska ve Baralkiewicz 2010; Chudzinska ve Baralkiewicz 2011).

2.2.1.2. İzotop oranı kütle spektrometresi (IR-MS)

İzotop atomlar, aynı sayıda protona sahip olan fakat çekirdeklerinde farklı sayıda nötron bulunan atomlar olarak tanımlanabilirler. Gıda kaynağına bağlı olarak moleküllerin izotop içerikleri ve dağılımları, çevresel faktörlerden ve sentez yollarından etkilenmektedir. Bu özellikten faydalanarak, aynı kimyasal yapıya sahip fakat farklı kaynaklardan elde edilen moleküllerin kökeni (kaynağı) hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Literatürde izotopik analizler için, gıdalarda yapılan hilenin tespiti için kullanılan en etkili yöntemlerden birisi olduğu ifadelerine rastlanmaktadır (Calderone ve Guillou 2008; Luykx ve Van Ruth 2008; Sun 2008; Magdas vd. 2013).

İzotop Oranı Kütle Spektrometresi (IR-MS) hidrojen, karbon, oksijen, azot ve kükürt gibi hafif elementlerin kararlı izotoplarının oranlarının ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ve $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) analizinin yapılabildiği bir tekniktir (Sun 2008). Çizelge 2.7'de bazı kararlı izotopların doğal bolluk oranları sunulmaktadır (Calderone ve Guillou 2008).

Çizelge 2.7. Bazı kararlı izotopların doğal bolluk oranları (Calderone ve Guillou 2008)

Element	İzotop	Doğadaki Bolluluğu (%)
Hidrojen	^1H	99,99
	^2H	0,01
Karbon	^{12}C	98,89
	^{13}C	1,11
Azot	^{14}N	99,63
	^{15}N	0,37
Oksijen	^{16}O	99,76
	^{17}O	0,04
	^{18}O	0,20

İzotop oranı ölçümleri için kütle spektrometreleri, hassas sonuçlar vermesi için manyetik bir alana ve tüm iyon ışınlarının eş zamanlı olarak ölçülmesi için farklı Faraday kaplarından oluşan çoklu toplama alanına sahiptir. İzotopik farklılıklar oldukça küçük değişimler gösterdiği için per mil (‰) olarak « Delta », « δ » olarak tanımlanır. Delta değeri belirlenmiş bir orandır ve uluslararası kabul edilmiş bir elementin izotop oranının sapmasını gösterir (2.1) (Sun 2008).

$$\delta(\text{‰}) = (R_{\text{örnek}}/R_{\text{standart}})/R_{\text{standart}} \quad (2.1)$$

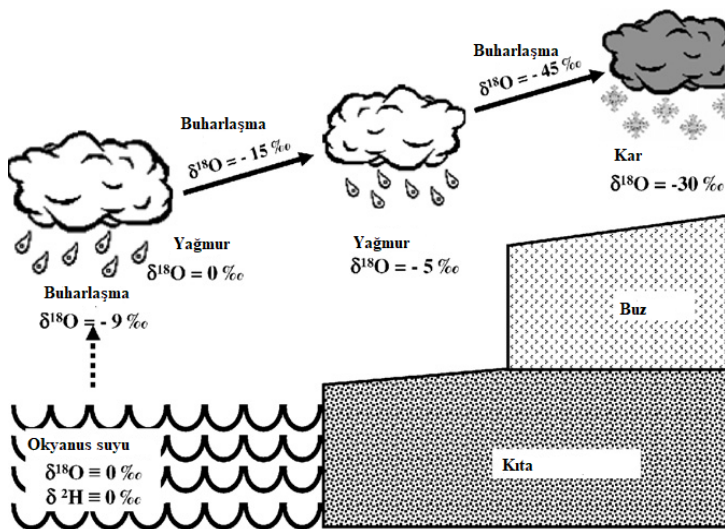
IR-MS çalışma prensibi

IR-MS’de sadece gaz halindeki organik örnekler analiz edilebilir. Bu nedenle numune gaz formuna çevrilir. Numune iyonlaştırılır. İyonik yükler, kütle ayırıcısında ayrılır. Delta sonucu değerlendirilir (Sun 2008).

Biyo-elementlerin izotop oranları ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) bazı faktörlere bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Bu farklılıkların çevresel veya metabolik farklılıklar olarak karşımıza çıkmaktadır (Calderone ve Guillou 2008; Sun 2008; Magdas vd. 2013).

Oksijen ve hidrojen

Hidrojen (^2H) ve oksijenin (^{18}O) doğal izotop fraksiyonu, su döngüsünün buharlaşma ve yoğunlaşma işlemlerine bağlı olarak değişir (Calderone ve Guillou 2008). Bu yüzden sıcaklık, ^{18}O ve ^2H izotoplarının zenginleşmesini etkileyen en önemli faktördür. Sıcaklık değişimleri ^{18}O ve ^2H ’nin değişimlerine neden olur. Orta ve yüksek enlemlerde bu değişimi yansıtabilecek düzeyde modellerin geliştirildiği bildirilmiştir. Ancak düşük enlemlerde yağışların izotopik içeriğinin, yağın yağmur miktarı ile daha yakından ilgili olduğu ifade edilmiştir (Sun 2008). Şekil 2.4’te oksijen ve hidrojen elementlerinin izotopik fraksiyonlanması üzerine iklimsel ve coğrafik etkileri sunulmaktadır (Calderone ve Guillou 2008).



Şekil 2.4. Oksijen ve hidrojen elementlerinin izotopik fraksiyonlanması üzerine iklimsel ve coğrafik etkileri (Calderone and Guillou 2008)

Hidrojen ve oksijenin izotopik fraksiyonunun oluşmasında, ikinci önemli etki ise yüksekliktir. Yükseklikteki her 100 metrelik artışın ^{18}O oranında ‰-0,15 ile -0,5 arasında, ^2H oranında ‰-1 ile -4 arasında değişmelere neden olduğu bildirilmiştir (Sun 2008). Bitki ve hayvanlardaki oksijen ve hidrojen izotopik zenginleşme ise genellikle bölgesel yağışlardan etkilenmektedir (Sun 2008). Bitki fizyolojisinde gerçekleşen ve bitkinin yetiştiği ortamdaki su mevcudiyetine uyum sağlamasını kolaylaştıran stomanın açılıp kapanması olayı izotop oranlarının değişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca olgunlaşma döneminde gerçekleşen buharlaşma-terleme olayı, izotop oranlarının değişimleri üzerine etkilidir. Bu fizyolojik olay, bitki ve meyvelerin sularının ^{18}O ve ^2H izotoplarınca zenginleşmesine neden olur. Bunun kanıtı olarak, asma gibi yeryüzünde yetişen bitkilerin, yer altında büyüyen şeker pancarı gibi bitkilere göre daha kuvvetli buharlaşma-terleme olayını gerçekleştirmesinden dolayı, asmanın sahip olduğu şekerin ^2H içeriği, şeker pancarındaki şekerin ^2H içeriğinden daha zengin olduğu bilgisi sunulabilmektedir (Calderone ve Guillou 2008).

Karbon

Metabolizmalarındaki farklılıktan dolayı bitkiler karbon asimilasyon yolları bakımından üç kategoride sınıflandırılabilirler (Sun 2008; Magdas vd. 2013). Bunlar;

- *C3 bitkileri*: Tüm ağaçlar dahil olmak üzere bitkilerin çoğu, Calvin döngüsü metabolizmasına sahiptir ve genellikle fotosentez sırasında sentezlenen ilk organik asitin karbon atom sayısından dolayı C3 bitkileri olarak adlandırılırlar. $\delta^{13}\text{C}$ değerleri ‰-24 ile -32 arasında değiştiği ifade edilmiştir (Sun 2008). Başka bir kaynakta bu değerlerin ‰-22 ile -33 arasında değiştiği ve ortalama değerlerin ‰-27 olduğu bildirilmiştir (Magdas vd. 2013). Bu grubun tipik örneklerinden en bileneni ise şeker pancarı'dır (Sun 2008).
- *C4 bitkileri*: Tropik bölgelerde yetişen bitkilerde görülmekte olup, Hatch-Slack metabolizmasına dayanmakta ve C4 bitkileri olarak adlandırılmaktadır (Sun 2008). C4 bitkileri C3 bitkilerinden yaklaşık ‰14 daha fazla ^{13}C içermektedir (Magdas vd. 2013). Mısır, şeker kamışı ve sorgum bu grupta yer alan bitkilerden olup $\delta^{13}\text{C}$ değerleri ‰-12 ile -14 arasında ifade edilmiştir (Sun 2008). Magdas ve arkadaşları (2013) $\delta^{13}\text{C}$ değerlerinin ‰-10 ile -16 arasında olduğu bildirilmiştir (Magdas vd. 2013).
- *CAM bitkileri*: kurak iklimlerde yetişen ve Crassulacean asit metabolizmasına dayanan bitkilerdir. CAM metabolizması C4 metabolizmasına benzer olduğundan CAM bitkilerine ait $\delta^{13}\text{C}$ değerleri C3 ve C4 bitkileri'nin $\delta^{13}\text{C}$ değerleri arasında (‰-15 ile -24) bir aralıkta yer almaktadır. Ananas, kaktüs ve vanilya bu grupta yer alan bitkiler'dir (Sun 2008).

Azot

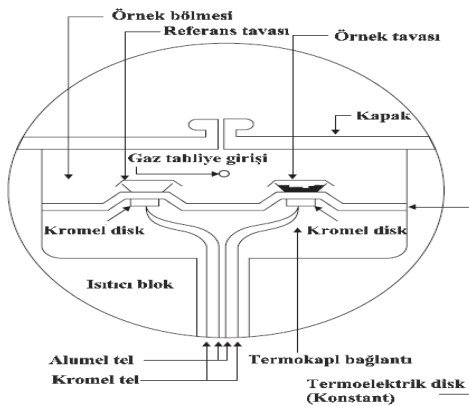
Literatürde bitkilerin ^{15}N zenginleşmelerinin nedenleri; bitki türü, bitkinin yetiştiği toprak türü (meydana gelen tüm mineralizasyon, nitrifikasyon, denitrifikasyon süreçleri ve simbiyotik bakteri varlığı) ve gübre çeşidi olarak bildirilmiştir. Hayvanlarda görülen zenginleşmenin nedeni ise, besin zincirindeki ^{15}N 'çe zengin diyetten kaynaklanabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca kullanılan sentetik gübrelerin, kullanıldıkları tarım ürünlerindeki azot değerlerinin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir (Sun 2008).

Sonuç olarak, gıda kaynağına bağlı olarak izotop oranları çeşitli faktörlere (gübre kullanımı, toprak bileşimi, mevsimsel faktörler, denizden olan yükseklik, damıtma ve buharlaştırma vb.) bağlı olarak farklılık göstermekte olup, gıdanın orijini hakkında önemli ipuçları vermektedir (Luykx ve Van Ruth 2008). Kararlı izotop analizleri son 30 yıldır gıdalarda yapılan hilenin tespiti için kullanılan en etkili yöntemlerden birisi olup, Avrupa ve Kuzey Amerika’da gıdaların orijinalliğinin tespiti için çeşitli izotop analizleri resmi veya standart yöntemler olarak kullanılmaktadır (Calderone ve Guillou 2008). Literatürde, IR-MS tekniği ile portakal sularına katılan şekerin tespit edilmesinde (Antolovich vd. 2001), içeceklere katılan yasal olmayan suyun tespit edilmesinde (Calderone ve Guillou 2008) tavuk yumurtası, et (domuz eti, tavuk), balda coğrafi orijinalliğinin tespit edilmesi ve doğrulanması (Malec-Czechowska ve Wierznicki 2013), meyve sularının doğrulanması amacıyla (Magdas vd. 2013) ve sütlerin coğrafi kökenlerinin belirlenmesinde (Luo vd. 2016) kullanıldığı tespit edilmiştir.

2.2.1.3. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

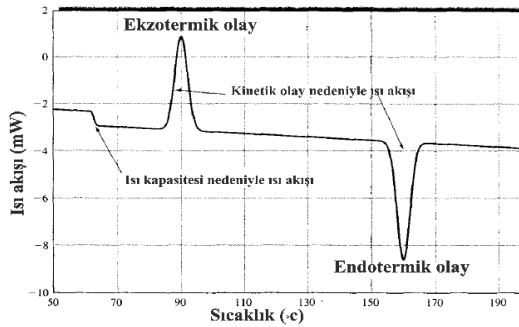
Termal analiz, bir maddenin fiziksel özelliklerinin sıcaklık fonksiyonu olarak ölçüldüğü bir teknikler grubu olarak tanımlanır. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), örnek ve referans materyaline kontrollü ve aynı sıcaklık programı uygulanırken, biri örneğe ve biri referansa ait olan iki ölçüm sensörünün kullanılması ile elde edilen enerji girdilerinin farkının, sıcaklığa karşı fonksiyonunu ölçen, kantitatif, hızlı ve yıkıcı olmaması sebebiyle en yaygın kullanılan termal bir tekniktir (Sun 2008; Şimşek 2008). Güç dengeli ve ısı akışlı olmak üzere temelde birbirinden farklı iki tür DSC cihazı geliştirilmiştir (Sun 2008). Tez kapsamında, ısı akışlı DSC kullanılarak termal analizler gerçekleştirilmiştir.

Isı akışlı DSC Cihazı, 1920 yılında Tian ve Calvet tarafından geliştirilmiştir. Çalışma prensibi; numune ve referans madde aynı termoelektrik bir disk üzerindeki platformlar üstünde bulunan alüminyumdan yapılmış küçük tepsilere yerleştirilir. Isı, elektrikle ısıtılan diskten tepsilere, oradan da maddelere aktarılır. İki tepside diferansiyel ısı akışı, termokapılar yardımıyla ölçülmesi esasına dayanır. Oluşan sıcaklık farkı iki malzeme arasındaki ısı akış farkı ile doğru orantılıdır. Sinyal (sıcaklık farkı) daha sonra kalorimetrik duyarlılık kullanılarak bir güç farkına dönüştürülür. Şekil 2.5’te ısı akışlı DSC cihazının iç yapısı gösterilmiştir (Sun 2008).



Şekil 2.5. Isı akışlı DSC sistemi (Sun 2008)

Sonuç olarak, termogram olarak adlandırılan ısı akışına karşı sıcaklık grafiği üretilmektedir (Şekil 2.6). Sıcaklık değiştikçe termogram çizgisinde meydana gelen değişimler ürün hakkında bilgi vermektedir. Bu tür DSC cihazı için, ısı akışındaki bir artış ekzotermik bir süreci ifade ederken, azalma ise endotermik bir süreci göstermektedir (Skoog, et al. 2007).



Şekil 2.6. Örnek DSC termogramı (Skoog vd. 2007)

Modern DSC cihazları ile kullanıcılar, erime noktalarını, camsı geçiş sıcaklıklarını ve ısı kapasite değerlerini belirleyebilmektedir. Ayrıca kinetik olaylar ve diğer geçiş sıcaklık dereceleri de hesaplanabilmektedir. Geçiş sıcaklıkları; materyalin bir durumdan diğer duruma geçerkenki ısı kapasitesindeki değişimi gösterirken, pikin altında/üstünde kalan alan ise, entalpi değişim değeri ile orantılı olarak değişmektedir (Skoog vd. 2007).

DSC analizleri ile elde edilen kalorimetrik veri gıda maddelerinin işlenmesi ve depolanması süreçlerinde termal geçişlerin anlaşılması noktasında önem arz etmektedir. Bununla birlikte, gıda maddesini meydana getiren birtakım öğeler termal davranışlar açısından farklı davranışlar sergileyebilmekte ve bu davranışların incelenmesi ile gıda maddesinin saflığı ve coğrafi kökenleri hakkında birtakım verilere ulaşılabilmektedir. Yapılan literatür çalışmalarında, gıdalardaki hilelerin belirlenmesinde, un ve nişastalarda retrogradasyon, jelatinizasyon ve camsı geçiş; katı ve sıvı yağlarda erime noktası, kristalizasyon, polimorfik davranışlar ve oksidasyon stabilitesi; sebzelerden elde edilen tozlarda camsı geçiş; proteinlerde denatürasyon ve agregasyondan sıklıkla yararlanıldığı tespit edilmiştir (Skoog vd. 2007; Sun 2008).

Nişasta, salebin ikinci ana bileşenini oluşturmakta olup salep taşıması konusunda da farklı türden nişastalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda maddelerinde bulunan doğal veya modifiye türden nişastalar DSC termogramında farklı piklere neden olmaktadır. Nişastanın türüne bağlı olarak 50 ve 80 °C arasında jelatinizasyon, 100 °C üzerinde amiloz-lipit kompleksi ve 140 °C'nin üzerinde ise yeniden kristallenmiş amiloz ve yeniden kristallenmiş amilopektinde retrogradasyon görülmekte olup bu değerler nişasta türleri arasında farklılıklar arz etmektedir (Heussen vd. 2011). Ayrıca literatürde; DSC sistemi kullanılarak tereyağındaki hayvasal yağ miktarının tespit edilmesinde (Coni vd. 1994), ballarda yapılan hilelerin belirlenmesinde (Cordella vd. 2002a), zeytinyağlarında farklı türden yağlar ile yapılan taşışın tespit edilmesi (Chiavaro vd. 2009; Van Wetten vd. 2015) ve tereyağı ile hurma yağı katılarak yapılan taşışının tespit edilmesi (Tomaszewska-Gras 2016) gibi çalışmalarında yer aldığı tespit edilmiştir.

2.2.1.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)

Kromatografik teknikler çeşitli şekillerde gıda analizinde kullanılan önemli yöntemler arasında yer almaktadır. Kromatografi terimi, bir hareketli faz ve bir sabit faz arasında analitlerin adsorpsiyonuna dayanan teknikleri kapsamaktadır. Bunlar genellikle sabit ve hareketli fazların karakterine, sabit fazın biçimine ve moleküllerin ayrılma güçlerine göre sınıflandırılırlar (Sun 2008).

Sıvı kromatografisi (LC), katı destek (adsorban) ile doldurulmuş bir kolon ve destek yatağı boyunca hareket eden bir sıvı kullanılarak yapılan, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız bileşenlerin ayrılması için kullanılan yöntemdir. Bileşenler, hareketli faz ile adsorban boyunca hareket eder, bu sırada bileşenler hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım katsayısındaki farklılıktan dolayı ayrılır. Ayrılan bileşenler kolon çıkışına bağlanan dedektörle tespit edilerek miktarlarıyla orantılı olarak ölçülür. Dedektör tarafından elde edilen ve analit konsantrasyonunun zamana bağlı fonksiyonunu gösteren grafikler kromatogram olarak ifade edilmektedir (Skoog vd. 2007).

Sıvı kromatografi tekniğinin literatürde geniş kapsamda kullanılmaya başlamasından sonra zamanla analiz süresini azaltma ihtiyacı oluşmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, yüksek basınç (yaklaşık 400 bar) uygulanmasıyla beraber kolon dolgu maddesi ve dedektörlerdeki iyileştirmeler cihaz performansının yükselmesini sağladığı görülmüştür. Dolayısıyla 1970'lerin ortalarından sonlarına doğru sıvı kromatografisi "yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)" adıyla anılmaya başlamıştır. HPLC teknolojisinin hızlı gelişimi, küçük ve spesifik bileşenlerin veya bunların gruplarının ayırılıp saptanmasını kolaylaştırmıştır. Bundan dolayı, literatürde bileşenlerin araştırılması için mükemmel bir araç olduğu ifade edilmektedir (Sun 2008).

Sıvı kromatografisinin çok geniş ürün gruplarını analiz edebilen analitik tekniklerden biri olmasının en önemli nedeni olarak, mevcut çok sayıda farklı dedektör tipinin olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir. Tek veya çoklu dalga boyu UV-Vis dedektörler, rutin analizde yaygın olarak kullanılırken; diyot dedektörleri, aynı anda belirlenen geniş bir dalga boyu spektrumu boyunca absorbanı ölçer ve analitlerin geçici olarak tanımlanması için değerli bilgiler sağlayabilmektedir. Floresans dedektörler, çok düşük analit seviyelerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Elektrokimyasal algılama dedektörleri, yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlayabilir ve redoks-aktif bileşenlerin analizine uygulanabilmektedir. Refraktif indeks dedektörleri ise, ışığın kırılması veya bükülmesi özelliğinden faydalanılarak sonuç verir ve genellikle analitler UV emilimi göstermediğinde (örneğin karbonhidrat düzeyinin belirlenmesi için) tercih edilmektedir (Sun 2008).

Gıdalarda karbonhidrat düzeylerinin tespitinden yola çıkılarak taklit/tağşişin belirlendiği pekçok literatür çalışmalarının mevcut olduğu tespit edilmiştir. Kahvede kavrulmuş soya ve buğday ile yapılan tağşişin belirlenmesinde, örneklerin karbonhidrat kompozisyonu belirlenmiş ve saf kavrulmuş kahvenin galaktoz ve mannoz açısından zengin olduğu, kavrulmuş buğday ile yapılan tağşişin belirlenmesinde belirleyici unsurun glikoz olduğu, kavrulmuş soya ile yapılan tağşişin belirlenmesinde ise fruktozun belirteç olduğu bildirilmektedir (Pauli vd. 2014).

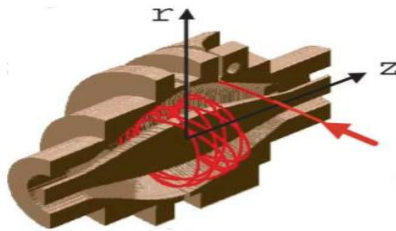
Benzer bir başka çalışmada, kahvelerde buğday ve bölgesel bir tohum (acai seed) ile yapılan tağışın belirlenmesinde arabinoz, galaktoz, glikoz, ksiloz ve mannoz bileşenleri araştırılarak galaktozun kahve tağışının belirlenmesi için karakteristik bir bileşen olduğu sonucuna varılmıştır (Domingues vd. 2014). Kimyasal bileşim açısından değerlendirildiğinde salebin de yüksek oranda karbonhidrat kaynağı olduğu söylenebilmektedir. Bu kapsamda Avrupa salebi (konyak) üzerine yapılan çalışmalarda yapıda bulunan glukomannanın mannoz ve glikoza oranlarının bitkinin orijini hakkında özgünlük ifade ettiği ve konyakta bu oranın 1,6:1 olduğu, bunun karşılığında orkide yumrularında 3,6:1 oranlarında oldukları belirtilmektedir (Alonso-Sande vd. 2009).

2.2.1.5. Orbitrap kütle spektrometresi (ORBITRAP-MS)

1980'li yıllardan bu yana, MS giderek artan bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle, gıda bilimleri alanında, MS tabanlı teknikler, kalite, orijinallik ve işlevsellik konularının belirlenmesine güvenilir teknikler olduğu için hızla gelişmiştir (Pico 2015). Bir MS sistemi üç ana bölümden oluşur: her bileşenden iyonları üreten iyon kaynağı; farklı m/z oranlarının iyonlarını ayırmak için kütle analizörü; ve iyonları toplayan detektördür (Sun 2008).

Kütle analizörlerinde, iyonların hareketleri, manyetik ve/veya elektriksel alan ile gerçekleşmektedir. Bu alanda hareketli yüklü bir parçacık sahip olduğu momentuma (kütle.hız) ve kinetik enerjiye bağlı olarak diğer bir yüklü parçacıktan ayrılmaktadır (Skoog vd. 2007). Bu temel özelliğe dayanarak çalışan; manyetik sektör, kuadropol (Q), kuadropol iyon tuzağı (QIT), uçuş zamanlı (TOF), orbitrap ve iyon siklotron rezonans (ICR) analizörleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Skoog vd. 2007; Pico 2015).

Orbitrap kütle analizörü 2000 yılında Alexander Makarov tarafından tasarlanmış ve 2005 yılında piyasaya sunulmuştur. Kütle spektrometresi alanında günümüzde orbitrap analizörü çok önemli bir yere sahiptir. Bir iyon tuzağı analizörü olan bu analizörün, diğer iyon analizörlerinden farkı, iyonları tutmak için manyetik veya dinamik elektrik alanlarına ihtiyaç duymadan, iyon frekansına göre analiz yapmasıdır (Pico 2015). Analizör, bir çift dış elektrot tarafından çevrelenen merkez elektrottan oluşmaktadır. İyonlar, merkez elektrot etrafında r yönünde (radyal ve açısal) orbital hareket ederken aynı zamanda z yönünde (eksensel) sürekli olarak salınım yapmaktadır. r yönündeki hareketi, iyon kütlesinden bağımsız olarak iyonların kinetik enerjisinden, dış ve iç elektrotlar arasındaki elektriksel alan kuvvetinden kaynaklanmaktadır. z yönündeki hareketi ise, tamamen bağımsız olup, elektrotlar arasındaki sabit potansiyelde iyonların sadece m/z değerine göre gerçekleşmektedir. Şekil 2.7'de iyonların orbitrapteki hareketleri sunulmaktadır (Hu vd. 2005).



Şekil 2.7. Orbitrap MS sistemindeki iyon hareketleri (Hu vd. 2005)

Bu analizörün, basit bileşenlerin tanımlamasından karmaşık yapıdaki matrislerde eser miktarda bulunan bileşenlerin analizine kadar geniş bir uygulama alanına sahip olduğu bildirilmektedir (Pico 2015). Orbitrap kütle analizörü ile güvenilir kütle ölçümleri yapılarak 1 ppm değerinin altında kütle sapması elde edilebilmektedir (Makarov ve Scigelova 2010).

Literatürde çeşitli ürünlerde orijinalliğin ve hilelerin belirlenmesinde gıdadaki organik asit belirlenmesiyle ilgili çalışmaların yapıldığı tespit edilmiştir (Cordella vd. 2002b; Sun 2008; Pico 2015). Bitkisel ürünlerde organik asit profili ve düzeyleri bitkinin yetiştiği toprak ve maruz kaldığı stres durumlarına göre değişebilmektedir. Literatürde bu kapsamda izlenen organik asitler genellikle tartarik, malik, sitrik, laktik ve askorbik asit olarak belirtilmesine rağmen, bitki köklerinin bazı özel organik asitlerce de zengin olduğu bilinmektedir. Tipik olarak köklerdeki organik asit miktarının kökün kuru ağırlığının yaklaşık % 1-4 arasında değiştiği literatürde yer alan bilgiler arasındadır (Jones 1998).

2.2.1.6. Sıvı kromatografi kütle kütle spektrometresi (LC-MS/MS)

LC ve MS kombinasyonunu, yüksek seçicilik ve hassasiyette sağlamasından dolayı ayırma ve saptama için en ideal yöntem olduğu bildirilmiştir. Ancak bazı çok karmaşık karışımlar için LC ve MS kombinasyonu yeterli çözünürlük sağlamadığı, bu gibi durumlarda MS/MS teknolojisinin devreye girdiği ifade edilmektedir. Standart HPLC tekniğinde maddenin sadece alıkonma zamanı teşhis edilir iken LC-MS/MS teknolojisi ile alıkonma zamanına ek olarak ‘ana ve ikincil’ iyonlar değerlendirilmektedir (Skoog vd. 2007).

LC-MS/MS çalışma prensibi; karışık moleküllerde birinci MS’de moleküllerin kendine ait ana iyonları oluşmaktadır. Böylelikle içeriği bilinmeyen örneğin karakteristik ana iyonu diğer bileşenlerden ayrılıp seçilerek tanımlanmaktadır. Birinci MS’de ayrılmış olan ana iyon ikinci MS’e gönderilir. Burada ikincil (yavru) iyonlarına ayrılır. Ana iyon ve ikincil iyonun beraber tanımlanması birleşimin daha yüksek seçicilikte tanımlanmasını ve bileşenlerin tamamen ayırt edilebilmesini olanak sağlamaktadır. LC-MS/MS cihazı; yüksek hassaslık, az miktarda reaktif gerekliliği, geniş analitik ölçüm aralığı, aynı anda yüzlerce analitin ölçülebilmesi gibi avantajlara sahip olana bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (Skoog vd. 2007). Özellikle amino asit dizisi homolojisine dayanarak proteinlerin tanımlanması için çok önemli bir teknik olduğu belirtilmiştir (Pico 2015).

Dünya’da gıdalardaki taklit ve tağşişinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yaygın bir şekilde yapılmakla birlikte, ülkemizde büyük önem arz eden konular içerisinde yer almaktadır. Çizelge 2.8’de literatür taraması sonucunda tespit edilen Türkiye’de gıdalardaki taklit ve tağşişin belirlenmesine yönelik yapılmış çalışmalar özetlenerek sunulmaktadır. Çalışmalar incelendiğinde özellikle son 10 yılda gıdalarla ilgili taklit ve tağşişin belirlenmesine yönelik çalışmaların büyük bir ivme kazandığı görülmektedir.

Çizelge 2.8. Son 20 yıla ait Türkiye’de gıdalarda taklit ve tağşişin belirlenmesine yönelik yapılmış olan içeriğine ulaşılabilmış çalışmalar

Uygulama Matrisi	Tespit amaçlı kullanılan teknik	İncelenen bileşen(ler)	Kemometrik teknik	Kaynak
Pastırma	Kimyasal ve mikrobiyolojik analizler	Nem, lipit, kül, protein, tuz		(Doğruer vd. 1995)
Sığır içyağı, koyun kuyruk yağı ve tereyağı	FTIR, GC	Lipit		(Javidipour 1998)
Süt tozu	HPLC	Nem, kül, protein, karbonhidrat,		(Hafıza 2000)
Bal	HPLC, Lane Eynon yöntemi	Karbonhidrat		(Şahin 2000)
Tereyağı	DSC	Lipit		(Aktaş ve Kaya 2001)
Pekmez	Kimyasal analizler, enzimatik analizler ve AAS	Karbonhidrat, kül, mineraller		(Şimşek vd. 2004)
Çikolata (kakao yağı)	HPLC	Lipit		(Özocak 2004)
Narinciye suyu	HPLC	Organik asit		(Karadeniz 2004)
Zeytinyağı	HPLC, spektrofotometre	Lipit		(Okay 2004)
Kaşar peyniri	Kimyasal ve mikrobiyolojik analizler, GC	Karbonhidrat, lipit		(Balkır 2006)
Portakal suyu	HPLC	Amino asit, organik asit, karbonhidrat, flavonoidler		(Kirit ve Özdemir 2007)
Bal	AAS, HPLC, IR-MS ve Kimyasal analizler	Nem, kül, karbonhidrat, vitamin C, prolin, potasyum		(Guler vd. 2007)
Zeytinyağı	FTIR	Lipit	PCA	(Taş 2008)
Nar suyu	FTIR		PCA ve PLS	(Vardin vd. 2008)
Zeytinyağı	FTIR	Lipit	PLS, PLS-DA ve PCA	(Gürdeniz ve Ozen 2009)
Pekmez	HPLC, IR-MS ve İTK	Karbonhidrat, İzotop oranları		(Yılmaz 2011)
Bal	IR-MS	İzotop oranları		(Şimşek vd. 2012)
Köfte	Mikrobiyolojik			(Ali vd. 2012)
Nar suyu	Kapiler elektroforez	Amino asit		(Tezcan vd. 2013)
Bal	IR-MS	İzotop oranları		(Tosun 2013)
Tereyağı	Raman spektroskopisi		PCA, PCR, PLS ve ANNs	(Uysal vd. 2013)
Rakı	MIR spektroskopisi		PCA ve PLS	(Yücesoy ve Özen 2013)

Çizelge 2.8'in devamı

Uygulama Matriksi	Tespit amaçlı kullanılan teknik	İncelenen bileşen(ler)	Kemometrik teknik	Kaynak
Bal	Kimyasal analiz, IR-MS	Nem, kül, prolin Karbonhidrat, izotop oranları		(Güney 2014)
Pirinç	Fiziksel, kimyasal analizler, Pişme testi	Rutubet, kül, protein		(Yazman 2014)
Bal	IR-MS	İzotop oranları		(Guler vd. 2014)
Bal	IR-MS	İzotop oranları		(Çinar vd. 2014)
Bal	HPLC	Kuru madde, kül, karbonhidrat	PCA	(Yılmaz vd. 2014)
Bal	IR-MS	İzotop oranları		(Cengiz vd. 2014)
Bal	Kimyasal analizler ve IR-MS	Nem, suda çözünmeyen kuru madde, karbonhidrat, İzotop oranları		(Kutlu ve Bengü 2015)
Süt	FTIR		PCA, PLS ve GILS	(Samancıoğlu 2015)
Sucuk	Fiziko-kimyasal analizler, mikrobiyolojik ve duyuusal analizler	Rutubet, Lipit, Protein		(Pehlivanoğlu vd. 2015)
Tereyağı	Kimyasal analizler	Lipit		(Kahyaoğlu ve Çakmakçı 2016)
Nar suyu	HPLC	Fenolik bileşenler		(Ongan 2016)
Kakao tozu	HPLC	Karbonhidrat, azotlu organik bileşen		(Karamanoğlu 2016)
Zeytinyağı	Kırınım yöntemi			(Ekici ve Dinleyici 2016)
Bitki türleri	Mikrobiyoloji			(Kesmen vd. 2017)
Meyve suyu	Lazer indüklenmiş floresans dedektörlü misel elektrokinetik kromatografi	Prolin ve arjinin		(Tezcan vd. 2017)
Arabika kahvesi	LIBS Spektrofotometre, ICP-OES	Mineral maddeler	PCA ve PLS	(Sezer vd. 2018)

FTIR: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, GC: gaz kromatografi, HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografi, DSC: diferansiyel taramalı kalorimetre, AAS: Atomik absorpsiyon spektrofotometresi, IR-MS: İzotop Oranı Kütle Spektrometresi, İTK: İnce tabaka kromatografi, MIR: Orta kızılötesi spektroskopisi, ICP-OES: İndüktif eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi, LIBS: Lazer kaynaklı breakdown spektroskopisi, PCA: Temel bileşenler analizi, PLS: Kısmi En Küçük Kareler Ayırıcı Analizi, PCR: Temel bileşenler regresyonu, ANNs: Yapay sinir ağları

2.2.2. Veri analizleri

Yapılan bir deneysel çalışma sonrasında elde edilen verilerin hesaplamalarına geçmeden önce dikkatle incelenmesi gerekmektedir. Elde edilen veriler arasında birbirinden farklı değerler bulunuyorsa veya değerler arasında büyük dengesizlik söz konusu olduğu durumlarda, verilerin benzer birimlere çevrilmeleri veya ortalama değer etrafında toplanması gerekebilmektedir. Bu ve benzer durumlarda verilere normalizasyon vb. ön işlemler uygulanarak veri ön işlemine tabii tutularak veri analizine hazır hale getirilmelidir (Brereton 2003).

Aletsel tekniklerin gelişmesine bağlı olarak artan verilerin doğru ve güvenilir şekilde değerlendirilmesi aşamalarında da bir takım ihtiyaçlar ortaya çıkmıştır. Buna bağlı olarak da kemometri kavramı doğmuştur. Kemometri kavramı kısaca, kimya ve analitik kimya uygulamalarından elde edilen verilerin bilgisayar ve çeşitli yazılımlar kullanılarak istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin uygulanmasıyla bu verilerden daha yararlı bilgilerin elde edilmesi işlemi olarak ifade edilebilmektedir. Kemometrik hesaplamalarda genellikle Excel, MATLAB ve diğer paket programlar kullanılmaktadır. Kimya ve analitik kimya uygulamalarında kullanılan kompleks karışımların kalitatif ve kantitatif analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunması kemometrik yöntemlere rağbetin artmasına neden olduğu söylenebilmektedir (Dinç 2007; Sun 2008; Marini 2013; Pico 2015). Tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme, deneysel tasarım, modelleme, kalibrasyon, optimizasyon, yapı tanıma, sınıflandırma, yapay akıl yöntemleri, resim işleme, bilgi ve sistem kuramı gibi kavram ve uygulamalar kemometrinin konularını oluşturmaktadır (Dinç 2007).

Son 10 yılda gıdalardaki taşışın belirlenmesinde aletsel cihazlardan elde edilen verilerin kemometrik yöntemlerle işlenmesi uygulamalarının bir ivme kazandığı ifade edilebilmektedir (Di Anibal vd. 2009; Chudzinska ve Baralkiewicz 2010; Gok vd. 2015; Kuş ve Van Ruth 2015). Özellikle çok değişkenli ölçme tekniklerinde, yapılan çalışmalarda tek bir bileşiğe bakılması yerine tüm bileşenlerin birlikte değerlendirilmeye alınması sebebiyle tek değişkenli ölçme tekniklerine göre önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Sun 2008; Marini 2013).

2.2.2.1. Çok değişkenli sınıflandırma teknikleri

Sınıflandırma teknikleri, genel anlamda, nesnenin kendisini tanımlamak veya karakterize etmek için kullanılan tekniklerdir. Çok değişkenli sınıflandırma teknikleri, sistemin oluşturulma şekline göre yönlendirmeli ve yönlendirmesiz teknikler olmak üzere 2 şekilde gruplandırılmaktadır (Marini 2013).

Yönlendirmesiz teknikler

Yönlendirmesiz tekniklerde veriler sebep-sonuç ya da giriş-çıkış şeklinde etiketlenmeden, veri içerisinde var olan ilişkiler ve yapılar üzerinden bilinmeyen bir yapıyı tahmin etmek için kullanılan bir tekniklerdir. Temel bileşenler analizi (PCA), en basit ve çok kullanılan yönlendirmesiz tekniklerden biridir (Brereton 2003; Pico 2015). PCA verinin kovaryans matrisinin özvektörleri üzerinden, hiçbir sınıf bilgisi sağlanmadan, verinin varyansını maksimize eden doğrultulara yansıtır.

Bu işlem spektral ve çoklu kimyasal analiz gibi değişkenler arası korelasyonun yüksek olduğu durumlarda bilginin “sıkıştırılarak” çok daha az boyutta incelenmesine olanak tanır. Bu yansıtma işlemi üzerinden, örneğin 2 boyuta indirgenmiş grafik vasıtasıyla, muhtemel gruplanmalar ve dışarıda kalmış ya da sorunlu örnekler gözlemlenebilir (Brereton 2003; Ortiz vd. 2013).

Yönlendirmeli teknikler

Yönlendirmeli tekniklerde ise verilen girdi kümesinden istenen çıktı kümesinin elde edilmesi için bir fonksiyon öğretilmektedir. (Brereton 2003). Yönlendirmeli tekniklerinden kısmi en küçük kareler (PLS) algoritmasını temel alan kısmi en küçük kareler ayırıcı analizi (PLS-DA) oldukça yaygın olan çok değişkenli bir boyut küçültme tekniği olduğu bildirilmektedir (Perez ve Narasimhan 2017). Elde edilen ilk doğrultular ilişkiyi en iyi açıklayan doğrultular iken, son doğrultular ise gürültüye ya da konsantrasyonla ilişkisiz bilgilere tekabül edebilir. Bu doğrultular temel bileşen (PC) ya da gizli değişken (LV) olarak adlandırılabilir. PLS-DA, aşırı sayıda sonuç verebilmektedir ve bu nedenle kullanılacak en iyi LV sayısını seçmek için dikkatli bir doğrulama adımı gereklidir. Optimal LV sayısının belirlenmesinde çeşitli yöntemler olmasına rağmen, bir örneği dışarıda bırakan çapraz doğrulama (LOOCV) en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu işlem gerçekleştirilirken her seferinde bir örnek dışarıda bırakılır. Çizdirilen grafikte en hızlı düşüşün gerçekleştiği nokta ise LV sayısı olarak seçilir. Seçilen LV değeri ile nihai model kurulur (Brereton 2003; Marini 2013).

2.3. Metot Validasyonu

Metot validasyonunun (geçerli kılma) tanımı ISO 17025 standardında "bir metod veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilip belgelendirilmesidir" şeklinde yapılmıştır (TS EN ISO, 2012a). Bir analiz için yeni metod geliştirildiğinde, herhangi bir metod laboratuvarında ilk defa uygulanacağına, kullanılmakta olan yöntemde değişiklik yapıldığında, farklı bir kişi ya da farklı bir cihaz kullanılacağına, iki yöntem karşılaştırılacağı zaman, uzun süre kullanılmayan bir yöntem yeniden kullanılacağı zaman ve kalite kontrol testleri sonunda metodun performansında zamanla bir değişim olduğu anlaşıldığında metod valide edilmelidir (Kalra 2011). Uygulanacak olan metod tipine göre hangi validasyon parametrelerinin yapılması gerektiği Çizelge 2.9’da gösterilmiştir (Taverniers vd. 2004).

Çizelge 2.9. Metotlara göre validasyon parametreleri (Taverniers vd. 2004)

Parametre	METOT TİPİ			
	Tanımlama	Saflık		Tayin
		Limit	Miktar	
Gerçeklik	-	-*	+	+
Kesinlik	-*	-	+	+
Spesifiklik	+	+	+	+
Tespit sınırı (LOD)	-*	+	-	-
Tayin sınırı (LOQ)	-*	-	+	-
Doğrusal/Ölçüm Aralığı	-*	-*	+	+
Doğrusallık	-*	-	+	+
Sağlamlık	+	+	+	+

* İsteğe bağlı ölçülebilir

2.3.1. Doğrusallık

Doğrusallık ölçümü için, kalibrasyon grafiğinin oluşturulması gerekmektedir. Kalibrasyon grafiğinin oluşturulmasında kullanılan en ideal yaklaşım örneğin cihaza verilmesinden sonra elde edilen analitik sinyalin kalibrasyon grafiğinin orta bölgesine düşmesini sağlamaktır. Hazırlanacak standartların konsantrasyon aralığının en az altı olması ve her bir standardın en az 3 kez cihaza verilmesi önerilmektedir (Taverniers vd. 2004). Çalışma sonucunda standartların konsantrasyonuna karşı cihazdan elde edilen analitik sinyal baz alınarak bir kalibrasyon grafiği çizilmektedir; grafikten elde edilen eğrinin korelasyon katsayısı (R^2) hesaplanmaktadır. Ortalama değeri formül (2.2)'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Standart sapmanın hesaplanmasında formül (2.3)'ten yararlanılmıştır (Kalra 2011).

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n \quad (2.2)$$

$$SD = \sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (2.3)$$

SD : Örneğe ait verilerin standart sapması
 x : İlgilenilen örnek
 n : Örnek sayısı
 $\bar{x}$: Örneğe ait verilerin ortalaması

2.3.2. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Tespit sınırı (LOD) bir analitik metot ile güvenilir olarak belirlenebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak S/N oranının, alınan cevabın standart sapmasının (SD) veya kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 3 katı LOD değeri olarak kabul etmektedir (Taverniers vd. 2004; Kalra 2011). Tayin sınırı (LOQ), analitik metodun ölçebileceği en büyük değer olup, belirlenmesi için tespit sınırı çalışmasından elde edilen sonucun 2,5-3 katının alınması veya çok düşük konsantrasyonda analit eklenmiş örnek körünün standart sapmasının 10 katının ölçüm sınırı olarak belirlenmesi önerilmektedir (Taverniers vd. 2004; Kalra 2011).

2.3.3. Doğruluk

Bir cihazın, ekipmanın, metodun veya ölçüm sisteminin çalışıldığı laboratuvar koşullarında belirlenen amaca uygun olduğunun test edilerek yazılı kayıtlarla onaylanmasıdır. Doğruluğun iki alt bileşeni vardır. Bunlar gerçeklik ve kesinliktir. Bir metodun sistematik hatası (bias) doğruluğun gerçeklik bileşenini, rastgele hatası ise kesinlik bileşenini oluşturur (Taverniers vd. 2004).

1) Gerçeklik; ölçüm sonucu ortalaması ile gerçek değer (referans değer) arasındaki yakınlığı ifade eder. Gerçeklik çalışması geri kazanım bulunarak hesaplanabilir. Geri kazanım çalışması, analitik metodun bir bütün olarak değerlendirilmesidir. Bir analitin örnekten ne kadar iyi ekstrakte edilebildiğinin ve analitik cihazda ne kadar iyi ölçüm yapılabildiğinin bir göstergesidir. Genellikle üç yoldan biri ile saptanır. (Taverniers vd. 2004).

a) Bilinen konsantrasyondaki bir örneğin analiz edilmesi ve ölçülen değer ile gerçek değer (referans standartları) karşılaştırılması ile belirlenir. Hesaplamada kullanılan formül (2.4)'te gösterilmiştir (Taverniers vd. 2004).

$$R_m = C_{obs} / C_{CRM} \quad (2.4)$$

C_{obs} : Bulunan konsantrasyon değeri
 C_{CRM} : Referansın konsantrasyon değeri

b) Önceden kullanılan alternatif metodun sonuçlarıyla yeni bir metottan elde edilen analiz sonuçlarının karşılaştırılması bulunabilir. Hesaplamada kullanılan formül (2.5)'te gösterilmiştir (Taverniers vd. 2004).

$$R_m = C_{met} / C_{ref} \quad (2.5)$$

C_{met} : Metotla bulunan miktar
 C_{ref} : Referans metotla bulunan miktar

c) Örnek matrisine bilinen miktarda analitin eklenerek geri kazanımına dayanmaktadır. Hesaplamada kullanılan formül (2.6)'da gösterilmiştir (Taverniers vd. 2004).

$$R_m = (C_{obs} - C_{smp}) / C_{spike} \quad (2.6)$$

C_{smp} : Örneğin konsantrasyon değeri
 C_{spike} : Eklenmiş konsantrasyon değeri

Geri kazanım çalışmalarından elde edilecek sonuçlar örneğin yapı ve bileşimine, örnek hazırlama tekniğine ve analitin örnekteki konsantrasyonu gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak değişim göstermektedir. Örnekte bulunan analit konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilebilecek geri kazanım oranları için önerilen değerler çizelge 2.10'da sunulmaktadır (Taverniers vd. 2004).

Çizelge 2.10. Analit konsantrasyonuna bağlı olarak olması gereken geri kazanım oranları (Taverniers vd. 2004)

Analit (%)	Analit/Numune Oranı	Birim	Geri kazanım oranı (%)
100	1	1000 g/kg	98-102
10	10 ⁻¹	100 g/kg	98-102
1	10 ⁻²	10 g/kg	97-103
0,1	10 ⁻³	1 g/kg	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 mg/kg	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 mg/kg	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 mg/kg	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 µg/kg	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10 µg/kg	60-115

2) *Kesinlik*; aynı koşullarda yapılan bağımsız ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını göstermektedir. Kesinlik parametresi kendi içerisinde tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olmak üzere ikiye ayrılır (Taverniers vd. 2004):

a) Tekrarlanabilirlik; bir maddenin aynı ölçüm koşullarında (aynı kişi, aynı cihaz ve ekipmanlar, aynı laboratuvar şartları), kısa zaman aralığında yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını değerlendirmek amacıyla standart sapmasının hesaplanmasıdır. Standart sapmayı ölçüm sonucundan bağımsız ve birimsiz olarak raporlamak için bağıl standart sapma (% RSD) formül (2.7)'den yararlanılarak hesaplanır (Taverniers vd. 2004). Örnekte bulunan analit konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilebilecek % RSD oranları için önerilen değerler Çizelge 2.11'de sunulmaktadır (Kalra 2011).

$$\% \text{ RSD} = (\text{SD}/\bar{x}) * 100 \quad (2.7)$$

SD : Örneğe ait verilerin standart sapma
 $\bar{x}$: Örneğe ait verilerin ortalaması

Çizelge 2.11. Analit konsantrasyonuna bağlı olarak olması gereken tekrarlanabilirlik kesinliği (Taverniers vd. 2004)

Analit (%)	Analit/Numune oranı	Birim	% RSD
100	1	1000 g/kg	1,3
10	10 ⁻¹	100 g/kg	2,8
1	10 ⁻²	10 g/kg	2,7
0,1	10 ⁻³	1 g/kg	3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 mg/kg	5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 mg/kg	7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 mg/kg	11
0,00001	10 ⁻⁷	100 µg/kg	15
0,000001	10 ⁻⁸	10 µg/kg	21

b) Tekrar Üretilebilirlik; Analizi yapan kişi, farklı cihaz veya farklı laboratuvar veya farklı günlerde elde edilen sonuçların % RSD olarak hesaplanmasıdır (Taverniers vd. 2004).

2.3.4. Doğrusal/Ölçüm aralığı

Doğrusal aralık ise kalibrasyon işleminin doğrusal olduğu derişim aralığıdır (Kalra 2011).

3. MATERYAL VE METOT

Çalışma üç aşamalı olarak tasarlanmıştır. İlk aşamada Türkiye saleplerini temsil edebilecek şekilde yaş yumrular temin edilmiş ve toplanan yumru örnekleri, uygun şekilde yabancı materyalden arındırıldıktan sonra sırasıyla haşlama, güneşte kurutma ve öğütme işlemine tabi tutulmuştur. Eş zamanlı olarak literatürde yer alan olası taklit, tağşiş ve katkı maddeleri (TTK) dikkate alınarak piyasadan en az 2 farklı marka olacak şekilde belirlenmiş TTK maddeleri temin edilmiştir.

İkinci aşamada, olası hileler ve yöntemler dikkate alınarak literatürde yer alan analiz talimatları uygun modifikasyonlar yapılarak, her analiz talimatının validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Valide edilmiş yöntemler kullanılarak gerçek salep örnekleri ile TTK maddeleri analiz edilmiş, elde edilen sonuçlar istatistiksel ve kemometrik yöntemlerle değerlendirilerek, saleplere ait ayırt edici özellikler belirlenmiştir. Sonraki aşamada, belirlenmiş oranda salep ve TTK maddesi içeren karışımlar hazırlanmış ve seçilen yöntemlerle analiz edilmiştir.

Üçüncü aşamada ise, piyasada satılan saleplerden örnekler alınarak, karışım örneklerinde belirlenen yöntem veya yöntemlerle analizleri yapılmış ve varsa etiket bilgileri ile tespit edilen değerler karşılaştırılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Salep, taklit, tağşiş ve katkı maddelerinin toplanması

Araştırma materyali olarak kullanılan salepler 2016 ve 2017 yıllarında salebin yoğun toplama dönemi olan Nisan ve Mayıs aylarında çizelge 3.1’de gösterilen bölgelerdeki 3 farklı tüccarlardan yaklaşık 1 kg yaş yumru olacak şekilde temin edilmiştir. Yaş salep örnekleri laboratuvarda kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin ağırlıkları yaş ağırlıklarının 1/5’i ile 1/7’sine kadar düşmüştür. Yörelere tespitinde 2007 yılında yapılmış olan bir TÜBİTAK projesinde belirtilmiş numune toplama noktaları esas alınmıştır (Sezik vd. 2007). Çizelge 3.1’de tez kapsamında toplanan salep örnekleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında salep örnekleri toplanan iller

Bölge sınıfı	Bölge	İller
1	Kuzey Anadolu (KA)	Kastamonu-Tokat-Yozgat (Akdağ Madeni), Bartın
2	Güneybatı Anadolu (GBA)	Muğla
3	Güney Anadolu (GD)	Antalya-Mersin
4	Güneydoğu Anadolu (GDA)	Kahramanmaraş-Adıyaman-Malatya
5	Doğu Anadolu (DA)	Van-Muş-Siirt-Hakkari-Bitlis



Şekil 3.1. Tez kapsamında ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen ve analizler için uygun hale getirilen salep örnekleri

Literatür taraması sonucu en yaygın kullanıldığı belirlenen ek-1’de detaylarıyla sunulmuş olan TTK maddelerinin her biri en az iki farklı ticari marka olmak üzere piyasadan temin edilmiştir. Çizelge 3.2’de Taklit, Tağşiş ve Katkı Maddesi (TTK) olarak izlenilen maddeler gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Taklit, tağşiş, katkı maddesi (TTK) olarak izlenilen maddeler

TTK grubu	Kısaltma	TTK maddeleri
Sakızlar	GUM	Guar sakız
	GAR	Arabik sakızı
	KBG	Keçiboynuzu sakızı
	KJG	Konyak sakız
	KSG	Ksantan sakız
Nişastalar	BNT	Buğday nişastası
	MNT	Mısır nişastası
	PAN	Patates nişastası
	PIN	Pirinç nişastası
Ticari katkılar	SKR	Şeker
	YST	Yağsız süt tozu
	VNL	Vanilya
	TRC	Tarçın
Diğer taklit/tağşiş maddeleri	OMK	Öğütülmüş makarna
	GLT	Galetu unu
	OPR	Öğütülmüş pirinç
	OBL	Öğütülmüş bulgur
	BUN	Buğday unu
	SSA	Salep sıvı aroma verici
	SKA	Salep katı aroma verici
	CMC	Karboksimetil selüloz

3.1.2. Salep örneklerin analize hazırlanması

Temin edilen salep yumruları, her hangi bir işleme tabi tutulmadan evvel daraları alınmıştır.

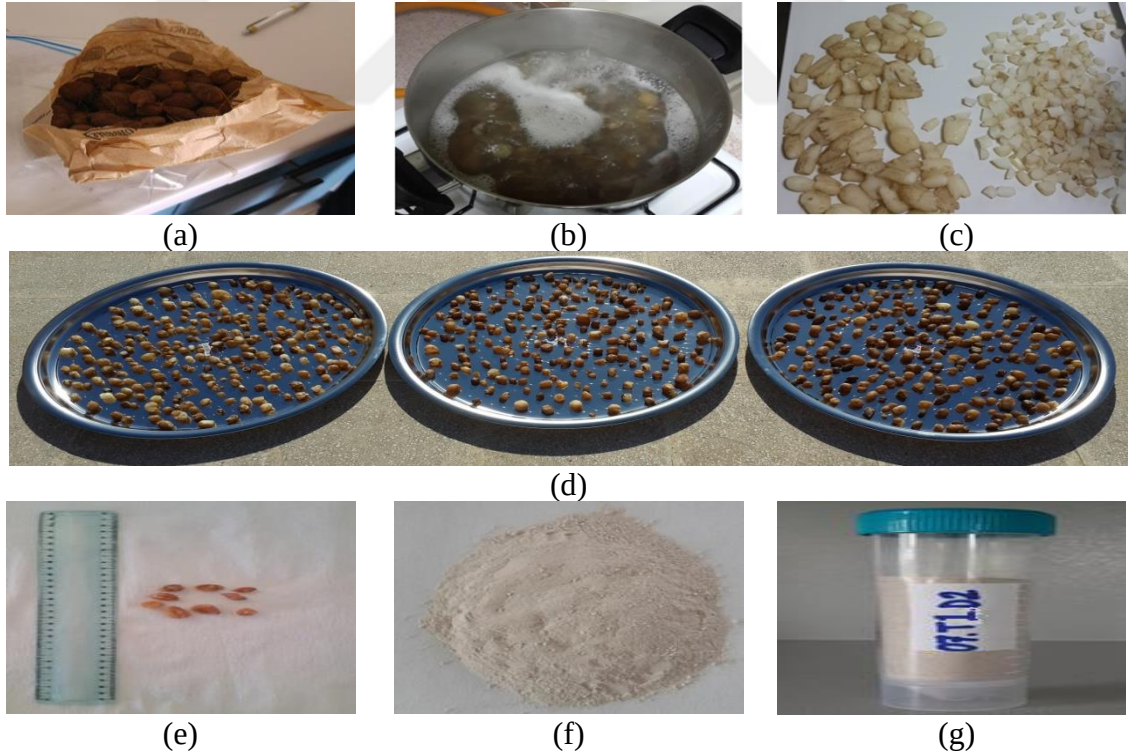
Soğuk suyla yıkanarak üzerlerinde bulunan toprak ve kirlilik oluşturan unsurlar uzaklaştırılmıştır. Gerek duyulan örneklerde bıçak kullanılarak istenmeyen unsurlar giderilmiştir

Yıkanan yumrular kaynar suda 15 dk. hafif yumuşayınca kadar kaynatılarak haşlanmıştır.

Haşlanan yumrular tepsilere yerleştirilerek güneşte 5-7 gün kurutulmuştur. Kurutma işleminin sona erdiği, yumruların dış kesmeyecek kıvama gelmesiyle anlaşılmıştır.

Kurutma işleminin ardından örnekler bir çekiçli değirmen kullanılarak toz formunda öğütülmüştür.

Öğütülen örnekler 100 mesh elekten geçirilmiş ve elek altından toplanan örnekler analiz süresine kadar oda sıcaklığında polipropilen santrifüj tüpleri içerisinde muhafaza edilmiştir. Şekil 3.2’de gelen yaş salebe uygulanan basamaklar gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Salebin ön hazırlık işlemleri; **(a)** kaynatma öncesi yaş salep yumrusu, **(b)** kaynatma işlemi, **(c)** kaynatma sonrası, **(d)** güneşte bekletme işlemleri **(e)** kurutulmuş salep yumruları, **(f)** çekiçli değirmenden geçirilerek boyutu küçültülmüş salep tozu, **(g)** muhafaza edilen salep

Araştırmalarda kullanılacak olan tüm salep örneklerinden homojen yapıda örnekler elde edilmesi amacıyla farklı gözenek çaplarına sahip eleklerden geçirilmiştir. Gerçekleştirilen elek analizine ait sonuçlar çizelge 3.3'te sunulmaktadır.

Çizelge 3.3. Farklı gözenek çapına sahip eleklerden geçirilen salep örneklerinin elek üstü yüzdesel dağılımı

Elek ölçüleri		Elek üstü miktar	Toplam elek üstü miktar
μm	mesh	%	%
500	35	1,01±0,76	49,15±4,26
150	100	48,14±10,06	
53	270	35,46±7,08	
45	350	8,92±7,17	50,85±2,45
< 45	> 350	6,47±3,49	

Çizelge 3.3'te belirtildiği üzere partikül büyüklüğüne bağlı olarak fraksiyonlarına ayrılan salep örneklerinde gerekli olan homojenizasyonun sağlanabilmesi amacıyla 150 μm (100 mesh) ölçülere sahip eleğin altında kalan fraksiyon toplanmıştır. Benzer işlem TTK maddeleri için de gerçekleştirilmiş olup, salep örnekleri ve TTK maddelerinden hazırlanacak olan karışımlarda meydana gelebilecek karışımdaki homojenizasyon probleminin önüne geçilmiştir. Elde edilen TTK maddelerinde analiz süresine kadar oda sıcaklığında polipropilen santrifüj tüpleri içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.1.3. Salep içeren toz karışımların oluşturulması

Ülkemizde satışa sunulan ticari salep içecek tozu içeren karışımlarının reçeteleri proje kapsamında danışman olarak görev alan Prof. Dr. Ekrem SEZİK tarafından önerildiği şekli ile % 59,50 şeker, % 30,80 yağsız süt tozu, % 4,40 buğday nişastası, % 3,90 guar sakız, % 0,50 katı salep aroması, % 0,40 tuz, % 0,30 salep ve % 0,20 tarçın olarak hazırlanmıştır.

Bildirilen bu reçete üzerinden oluşturulan ve farklı oranlarda salep içeren çeşitli ticari salep reçetesi çizelge 3.4'te verilen şekilde oluşturulmuştur. Homojen toz karışımlarının oluşturulmasında bileşenler bir polipropilen santrifüj tüpü içerisinde toplanmış ve ultraturax 1000 devir/dk.'da 5 dk. homojen bir karışım haline getirilmesi sağlanmıştır.

Çizelge 3.4. Farklı oranlarda salep içeren homojen toz karışım reçeteleri

Örnek No	Şeker (g)	Yağsız süt tozu (g)	Buğday nişastası (g)	Guar sakız (g)	Salep (g)	aroması	Tuz (g)	Tarçın (g)	Salep (g)	Salep (%)
1	4,18	2,16	0,31	0,27	0,04		0,03	0,01	0,00	0,00
2	4,17	2,16	0,31	0,27	0,04		0,03	0,01	0,01	0,11
3	4,17	2,16	0,31	0,27	0,03		0,03	0,01	0,01	0,21
4	4,17	2,16	0,31	0,27	0,03		0,03	0,01	0,02	0,31
5	4,16	2,15	0,31	0,27	0,03		0,03	0,01	0,03	0,41
6	4,15	2,15	0,31	0,27	0,03		0,03	0,01	0,04	0,61
7	4,14	2,15	0,31	0,27	0,03		0,03	0,01	0,06	0,80
8	4,14	2,14	0,31	0,27	0,03		0,03	0,01	0,07	1,00
9	4,12	2,13	0,30	0,27	0,03		0,03	0,01	0,09	1,29
10	4,11	2,13	0,30	0,27	0,03		0,03	0,01	0,11	1,59
11	4,10	2,12	0,30	0,27	0,03		0,03	0,01	0,13	1,87
12	4,08	2,11	0,30	0,27	0,03		0,03	0,01	0,16	2,26
13	4,07	2,11	0,30	0,27	0,03		0,03	0,01	0,18	2,64
14	4,05	2,10	0,30	0,27	0,03		0,03	0,01	0,21	3,02
15	4,03	2,09	0,30	0,26	0,03		0,03	0,01	0,24	3,49
16	4,01	2,08	0,30	0,26	0,03		0,03	0,01	0,28	3,95
17	3,99	2,07	0,30	0,26	0,03		0,03	0,01	0,31	4,41
18	3,97	2,05	0,29	0,26	0,03		0,03	0,01	0,35	5,04
19	3,94	2,04	0,29	0,26	0,03		0,03	0,01	0,40	5,67
20	3,92	2,03	0,29	0,26	0,03		0,03	0,01	0,44	6,29

Çizelge 3.4'ün devamı

Örnek No	Şeker (g)	Yağsız süt tozu (g)	Buğday nişastası (g)	Guar sakız (g)	Salep (g)	aroması	Tuz (g)	Tarçın (g)	Salep (g)	Salep (%)
21	3,85	1,99	0,29	0,25	0,03		0,03	0,01	0,55	7,84
22	3,82	1,98	0,28	0,25	0,03		0,03	0,01	0,60	8,52
23	3,79	1,96	0,28	0,25	0,03		0,03	0,01	0,64	9,18
24	7,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,00	7,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	7,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	7,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	7,00		0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		7,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	7,00	0,00	0,00
31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	7,00	100,00
32	3,76	1,95	0,28	0,25	0,03		0,03	0,01	0,70	10,00
33	3,34	1,73	0,25	0,22	0,03		0,02	0,01	1,40	20,02
34	2,92	1,51	0,22	0,19	0,02		0,02	0,01	2,10	30,04
35	2,50	1,29	0,18	0,16	0,02		0,02	0,01	2,80	40,07
36	2,08	1,08	0,15	0,14	0,02		0,01	0,01	3,50	50,10
37	1,66	0,86	0,12	0,11	0,01		0,01	0,01	4,20	60,15
38	1,24	0,64	0,09	0,08	0,01		0,01	0,00	4,90	70,17
39	0,83	0,43	0,06	0,05	0,01		0,01	0,00	5,60	80,16
40	0,41	0,21	0,03	0,03	0,00		0,00	0,00	6,30	90,12

3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar kromatografik ve/veya yüksek saflıkta temin edilmiştir. Analiz süresine kadar tüm kimyasallar 4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kromatografik sistemde hareketli fazın hazırlanması, belirli düzeylerde standart maddelerin temini ve anabileşenlerinin düzeyinin belirlenmesi işlemlerinde kullanılan su 18,2 MΩ/cm (25 °C’de) kalitesinde Millipore ultra saf su saflaştırma sisteminde üretilmiştir. Çizelge 3.5’te kullanılan kimyasallar, bileşimi ve temin edildiği firmalar ve çizelge 3.6’da ise kullanılan cihazların kullanım amaçları ve modelleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar

Kimyasal adı	Bileşimi	Markası
Borik asit	H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Sodyum hidroksit	NaOH	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Hidroklorik asit	HCl	Merck (Darmstadt, Almanya)
Metilen kırmızısı	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂	Merck (Darmstadt, Almanya)
Metilen mavisi	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S	Merck (Darmstadt, Almanya)
Etanol	C ₂ H ₆ O	Merck (Darmstadt, Almanya)
Sülfürik asit	H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Katalizör tablet	K ₂ SO ₄ , CuSO ₄	Velp scientifica (Usmate, İtalya)
Nitrik asit	HNO ₃	Merck (Darmstadt, Almanya)
Metanol	CH ₃ OH	Merck (Darmstadt, Almanya)
Formik Asit	CH ₂ O ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Elementel bileşenler analizi standartları	⁵⁷ Fe, ⁶⁶ Zn, ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁵² Cr, ⁸⁸ Sr, ⁶⁰ Ni, ⁴⁷ Ti, ⁸⁵ Rb, ¹³⁸ Ba, ⁹⁸ Mo, ⁵¹ V, ⁵⁹ Co, ⁷ Li, ⁶⁹ Ga, ⁸² Se, ¹³³ Cs, ¹²¹ Sb, ⁹ Be, ²⁰⁵ Tl ve ²⁰⁹ Bi	VHG lab(Manchester, NH, ABD)
İzotop oranları analizi standartları	Sakkaroz (IAEA CH6), Selüloz (IAEA CH3), Potasyum nitrat (USGS 34) ve Su (IAEA VSMOW 2)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MS, ABD)
Karbonhidrat standartları	Glikoz, Fruktoz, Sakkaroz, Maltoz, Mannoz, Galaktoz, Arabinoz	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Organik asit standartları	Tartarik Asit, Sitrik Asit, Fumarik Asit, Malik Asit, Propiyonik Asit, Bütirik Asit, Laktik Asit	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Amino asit standartları	Lisin, Histidin, Arjinin, Sistein, Serin, Glutamik Asit, Treonin, Aspartik Asit, Prolin, Valin, Metionin, Tirozin, İzolösin, Lösin, Fenilalanin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
İndiyum	In	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Enzimatik kitler	Glukomannan ve Toplam Nişasta	Megazyme (Wicklow, İrlanda)
Kullanılan Gazlar	Helyum, Argon, Azot, Oksijen, Hidrojen, Karbondioksit ve Karbonmonoksit gazları	Habaş (İstanbul, Türkiye)

Çizelge 3.6. Analizler kapsamında kullanılan laboratuvar cihazları ve yardımcı malzemeler

Cihaz adı	Kullanım Amacı	Marka ve Modeli
ICP-MS sistemi	Elementel bileşen belirleme çalışmaları için kullanılmıştır	Perkin-Elmer ELAN DRC-e (Norwalk, CT, ABD)
IR-MS sistemi	İzotop oranları analizleri için kullanılmıştır	Thermo Finnigan Delta V (Waltham, MA, ABD)
HPLC sistemi	Karbonhidrat bileşenleri analizleri için kullanılmıştır	Shimadzu LC 10 A (Kyoto, Japonya)
DSC cihazı	Kalorimetrik ölçümler için kullanılmıştır	Perkin-Elmer DSC 6000 (Norwalk, CT, ABD)
LC-MS/MS	Amino asit ölçümler için kullanılmıştır	Thermo Scientific TSQ Access Max (Waltham, MA, ABD)
Orbitrap MS	Organik asit ölçümler için kullanılmıştır	Thermo Scientific Exactive (Waltham, MA, ABD)
Yakma ünitesi	Protein analizinde parçalama aşamasında kullanılmıştır	Velp Scientifica DK 6 (Usmate, İtalya)
Distilasyon cihazı	Protein analizinde damıtma aşamasında kullanılmıştır	Velp Scientifica UDK 129 (Usmate, İtalya)
Kül fırını	Kül oranının belirlenmesi için kullanılmıştır	Elektra Rezistans 14060 (Ankara, Türkiye)
Etüv	% 10 Hidroklorik asitte çözünmeyen madde, Glukomannan oranının ve toplam nişasta oranının belirlenmesi kullanılmıştır	Nüve NC500 (Ankara, Türkiye)
Karl Fisher titrasyon	Rutubet oranının belirlenmesi için kullanılmıştır	Mettler Toledo Easy KfV (Zaventem, Belçika)
Manyetik karıştırıcı	Glukomannan oranının ve toplam nişasta oranının belirlenmesi için kullanılmıştır	Heidolph MR Hei Standard (Schwabach, Almanya)
Santrifüj	Glukomannan oranının ve toplam nişasta oranının belirlenmesi için kullanılmıştır	Eppendorf Cenrifuge 5810R (Hamburg, Almanya)
pH metre	Glukomannan oranının ve toplam nişasta oranının belirlenmesi için kullanılmıştır	Mettler Toledo AG8603 (Zaventem, Belçika)
Spektrofotometre	Glukomannan oranının ve toplam nişasta oranının belirlenmesi için kullanılmıştır	Perkin Elmer Lambda-35 (Waltham, MA, ABD)
Mikrodalga Yakma Sistemi	Elementel bileşenleri belirleme çalışmalarında örneklerin suda çözünür hale getirilmesi için kullanılmıştır	Berghof Speedwave® marka Four Microwave model (Eningen, Almanya)
Ultra saf su cihazı	Analizlerde kullanılmak üzere gerekli olan ultra saf suyun temini için kullanılmıştır	Millipore Milli-Q(Bedford, MA, ABD)
Hassas terazi	Tüm analizlerde kullanılmıştır	Sartorius ED224S (Göttingen, Almanya)
Vorteks	Tüm analizlerde kullanılmıştır	IKA TTS 3 Basic (Wilmington, NC, ABD)
Çekiçli değirmen	Örnek hazırlama aşamasında kullanılmıştır	IKA (Staufen, Almanya)
Sarsak elek	Örnek hazırlama aşamasında kullanılmıştır	RETSCH (Haan, Almanya)
Şırınga ucu filtreler	Karbonhidrat, organik asit ve amino asit analizlerinde kullanılmıştır	Millipore (Burlington, Massachusetts, ABD)

3.2. Metot

Bu bölümde, tez kapsamında yapılması planlanan analizler anabileşen analizleri (protein analizi, kül oranı, % 10 HCl asitte çözünmeyen kül oranı, nem tayini ve indirgen şeker düzeyi), enzimatik analizler (glukomannan ve toplam nişasta) ve aletsel analizler (elementel bileşen, izotop oranları analizleri, kalorimetrik ölçümler, karbonhidrat bileşenleri analizleri, organik asit bileşenleri analizleri, amino asit bileşenleri analizleri) olmak üzere 3 başlık altında sunulmaktadır. Uygulanacak metot ve yöntemlerin doğruluğunun test edilmesi amacıyla validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar kapsamındaki tüm analizler Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Anabileşen analizleri

3.2.1.1. Protein miktarlarının belirlenmesi

Protein oranının belirlenmesi analizi; kimyasalların hazırlanması, parçalama, damıtma, titrasyon ve hesaplama olmak üzere beş aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

a) Kimyasalların hazırlanması:

- % 3'lük Borik asit çözeltisi: 30 g Borik asit 1l saf suda çözündürülmüştür.
- % 30'luk NaOH çözeltisi: 300 g NaOH, 1l saf suda çözündürülmüştür.
- 0,2 N HCl çözeltisi: % 37'lik HCl'den 16,56 ml alınıp 1l'ye saf su ile tamamlanmıştır.
- İndikatör çözelti: 0,10 g metilen kırmızısı ile 0,05 g metilen mavisi, 100 ml etanolde çözündürülmüştür. Amber renkli şişede saklanmıştır.
- Derişik H₂SO₄ (% 96-98): Direkt olarak kullanılmıştır.

b) Parçalama Aşaması:

1 g örnek 0,1 mg duyarlılıkta tartılıp Kjeldahl tüpüne konulup, içersine 2 katalizör tablet, 2 köpük önleyici tablet ve 12 ml derişik H₂SO₄ (% 96-98) ilave edilmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Tüpler parçalama cihazına yerleştirilip, 40 dk. 300 °C'de ve 90 dk. 420 °C'de çalışmak üzere ayarlanmış olan program kullanılmıştır. Yakma işlemi tamamlandıktan sonra tüpler sıcaklıkları 50-60 °C'ye düşünceye kadar tezgah üzerinde ağzı kapalı olarak bekletilmiştir. Her bir tüpe dikkatli bir şekilde 50 ml saf su konulup, hafifçe çalkalanmıştır. Üzerine 50 ml NaOH ilave edilmiştir. NaOH eklenmesiyle birlikte zümrüt yeşili olan tüp içeriğinin siyah renge döndüğü gözlemlenmiştir.

c) Damıtma Aşaması:

Bir erlenin içersine 30 ml Borik asit+3-4 damla indikatör çözeltisi konulup, cihaza yerleştirilmiştir. Örnek cihazın damıtma bölümüne konmuş ve cihazda 5 dk. boyunca damıtma işlemi gerçekleştirilmiştir.

d) Titrasyon Aşaması:

Süre sonunda erlen alınıp 0,20 N HCl çözeltisi ile pembe dönüm noktasına kadar titre edilmiştir. Harcanan HCl asit hacim (ml) olarak kaydedilmiş ve formül (3.1)'de yerine yazılmıştır.

e) Hesaplama:

$$\% \text{ Protein} = N * f * (V_1 - V_0) * (0,014/m) * 100 * \text{ÇF} \quad (3.1)$$

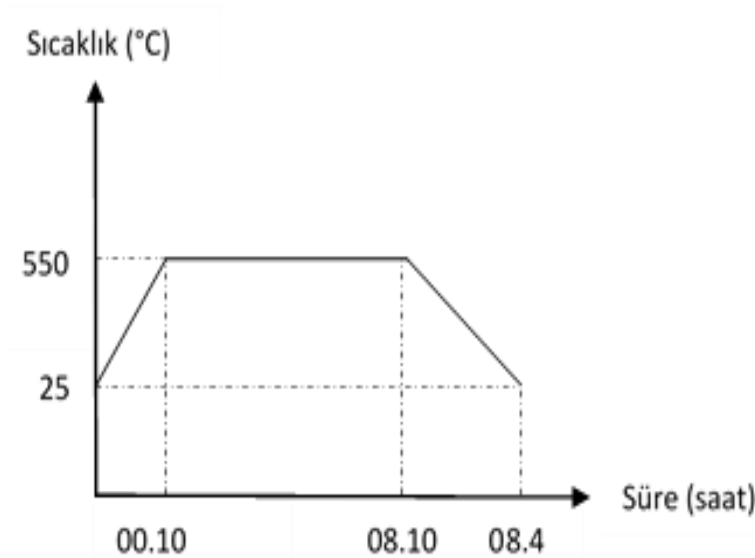
N: Titrasyonda kullanılan HCl'nin normalitesi
 f: Titrasyonda kullanılan HCl'nin faktörü
 V₁: Titrasyonda kullanılan HCl'nin hacmi (ml)
 V₀: Kör için harcanan HCl'nin hacmi (ml)
 m: Örnek kütlesi (g)
 ÇF: Çevirme faktörü

3.2.1.2. **Kül miktarlarının belirlenmesi**

Porselen kroze iyice yıkanıp kurutulduktan sonra 500-550 °C'de 30 dk. yakılmış sonra 30 dk. desikatörde soğutulup, darası alınmıştır (mg duyarlılıkta) (m₁). Kroze 3 g örnek mg duyarlılık ile tartılmış (m₂) ve kül fırınında 550 °C'de 8saat (sabit ağırlıkta beyaz bir kül elde edilene kadar) yanması için bekletilmiştir. Yanmış örnek, desikatöre alınıp sabit tartıma gelinceye kadar beklenmiş ve tartılmıştır (m₃). Hesaplama da kullanılan formül (3.2)'de gösterilmiştir. Şekil 3.3'te kül fırının çalışma koşulları gösterilmiştir.

$$\% \text{ Kül} = ((m_3 - m_1)/m_2) * 100 \quad (3.2)$$

m₁:Kroze darası (g)
 m₂:Kül fırınında yakma işlemi öncesi tartılan örnek miktarı
 m₃:Kül fırınında yakma işlemi sonrası elde edilen kül+kroze ağırlığı



Şekil 3.3. Kül fırını çalışma koşulları

3.2.1.3. % 10 Hidroklorik asitte çözünmeyen madde miktarının belirlenmesi

% 10'luk HCl asitte çözünmeyen kül analizinde, toplam kül tayini yapılmış olan yanmış örnekler kullanılmıştır. Krozedeki kül, 25 ml % 10'luk HCl asit çözeltisi ile behere alınıp, çeker ocak içinde 5 dk. kaynatılmıştır. Kaynatma sırasında beherin ağzı saat camı ile kapatılmıştır. Kaynatma sonrası elde edilen çözelti soğutulduktan sonra külsüz özellikte bir filtre kağıdından geçirilip, filtre kağıdı sıcak su ile iyice yıkanmıştır. Süzme işi tamamlandıktan sonra filtre kağıdı, içerisindeki kül ile birlikte katlanarak yakma işleminde kullanılan aynı kroze yerleştirilmiştir. Eş zamanlı olarak kör denemesi yapılmıştır. Bunun için bir adet külsüz filtre kağıdı önceden darası alınmış kroze konmuştur. Hazırlanan kör ve örneğe ait kroze önce etüvde 105 °C'de 1 saat kurutulmuş ve sonra 550 °C'de 1 saat kül fırınında yakılmıştır. Kroze yaklaşık 100 °C'ye kadar soğuduktan sonra desikatöre alınıp oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Desikatörden alınıp tartım işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4. Rutubet miktarının belirlenmesi

Örneklerdeki rutubet miktarı Karl Fischer titrasyon cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde, hazırlanan örneklerden 0,20-0,25 g tartılmış ve çizelge 3.7'de yer alan Karl Fischer titrasyon cihazı çalışma koşulları altında okumalar yapılmıştır.

Çizelge 3.7. Karl Fischer titrasyon cihazı çalışma koşulları

Cihaz	Mettler Toledo Easy KfV
Formamid hacmi	30 ml
Combi Metanol hacmi	30 ml
Combi Titrant 5 hacmi	Otomatik
Maksimum başlangıç hacmi	50 µl/dk.
Karıştırma ön süresi	60 sn
Voltaj	100 mV

3.2.1.5. İndirgen şeker düzeylerinin belirlenmesi

Örneklerdeki indirgen şeker düzeyleri karbonhidrat bileşenleri analizleri kısmında belirtilen yöntem kullanılmıştır. Tespit edilen glikoz ve fruktoz değerlerinin toplamı indirgen şeker düzeyi olarak ifade edilmiştir.

3.2.2. Enzimatik analizler

3.2.2.1. Glukomannan düzeyinin belirlenmesi

Glukomannan miktarlarının saptanabilmesi için örnekler, Megazyme Glukomannan Deney Prosedürü (K- GLUM 03/14) çerçevesinde deneye hazırlanmıştır.

- 1) Cam bir test tüpüne mg duyarlılıkta 0,10 g örnek tartılmıştır ve üzerine 5 ml seyreltik etanol (% 80 v/v) çözeltisi ilave edilerek vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir.
- 2) Hazırlanan tüp 90 °C sıcaklıkta 5 dk. termoreaktörde inkübasyona bırakılmıştır ve süre sonunda tekrar 5 ml seyreltik etanol (% 80 v/v) ilave edilmiştir.
- 3) Test tüpü 1500 devir/dk. dönüş hızında 10 dk. boyunca santrifüjlenmiştir.
- 4) Santrifüjleme sonucu oluşan üst faz atılmıştır. Süzülme işlemi uygulanmıştır.
- 5) Alt pellet fazına 5 ml seyreltik etanol (% 80 v/v) ilave edilerek vorteks ile homojenize edilmiş ve üzerine yeniden 5 ml seyreltik etanol (% 80 v/v) ile süspanse edilerek vorteks ile homojenize edilmiştir.
- 6) Test tüpü 1500 devir/dk. dönüş hızında 10 dk. boyunca santrifüjlenmiştir.
- 7) Santrifüjleme sonucu oluşan üst faz atılmıştır ve alt pellet fazı analiz kitinde belirtilen şekilde hazırlanmış olan “Solution 1 (pH:4,5)” çözeltisinden 8 ml kullanılarak yeniden süspanse edilmiştir.
- 8) Tamamen dağılımın olacağı şekilde vortekste kuvvetlice karıştırılır. Termoreaktör içersine tüp yerleştirilerek (90 °C) 30 sn inkübe edilir. Inkübe edilen tüp tekrar vortekste kuvvetlice karıştırılır, yeniden termoreaktör içersine tüp yerleştirilerek 30 sn inkübe edilmiş ve inkübe edilen tüp tekrar vortekste kuvvetlice karıştırılmıştır.
- 9) Pelet fazını içeren test tüpü 90 °C’lik termoreaktör içersinde homojenize edilerek 4 dk. boyunca bekletilmiştir. Inkübe edilen tüp vortekste kuvvetlice karıştırılmıştır.
- 10) Tüp 40 °C’lik su banyosuna yerleştirilmiştir.
- 11) 5 dk. sonra su banyosundan alınan test tüpü içersine analiz kiti içeriğinde yer alan “Suspension 4 (β-mannanase)” solüsyonundan 20 µl ilave edilmiş ve tüp 30 s boyunca vortexlenmiştir.
- 12) Test tüpü 40 °C sıcaklığındaki su banyosunda 60 dk. boyunca inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresince aralıklı olarak (3 kez) vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir.
- 13) Test tüpü içeriği bir beher içersine aktarılmış ve son hacim 70 ml olana kadar saf su ilave edilmiştir.
- 14) 1 M NaOH çözeltisi kullanılarak beher içersindeki çözeltinin pH değeri 12,5 olarak ayarlanmış ve çözelti 10 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 15) Beherin içersine 200 mM sodyum fosfat tampon çözeltisinden (pH:6,50) 20 ml ilave edilmiştir.

- 16) 1 M HCl çözeltisi kullanılarak beher içerisindeki çözeltinin pH değeri 6,50 olarak ayarlanmıştır.
- 17) pH ayarlaması yapılmış olan beher içindeki çözeltinin hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 18) 0,5 ml örnek çözeltisinden spektrofotometre küvetine alınmış ve üzerine analiz kiti içeriğinde yer alan "Suspension 5 (β -Glucosidase+ β -mannosidase)" çözeltisinden 0,02 ml ilave edilmiştir.
- 19) Kör okuma için hazırlanan küvete ise 0,5 ml örnek çözeltisi ve 0,02 ml saf su (~ 35 °C) konulmuştur.
- 20) Hazırlanan kör ve örnek küvetleri hafifçe çalkalanmış ve ağzıları kapatılarak 35 °C sıcaklıktaki bir etüvde 20 dk. boyunca inkübe edilmiştir.
- 21) Hazırlanan her iki küvete 2 ml saf su (~ 35 °C), 0,20 ml "Solution 2 (buffer-kullanıma hazır)" ve 0,10 ml "Solution 3" ilave edilmiştir.
- 22) Kör ve örnek küvetleri hafifçe çalkalanarak 30 °C sıcaklıktaki bir etüvde 3 dk. inkübe edilmiştir. Süre sonunda küvetler 340 nm dalga boyundaki spektrofotometre cihazında okutularak elde edilen absorbans değerleri not edilmiştir ($A_{1\text{örnek}}$ ve $A_{1\text{kör}}$)
- 23) İkinci inkübasyonun ardından küvetlerin her birine analiz kiti içeriğinde yer alan "Suspension 6 (HK/G6P-DH)" çözeltisinden 0,02 ml ilave edilmiş, küvetler hafifçe çalkalanmış ve 5 dk. bekletildikten sonra spektrofotometre cihazında okutulmuştur. ($A_{2\text{örnek}}$ ve $A_{2\text{kör}}$)
- 24) Küvetlerin her birine analiz kiti içeriğinde yer alan "Suspension 7 (PGI/PMI)" çözeltisinden 0,02 ml ilave edilmiş, küvetler hafifçe çalkalanmış ve 20 dk. bekletildikten sonra spektrofotometre cihazında okutulmuştur. ($A_{3\text{örnek}}$ ve $A_{3\text{kör}}$)
- 25) Glucomannan miktarının (% m/m) belirlenebilmesi amacıyla formül (3.3)'ten yararlanılmıştır.

$$\% \text{ Glucomannan} = (A_3 - A_1)_{\text{örnek}} - (A_3 - A_1)_{\text{kör}} * 36,8 \text{ (g/100g)} \quad (3.3)$$

A_1 örnek	: Basamak 20'de elde edilen örneğe ait absorbans değeri
A_3 örnek	: Basamak 22'de elde edilen örneğe ait absorbans değeri
A_1 kör	: Basamak 20'de elde edilen kör ait absorbans değeri
A_3 kör	: Basamak 22'de elde edilen kör ait absorbans değeri

3.2.2.2. Toplam nişasta düzeyinin belirlenmesi

Nişasta miktarlarının saptanabilmesi için örnekler, Megazyme Total Nişasta Deney Prosedürü (AA/AMG 02/14) çerçevesinde deneye hazırlanmıştır.

- 1) Cam bir test tüpüne mg duyarlılıkta 0,10 g örnek tartılmış ve test tüpüne 0,2 ml seyreltik etanol (% 80 v/v) çözeltisi ilave edilmiştir.

- 2) Test tüpüne analiz kitinde belirtilen şekilde hazırlanmış olan 3 ml “termostabil α -amilaz solüsyonu”ndan eklenmiş ve 6 dk. boyunca test tüpü kaynar su banyosunda bekletilmiştir.(2, 4 ve 6. dk.’da vortex yardımıyla homojenize edilmiştir.)
- 3) Test tüpüne analiz kiti içeriğindeki “amiloglikozidaz (20 U) çözeltisi”nden 0,10 ml eklenmiş ve vortex yardımıyla tüp içeriği homojenize edilmiştir.
- 4) Test tüpü 50 °C sıcaklığındaki su banyosuna yerleştirilerek 30 dk. boyunca bekletilmiş ve süre sonunda balon joje içinde 100 ml’ye (Örnek, deney prosedüründe bahsedilen D-glucose konsantrasyonu 0,02 ile 0,40 g/l arasında değişecek şekilde seyreltilmiştir. Seyreltme oranının belirlenebilmesi için HPLC analizi sonucunda elde edilen bilgilerden yararlanılmıştır. HPLC analizi sonucuna göre salep örneklerinde ortalama 12000 mg/kg = 12 g/l D-glikoz bulunduğu belirlenmiştir. Bu bilgiden yola çıkılarak deney prosedürünün bahsetmiş olduğu dilüsyon faktörü 100 kat olarak bulunmuştur); saf su ile tamamlanmıştır.
- 5) Balon jodeden 35 ml çözelti santrifüj tüpüne alınarak 3000 devir/dk. dönüş hızında 10 dk. boyunca santrifüj edilmiştir.
- 6) Örnek küvetinin hazırlanması: santrifüj tüpünün üst kısmındaki berrak çözeltiden 0,05 ml örnek spektrofotometre küvetine alınmış ve üzerine 2 ml saf su, analiz kiti içeriğinde yer alan “buffer çözeltisi”nden 0,10 ml ve analiz kitinde belirtilen şekilde hazırlanmış olan “NADP+/ATP çözeltisi”nden 0,10 ml eklenerek hazırlanmıştır.
- 7) Kör örnek küvetinin hazırlanması: içi boş bir spektrofotometre küvetine 2,05 ml saf su ilave edilerek hazırlanmıştır. Üzerine “buffer çözeltisi”nden 0,10 ml ve “NADP+/ATP çözeltisi”nden 0,10 ml eklenerek hazırlanmıştır.
- 8) Kör ve örnek küvetleri hafifçe çalkalanarak 3 dk. inkübe edilmiştir. Süre sonunda küvetler 340nm dalga boyundaki spektrofotometre cihazında okutularak elde edilen absorbans değerleri not edilmiştir Elde edilen değer “ $A_{1\text{örnek}}$ ” ve “ $A_{1\text{kör}}$ ” şeklinde tanımlanmıştır.
- 9) Küvetlerin her birinin üzerine analiz kiti içeriğinde yer alan “HK/G-6-PDH çözeltisi”nden 0,02 ml eklenmiştir. 5 dk. sonunda küvetler spektrofotometre cihazında yine aynı dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen değerler “ $A_{2\text{kör}}$ ” ve “ $A_{2\text{örnek}}$ ” şeklinde tanımlanmıştır.
- 10) Toplam nişasta miktarının belirlenebilmesi amacıyla formül (3.4)’ten yararlanılmıştır.

$$\% \text{ Nişasta} = 1,1685 * (A_{2\text{örnek}} - A_{2\text{kör}}) \text{ örnek} - (A_{2\text{örnek}} - A_{2\text{kör}}) \text{ kör (g/l)} \quad (3.4)$$

A_1 örnek	: Basamak 8’de elde edilen örneğe ait absorbans değeri
A_2 örnek	: Basamak 9’da elde edilen örneğe ait absorbans değeri
A_1 kör	: Basamak 8’de elde edilen kör ait absorbans değeri
A_2 kör	: Basamak 9’da elde edilen kör ait absorbans değeri

3.2.3. Aletsel analizler

3.2.3.1. Elementel bileşen analizleri

Örneklerin elementel bileşenleri Perkin-Elmer marka ELAN DRC-e model ICP-MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler elementel analiz öncesinde teflon hazneleri olan mikrodalga fırında yakılmıştır. Bu amaçla Berghof Speedwave® marka Four Microwave (Eningen, Almanya) model mikrodalga yakma ünitesi kullanılmıştır. Homojen halde olan toz örneklerden $0,10 \pm 0,01$ g tartılarak mikrodalga ünitesinin teflon kapları içine konulmuş ve üzerine 5 ml H_2NO_3 ve 2 ml H_2O_2 ilave edilerek mikrodalga fırınında yakılmıştır. Mikrodalga ünitesinin sıcaklık koşulları oda sıcaklığından $170^\circ C$ 'ye 5 dk. ve ardından $190^\circ C$ 'ye 15 dk.'lık artış şeklinde programlanmış ve süre bitiminde örnekler oda sıcaklığında soğutulurak polipropilen santrifüj tüpleri içerisinde son hacmi 25 ml oluncaya kadar ultra saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti ICP-MS cihazında analiz edilmiştir. ICP-MS cihazının çalışma alanına giren tüm elementlere ait bir tarama gerçekleştirilmiş ve tarama sonucunda örneklerde bulunma ihtimali olan elementler belirlenerek bu elementlere yönelik miktarsal analizler gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.8'de ICP-MS çalışma şartları sunulmaktadır.

Çizelge 3.8. ICP-MS çalışma koşulları

Plazma şartları	
Cihaz	Elan DRC-e (Perkin Elmer SCIEX, Norwalk, ABD)
Örnek girişi	Quartz CYCLONIC DRC Spray Chamber
RF Gücü	1100
Skimmer Cone	Nikel
Sampler Cone	Nikel
Nebulizer	Micromist Nebulizer 0,4 ml/dk.
Plazma Ar akış oranı (l/dk.)	19
Auxiliary Ar akış oranı (l/dk.)	1,20
Nebulizer gaz akış oranı (l/dk.)	0,81
Tarama şartları	
Tarama modu	Peak hopping
Analitik kütleler(amu)	Standart mod
Analitik kütle başına bekleme süresi (Dwell time)(ms)	50
Oto örnekleyici	CETAX ASX-520
Internal standart	Tb
Analitik kütleler (amu)	Standart mod: ^{57}Fe , ^{66}Zn , ^{55}Mn , ^{63}Cu , ^{88}Sr , ^{52}Cr , ^{60}Ni , ^{47}Ti , ^{85}Rb , ^{138}Ba , ^{98}Mo , ^{51}V , ^{59}Co , ^7Li , ^{69}Ga , ^{82}Se , ^{133}Cs , ^{121}Sb , ^9Be , ^{205}Tl ve ^{209}Bi

a) Standart çözelti ve hazırlanması

Konsantrasyonları 2-5-10-25-50-100-200 $\mu g/kg$ olacak şekilde standart çözeltiler (% 2) HNO_3 kullanılarak hazırlanmıştır.

b) Hesaplama ve sonuç

Tayin edilmek istenen her bir element için hazırlanan çalışma standart çözeltileri artan konsantrasyonlarda cihaza okutulularak elde edilen değere göre çizilen kalibrasyon eğrisinden örnekteki element düzeyleri hesaplanmıştır. Örnekteki miktar hesaplanırken, cihazda örnek için okunan konsantrasyon değerinden kör örneğinin konsantrasyonu çıkarılıp, seyreltme faktörü ile çarpılması sonucu örnekteki elemente ait miktar hesaplanmıştır. Hesaplama kullanılan formül (3.5)'te gösterilmiştir.

$$X (\mu\text{g/kg}) = (C_0 - C_K) * (V/m) \quad (3.5)$$

X : Örnekteki element miktarı ($\mu\text{g/kg}$)
 C_0 : Kalibrasyon Eğrisinden Okunan Örnek Konsantrasyonu ($\mu\text{g/l}$)
 C_K : Kalibrasyon Eğrisinden Okunan Kör Konsantrasyonu ($\mu\text{g/l}$)
V : Analize Hazırlanmış Örnek Hacmi (ml)
m : Örnek Miktarı (g)

3.2.3.2. İzotop oranları analizleri

Salep ve diğer maddelerin $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ düzeyleri elementel analiz izotop oran kütle spektrometresi (EA/IR-MS) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle IR-MS cihazı Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MS, ABD) firmasından temin edilen sertifikalı izotopik referans ile kalibre edilmiştir. Belirtilen standart maddeler kullanılarak karbondioksit, azot, hidrojen ve oksijen gazlarının izotopik değerleri tanımlanmış ve ardından örneklerin izotopik kompozisyonları belirlenmiştir. Kalibre edilen sistem kullanılarak salep örneklerinin, TTK maddelerinin üç tekrarlı analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ analizleri için $150 \pm 50 \mu\text{g}$ ağırlığındaki örnek mikro kalay kapsül içine; $^2\text{H}/^1\text{H}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ analizleri için $150 \pm 50 \mu\text{g}$ ağırlığındaki örnek gümüş kapsül içine ultra hassas terazi kullanılarak tartılmış ve cihazın oto örnekleyici kısmına yerleştirilerek analiz edilmiştir. Çalışma şartları çizelge 3.9'da detaylı olarak gösterilmiştir. Elde edilen δ değerlerine ait sonuçlar cihazın yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.9. IR-MS çalışma koşulları

Cihaz	Thermo Finnigan Isotope Ratio Mass Spectrometer	
Elementel analizör	Thermo-Electron Flash EA 2000	
Arayüz	Thermo Finnigan ConFlo IV	
	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ve $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	$^2\text{H}/^1\text{H}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
Oksidasyon reaktörü sıcaklığı	1020 °C	Off
Redüksiyon reaktörü sıcaklığı	450 °C	1450 °C
Fırın sıcaklığı	60 °C	100 °C
Taşıyıcı gaz (He) akış hızı	100 ml/dk.	120 ml/dk.
Flaş yanma gazı (O ₂) akış hızı	250 ml/dk.	Off
ConFlo IV Interface He basıncı	1,40bar	1,40bar
ConFlo IV Interface CO ₂ H ₂	1,40bar	2,60bar
ConFlo IV Interface N ₂ CO basıncı	1,60bar	2,00bar

3.2.3.3. Kalorimetrik analizler

Örneklerin kalorimetrik analizleri Perkin Elmer marka DSC 6000 model diferansiyel tarama kalorimetresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10-20 mg ağırlığında hassas olarak alüminyum kaplara tartılan örnek, referans olarak konulan boş alüminyum kaba karşı analiz edilmiştir. DSC cihazının kalibrasyonu standart indiyum kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. DSC analizleri 0'dan 300 °C'ye $\beta=10$ °C/dk. ısıtma hızında ve 25 ml/dk. N₂ koşullarında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde erime sıcaklığı, erime entalpisi ve Tg/Step parametreleri incelenmiştir. Elde edilen termogram eğrileri, camsı geçiş sıcaklığı ve erime sıcaklığı DSC 600 PYRIS Manager bilgisayar yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.3.4. Karbonhidrat bileşenleri analizleri

Örneklerde mevcut karbonhidrat bileşenleri Refraktif İndeks Dedektörlü (RID) Shimadzu marka LC-20 AD model HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin hazırlanması ve örnek seyreltme oranı Öziyici'nin (2015) belirttiği analiz yöntemine uygun olarak hazırlanmıştır (Öziyici vd. 2015).

Bu metoda göre, homojen haldeki örneklerden 1g tartılıp 50 ml'lik falkon tüpü içersine ultra saf su ile tamamlanarak çözünür hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler, 40 °C'lik ultrasonik banyoda 30 dk. ekstraksiyona bırakılıp, ardından 3000 devir/dk.'da 10 dk. santrifüj edilmiştir. Berrak üst faz kısmından 2-3 ml alınıp, 0,45 µm membran filtreden geçirildikten sonra 1 ml örnek alınarak viallenmiştir. Çizelge 3.10'da belirtilen şartlar altında analize alınmıştır.

Çizelge 3.10. HPLC-RID çalışma koşulları

Cihaz	Shimadzu-10A (Shimadzu, Kyoto, Japonya).
Dedektör	Refractive Index Detector (RID)
Kolon	Transgenomic ION 300 (Transgenomic, NE, ABD)
Yazılım	Lab solution
Kolon fırın sıcaklığı	65 °C
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Akış hızı	0,6 ml/dk.
Mobil faz	0,125 mM H ₂ SO ₄

Standart çözelti ve hazırlanması

Konsantrasyonları 10-25-50-100-250-500-1000 mg/kg olacak şekilde standart çözelti hazırlanmıştır. Bunun için 50 ml'lik balon joje içine hesaplanan miktarda standart ilave edilip ultra saf su ile tamamlanmıştır.

3.2.3.5. Organik asit bileşenleri analizleri

Salep örnekleri ve TTK maddelerindeki organik asit bileşenlerinin (tartarik asit, sitrik asit, fumarik asit, malik asit, propiyonik asit, bütirik asit, laktik asit) analizi Oziyici'nin (2015) belirttiği analiz yöntemi ile ekstrakte edilerek, analiz edilmiştir (Regueiro vd. 2013; Kıvrak 2015).

Homojen haldeki örneklerden 1 g tartılıp 50 ml'lik falkon tüpü içersine ultra saf su ile tamamlanarak çözünür hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler, 40 °C'lik ultrasonik banyoda 30 dk. ekstraksiyona bırakılıp, ardından 3000 devir/dk.'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Berrak üst faz kısmından 2-3 ml alınıp, 0,45 µm membran filtreden geçirildikten sonra 0,50 ml örnek ve % 0,10 (v/v) formik asit bulunan 0,50 ml metanol alınarak vialle alınmış ve çizelge 3.11'de belirtilen koşullar altındaki Orbitrap-MS cihazına enjekte edilmiştir. Çizelge 3.12'de organik asitlerin kütle değerleri (m/z) sunulmaktadır.

Çizelge 3.11. ORBITRAP-MS çalışma koşulları

Cihaz	Thermo Scientific Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fischer Sci. Inc., Waltham Massachussetts, ABD)
Kolon	Hypersil GOLD RP C18 (1,9 µm). 100*2,1 mm
Yazılım	Xcalibur
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Enjeksiyon hacmi	10 µl
Kapiler sıcaklığı	300 °C
Auxiliary gaz basıncı	10 bar
Sheath gaz basıncı	30 bar
Sprey Voltaj	- 4000 V
Tarama aralığı	60-300 m/z
Çözünürlük	Yüksek
Polarite	Negatif [M-H]
Mobil faz A	Suda % 0,5 formik asit
Mobil faz B	Asetonitrilde % 0,5 formik asit

Çizelge 3.12. Organik asitlerin kütle değerleri

Organik asit	Monoisotropik kütle	Gerçek kütle	İyonlaşma
Tartarik Asit	150,02	149,01	[M-H]
Sitrik Asit	192,03	191,02	[M-H]
Fumarik Asit	116,01	115,00	[M-H]
Malik Asit	134,02	133,01	[M-H]
Propiyonik Asit	74,04	73,03	[M-H]
Bütirik Asit	88,05	87,04	[M-H]
Laktik Asit	90,03	89,03	[M-H]

Standart çözelti ve hazırlanması

Konsantrasyonları 0-0,1-0,25-0,5-1-2,5-5-10-25 mg/kg olacak şekilde standart çözeltiler saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.3.6. Amino asit bileşenleri analizleri

Salep örnekleri ve TTK maddelerindeki serbest amino asit (lisin, histidin, arjinin, sistein, serin, glutamik asit, treonin, aspartik asit, prolin, valin, metionin, tirozin, izolösin, lösin, fenilalanin) miktarlarının analizi Kıvrak'ın 2014'de belirttiği yöntemle göre sıvı kromatografisi kütle/kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) cihazı kullanılarak, bazı küçük modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir (Kıvrak vd. 2014). Bu yöntemle göre homojenize edilmiş 0,50 g örnek içerisine % 0,10 (v/v) formik asit bulunan 10 ml su:metanol (80:20, v/v) çözeltisi ilave edilerek ekstrakte edilmiştir. Karışım 5 dk. vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4 °C'de 4000 devir/dk. hızda 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen üst faz 0,45µm PTFE membran filtreden geçirilmiştir. Örnekten vial içersine 0,20 ml alınmış ve üzerine 0,80 ml mobil faz A (su:metanol (95:5, v/v)) ilave edilmiştir. Çizelge 3.13'te belirtilen koşullar altındaki LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

Çizelge 3.13. LC-MS/MS çalışma koşulları

Cihaz	Thermo Scientific- TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ABD)
Kolon	Hypersil GOLD RP C18 (1,9 µm). 100*2,1 mm
Yazılım	Xcalibur
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Enjeksiyon hacmi	10µl
Kapiler sıcaklığı	270 °C
Buharlaştırma sıcaklığı	50 °C
Auxiliary gaz basıncı	20 bar
Sheath gaz basıncı	50 bar
Sprey Voltaj	±3500 V
Mobil faz A	Su: MeOH 95:5, % 0,1 formik asit, 4 mM amonyum asetat
Mobil faz B	Metanol

Standart çözelti ve hazırlanması

Konsantrasyonları 0-1-2-4-8-10-12-14 mg/kg olacak şekilde standart çözeltiler % 0,10 (v/v) formik asit bulunan % 20'lik metanollü su (v/v) kullanılarak hazırlanmıştır.

3.3. Yöntemlerin Doğrulanması

Metod veya ölçüm prosedürlerinin belirlenen amaçlara uygunluğunun belirlenmesi çalışmalarında doğrusalılık, tespit sınırı, ölçüm sınırı ve doğruluk (geri kazanım, tekrarlanabilirlik) çalışmaları temsili bir salep örneği üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Doğrusallık

En az 6 farklı konsantrasyon noktasında olmak üzere hazırlanan analitlerin standart çözeltileri üç kez cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ilgili cihazların yazılımları ile değerlendirilmiş ve kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Oluşturulan bu grafiklerden R^2 değerleri hesaplanmıştır.

3.3.2. Tespit sınırı ve ölçüm sınırı (LOD ve LOQ)

Temsili salep örneği kullanılarak hazırlanan 6 paralel çözelti için en az 3 kez ölçüm yapılmış, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Standart sapma değerinin 3 katı tespit sınırı ve 10 katı ölçüm sınırı olarak ifade edilmiştir.

3.3.3. Doğruluk

Doğruluk çalışması kapsamında gerçeklik ve kesinlik değerleri incelenmiştir. Gerçeklik parametresinde geri kazanım değerleri belirlenirken, kesinlik parametresinde tekrarlanabilirlik değeri hesaplanmıştır. Elde edilen değerlerin karşılaştırılması ise sırasıyla çizelge 2.11 ve çizelge 2.12'deki değerlere göre gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. Gerçeklik

Gerçeklik çalışmasında salep örneği kullanılarak hazırlanan 6 paralel çözelti için 3 kez ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan geri kazanım değerleri elementel analizler için formül (2.3) göre, karbonhidrat bileşenleri, organik asit ve amino asit bileşenleri analizleri için formül (2.5) göre hesaplanmıştır.

3.3.3.2. Kesinlik

Bu çalışmada anabileşenler analizleri, enzimatik analizler ve aletsel analizler için tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik; temsili salep örneği kullanılarak hazırlanan 6 paralel çözelti için 3 kez ölçüm yapılmış ve elde edilen sonuçlardan bağıl standart sapma (% RSD) değeri, tekrarlanabilirlik değeri olarak ifade edilmiştir.

3.4. İstatiksel ve Kemometrik Değerlendirmeler

3.4.1. İstatiksel değerlendirmeler

Hazırlanan salep örnekleri için belirlenen yöntemlerin uygulanması sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizlerini gerçekleştirmek için SPSS statistics 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılmıştır. Veri setine uygun, doğru istatistiksel analizi belirlemek amacıyla önce normal dağılım testlerinden Kolmogorov-Smirnov (örnek sayısı 50'den fazla olması nedeni ile) uygulanmıştır. Kolmogorov-Smirnov testine ait önem düzeyi temel alınarak normal dağılım gösteren veya göstermeyen veriler için hangi testin seçileceğine karar verilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler üzerinde farklılıkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için varyans analizi (ANOVA) testi ve normal dağılım göstermeyen veri setlerinde farklılıkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ise Kruskal-Wallis H test yöntemi uygulanmıştır.

ANOVA testi sonucunda farklılıkların hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Post Hoc testleri uygulanmıştır. Bu kapsamda, varyansların homojen olması durumunda Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, varyansların homojen olmaması durumunda ise Tamhane's T2 Çoklu Karşılaştırma Testi seçilmiştir. Testler sonucunda istatistiksel olarak önemli farklılıklar arz eden özellikler ilgili çizelgelerde farklı harflerle gösterilmiştir. Normal dağılım göstermeyen salep bileşenlerinin gerek bölgeler arasında, gerekse salep ile TTK maddeleri arasındaki bileşenler açısından farklılığını belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Testler sonucunda istatistiksel olarak önemli farklılıklar gösteren özellikler ilgili çizelgelerde harflendirme veya “*” işareti kullanılarak gösterilmiştir. Özelliklere ait tanımlayıcı görsellerin (regresyon grafiği, histogram, pasta grafiği vb) oluşturulmasında Minitab 18 ve Microsoft Excell yazılımlarından yararlanılmıştır.

Laboratuvar ortamında hazırlanan salep ve TTK maddeleri içeren homojen toz karışımlar kemometrik ve istatistiksel değerlendirmeler sonucunda önemli bulunan analitik yöntemlerle analiz edilmiştir. İki sayısal ölçüm arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığını, varsa bu ilişkinin yönünü ve şiddetini belirlemek için korelasyon katsayısı değerlendirilmiştir. Veri setinin normal dağılım göstermemesi durumunda Pearson korelasyon katsayısı, normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman's rho korelasyon katsayısı kullanılmıştır. Uygun p değeri ($p < 0,05$) şartlarını taşıyan örneklerin korelasyon katsayılarının (r) yorumlanması çizelge 3.14'te gösterildiği şekilde yapılmıştır (Kılıç 2012).

Çizelge 3.14. Korelasyon katsayısının (r) yorumlanması

Korelasyon Değeri	Yorumlaması
$r < 0,20$	Çok zayıf ilişki yada korelasyon yok
0,20-0,50 arasında	Zayıf ilişki
0,50-0,70 arasında	Orta şiddette ilişki
0,70-0,90 arasında	Yüksek ilişki
$0,90 < r$	Çok yüksek ilişki

Yüksek korelasyon gösteren parametrelerin doğrusallığı incelenmiş ve tüm istatistiksel veriler birlikte değerlendirilerek salebin taklit ve taşımasının belirlenmesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

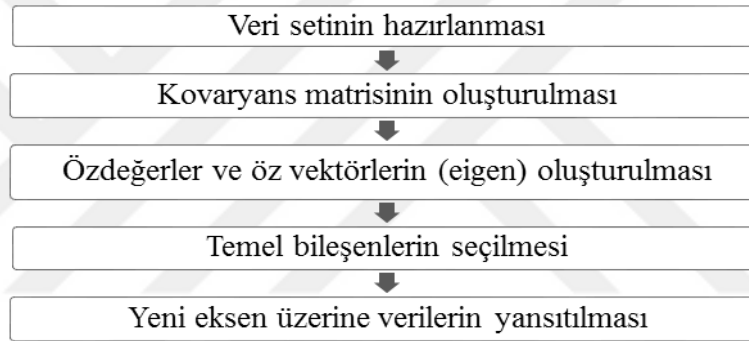
3.4.2. Kemometrik değerlendirmeler

Belirtilen parametrelerden hangilerinin salep ve TTK maddeleri ile olan ayrımında ön plana çıktığının belirlenmesi amacıyla kemometrik yaklaşımlar denenmiştir. Çalışmalar İYTE Üniversitesi kimya laboratuvarında Prof. Dr. Durmuş ÖZDEMİR ve ekibi tarafından MATLAB platformunda geliştirilen yazılım paketleri kullanılarak yapının tanımlanmasında yönlendirmesiz ve yönlendirmeli sınıflandırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmalarında temel bileşen analizi (PCA) yöntemiyle veriler incelenirken, yönlendirmeli sınıflandırma yöntemlerinden kısmi en küçük kareler-diskriminant analiz (PLS-DA) kullanılarak modeller oluşturulmuştur. Elde edilen kemometrik modelin başarısı bağımsız test seti kullanılarak ölçülmüştür. Tüm analiz yöntemlerinin birleştirilmesi ile oluşturulan ilk model ile aynı zamanda hangi analiz yönteminin sınıflandırmaya en çok katkısı olduğu da belirlenmiştir. En yüksek başarıya sahip analiz yöntemleri ile ayrı ayrı PLS-DA modelleri kurularak bu modellerin de doğru tahmin oranı testlerinin tamamlanması ile en az efor, zaman ve maliyet kriterlerini sağlayan ve aynı zamanda yüksek sınıflandırma başarısına sahip analitik yöntem belirlenmiştir.

3.4.2.1. Yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmaları

Yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmalarında temel bileşen analizi (PCA) metoduyla veriler incelenmiştir. Analizlerin sonuç skalası oldukça farklı olduğu için model, korelasyon matrisi üzerinden kurulmuştur. Şekil 3.4'te PCA'nın akış şeması sunulmaktadır.



Şekil 3.4. PCA akış şeması

3.4.2.2. Yönlendirmeli sınıflandırma çalışmaları

Örneklerin kimyasal analizleri kullanılarak taklit malzemeleri ile taşıyıcı malzemelerinin ayırt edilmesini sağlayacak yönlendirmeli sınıflandırma çalışmalarında kısmi en küçük kareler ayırıcı analizi (PLS-DA) kullanılmıştır. Ayrı ayrı olmak üzere salep ve TTK maddelerine ait analiz verilerinin 2/3'ü model seti, kalan 1/3'ü ise validasyon seti olacak şekilde rastgele dağıtılmıştır. Tüm PLS tabanlı algoritmalarda olduğu gibi PLS-DA'da da bileşen sayısının seçilmesi için tek örneği dışarıda bırakan çapraz doğrulama yöntemi (LOOCV) model setine uygulanmıştır. En düşük sınıflandırma hatasına tekabül eden veya LOOCV değerinin hızlı düşüşünün sonlandığı nokta bileşen sayısı olarak seçilmiştir. Ardından seçilen bileşen sayısı ile kurulan nihai PLS-DA modeli ile model setinin kendisi ve validasyon seti tahmin ettirilmiştir. Modelde sorun oluşturma ihtimali bulunan maddeler tespit edilmiş bu maddeler uzaklaştırılmış ve tekrar model çalıştırılmıştır. Kimyasal analizlerin PLS-DA sınıflandırmasındaki etkileri karşılaştırılmak istendiğinde öncelikle girdi matrisi (kimyasal analiz sonuçları) ve çıktı matrisi (örneklerin hangi gruba ait olduğu bilgisinin ikili sistemde gösterildiği matris) normalize edilmiş ve sonrasında model çalıştırıldığında analizlere tekabül eden katsayılar doğrudan birbirleriyle büyüklük olarak karşılaştırılabilir hale gelerek sonuçlar incelenmiştir.

3.5. Piyasa İzleme Çalışmaları

Çalışma kapsamında belirlenen yöntem veya yöntemler kullanılarak piyasalarda satışa sunulan ve/veya bileşimlerinde salep olduğu satıcıları tarafından ve/veya etiket bilgilerine göre beyan edilen ticari ürünler incelenmiş ve bu ürünlerin salep içerip içermedikleri hakkında nicel değerlendirmeler yapılmıştır. Bu çerçevede; satışa sunulan içinde salep olduğu ifade edilen farklı markalara ait toplam 40 adet salep içecek tozu ve % 100 salep olduğu bildirilen 20 farklı örnek incelenmiştir. Çizelge 3.15'te piyasa izleme çalışmaları kapsamında tedarik edilen salep içecek tozu örnekleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında tedarik edilen salep içecek tozu örnekleri

No	İçindekiler
TS01	Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcı, doğal salep , aroma vericiler, tuz, tatlandırıcılar
TS02	Şeker, nişasta, süt tozu, salep aroması, vanilya, ksantan sakız, tarçın
TS03	Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, salep aroması, tarçın, salep tozu , vanilin aroması, tuz
TS04	Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcılar, salep aroma verici, salep tozu (% 0,30) , tarçın aroma verici
TS05	Nişasta, yağsız süt tozu, şeker, kahve beyazlatıcısı, süt proteini, emülgatör, aroma vericiler, topaklanma önleyici, tuz, tarçın, tatlandırıcı, salep tozu (% 0,01)
TS06	Şeker, patates nişastası, yağsız süt tozu, salep tozu (% 1) , aroma verici, toz tarçın, topaklanma önleyici, tuz, kıvam artırıcı
TS07	Şeker, yağsız süt tozu, patates nişastası, aroma vericiler, tarçın, topaklanma önleyici, salep tozu (% 0,30)
TS08	Şeker, modifiye patates nişastası, yağsız süt tozu, laktoz, aroma vericiler, kıvam artırıcılar, tarçın, salep tozu (% 0,10) , tatlandırıcı
TS09	Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcı, doğal salep , zencefil, topaklanma önleyici, salep aroması, süt aroması, vanilya aroması, tarçın, tuz,
TS10	Şeker, mısır nişastası, süt tozu, salep , tarçın, trisodyum sitrat, vanilin
TS11	Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, aroma vericiler, glikoz şurubu, emülgatör, sodyum kazeinat, tarçın, salep (% 0,10) , renklendirici
TS12	Şeker, süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, aroma vericiler, topaklanma önleyiciler
TS13	Şeker, mısır nişastası, süt tozu, kıvam artırıcı, tarçın, aroma vericiler, tatlandırıcı karışım,
TS14	Şeker, süt tozu, , topaklanma önleyiciler, kıvam artırıcı, vanilin, toz tarçın, aroma vericiler, renklendiriciler
TS15	Şeker, süt tozu, kıvam artırıcı, emülgatör, aromalar, topaklanma önleyici, tarçın
TS16	Şeker, patates nişastası, yağsız süt tozu, modifiye tapyoka nişastası, maltodekstrin, salep tozu (% 0,30) , kıvam artırıcı, tuz, aroma verici, toz tarçın, topaklanma önleyici,
TS17	Şeker, süt tozu, doğal salep (% 6,50) , dekstroz, peynir altı suyu, topaklanma önleyici, stabilizör, aroma vericiler

Çizelge 3.15'in devamı

No	İçindekiler
TS18	Şeker, nişasta, yağsız süt tozu, süt aroması, toz tarçın, salep aroması, topaklanma önleyici
TS19	Bileşim beyan edilmemiş
TS20	Şeker, mısır nişastası, süt tozu, doğal salep , kıvam artırıcı, vanilin, salep aroma, vanilin aroması
TS21	Şeker, modifiye mısır nişastası, yağsız süt tozu, salep tozu (% 0,40) , inceltici, aroma verici, topaklanma önleyici
TS22	Şeker, süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, toz tarçın, aroma vericiler, topaklanma önleyici
TS23	Şeker, yağsız süt tozu, guar sakız, mısır nişastası, salep aroması, tarçın aroması, silikon 225
TS24	Bileşim beyan edilmemiş
TS25	Bileşim beyan edilmemiş
TS26	Doğal dağ salebi (% 6) , şeker, topaklanma önleyici, mısır nişastası, kıvam artırıcı, guar
TS27	Şeker, nişasta, yağsız süt tozu, süt aroması, guar sakız, tarçın, vanilin, salep aroması, topaklanma önleyici
TS28	Şeker, kahve beyazlatıcı, kazeinat, emülgatör, topaklanma önleyici, renklendirici, yağsız süt tozu, modifiye nişasta, kıvam artırıcı, tarçın, aroma, salep (% 0,40) , vanilin
TS29	Şeker, mısır nişastası, süt tozu, kıvam artırıcı, damla sakızı, maltodekstrin, tarçın, salep , aroma vericiler
TS30	Bileşim beyan edilmemiş
TS31	Şeker, süt tozu, mısır nişastası, doğal salep , kahve beyazlatıcısı, emülgatör, renklendirici, vanilya, karbonat, admül, xantan sakız, guar sakız, aroma, tarçın, trikalsiyum fosfat
TS32	Bileşim beyan edilmemiş
TS33	Öğütülmüş saf salep
TS34	Şeker, modifiye mısır nişastası, yağsız süt tozu, laktoz, kıvam artırıcı, salep tozu (% 2) , aroma verici
TS35	Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, maltodekstrin, peyniraltı suyu tozu, aroma vericiler, kıvam vericiler, sodyum kazeinat, tarçın, renklendiriciler
TS36	Şeker, süt tozu, mısır nişastası, salep (% 1) , kıvam artırıcı, aroma vericiler
TS37	Şeker, yağsız süt tozu, modifiye mısır nişastası, salep (% 1) , kıvam artırıcı, tarçın, aroma verici
TS38	Saf salep
TS39	% 100 doğal salep
TS40	Şeker, yağsız süt tozu, buğday nişastası, kıvam artırıcı, salep aroması, tuz, salep (% 0,30) , tarçın aroması, vanilya, tarçın

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yöntem Doğrulama Çalışmaları

Yönem doğrulama çalışmaları kapsamında elementel, karbonhidrat, organik asit ve amino asit bileşenlerinin analizleri için yöntemlerin doğrusal aralıkları, kalibrasyon denklemleri, kalibrasyon katsayıları, tespit ve tayin sınırları, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Anabileşenler analizleri, enzimatik analizler, izotop oranları analizleri ve kalorimetrik ölçümler için tekrarlanabilirlik değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirilerek yöntemlerin uygunluğu tespit edilmiştir.

4.1.1. Anabileşenlere ait yöntem doğrulama çalışmaları

Anabileşenler analizleri kapsamında temsili salep örneğinin rutubet miktarı, kül miktarı, % 10 HCl'de çözünmeyen kül miktarı ve protein düzeylerinin belirlenmesinde kullanılacak yöntem doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Salep örneğine ait anabileşenler analizlerinin tekrarlanabilirlik sonuçları (ortalama miktarı (%), standart sapması ve bağıl standart sapması (% RSD)) çizelge 4.1'de sunulmaktadır. İndirgen şeker (glukoz ve fruktoz) düzeyinin belirlenmesinde kullanılacak yöntem doğrulama çalışma sonuçları bölüm 4.1.3.4'te çizelge 4.6'da sunulmaktadır.

Çizelge 4.1. Anabileşen analizlerine ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Analiz No	Rutubet	Kül	% 10 HCl'de Ç. kül	Protein
1	6,68	1,54	0,49	4,45
2	7,51	1,55	0,38	4,64
3	7,36	1,55	0,48	4,81
4	7,43	1,57	0,38	4,63
5	8,02	1,56	0,44	4,45
6	6,83	1,57	0,33	4,45
Ortalama	7,31	1,56	0,42	4,57
Standart sapma	0,45	0,01	0,06	0,14
% RSD	6,09	0,71	13,61	2,95

Çizelge 4.1'den elde edilen bilgiler doğrultusunda tekrarlanabilirlik değerleri rutubet miktarı için % 6,09; kül miktarı için % 0,71; % 10 HCl'de çözünmeyen kül miktarı için % 13,61; protein miktarı için % 2,95 olduğu hesaplanmıştır.

4.1.2. Enzimatik analizlere ait yöntem doğrulama çalışmaları

Enzimatik analizler kapsamında glukomannan ve toplam nişasta düzeylerinin belirlenmesinde kullanılacak yöntem doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan enzimatik analiz çalışmaları sonucunda salep örneğine ait toplam nişasta ve glukomannan miktarlarının ortalama miktarı, standart sapması ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri çizelge 4.2'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.2. Enzimatik analizlere ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Analiz No	Toplam Nişasta miktarı (g/100g)	Glukomannan miktarı (g/100g)
1	60,29	0,97
2	58,64	0,90
3	55,90	0,93
4	58,59	0,86
5	53,59	0,87
6	57,60	0,90
Ortalama	57,44	0,91
Standart sapma	2,16	0,04
% RSD	3,77	4,46

Çizelge 4.2’den elde edilen bilgiler doğrultusunda toplam nişasta miktarına ait tekrarlanabilirlik değeri % 3,77 ve glukomannan miktarına ait tekrarlanabilirlik değeri % 4,46 olarak bulunmuştur.

4.1.3. Aletsel analizlere ait yöntem doğrulama çalışmaları

Aletsel analiz yöntem doğrulama çalışmaları kapsamında elementel, karbonhidrat, kalorimetrik ölçümler, organik asit ve amino asit analizlerinin yöntem doğrulama çalışmaları yapılmıştır.

4.1.3.1. Elementel analizlerin yöntem doğrulama çalışmaları

Bu kapsamda seçilmiş olan salep örneğine ait elementel analizlerin yöntem uygunluk çalışmaları, materyal ve metot bölümünde yer alan, çizelge 3.6’da belirtilen koşullar altında ICP-MS cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda çizelge 4.3’te sunulan yöntem doğrulama sonuçlarına (doğrusal aralık, kalibrasyon denklemi, R^2 , tespit sınırı, tayin sınırı, bağıl standart sapma (% RSD), geri kazanım) ulaşılmıştır. Geri kazanım çalışmaları sertifikalı referans malzeme kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İlgili çizelgeye göre, salep örneğinde araştırılan 21 element için $R^2 > 0,99$ olarak tespit edilmiş ve belirtilen konsantrasyon aralıklarında metodun doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. Hazırlanmış olan 20 µg/kg konsantrasyondaki salep örneğine ait geri kazanım çalışması değerinin % 96,74 ile % 122,36 aralığında olduğu tespit edilmiş, tekrarlanabilirlik değerleri % 1,74 ile % 12,87 arasında hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların çizelge 2.11’de ve çizelge 2.12’de belirtilen limit değerleri arasında yer aldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Elementel analizlere ait yöntem doğrulama sonuçları

Parametre	Doğrusal Aralık (µg/l)	Kalibrasyon Denklemi	R ²	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)	% RSD	Geri kazanım (%)
Fe	0,5-200	y=7285,2x+4524	0,9968	0,42	1,39	2,43	103,01±1,63
Zn	2-200	y=1340,1x-1473,8	0,9987	0,77	2,59	12,87	92,65±1,52
Mn	2-50	y=18733x-17295	0,9921	1,52	5,06	3,73	99,05±6,35
Cu	2-50	y=6920,6x-1509,3	0,9983	0,14	0,47	2,52	101,79±3,04
Sr	0,5-50	y=27059x+8254,2	0,9974	1,24	4,09	3,44	110,55±2,63
Cr	2-50	y=5799,3x+16481	0,9947	1,32	3,96	4,42	95,52±3,86
Ni	2-100	y=3107,8x-2498,8	0,9987	1,11	3,70	3,62	101,45±3,78
Ti	2-100	y=950,93x+1645,7	0,9993	0,82	2,73	3,34	113,99±2,95
Rb	2-100	y=16844x+11729	0,9999	1,73	5,77	8,84	96,74±3,52
Ba	0,5-50	y=27564x+22783	0,9993	0,44	1,47	2,45	108,90±1,12
Mo	0,5-100	y=6369,2x+7349,5	0,9987	0,75	2,50	2,54	118,75±1,17
V	2-100	y=13258x+29800	0,9987	0,23	0,77	1,94	114,58±1,29
Co	0,5-100	y=14908x+21485	0,9984	0,25	0,83	1,74	115,38±1,17
Li	2-50	y=1473,6x+784,09	0,9996	0,01	0,03	8,42	*
Ga	2-50	y=10164x+6411,1	0,9996	0,02	0,07	10,64	*
Se	0,5-100	y=102,67x+138,02	0,9989	0,51	1,70	2,44	122,36±2,05
Cs	2-50	y=32901x+18497	0,9998	0,01	0,03	10,30	*
Sb	2-50	y=3578,7x-3986,5	0,9991	0,02	0,06	5,62	*
Be	2-200	y=279,11x-126,07	0,9993	0,07	0,24	3,47	*
Tl	2-200	y=20014x+4465,7	0,9992	0,10	0,36	5,79	*
Bi	2-50	y=26142x+5537,6	0,9999	0,02	0,06	6,82	*

*: Listede boş bırakılan hücreler sertifikalı referans materyalde bulunmayan elementlere aittir.

4.1.3.2. İzotop oranları analizleri yöntem doğrulama çalışmaları

Salep ve TTK maddelerinin IR-MS cihazı kullanılarak izotopik kompozisyonunun belirlenmesinde yöntemin uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla öncelikle IR-MS cihazında bölüm 3.2.3.2’de belirtilen standart maddeler kullanılarak karbondioksit, azot, hidrojen ve oksijen gazlarının izotopik değerleri tanımlanmış ve ardından örneklerin izotopik kompozisyonları belirlenmiştir. Kalibre edilen sistem kullanılarak salep örneğinin tekrarlanabilirlik analizleri gerçekleştirilmiş ve çizelge 4.4’te gösterilen ortalama değerleri, standart sapması ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri tespit edilmiştir.

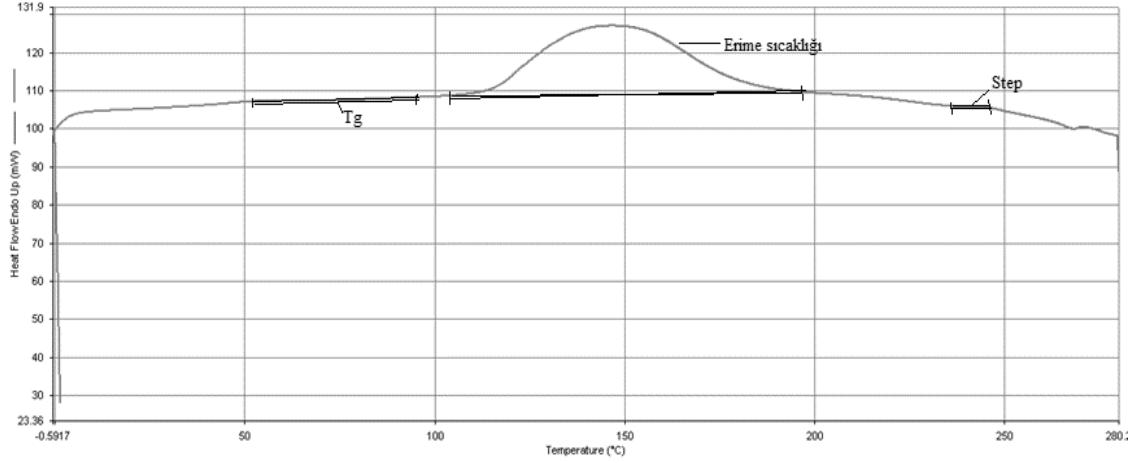
Çizelge 4.4. İzotop oranları analizlerine ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Analiz No	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	$^2\text{H}/^1\text{H}$	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
1	-27,33	9,16	-103,87	30,93
2	-27,18	7,12	-107,24	31,77
3	-27,24	5,38	-105,21	32,22
4	-27,62	9,11	-111,01	32,57
5	-27,49	9,37	-107,07	32,06
6	-27,28	10,17	-105,00	34,47
7	-27,37	8,42	-101,87	33,28
8	-27,41	7,29	-102,22	32,30
9	-27,34	9,04	-108,55	33,06
10	-27,41	10,12	-108,72	33,61
Ortalama	-27,37	8,52	-106,08	32,63
Standart sapma	0,13	1,51	2,97	1,01
% RSD	-0,46	17,70	-2,80	3,09

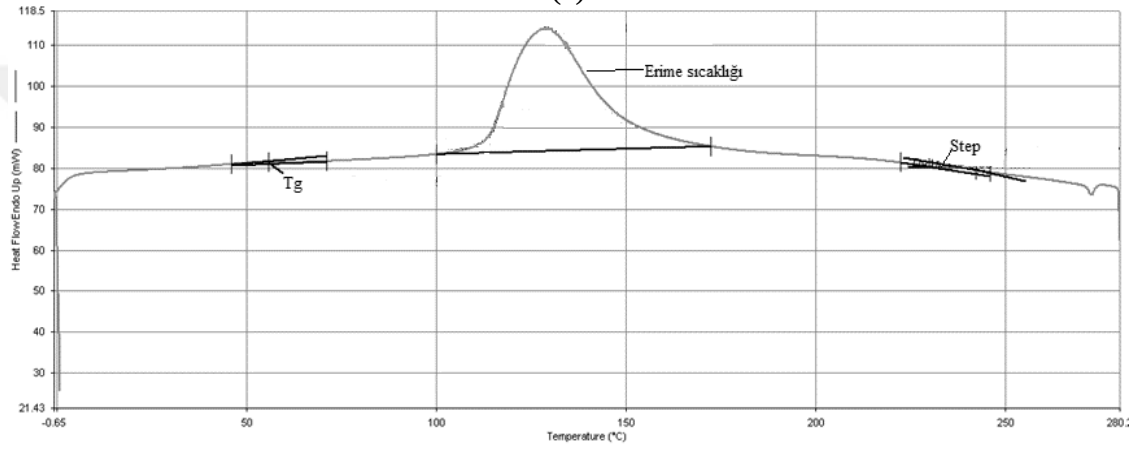
Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, tekrarlanabilirlik değerleri $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ için % -0,46, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ için % 17,70, $^2\text{H}/^1\text{H}$ için % -2,80, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ için % 3,09 olarak bulunmuştur. Bu veriler, örneklerin izotop oranlarını belirlemek için kullanılacak yöntemin doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar üretebildiğine işaret etmektedir.

4.1.3.3. Kalorimetrik analizler yöntem doğrulama çalışmaları

Örneklerin kalorimetrik ölçümleri Perkin Elmer marka DSC 6000 model diferansiyel tarama kalorimetresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DSC cihazının kalibrasyonu standart indiyum kullanılarak yapılmıştır. Literatürdeki verilerden yararlanarak çalışmamızın bu aşamasında -80 °C ile +300 °C tarama sıcaklık aralığında 5 °C/dk. ve 10 °C/dk. akış hızında çalışma gerçekleştirilmiş ve akış hızının pikler üzerine olan etkileri incelenmiştir (Şekil 4.1).



(a)



(b)

Şekil 4.1. -80 °C ile +300 °C tarama sıcaklık aralığına ait DSC termogramları (a) 5 °C/dk., (b) 10 °C/dk.

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere 5 °C/dk. akış hızı uygulanan pikte bir yayvanlaşma olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla doğru camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve erime sıcaklığı aralığının seçilmesinde zorluklar veya yanlışlıklar yaşanabileceği öngörülerek çalışmalarda daha uygun olacak akış hızı 10 °C/dk. olarak seçilmiştir. Literatürde Einhorn-Stoll’un (2007) yapmış olduğu çalışmasında da pektinin tanımlanmasında en uygun pik ayrımını veren akış hızının 10 °C/dk. olduğu ifade edilmiştir (Einhorn-Stoll vd. 2007). Bu çalışma seçimin doğruluğunu destekler niteliktedir.

Son durumda belirtilen koşullar altında (0’dan 300 °C’ye $\beta=10$ °C/dk. ısıtma oranında ve 25 ml/dk. N_2 koşullarında) gerçekleşen salep örneğine ait kalorimetrik analizlerden elde edilen tekrarlanabilirlik değerlerinin (ortalama miktarı, standart sapması ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri) sonuçları çizelge 4.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Kalorimetrik ölçümlere ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Analiz No	Erime Sıcaklığı (°C)	Erime Isısı (J/g)	Tg/Step (°C/°C)
1	165,22	222,26	138,68
2	162,96	211,56	133,70
3	167,11	223,26	143,24
4	166,75	211,60	134,03
5	168,77	218,28	145,33
6	169,18	209,94	137,33
Ortalama	166,67	216,15	138,72
Standart sapma	2,31	5,88	4,76
% RSD	1,39	2,72	3,43

Elde edilen veriler doğrultusunda erime sıcaklığı (°C), erime ısısı (J/g), Tg/Step'ne ait tekrarlanabilirlik değerleri % 1,39, % 2,72 ve % 3,43 olarak bulunmuştur.

4.1.3.4. Karbonhidrat analizleri yöntem doğrulama çalışmaları

Bu kapsamda seçilmiş olan salep örneğine ait karbonhidrat değerlerinin yöntem doğrulama verileri (doğrusal aralık, kalibrasyon denklemi, R^2 , tespit sınırı, tayin sınırı, bağıl standart sapma (% RSD), geri kazanım) çizelge 4.6'da sunulmaktadır.

Çizelge 4.6. Karbonhidrat bileşenleri analizlerine ait yöntem doğrulama sonuçları

Parametre	Doğrusal Aralık (mg/l)	Kalibrasyon Denklemi	R^2	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	% RSD	Geri Kazanım (%)
Sakkaroz	25-1000	y=3209,1x	0,99	90,62	302,15	2,39	99,52
Glikoz	25-1000	y=3558x	0,99	84,01	279,88	3,04	99,55
Fruktoz	25-1000	y=3193,2x	0,99	60,85	202,62	2,35	98,53
Maltoz	25-1000	y=3312x	0,99	58,93	196,33	2,69	98,61
Mannoz	25-1000	y=2835,4x	0,99	94,26	313,91	3,20	97,44
Galaktoz	25-1000	y=3957,1x	0,99	91,42	304,74	2,65	98,12
Arabinoz	25-1000	y=3524x	0,99	66,14	220,22	3,36	98,15

Çizelge 4.6'ya göre, salep örneğinin karbonhidrat analizi için incelenen 7 monosakkarit için $R^2 > 0,99$ olarak tespit edilmiş ve belirtilen konsantrasyon aralıklarında metodun doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. 500 mg/l konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışması % 97,44 ile % 99,55 aralığında tespit edilmiştir. Tekrarlanabilirlik değerleri % 2,35 ile % 3,36 arasında hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların Çizelge 2.11 ve çizelge 2.12'de belirtilen limit değerleri arasında yer aldığı belirlenmiştir. Tespit edilen sonuçlar yöntemin kabul edilebilir düzeylerde olduğunu göstermektedir.

4.1.3.5. Organik asit analizlerinin yöntem doğrulama çalışmaları

Seçilmiş olan temsili salep örneğindeki organik asit (tartarik asit, sitrik asit, fumarik asit, malik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve laktik asit) yöntem doğrulama çalışmalarına ait sonuçlar (doğrusal aralık, kalibrasyon denklemi, R^2 , tespit sınırı, tayin sınırı, bağıl standart sapma (% RSD), geri kazanım) çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Organik asit bileşenleri analizlerine ait yöntem doğrulama sonuçları

Parametre	Doğrusal Aralık (mg/l)	Kalibrasyon Denklemi	R^2	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	% RSD	Geri Kazanım (%)
Tartarik A.	25–1000	$y=0,0013x+1,30$	0,99	9,02	29,97	6,51	88,62
Sitrik A.	25–1000	$y=0,0041x-1,85$	0,99	8,13	26,97	8,23	92,40
Fumarik A.	25–1000	$y=0,0027x-1,74$	0,99	10,24	33,97	10,25	81,36
Malik A.	25–1000	$y=0,0016x+0,79$	0,99	8,50	28,31	9,96	85,48
Propiyonik A.	25–1000	$y=0,0034x+0,88$	0,99	10,42	34,63	9,24	77,92
Bütirik A.	25–1000	$y=0,0044x+1,63$	0,99	9,84	32,63	8,75	82,20
Laktik A.	25–1000	$y=0,0022x-1,44$	0,99	11,81	39,29	10,55	79,68

Salepteki organik asit bileşenlerine ait yöntem doğrulama çalışmasına göre, incelenen 7 organik asit bileşeni için $R^2 > 0,99$ olarak tespit edilmiş ve belirtilen konsantrasyon aralıklarında metodun doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. Hazırlanmış olan 0,1 ve 1 mg/l konsantrasyondaki örnekler için geri kazanım çalışmasında % 77,92 ile % 92,40 aralığında sonuçlar tespit edilmiştir. Tekrarlanabilirlik değerleri % 6,51 ile % 10,55 arasında hesaplanmıştır. Elde edilen geri kazanım ve tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla çizelge 2.11’de belirtilen limit değerleri ve çizelge 2.12’de belirtilen limit değerleri arasında yer aldığı belirlenmiştir. Salep örneği için bütün organik asit bileşenlerinin doğrusal aralığının 25-1000 µg/l olduğu tespit edilmiştir.

4.1.3.6. Amino asit analizlerinin yöntem doğrulama çalışmaları

Örneklerde izlenen amino asit bileşenlerine ait yöntem doğrulama çalışmalarından (doğrusal aralık, kalibrasyon denklemi, R^2 , tespit sınırı, tayin sınırı, bağıl standart sapma (% RSD), geri kazanım) elde edilen sonuçlar çizelge 4.8’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.8’deki veriler incelendiğinde tüm amino asit bileşenleri için $R^2 > 0,99$ olarak tespit edilmiş ve belirtilen konsantrasyon aralıklarında metodun doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. Salep örneği için bütün amino asit bileşenlerinin doğrusal aralığı 25-1000 µg/l olarak görülmüştür. Her amino asit örneği için farklı konsantrasyonlarda (en düşük 5,25 mg/kg serin, en yüksek 12,02 mg/kg sistein) hazırlanan örneklerde yapılan geri kazanım çalışmasında % 87,24 ile % 96,33 aralığında sonuçlar tespit edilmiştir. Tekrarlanabilirlik değerleri % 2,33 ile % 4,10 arasında hesaplanmıştır. Elde edilen geri kazanım ve tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla çizelge 2.11’de belirtilen limit değerleri ve çizelge 2.12’de belirtilen limit değerleri arasında yer aldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Amino asit bileşenleri analizlerine ait yöntem doğrulama sonuçları

Parametre	Doğrusal Aralık (mg/l)	Kalibrasyon Denklemi	R ²	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	% RSD	Geri Kazanım (%)
Arjinin	0,87-10,89	y=145089x+107014	0,99	5,02	16,70	2,39	95,32
Aspartik asit	0,67-8,32	y=206889x-8097,11	0,99	4,41	14,62	3,04	96,33
Sistein	1,20-15,02	y=54947,9x+5658,85	0,99	7,62	25,53	2,35	94,46
Glutamik asit	0,74-9,19	y=303008x+53121,60	0,99	5,93	19,76	2,69	94,78
Histidin	0,78-9,67	y=0,06x+2,78	0,99	5,35	17,55	3,20	87,24
İzolösin	0,66-8,19	y=0,06x+4,65	0,99	5,22	17,42	2,65	94,72
Lösin	0,66-8,19	y=0,06x+4,69	0,99	4,41	14,61	3,36	94,33
Lizin	0,73-9,14	y=902508x	0,99	5,12	17,04	3,27	93,82
Metiyonin	0,75-9,32	y=0,06x+1,31	0,99	6,05	19,95	3,82	91,73
Fenilalanin	0,83-10,32	y=0,06x+5,64	0,99	5,82	19,52	2,33	95,02
Prolin	0,57-7,20	y=0,06x+3,47	0,99	5,61	18,65	3,54	94,05
Serin	0,52-6,57	y=25456,20x	0,99	5,82	19,22	4,10	93,24
Treonin	0,59-7,45	y=258625x+50477,80	0,99	5,63	18,73	3,64	95,62
Tirozin	0,91-11,32	y=977602x+30008,40	0,99	7,45	24,76	2,93	95,03
Valin	0,58-7,31	y=177346x+74307,50	0,99	4,42	14,65	3,00	93,62

4.2. Salep Örneklerine Ait Analiz Sonuçları

Çizelge 3.1’de belirtilen farklı bölgelerden temin edilen salep örneklerine ait analiz sonuçları bu bölümde sunulmaktadır. Veriler istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve testler sonucunda bölgeler arasında belirlenen farklılıklar söz konusu ise ilgili çizelgelerde harflendirme yoluyla ifade edilmiştir. Bulunan en yüksek değer “a” olarak harflendirilerek alfabetik sırayla azalan değerler şeklinde gösterilmiştir.

4.2.1. Anabileşen analizleri

Anabileşen analizleri kapsamında salep örneklerinin rutubet miktarı, kül miktarı, % 10 HCl’de çözünmeyen kül miktarı, indirgen şeker ve protein düzeylerinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Verilere uygulanan normalite testi sonuçları çizelge 4.9’da sunulmaktadır.

Çizelge 4.9. Anabileşen analizlerinin normalite testi sonuçları

Parametre	Sig.
Protein	0,00
Rutubet	0,20
Kül	0,00
% 10 HCl’de Çözünmeyen Kül	0,20
İndirgen Şeker	0,00

Çizelge 4.9’dan elde edilen significant (sig.) sonuçları değerlendirildiğinde, örneklerin rutubet ve % 10 HCl’de çözünmeyen kül değerlerinin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiş ve çoklu grupların karşılaştırılması testi olan varyans analizi (ANOVA) testi uygulanmıştır. ANOVA testinin sonucuna göre, rutubet ve % 10 HCl’de çözünmeyen kül bileşenleri için varyansların homojen olmasından dolayı, bölgeler arası farklılığın belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmasına karar verilmiştir.

İlgili çizelgeye göre, protein, indirgen şeker ve kül değerlerinin ise normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) tespit edilmiş ve bu sebeple parametrik olmayan Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Testin sonucuna, protein ve kül için farklılığın önemli ($p < 0,05$) olmasından dolayı her iki bileşen için oluşan farklılığın hangi bölgeler arasında olduğunun belirlenmesi amacıyla veriler Mann Whitney U testine tabii tutulmuştur. İndirgen şeker verileri bakımından bölgeler arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. Çizelge 4.10’da salep örneklerine ait anabileşen analiz sonuçları (ortalama±standart sapma) ve karşılaştırma testleri kullanılarak önemli farklılık olduğu tespit edilen bölgeler, harflendirme yoluyla sunulmaktadır.

Çizelge 4.10. Salep örneklerine ait anabileşen analizlerinin sonuçları

Bölge	n	Rutubet (%)	Kül (%)	% 10 HCl'de çözünmeyen kül	Protein (%)	İndirgen Şeker (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	7,11 ^b ±1,12	1,92 ^b ±0,35	0,46 ^{a,b} ±0,16	4,44 ^d ±1,00	3904,69 ±6857,59
Güneybatı Anadolu	6	8,06 ^{a,b} ±0,75	3,03 ^a ±0,71	0,62 ^a ±0,22	11,04 ^a ±1,78	5552,42 ±8257,07
Güney Anadolu	8	8,16 ^{a,b} ±1,20	2,03 ^b ±0,26	0,36 ^b ±0,11	6,58 ^{b,c} ±1,83	11839,38 ±21220,37
Güneydoğu Anadolu	9	8,43 ^a ±1,33	2,05 ^b ±0,34	0,30 ^b ±0,25	5,60 ^{c,d} ±1,81	20276,08 ±26755,96
Doğu Anadolu	14	7,69 ^{a,b} ±0,76	2,19 ^b ±0,32	0,35 ^b ±0,15	7,86 ^b ±2,22	2551,61 ±5247,39
Ortalama	61	7,67 ±1,15	2,13 ±0,49	0,41 ±0,19	6,32 ±2,61	6536,57 ±13419,01

Çizelge 4.10'a göre, farklılıkların indirgen şeker hariç tüm parametreler için istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) olduğu tespit edilmiştir. En yüksek ortalama rutubet değerinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne (% 8,43) ve en düşük ortalamanın Kuzey Anadolu Bölgesi'ne (% 7,11) ait olduğu belirlenmiştir. Kül ve protein değerleri bakımından en yüksek ortalamalar Güneybatı Anadolu Bölgesi'nde (sırasıyla % 3,03 ve % 11,04), en düşük ortalamalar ise Kuzey Anadolu Bölgesi'nde (sırasıyla % 1,92 ve % 4,44) tespit edilmiştir. Örneklere ait %10 HCl'de çözünmeyen kül değeri için en yüksek ortalamanın Güneybatı Anadolu Bölgesi'nde (% 0,62), en düşük ortalamanın ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde (% 0,30) olduğu belirlenmiştir. Ortalama indirgen şeker değerinin en yüksek olduğu bölgenin Güneydoğu Anadolu Bölgesi (20276,08 mg/kg), en düşük olduğu bölgenin ise Doğu Anadolu Bölgesi (2551,61 mg/kg) olduğu hesaplanmıştır.

Tez çalışması kapsamında incelenen salep örneklerinin protein miktarının % 1,97-12,71 arasında olduğu; kül içeriğinin % 1,36-4,30 arasında; % 10 HCl'de çözünmeyen kül değeri için % 0,03-0,93 değiştiğini; indirgen şeker düzeyinin 160,50-66297,50 mg/kg arasında ve rutubet miktarının % 5,63-9,38 arasında olduğu tespit edilmiştir. Literatür çalışmalarına göre saleplerdeki protein miktarı % 2,70-11,93; kül içeriği bakımından % 0,95-6,72; rutubet miktarının % 7,5-13,56 arasında tespit edildiği belirlenmiştir (Kaya ve Tekin 2001; Farhoosh ve Riazi 2007; Tekinşen ve Güner 2010; Lalika vd. 2013; Vatansever 2016; Bulut-Solak vd. 2017; GTHB 2018; Şen vd. 2018). Elde edilen anabileşenlere ait değerler ile literatür çalışmalarında bildirilen değerlerin uyum içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatür ve tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre değerlerin geniş bir aralıkta olduğu belirlenmiştir. Sonuçların geniş aralıklarda tespit edilmesinin nedeni olarak literatürde, örneklerinin toplandığı bölgelerin farklı olması, farklı tür orkidelerden toplanan yumruların kullanılmış olması, örneklerin değişik toprak yapısında yetişmesi ve yetiştiği bölgelerde farklı iklim özelliklerinin görülmesinden (bağıl nem, sıcaklık değişimleri vb.) dolayı olabileceği ifade edilmektedir (Tekinşen ve Güner 2010; Bulut-Solak vd. 2017; Şen vd. 2018).

4.2.2. Enzimatik analizler

Enzimatik analizler kapsamında salep örneklerinin glukomannan ve toplam nişasta düzeylerinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.11'de salep örneklerine ait enzimatik analizden elde edilen verilerin normalite testi sonuçları sunulmaktadır.

Çizelge 4.11. Enzimatik analizlerin normalite testi sonuçları

Parametre	Sig.
Glukomannan	0,00
Nişasta	0,20

Çizelge 4.11’den elde edilen “sig.” sonuçları değerlendirildiğinde, örneklerin toplam nişasta değerinin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiş, bu sebeple ANOVA çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu test sonucunda nişasta verilerinin varyansının homojen olmasından dolayı, farklılığın hangi bölgeler arasında olduğunun belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

İlgili çizelgeye göre, glukomannan değerinin ise normal dağılım göstermemesi ($p < 0,05$) nedeniyle Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi seçilmiştir. Test sonucunda örnek toplanan bölgeler bakımından anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Diğer bir değişle tüm bölgelerdeki salep yumrularına ait glukomannan değerleri arasında benzerlikler görülmektedir. Çizelge 4.12’de salep örneklerine ait enzimatik analizlerin sonuçları (ortalama±standart sapma) ve karşılaştırma testleri sonucunda toplam nişasta bakımından farklılıkları tespit edilen bölgeler harflendirme yoluyla sunulmaktadır.

Çizelge 4.12. Salep örneklerine ait glukomannan ve toplam nişasta analizleri sonuçları

Bölge	n	Glukomannan (g/100g)	Toplam nişasta (g/100g)
Kuzey Anadolu	24	18,38±13,08	37,67 ^b ±14,13
Güneybatı Anadolu	6	10,66±2,41	40,38 ^{a,b} ±4,62
Güney Anadolu	8	11,01±5,17	38,67 ^b ±10,09
Güneydoğu Anadolu	9	9,80±3,32	50,13 ^a ±9,42
Doğu Anadolu	14	11,78±10,15	51,01 ^a ±9,19
Ortalama	61	13,88±10,33	42,97±12,55

Çizelge 4.12’de glukomannan değeri bakımından en yüksek ortalamanın Kuzey Anadolu Bölgesi’ne (18,38 g/100g) ve en düşük ortalamanın Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ne (9,80 g/100g) ait olduğu belirlenmiştir. Toplam nişasta değeri bakımından en yüksek ortalamanın Doğu Anadolu Bölgesi’ne (51,01 g/100g) ve en düşük ortalamanın ise Kuzey Anadolu Bölgesi’ne (37,67 g/100g) ait olduğu görülmektedir.

Tez çalışması kapsamında incelenen salep örneklerinin glukomannan miktarının % 2,04-47,03 (Doğu Anadolu Bölgesi-Kuzey Anadolu Bölgesi) arasında olduğu; toplam nişasta içeriğinin % 15,42-74,34 (Kuzey Anadolu Bölgesi-Doğu Anadolu Bölgesi) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Literatür çalışmalarına göre, saleplerdeki glukomannan miktarının en az % 7,84 en çok % 58,22 olarak belirlendiği; toplam nişasta içeriği bakımından ise en az % 2,8 en çok % 43,98 olduğu tespit edilmiştir (Kaya ve Tekin 2001; Farhoosh ve Riazi 2007; Tekinşen ve Güner 2010; Lalika vd. 2013; Vatansever 2016; Bulut-Solak vd. 2017; GTHB 2018; Şen vd. 2018).

İncelenen salep örneklerinde belirlenen glukomannan düzeylerinin literatürde belirtilen çalışmalardan düşük olarak tespit edilmiş olması, kullanılan salep örneklerinin partikül büyüklükleri arasındaki farklılıklarına bağlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan salep örnekleri öğütmenin ardından TTK maddeleri ile olan karıştırma işlemlerinde meydana gelebilecek olası homojenizasyon probleminin önlenmesi amacıyla 150 µm gözenek çapına sahip elekten geçirilerek hazırlanmıştır.

Bununla birlikte, örneklerin elekten geçmeyen üst kısımdaki fraksiyonunda da ($> 150 \mu\text{m}$) glukomannan analizleri gerçekleştirilmiş ve bu fraksiyonda daha yüksek düzeyde bir glukomannan miktarları tespit edilmiştir. Farklı bölgelerden temin edilen salep örneklerinin $150 \mu\text{m}$ 'lik eleğin alt ve üst kısımlarında toplanan fraksiyonları için tespit edilen glukomannan düzeyleri çizelge 4.13'te sunulmaktadır

Çizelge 4.13. Farklı partikül çapına sahip salep örneklerinin glukomannan düzeyleri

Salep örneğine temin edildiği il	Partikül büyüklüğü	
	$X > 150 \mu\text{m}$	$X < 150 \mu\text{m}$
Kastamonu	23,99	14,03
Yozgat	32,96	26,15
Muğla	23,80	6,36
Van	30,07	23,30
Muş	12,12	5,94
Karışım*	31,48	13,05

Proje kapsamında temin edilen tüm salep örneklerinden 5'er gram alınıp homojenize edilerek hazırlanmıştır.

Çizelge 4.13'te sunulan veriler, glukomannanın salebin öğütülmesi daha zor olan dış kısımlarında yoğunlaştığını açığa çıkarmaktadır. Özellikle kalite açısından önemli bir parametre olarak görülen glukomannan sonuçlarının bu kadar geniş aralıkta tespit edilmesi anabileşenler bölümünde belirtilen nedenlerden (toplandığı bölgelerin farklı olması, farklı tür orkide yumrularının analiz edilmesi, hasat edildiği dönem, farklı toprak yapısı ve iklim özelliği göstermesi) kaynaklanabileceği şeklinde ifade edilmiştir (Tekinşen ve Güner 2010; Bulut-Solak vd. 2017; Şen vd. 2018). Ayrıca tez kapsamında yapılan enzimatik analiz çalışmalarda, glukomannan ile nişasta arasında ters bir ilişki olduğu hesaplanmıştır. Enzimatik sonuçlara göre , Kuzey Anadolu Bölgesi saleplerinin en yüksek glukomannan düzeyine sahip olduğu belirlenirken, bölgedeki örneklerin aynı zamanda en düşük nişasta düzeyine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Doğu Anadolu Bölgesi'nde ise tersi bir durum söz konusu olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki bilgilerde bu tespiti doğrular niteliktedir. Tekinşen ve Güner'in (2010) yapmış oldukları çalışmada, aynı zaman diliminde farklı *Orchidaceae* türlerinden elde edilen salepler arasında glukomannan ve nişasta içeriği açısından negatif bir korelasyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Tekinşen ve Güner 2010).

4.2.3. Aletsel analizler

Salep örneklerine ait aletsel analiz sonuçları ile ilgili veriler, varsa literatürde yapılmış çalışmalar ve literatür değerleriyle tez kapsamında elde edilen değerlerin karşılaştırılması ve yorumlanması bu bölümlerde sunulmaktadır.

4.2.3.1. Elementel bileşen analizleri

Salep örneklerine ait elementel analizden elde edilen verilerin, istatistiksel olarak parametrik veya parametrik olmayan testlerden hangisinin uygulanacağını belirlenmesi amacıyla yapılan normalite testi sonuçları çizelge 4.14'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.14. Elementel analizlerin normalite testi sonuçları

Parametre	Sig.
Demir	0,00
Çinko	0,02
Mangan	0,00
Bakır	0,00
Stronsiyum	0,20
Krom	0,00
Nikel	0,00
Titanyum	0,00
Rubidyum	0,00
Baryum	0,00
Molibden	0,00
Vanadyum	0,00
Kobalt	0,00
Lityum	0,00
Galyum	0,00
Selenyum	0,00
Sezyum	0,00

Çizelge 4.14'ten elde edilen “sig.” sonuçları değerlendirildiğinde, örneklerin stronsiyum değerinin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiş ve bu sebeple ANOVA çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Yapılan testler sonucunda varyansların stronsiyum verileri için homojen olmasından dolayı, farklılığın hangi bölgeler arasında olduğunun belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Diğer elementlerin ise normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) belirlenmiş olup, Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Kruskal Wallis testi sonucunda ise örnek toplanan bölgeler bakımından mangan, titanyum, rubidyum, galyum ve sezyum elementlerine ait veriler değerlendirildiğinde farklılık olmadığı; ancak demir, çinko, bakır, krom, nikel, baryum, molibden, vanadiyum, kobalt, lityum ve selenyum elementlerine ait veriler değerlendirildiğinde bölgeler arasında anlamlı farklılık olduğu ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Çizelge 4.15'te salep örneklerine ait elementel analizlerin sonuçları (ortalama±standart sapma) ve karşılaştırma testleri kullanılarak farklılıkları tespit edilen bölgeler harflendirme yoluyla sunulmaktadır.

Çizelge 4.15. Salep örneklerine ait elementel analiz sonuçları

Bölge	n	Demir (mg/kg)	Çinko (mg/kg)	Mangan (mg/kg)	Bakır (mg/kg)	Stronsiyum (mg/kg)	Nikel (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	198,86 ^a ±115,94	12,84 ^c ±4,23	20,81±13,03	6,57 ^{b,c} ±2,92	15,54 ^a ±4,03	8,67 ^a ±7,65
Güneybatı Anadolu	6	97,14 ^b ±20,57	20,91 ^{a,b} ±1,35	14,59±2,65	10,67 ^a ±3,79	16,33 ^a ±3,44	2,18 ^b ±1,10
Güney Anadolu	8	85,13 ^b ±16,83	23,56 ^{a,b,c} ±15,04	14,95±4,22	6,86 ^b ±1,04	9,09 ^b ±1,72	3,08 ^b ±2,15
Güneydoğu Anadolu	5	138,73 ^a ±11,83	7,79 ^d ±1,88	13,03±4,39	5,67 ^{b,c} ±1,87	14,15 ^a ±4,42	3,08 ^{a,b} ±1,39
Doğu Anadolu	14	194,03 ^a ±69,72	16,27 ^c ±2,61	16,37±2,07	5,18 ^c ±1,09	10,44 ^b ±2,44	1,99 ^b ±1,92
Ortalama	57	165,73±94,34	15,60±7,65	17,56±9,14	6,62±2,80	13,34±4,32	5,07±5,96
Bölge	n	Titanyum (mg/kg)	Rubidyum (mg/kg)	Baryum (mg/kg)	Molibden (mg/kg)	Vanadyum (mg/kg)	Kobalt (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	12,03±6,52	2,62±1,47	5,72 ^a ±3,82	0,39 ^a ±0,33	0,47 ^a ±0,28	0,28 ^a ±0,17
Güneybatı Anadolu	6	10,05±2,94	4,08±0,55	4,00 ^{a,b} ±0,54	0,14 ^{b,c} ±0,03	0,25 ^b ±0,04	0,13 ^{a,b} ±0,04
Güney Anadolu	8	7,65±1,52	2,82±0,61	2,72 ^c ±2,45	0,17 ^{b,c} ±0,09	0,15 ^c ±0,04	0,08 ^c ±0,02
Güneydoğu Anadolu	5	6,55 ±0,68	8,60±7,83	2,41 ^c ±0,69	0,35 ^{a,b} ±0,28	0,39 ^a ±0,15	0,14 ^a ±0,04
Doğu Anadolu	14	9,43 ±3,38	18,67±20,14	2,89 ^{b,c} ±1,77	0,37 ^{a,b} ±0,15	0,19 ^{b,c} ±0,12	0,12 ^b ±0,04
Ortalama	57	10,09±4,99	7,27±12,06	4,13±3,09	0,33±0,26	0,33±0,24	0,18±0,14
Bölge	n	Galyum (mg/kg)	Selenyum (mg/kg)	Sezyum (mg/kg)	Lityum (mg/kg)	Krom (mg/kg)	
Kuzey Anadolu	24	0,21±0,17	0,08 ^b ±0,07	0,04±0,02	0,26 ^a ±0,11	11,43 ^a ±10,40	
Güneybatı Anadolu	6	0,13±0,02	0,22 ^a ±0,08	0,04±0,01	0,14 ^b ±0,03	3,42 ^b ±2,12	
Güney Anadolu	8	0,10±0,08	0,04 ^b ±0,02	0,02±0,01	0,10 ^c ±0,01	3,36 ^b ±1,17	
Güneydoğu Anadolu	5	0,11±0,02	0,15 ^a ±0,05	0,32±0,35	0,23 ^{a,b} ±0,18	5,12 ^{a,b} ±3,22	
Doğu Anadolu	14	0,11±0,07	0,06 ^b ±0,04	0,77±0,91	0,37 ^a ±0,20	3,90 ^b ±3,77	
Ortalama	57	0,15±0,13	0,09±0,08	0,24±0,55	0,25±0,16	7,05±7,96	

Çizelge 4.15'e göre, salep örneklerine ait toplam elementel değeri bakımından en yüksek elementel değerin Kuzey Anadolu Bölgesi'ne (296,82 mg/kg) ve en düşük elementel değerinin ise Güney Anadolu Bölgesi'ne (159,90 mg/kg) ait olduğu görülmektedir. Çalışmalarda Türkiye genelindeki salep örneklerinin demir elementi bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Salep örneklerindeki ortalama demir değerinin en yüksek olduğu bölgenin Kuzey Anadolu Bölgesi (198,86 mg/kg) olduğu ve en düşük olduğu bölgenin ise Güney Anadolu Bölgesi (85,13 mg/kg) olduğu belirlenmiştir. Hakim elementin demir olmasının en önemli nedeni olarak, Türkiye'nin maden rezervinin demir açısından zengin olmasından dolayı kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Anonim 2018c).

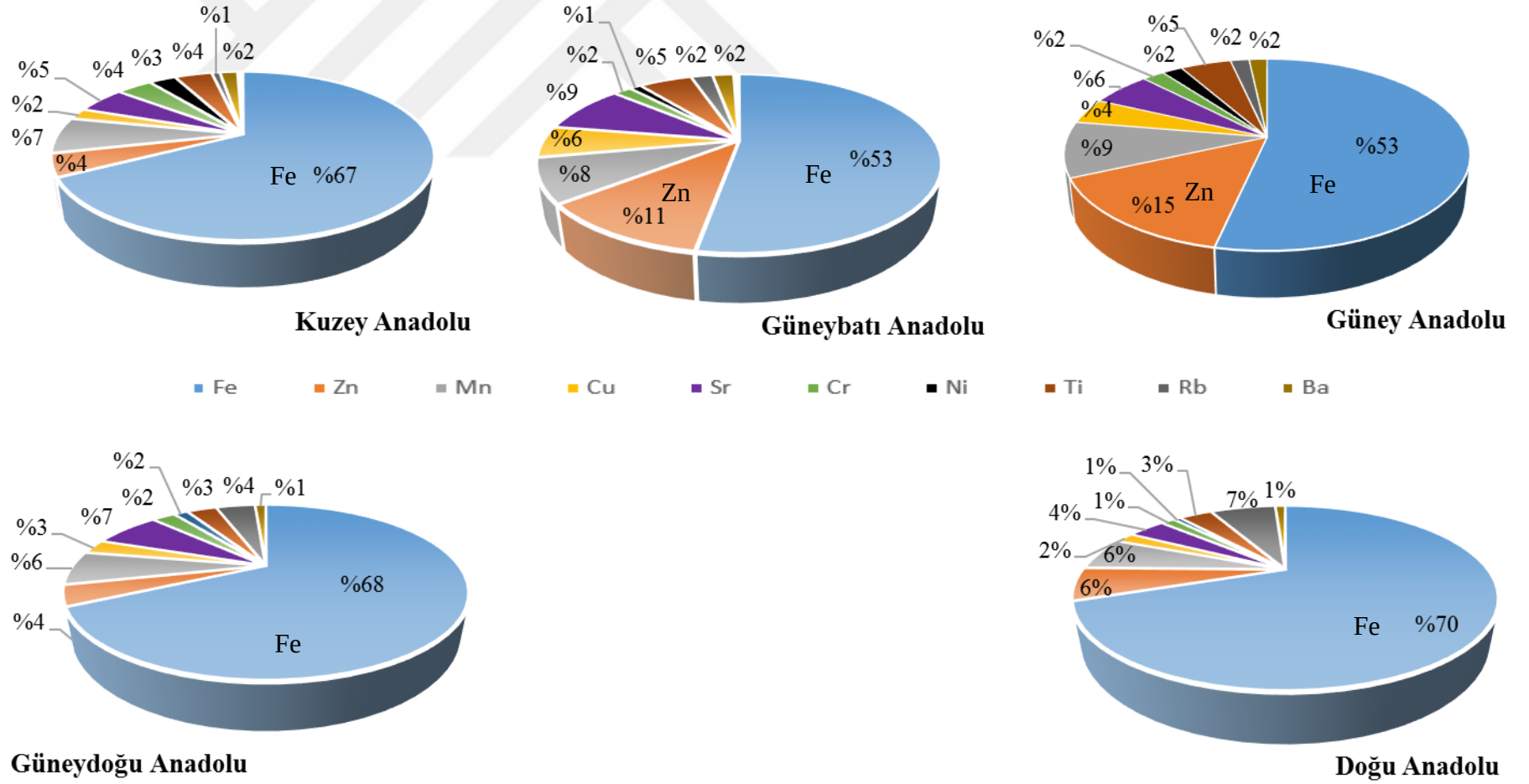
Çalışmalar kapsamında elementel içerik bakımından, salep bileşeminde yer alan en yüksek yüzdeye sahip ikinci ve üçüncü elementler sırasıyla mangan ve çinko olarak bulunmuştur. Mangan bakımından en zengin salep örneği Kuzey Anadolu Bölgesi'nden (52,40 mg/kg), çinko bakımından en zengin salep örneği ise Güney Anadolu Bölgesi'nden (56,82 mg/kg) temin edilen örneklerde olduğu tespit edilmiştir. Lalika ve ark.'nın (2013) yapmış olduğu çalışmada, Tanzanya'nın Kikondo bölgesinden toplanan salep yumru örneklerinde demir, çinko ve mangan miktarlarının sırasıyla 7,72 mg/kg, 3,92 mg/kg ve 1,09 mg/kg olduğu, Ibaga bölgesinden toplanan yumrulara ise bu değerlerin sırasıyla 3,40 mg/kg, 3,28 mg/kg ve 0,81 mg/kg olarak bulunduğu bildirilmektedir (Lalika vd. 2013).

Çalışma kapsamında yer alan 17 elemente ilave olarak elementel düzeyleri araştırılan antimuan, berilyum, talyum ve bizmut elementleri Güney, Güneybatı ve Kuzey Anadolu bölgelerinden toplanan salep örneklerinin hiçbirinde belirlenemezken, Doğu ve Güneydoğu bölgesinden temin edilen saleplerden sadece 2-3 örnekte iz düzeyde antimuan, berilyum ve talyum elementleri tespit edilmiştir. Bundan dolayı, bu elementlerin salebin taklit ve taşımasının belirlenmesinde kullanılabilecek bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.

Bölgeler açısından saleplerin zengin olduğu elementler değerlendirildiğinde; Kuzey Anadolu Bölgesi salebinin demir, mangan, krom, nikel, titanyum, baryum, molibden, vanadyum, kobalt ve galyum elementleri açısından diğer bölgelerden temin edilen salep örneklere göre daha yüksek düzeyde olduğunu belirlenmiştir. Ortalama en yüksek düzeyde bakır, stronsiyum ve selenyum elementleri Güneybatı Anadolu Bölgesi salebinde; çinko elementleri Güney Anadolu Bölgesi salebinde; rubidyum, lityum ve sezyum elementleri Doğu Anadolu Bölgesi'nden temin edilen salep örneklerinde tespit edilmiştir.

Krom ve nikel elementleri Kuzey Anadolu saleplerinde diğer bölgelere göre 2-3 kat daha yüksek oranda belirlenmiştir. Benzer şekilde Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgeleri'nden temin edilen salep örneklerindeki sezyum düzeyleri diğer bölgelerden temin edilen örneklere kıyasla sırasıyla yaklaşık 10 ve 20 kat daha fazla tespit edilmiş olması önemli bir ayrıntı olarak görülmektedir.

Sezyum, yarı ömrü 30,2 yıl olan yapay bir radyonüklittir. Nükleer silah denemeleri ve reaktör kazaları ile atmosfere katyonik formdaki sezyum şeklinde ulaşmakta, yağış ile birlikte hızla toprak ve bitkiler tarafından tutunmaktadır (Kindap ve Chen 2005; Pişkin 2009; Altıkat vd. 2015). Literatürde, 1986 yılındaki Çernobil kazası ile çevreye önemli miktarda sezyum yayıldığı ve bu tarihte Van gölü sedimentlerinden alınan örneklerde sezyum miktarının pik yaptığı belirtilmiştir (Pişkin 2009). Günümüzde halen aktivitesini sürdüren ve Türkiye'ye 16 kilometre uzakta bulunan Metsamor nükleer enerji santrali'nin gerekli güvenlik önemlerinin tam olarak alınmadığı ile ilgili bilgiler yer almaktadır (Kindap ve Chen 2005). Dolayısıyla fark edilen veya edilmeyen sezyum yağışlarının gerçekleşiyor olması Doğu ve Güneydoğu Bölgesi'ndeki toprak yapısında sezyum miktarının yükselmesine ve buradan toplanan salep örneklerinde miktarsal olarak yüksek sezyum görülmesine sebep olabileceği düşünülmektedir. Örneklerde tespit edilen elementlerin salebin yetiştiği toprağın yapısı ile ilişkili olabileceği gibi çevresel faktörlerin de etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır. Şekil 4.2'de tüm bölgelere ait salep örneklerinin elementel bileşenleri gösterilmiştir



% 1'in altındaki elementler (Se, Cs, Ga, Li, Co, V, Mo) şekillerde gösterilmemiştir.

Şekil 4.2. Salep örnekleri elementel bileşenlerinin bölgelere göre değişimi

4.2.3.2. İzotop oranları analizleri

Salep örneklerine ait izotop oranları analizden elde edilen verilerin, istatistiksel olarak parametrik veya parametrik olmayan testlerden hangisinin uygulanacağını belirlenmesi amacıyla yapılan normalite testi sonuçları çizelge 4.16’da sunulmaktadır.

Çizelge 4.16. İzotop oranları analizlerinin normalite testi sonuçları

Parametre	Sig.
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0,04
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,08
$^1\text{H}/^2\text{H}$	0,00
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0,20

Çizelge 4.16’dan elde edilen “sig.” sonuçları değerlendirildiğinde, örneklerle ait oksijen ve karbon izotop değerinin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiş ve bu sebeple ANOVA çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Karbon izotop oranlarına ait verilerin varyansının homojen olmasından dolayı, farklılığın belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmasına, oksijen izotop oranlarına ait verilerin varyansının homojen olmamasından dolayı ($p < 0,05$), farklılığın belirlenmesinde Tamhane T2 çoklu karşılaştırma testi uygulanmasına karar verilmiştir.

İlgili çizelgeye göre, diğer izotop oranlarına ait verilerin ise normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) tespit edilmesi sebebiyle Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Kruskal Wallis testi sonucunda örneklerin toplandığı bölgeler bakımından hidrojen ve azot izotop oranlarına ait veriler değerlendirildiğinde ise farklılığın anlamlı olduğu ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Çizelge 4.17’de salep örneklerine ait izotop oranlarının analiz sonuçları (ortalama±standart sapma) ve karşılaştırma testleri kullanılarak farklılıkları tespit edilen bölgeler harflendirme yoluyla sunulmaktadır.

Çizelge 4.17. Salep örneklerine ait izotop oranlarının analiz sonuçları

Bölge	n	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (‰)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰)	$^1\text{H}/^2\text{H}$ (‰)
Kuzey Anadolu	24	-28,11 ^b ±0,75	1,49 ^b ±1,52	31,20±1,12	-131,25 ^a ±4,60
Güneybatı Anadolu	6	-27,46 ^c ±0,67	0,87 ^b ±1,98	31,99±0,66	-103,74 ^{b,c} ±3,01
Güney Anadolu	8	-28,88 ^a ±0,46	0,88 ^b ±1,91	32,94±1,47	-100,77 ^c ±21,45
Güneydoğu Anadolu	9	-27,41 ^c ±0,56	4,35 ^a ±0,98	33,26±2,47	-122,97 ^{a,b} ±17,44
Doğu Anadolu	14	-27,79 ^{b,c} ±0,81	0,10 ^b ±3,72	32,46±1,46	-130,24 ^a ±11,03
Ortalama	61	-27,97±0,76	1,46±2,56	32,10±1,64	-123,10±16,49

Çizelge 4.17’den elde edilen bilgiler doğrultusunda, izotop oranları arasında yapılan varyans analizi sonucunda; azot, hidrojen ve karbon izotop oranları bakımından bölgeler arasında farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) olduğu, oksijen izotop oranlarının ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği hesaplanmıştır. Buna göre salep örneklerine ait karbon izotop oranlarının ‰-26,61 ile ‰-29,68 arasında; azot izotop oranlarının ‰-9,25 ile ‰6,66 arasında; oksijen izotop oranlarının ‰28,09 ile ‰37,31 arasında ve hidrojen izotop oranları incelendiğinde sonuçların ‰-84,20 ile ‰-144,86 arasında değiştikleri belirlenmiştir.

Karbon izotop oranları açısından en yüksek değerler Kuzey Anadolu Bölgesi’nden temin edilen salep örneklerinde belirlenirken, en yüksek azot ve hidrojen izotop oranlarının ise sırasıyla Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Güney Anadolu Bölgesi’nden elde edilen salep örneklerinde bulunduğu tespit edilmiştir. İlgili çizelgede elde edilen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranlarına bakıldığında *Orchidaceae* bitkisinin C3 bitkisi olduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranının bölgeler arası bir farklılık göstermemesi nedeni ile ülkemiz salep profiline yönelik standart değerleri yansıtmakta olduğu düşünülmektedir. Örneklerdeki karbon izotop oranındaki farklılığın nedeni; karbonun doğal çevrenin bileşeni olması ve izotop dağılımının fotosentez gibi bitki fizyolojisi faktörlerinden etkilenmesine; azot izotop oranları arasındaki farklılık gösterme nedeni ise, bitkinin yetiştiği doğal çevresel faktörlere (gübre kullanımı veya çevresel kirlilikten gelen azot içeriği) ve salebin yetiştiği ortamlardaki mikrofloraların farklı olmasına; hidrojen izotop oranlarının farklılığında su döngüsü, iklimsel koşullar ve yükseltinin farklı olmasına bağlanmıştır (Sun 2008; Yücel vd. 2016; Anonim 2018b).

4.2.3.3. Kalorimetrik analizler

Salep örneklerinin kalorimetrik ölçümlerini belirlemek amacıyla DSC analizi yapılmıştır. Analizde hareketsiz bir ortamda ısıtma işlemiyle meydana gelen termal geçişler incelenmiştir. Salep örneklerine ait kalorimetrik analizden elde edilen verilerin normalite testi sonuçları çizelge 4.18’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.18. Kalorimetrik analizlerin normalite testi sonuçları

Parametre	Sig.
Erime	0,00
Entalpi (ΔH)	0,20
Tg	0,00

Çizelge 4.18’den elde edilen “sig.” sonuçları değerlendirildiğinde, örneklerle ait entalpi değerinin normal dağılım gösterdiği belirlenmiş ve bu sebeple ANOVA çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu testten elde edilen sonuçlar doğrultusunda varyansların homojen olmasından dolayı, farklılığın belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmasına karar verilmiştir.

İlgili çizelgede erime değeri ve Tg değeri ise normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) tespit edilmiş ve bu sebeple Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu test sonucunda örnek toplanan bölgeler bakımından erime değerleri ve Tg/Step değerleri açısından farklılık olmadığı belirlenmiştir. Çizelge 4.19’da salep örneklerine uygulanan kalorimetrik analizler sonucu elde edilen bulgular (ortalama±standart sapma) ve karşılaştırma testi kullanılarak farklılıkları tespit edilen bölgeler harflendirme yoluyla sunulmaktadır

Çizelge 4.19. Salep örneklerine ait kalorimetrik analiz sonuçları

Bölge	n	Erime (°C)	ΔH (j/g)	Tg/Step (°C/°C)
Kuzey Anadolu	24	148,20±16,42	154,15 ^b ±40,63	60,87±16,07
Güneybatı Anadolu	6	136,13±12,72	136,42 ^b ±18,65	55,16±5,01
Güney Anadolu	8	151,76 ±16,29	168,02 ^{a,b} ±45,85	60,97±5,30
Güneydoğu Anadolu	6	155,87±12,35	185,46 ^a ±20,86	61,79±6,25
Doğu Anadolu	14	148,60 ±14,66	151,36 ^b ±31,26	60,00±5,75
Ortalama	58	148,46±15,52	157,09±34,85	60,21±11,07

Bölgelerden toplanan salep örneklerine ait erime sıcaklığı değerlerin 124,77 ile 178,97 arasında, entalpi değerlerinin 109,99 ile 268,57 arasında olduğu ve termogravimetrik değerlerinin ise (Tg/Step) 34,97 ile 125,48 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Örneklerde belirlenen erime sıcaklığı, entalpi ve termogravimetrik değerlerin geniş bir aralıkta seyrettiği ve standart sapmaların fazla olduğu görülmektedir. Bunun sebebi olarak, salebin bileşiminde büyük orana sahip olan ve geniş bir aralıkta (15,42-74,34 g/100g) seyreden nişastanın retrogradasyonu ve jelanizasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.2.3.4. Karbonhidrat bileşenleri analizi

Çizelge 4.20’de salep örneklerine ait karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi çalışmalarından elde edilen verilerin normalite testi sonuçları sunulmaktadır.

Çizelge 4.20. Karbonhidrat bileşenleri analizi normalite testi sonuçları

Parametre	Sig.
Sakkaroz	0,00
Glikoz	0,00
Fruktoz	0,00

Çizelge 4.20’den elde edilen “sig.” sonuçları değerlendirildiğinde, örneklerine ait tüm karbonhidrat değerlerinin normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) tespit edilmiş ve bu sebeple Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Kruskal Wallis testi sonucunda örnek toplanan bölgeler bakımından sakkaroz ve glikoz değerlerine ait veriler değerlendirildiğinde farklılık olmadığı, fruktoz verileri değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık olduğu ($p < 0,05$) belirlenmiştir. Çizelge 4.21’de salep örneklerine uygulanan kalorimetrik analizler sonucu elde edilen bulgular (ortalama±standart sapma) ve karşılaştırma testi kullanılarak farklılıkları tespit edilen bölgeler harflendirme yoluyla sunulmaktadır

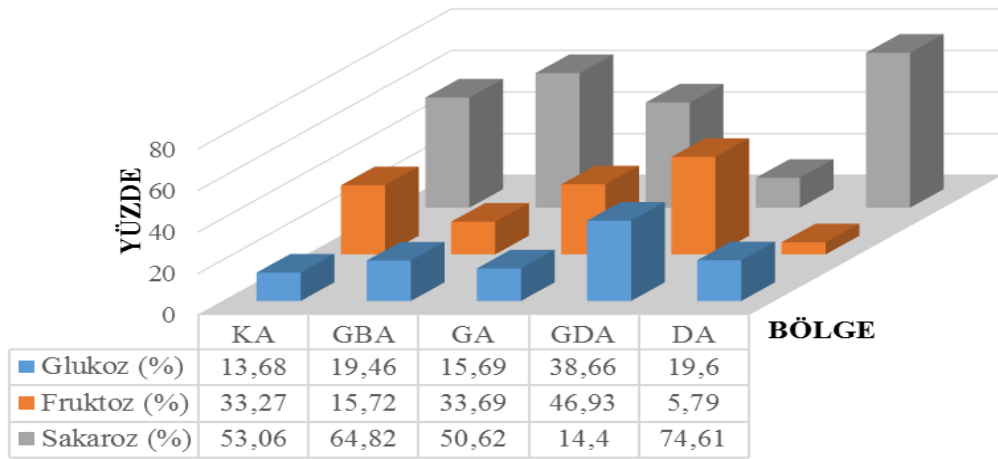
Çizelge 4.21. Salep örneklerine ait karbonhidrat bileşenlerinin analiz sonuçları

Bölge	n	Sakkaroz (mg/kg)	Glikoz (mg/kg)	Fruktoz (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	4413,15±4477,34	1137,73±2957,10	2766,96 ^b ±4191,66
Güneybatı Anadolu	6	10231,42±7754,93	3071,00 ±5930,83	2481,42 ^{a,b,c} ±2645,64
Güney Anadolu	8	12137,5±13585,65	3761,13±7792,92	8078,25 ^{a,b,c} ±15440,13
Güneydoğu Anadolu	5	3875,10±1962,78	10402,00±13422,70	12625,90 ^a ±17951,16
Doğu Anadolu	14	7497,57±9242,97	1969,43±5391,93	582,18 ^c ±448,20
Ortalama	57	6820,10±8089,50	2726,36±6371,21	3810,55±8573,62

Karbonhidrat bileşenlerinin yöntem doğrulama çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen doğrusalılık, tekrarlanabilirlik, tespit ve tayin sınırı çalışmalarında kabul edilebilir sonuçlar elde edilmesine rağmen, çalışmalarda jelleşen salebin LC kolonunda tutunarak karbonhidrat bileşenlerinin birbirinden ayıramamasına sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu kapsamda karbonhidrat bileşenlerinin uygun çözünürlükte ayrımını gerçekleştirebilmek amacıyla en uygun seyreltme oranları belirlenerek çalışmalar tamamlanmıştır.

Salep örneklerinin karbonhidrat bileşenleri analiz sonuçları örneklerdeki sakkaroz, glikoz ve fruktoz miktarlarının geniş bir aralıkta seyrettiğini ortaya koymaktadır. Tespit edilen bu değerlerdeki standart sapma değişiminin yüksek olması salep örneklerinin sıvı ortamda jelleşmesine ve böylelikle analitik çalışmalarda kullanılan ayırma kolonundaki çözünürlük kaybına neden olmasına bağlanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında yer alan karbonhidrat bileşenlerinden maltoz, mannoz, galaktoz, arabinoz salep örneklerinin hiçbirinde tespit edilememiştir.

Çizelge 4.21'e göre salep örneklerine ait sakkaroz bakımından en yüksek ortalamanın Güney Anadolu Bölgesi'ne (12137,5 mg/kg) ve en düşük ortalama ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne (3875,10 mg/kg) ait olduğu görülmektedir. Örneklerdeki en yüksek sakkaroz içeriği 35894,50 mg/kg ile Doğu Anadolu Bölgesi'ne ait örnekte görülürken en düşük sakkaroz içeriği 658,00 mg/kg ile Kuzey Anadolu Bölgesi'ne ait örnekte görülmüştür. En yüksek glikoz ortalamasının Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne (10402,00 mg/kg) ve en düşük ortalama ise Kuzey Anadolu Bölgesi'ne (1137,73 mg/kg) ait olduğu görülmektedir. Örneklerdeki en yüksek glikoz içeriği 27288,00 mg/kg ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne ait örnekte görülürken, en düşük 0,00 mg/kg ile Güneybatı Anadolu Bölgesi'ne ait örnekler hariç diğer bölgelerden temin edilen örneklerde olduğu tespit edilmiştir. Fruktoz açısından en yüksek ortalamanın Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne (12625,90 mg/kg) ve en düşük ortalama ise Doğu Anadolu Bölgesi'ne (582,18 mg/kg) ait olduğu görülmektedir. En yüksek fruktoz içeriği 43609,00 mg/kg ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne ait örnekte görülürken en düşük fruktoz miktarı ise 0,00 mg/kg ile 2. ve 3. bölgelere ait örnekte görülmüştür. Şekil 4.3'te salep örneklerine ait karbonhidrat bileşenleri gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Salep örnekleri karbonhidrat bileşenlerinin bölgelere göre değişimi

Bölgelere ait salep örneklerindeki karbonhidrat içeriği değerlendirildiğinde, Kuzey Anadolu Bölgesi (KA), Güneybatı Anadolu Bölgesi (GBA), Güney Anadolu Bölgesi (GA) ve Doğu Anadolu Bölgelerinde (DA) sakkaroz içeriğinin % 50 ve üzerinde olduğu ve hakim şekerin bu bölgelerde sakkaroz olduğu belirlenmiştir. Güneydoğu Anadolu Bölgesinden (GDA) toplanan salep örneklerinde ise fruktozun (% 47) hakim şeker olduğu tespit edilmiştir.

Lalika ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada Tanzanya'nın iki farklı bölgesinden (Kikondo ve Ibaga) toplanan salep yumrularında yapmış oldukları çalışmada Ibaga bölgesinden toplanan örneklerde karbonhidrat içeriğinin 5,97 g/100g, Kikondo bölgesinden toplanan örneklerde ise 2,06 g/100g olarak bulunduğu bildirilmiştir (Lalika vd. 2013). Başka bir çalışmada ise toplam şeker miktarını 54,4 g/100g olduğu, glikoz miktarını ise 44,8 g/100g olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Vatansever 2016). *Orchis anatolica* yumruları üzerinde yapılmış çalışmada, örneklerin hiç birinde fruktoz tespit edilemediğini, glikoz ve sakkaroz miktarını sırasıyla 0,19 g/100g ve 2,34 g/100g olarak belirlendiğini ifade etmişlerdir (Bulut-Solak vd. 2017). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının sitesinde yer alan Ulusal gıda kompozisyon veri tabanında Maraş Bölgesi'ndeki toz saleplerin sakkaroz içeriğinin 0,35 g/100g, glikoz içeriğinin 0,14 g/100g, fruktoz içeriğinin 0,11 g/100g olduğu yayınlanmıştır (GTHB 2018).

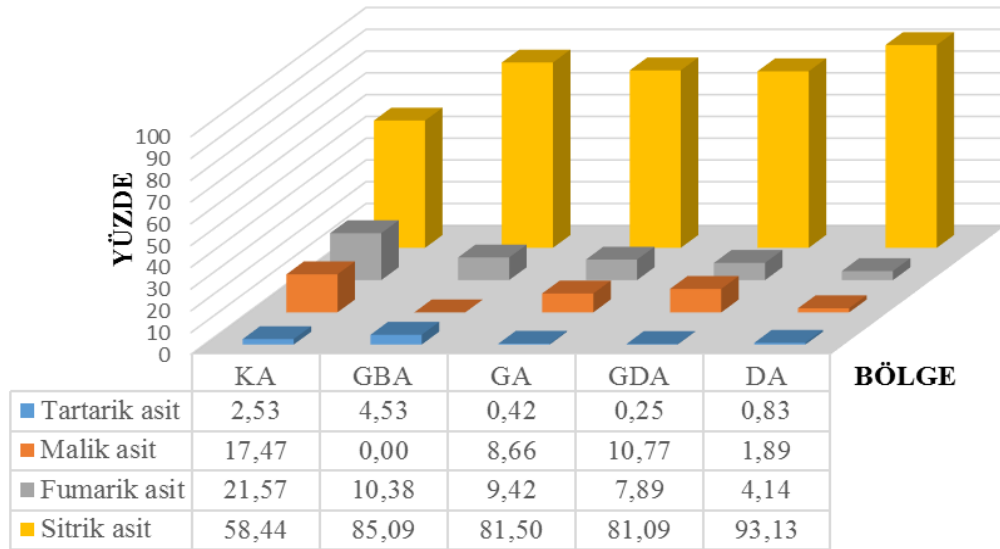
4.2.3.5. Organik asit bileşenleri analizleri

Bölgelerden toplanan salep örneklerinde (59 adet) yapılan organik asit çalışmaları sonucunda tartarik asit bakımından 52 örnek, fumarik asit bakımından 48 örnek, malik asit bakımından 46 örnek ve sitrik asit bakımından 32 örnek <LOD olarak hesaplanmıştır. Çok sayıda örneğin <LOD olması analizde kullanılacak veri sayısının (n) istatistiksel karşılaştırma testi için yetersiz kalmasına ve salep örneklerinin organik asit verileri kullanılarak bölgesel farklılıklarının olup olmadığı test edilememesine neden olmuştur. Çizelge 4.22'de salep örneklerine ait organik asit bileşenlerinin analizden elde edilen veriler sunulmaktadır.

Çizelge 4.22. Salep örneklerine ait organik asit bileşenlerine ait analiz sonuçları

Bölge	n	Tartarik A. (mg/kg)	Malik A. (mg/kg)	Fumarik A. (mg/kg)	Sitrik A. (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	2,26±11,06	15,63±27,81	19,30 ±65,41	52,30±221,50
Güneybatı Anadolu	6	18,92±29,40	<LOD	43,3±106,23	355,59±830,57
Güney Anadolu	8	6,19±17,50	127,56±270,61	138,78±115,56	1200,73±1344,52
Güneydoğu Anadolu	7	15,22±26,05	657,00±1171,94	481,46±1036,35	4947,25±6617,32
Doğu Anadolu	14	3,78±14,14	8,61±21,89	18,81±70,39	423,21±621,82
Ortalama	59	6,38±17,59	103,65±441,43	92,67±372,60	907,63±2699,24

Elde edilen organik asitler verilerine göre; farklı konsantrasyonlarda tartarik asit (<LOD-60,28 mg/kg), malik asit (<LOD-1713,46 mg/kg), fumarik asit (<LOD-592,53 mg/kg) ve sitrik asit (<LOD-17361,35 mg/kg) bileşenleri belirlenmiştir. Farklı bölgelerden temin edilen salep örneklerinin organik asit içeriği açısından değerlendirildiğinde en yüksek ortalama organik asit içeriğinin (6100,93 mg/kg) Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki örneklerde olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında incelenen organik asitlerden bütirik, propiyonik ve laktik asitlerden hiçbiri tespit edilmezken, salep örneklerinin tamamında da belirlenebilen spesifik bir organik asit bulunamamıştır. Şekil 4.4'te salep örneklerine ait organik asit içerikleri gösterilmiştir.

**Şekil 4.4.** Salep örnekleri organik asit bileşenlerinin bölgelere göre değişimi

Salep örneklerinin organik asit içeriği değerlendirildiğinde, bütün bölgelerden toplanan salep örneklerinde, hakim organik asidin sitrik asit olduğunu tespit edilmiştir. Tartarik asit bakımından ise fakir olduğu belirlenmiştir.

Sırasıyla bölgesel bazda örneklerdeki sitrik asit içerikleri, Kuzey Anadolu Bölgesi'nde % 58,44; Güneybatı Anadolu Bölgesi'nde % 85,09; Güney Anadolu Bölgesi'nde % 81,50; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde % 81,09 ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde % 93,13 olduğu belirlenmiştir. İkinci sırada baskın organik asitin fumarik asit olduğu ve salep örneğinde fumarik asit (%) içeriğinin % 21,57 ile % 4,14 arasında değiştiği gözlenmiştir.

4.2.3.6. Amino asit bileşenleri analizleri

Salep örneklerine ait amino asit bileşenlerinin analizden elde edilen verilerin, istatistiksel olarak hangi testin uygulanacağını belirlenmesi amacıyla yapılan normalite testi sonuçları çizelge 4.23'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.23. Amino asit analizlerinin normalite testi sonuçları

Parametre	Sig.
Treonin	0,02
Lizin	0,20
Arjinin	0,04
Histidin	0,04
Aspartikasit	0,00
Glutamikasit	0,03
Serin	0,00
Prolin	0,00
Valin	0,00
Metiyonin	0,00
Tirozin	0,00
Lösin+İzolösin	0,00
Fenilalanin	0,00

Bölgelerden toplanan salep örneklerinde (61 adet) yapılan amino asit çalışmaları sonucunda sistein amino asidi bakımından 57 örneğin <LOD olarak hesaplanmıştır. Çok sayıda örneğin <LOD olması analizde kullanılacak veri sayısının (n) istatistiksel karşılaştırma testi için yetersiz kalmasına neden olmuştur.

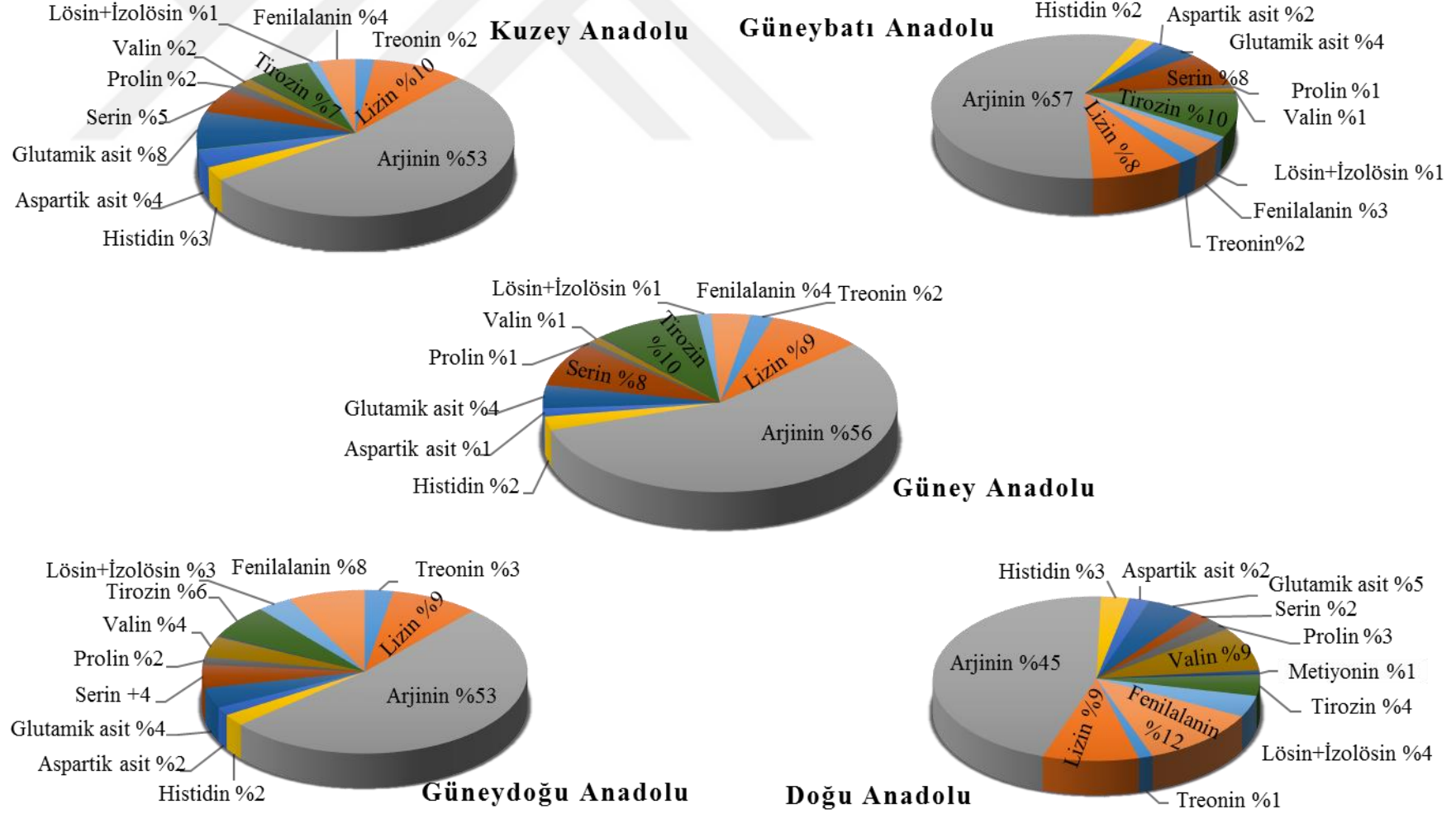
Çizelge 4.23'e göre, lizin amino asidine ait değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiş ve bu sebeple ANOVA çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu amino aside ait verilerin varyansının homojen olmamasından dolayı ($p < 0,05$), oluşan farklılığın belirlenmesinde Tamhane T2 çoklu karşılaştırma testi uygulanmasına karar verilmiştir. Diğer amino asitlerin ise normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) tespit edilmesi sebebiyle Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda Kruskal Wallis testi sonucunda örnek toplanan bölgeler bakımından incelenen amino asitlere ait veriler değerlendirildiğinde ise farklılığın tüm bölgelerde önemli olduğu ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Çizelge 4.24'te salep örneklerine ait amino asit analiz sonuçları (ortalama±standart sapma) ve karşılaştırma testi kullanılarak farklılıkları tespit edilen bölgeler harflendirme yoluyla sunulmaktadır. Şekil 4.5'te bölgesel bazda salep örneklerinin amino asit içerikleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.24. Salep örneklerine ait aminoasit bileşenleri analiz sonuçları

Bölge	n	Treonin (mg/kg)	Lizin (mg/kg)	Arjinin (mg/kg)	Histidin (mg/kg)	Aspartik asit (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	60,00 ^c ±62,00	293,64 ^b ±261,01	1585,44 ^b ±1802,99	80,79 ^c ±74,27	106,22 ^b ±78,87
Güneybatı Anadolu	6	143,06 ^a ±13,17	565,92 ^a ±57,31	3914,79 ^a ±467,18	155,04 ^{a,b} ±11,99	110,65 ^{a,b} ±8,82
Güney Anadolu	8	155,14 ^a ±11,16	641,73 ^a ±51,13	4171,06 ^a ±402,31	184,66 ^a ±2,11	107,86 ^b ±10,83
Güneydoğu Anadolu	9	67,14 ^{b,c} ±94,55	241,96 ^b ±190,33	1421,13 ^b ±1479,49	65,87 ^c ±58,49	45,77 ^c ±50,18
Doğu Anadolu	14	103,59 ^b ±65,53	704,14 ^a ±303,55	3355,15 ^a ±1920,07	209,03 ^{a,b} ±124,00	150,16 ^a ±83,30
Ortalama	61	91,71±70,36	452,66±298,44	2535,57±1903,90	128,95±97,31	108,04±72,39

Bölge	n	Sistein (mg/kg)	Glutamik asit (mg/kg)	Serin (mg/kg)	Prolin (mg/kg)	Valin (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	3,59±9,27	232,80 ^{a,b} ±119,59	148,49 ^c ±252,97	51,00 ^b ±61,00	46,60 ^c ±30,34
Güneybatı Anadolu	6	<LOD	284,39 ^{a,b} ±21,82	559,48 ^a ±66,30	56,88 ^{a,b} ±6,56	70,48 ^{b,c} ±9,03
Güney Anadolu	8	<LOD	312,59 ^{a,b} ±36,15	592,70 ^a ±56,72	58,89 ^{a,b} ±5,90	78,40 ^b ±8,04
Güneydoğu Anadolu	9	<LOD	106,24 ^b ±107,54	110,50 ^c ±217,28	41,48 ^b ±40,15	112,51 ^{b,c} ±146,49
Doğu Anadolu	14	<LOD	360,82 ^a ±162,96	155,20 ^b ±86,77	186,28 ^a ±189,76	642,33 ^a ±466,61
Ortalama	61	1,41±6,01	259,05±142,53	243,11±259,86	82,26±112,94	199,57±332,06

Bölge	n	Metiyonin (mg/kg)	Tirozin (mg/kg)	Lösin+İzolösin (mg/kg)	Fenilalanin (mg/kg)
Kuzey Anadolu	24	5,64 ^d ±4,88	202,69 ^{b,c} ±284,10	37,02 ^c ±35,28	118,34 ^c ±106,58
Güneybatı Anadolu	6	11,13 ^c ±1,45	649,90 ^a ±78,31	89,18 ^{a,b} ±10,73	213,43 ^{b,c} ±108,97
Güney Anadolu	8	13,48 ^b ±1,82	712,23 ^a ±70,13	96,50 ^{a,b} ±9,16	264,56 ^b ±22,54
Güneydoğu Anadolu	9	7,81 ^{b,c,d} ±9,36	152,58 ^{b,c} ±256,60	85,96 ^c ±124,87	211,66 ^{b,c} ±232,19
Doğu Anadolu	14	63,51 ^a ±46,01	312,17 ^b ±301,46	314,12 ^a ±277,16	879,14 ^a ±669,66
Ortalama	61	20,81±32,24	331,24±318,57	120,77±176,38	335,25±449,49



Şekil 4.5. Salep örnekleri amino asit bileşenlerinin bölgelere göre değişimi

Çizelge 4.24'teki aminoasit analiz verilerine göre; salepteki sistein aminoasidinin tüm örneklerde (Kuzey Anadolu Bölgesi'nden toplanan 3 örnek hariç) <LOD olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin tamamında farklı düzeylerde treonin, lizin, arjinin, histidin, aspartik asit, glutamik asit, serin, prolin, valin, metiyonin, tirozin, lösin+izolösin ve fenilalanin tespit edilmiştir. Belirlenen bu aminoasitlerin salep örneklerinin bu aminoasitleri içermeyen TTK maddeleri ile ayırımında önemli belirleyici analitler olabileceği sonucuna varılmıştır.

Ülkemizin farklı bölgelerinde toplanan salep örneklerinde istatistiksel olarak en yüksek oranda treonin, lizin, arjinin, serin ve tirozin Güney ve Güneybatı Anadolu Bölgeleri'nde, histidin Güney Anadolu Bölgesi'nde, aspartik asit, glutamik asit, prolin, valin, metiyonin, lösin+izolösin ve fenilalanin Doğu Anadolu Bölgesi'nde tespit edilmiştir. Şekil 4.5'ten elde edilen bilgiler doğrultusunda bölgelere ait salep örneklerindeki amino asit (%) içerikleri incelendiği zaman bütün bölgelerde arjinin amino asidinin hakim olduğu tespit edilmiştir. Türkiye saleplerinin arjinin içeriğinin % 57 (Güneybatı Anadolu Bölgesi) ile % 45 (Doğu Anadolu Bölgesi) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Örneklerin toplam ortalama amino asit miktarı ve esansiyel amino asit içeriği açısından değerlendirildiğinde sırasıyla 7435,67 mg/kg ve 2706,85 mg/kg değeri ile Doğu Anadolu Bölgesi'nin en zengin amino asit içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Saleplerdeki esansiyel amino asit miktarının toplam amino asit miktarına oranı bakımından değerlendirildiğinde % 36,40 Doğu Anadolu Bölgesi, % 27,22 Güneydoğu Anadolu Bölgesi, % 18,88 Kuzey Anadolu Bölgesi, % 16,91 Güney Anadolu Bölgesi ve % 16,02 ile Güneybatı Anadolu Bölgesi'nin yer aldığı belirlenmiştir.

Literatüre göre, kök bitkilerinin mevcut olan esansiyel amino asitlerin dengesi açısından iyi kalitede proteinlere sahip olduğu ve hatta sığır, yumurta veya süt gibi hayvansal proteinlerinkine karşılaştırılabilir düzeyde olduğu bildirilmiştir. Çoğu kök bitkisinin, baklagillerden daha az bir miktar lizin içerdiği, ancak kükürtlü amino asitlerin (sistein, sistin ve metiyonin) oldukça sınırlı düzeyde bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca bitkilerin protein içeriğinin yumrunun çeşidine, yetiştiği ortama ve iklim şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterebileceğinden de bahsedilmiştir (FAO 1990).

4.3. Taklit, Tağşiş, Katkı Maddelerine Ait Analiz Sonuçları

TTK maddelerine ait analiz sonuçları bu bölümlerde sunulmaktadır. Test sonucunda salep ile farklılık gösteren ($p < 0,05$) örnekler ilişkili çizelgelerde “*” işareti ile gösterilmiştir.

4.3.1. Anabileşen analizleri

Anabileşen analizleri kapsamında TTK maddelerinin rutubet miktarı, kül miktarı, % 10 HCl'de çözünmeyen kül miktarı, protein miktarı ve indirgen şeker düzeylerinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Salep örneklerine ve TTK maddelerine ait anabileşenler analizlerinin sonuçları (ortalama±standart sapma) ve salep ile % 95 önem seviyesinde farklı gösteren TTK maddeleri çizelge 4.25'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.25. TTK maddelerine ait anabileşen analizlerinin sonuçları

TTK Maddesi	n	Rutubet (%)	Kül (%)	% 10 HCl'de Çözünmeyen Kül (%)	Protein (%)	İndirgen Şeker (mg/kg)
GUM	3	11,48*±0,89	0,69*±0,08	0,23±0,14	3,43*±0,18	<LOD
GAR	2	11,81*±0,57	2,69±1,07	0,50±0,01	0,32*±0,06	5603,00±1605,70
KBG	4	8,88±3,21	0,83*±0,05	0,39±0,06	4,67±0,93	23991,38±36045,22
KJG	4	8,09±3,14	3,06*±0,06	0,07*±0,01	0,34*±0,39	207,13*±362,88
KSG	3	9,31±2,76	5,73*±0,34	0,44±0,09	3,22*±0,23	217,33*±376,43
BNT	3	13,21*±1,44	0,16*±0,03	0,02*±0,04	0,00*±0,00	42,33*±44,95
MNT	3	11,77*±0,70	0,10*±0,02	0,06*±0,08	0,00*±0,00	143,83*±249,13
PAN	3	18,70*±1,11	0,25*±0,03	0,12*±0,12	0,03*±0,03	230,33*±398,95
PIN	2	11,78*±2,20	0,31*±0,30	0,07*±0,03	0,00*±0,00	<LOD
SKR	3	0,30*±0,24	0,03*±0,05	0,00*±0,00	0,00*±0,00	10531,67±18241,38
YST	3	5,45*±0,51	7,96*±1,38	0,82*±0,10	23,36*±15,89	3481,50±4105,34
VNL	3	4,08*±2,94	0,03*±0,03	0,03*±0,03	0,00*±0,00	20369,83*±14944,63
TRC	3	11,06*±0,83	4,12*±1,53	0,60±0,06	3,28*±0,10	1319,33±855,26
GLT	3	8,76±0,59	1,50*±0,03	0,18*±0,01	13,09*±2,30	5886,00±7260,97
OMK	3	10,38*±1,70	0,82*±0,06	0,05*±0,05	11,51*±0,85	12101,50*±5338,31
OPR	3	11,69*±2,57	0,60*±0,12	0,06*±0,02	6,89±0,59	585,17±742,91
OBL	3	10,09±2,15	0,99*±0,13	0,17*±0,01	11,72*±1,02	4840,67±8283,59
BUN	3	12,01*±2,60	0,72*±0,25	0,04*±0,03	10,56*±1,59	<LOD
SSA	3	1,48*±0,88	0,01*±0,00	0,00*±0,00	0,00*±0,00	359,00*±621,81
SKA	2	3,38*±0,53	69,52*±8,44	7,90*±3,37	0,00*±0,00	1277,00±1805,95
CMC	2	11,77*±2,41	18,90*±1,10	1,60*±0,33	0,00*±0,00	1823,50±1876,66
Salep	61	7,68±1,14	2,13±0,49	0,41±0,19	6,32±2,61	6536,57±13419,01

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir

<LOD: Tespit sınırının altında.

Çizelge 4.25'ten elde edilen bulgular doğrultusunda salep örnekleri ile izlenen TTK maddeleri arasında anabilesenlere ait veriler açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($p < 0,05$) göstermektedir. Protein açısından en yüksek değer yağsız süt tozu örneğinde belirlenmiştir. Özellikle nişasta örneklerinin (buğday, mısır, patates ve pirinç) tamamında, şeker, vanilya, karboksimetil selüloz, sıvı ve katı salep aroma vericilerinde protein neredeyse hiç tespit edilememiş ve bu örnekler ile salep örnekleri arasında istatistiksel açıdan da oldukça önemli bir fark olduğu $p < 0,01$ hesaplanmıştır. Salepte belirlenen ortalama protein miktarı ($6,32 \pm 2,61$), öğütülmüş pirinç ve keçiyoynuzu sakızında belirlenen değerlerle istatistiksel olarak farklılık tespit edilemezken, diğer TTK maddelerinde belirlenen düzeylerle farklılıklar içerdiği sonucuna varılmıştır ($p < 0,05$). Bu kapsamda belirtilen maddeler ile yapılan taklit ve tağşişte protein düzeylerinin bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. TTK maddelerinin rutubet düzeylerinin % 0,14 ile % 19,74 arasında değiştiği tespit edilirken, kül ve % 10 HCl'de çözünmeyen miktarları açısından katı salep aromasının oldukça yüksek düzeylerde (sırasıyla salebin yaklaşık 32 ve 19 katı) olduğu hesaplanmıştır. Salep örneklerindeki kül miktarlarının ($2,13 \pm 0,49$) arabik sakızda tespit edilen değerle en yakın benzerlikler içerdiği, buna karşılık yanında karboksimetil selüloz, yağsız süt tozu, ksantan sakız, tarçın ve konyak sakızın ortalama kül düzeylerinin salebin ortalama kül düzeyinden yüksek olduğu ve farklılıklar arzettiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). İndirgen şeker açısından salep ile nişasta grubunun tamamı, guar sakız, konyak sakız, ksantan sakız, vanilya, öğütülmüş makarna, buğday unu ve sıvı salep aroması arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($p < 0,05$) göstermektedir.

4.3.2. Enzimatik analizler

Salep örneklerine ve TTK maddelerine ait enzimatik analizlerinin sonuçları (ortalama $\pm$ standart sapma) çizelge 4.26'da sunulmaktadır. Çizelge 4.26'dan elde edilen bulgular TTK maddelerindeki glukomannan ve toplam nişasta düzeylerinin oldukça geniş bir aralıkta seyrettiğini göstermektedir. TTK maddelerindeki ortalama glukomannan düzeyleri 0,00 ile 29,83 g/100g arasında; ortalama toplam nişasta düzeyleri 0,00 ile 85,70 g/100g arasında değiştiği belirlenmiştir.

Salep örneklerindeki glukomannan düzeyleri ($14,28 \pm 10,24$ g/100g) ile TTK maddelerinin glukomannan düzeyleri karşılaştırıldığında, konyak sakızın ($29,83 \pm 26,88$ g/100g) salep örnekleri ile karşılaştırılabilir düzeyde glukomannan içerdiği belirlenmiştir. Diğer TTK maddelerindeki glukomannan düzeyleri ise salebe göre istatistiksel olarak farklılıklar arzettiğini ortaya çıkarmaktadır ($p < 0,05$). Bu nedenle salep ve TTK maddelerinin ayrımı açısından (konyak sakız hariç) glukomannan düzeyinin önemli bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

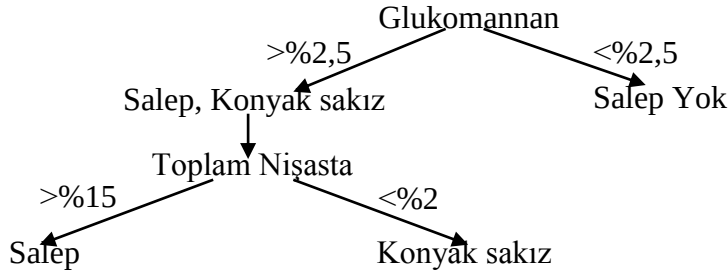
TTK maddelerinin toplam nişasta düzeyleri incelendiğinde ise, sakız grubundaki tüm maddelerin (guar sakız, arabik sakız, ksantan sakız ve konyak sakız), katı, sıvı aroma vericilerin ve şekerin, salebin nişasta düzeyine ($42,62 \pm 12,48$ g/100g) göre düşük nişasta içerdiği ve istatistiksel açıdan farklılık arzettiği ($p < 0,05$) belirlenmiştir. Tarçın, galeta, yağsız süt tozu, öğütülmüş makarna ve öğütülmüş pirinçteki nişasta düzeyleri ile salep nişasta düzeyi arasında ise önemli bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 4.26. TTK maddelerine ait enzimatik analizlerinin sonuçları

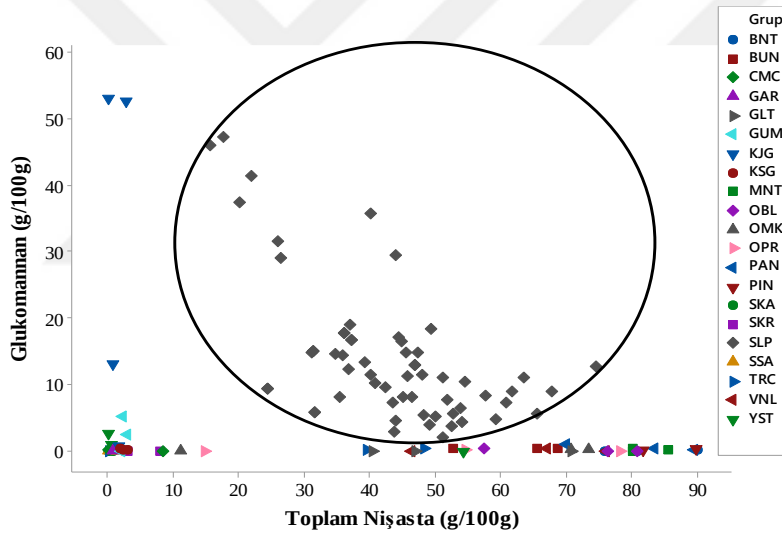
TTK Maddesi	n	Glukomannan oranı (g/100g)	Toplam nişasta oranı (g/100g)
GUM	3	2,50*±2,56	2,33*±0,45
GAR	2	0,06*±0,02	1,06*±0,49
KJG	4	29,83±26,88	1,21*±1,15
KSG	3	0,26*±0,16	2,33*±0,49
BNT	3	0,09*±0,12	82,16*±7,13
MNT	3	0,13*±0,17	81,88*±3,11
PAN	3	0,53*±0,45	80,95*±9,94
PIN	2	0,29*±0,20	85,70*±5,72
SKR	3	0,00*±0,00	4,51*±2,97
YST	3	1,21*±1,34	18,18±31,09
VNL	3	0,13*±0,23	63,07*±15,19
TRC	3	0,22*±0,20	29,16±25,64
GLT	3	0,00*±0,00	52,57±15,91
OMK	3	0,06*±0,06	50,40±34,26
OPR	3	0,02*±0,04	48,99±31,95
OBL	3	0,12*±0,21	71,38*±12,47
BUN	3	0,32*±0,02	62,25*±8,50
SSA	3	0,00*±0,00	0,47*±0,53
SKA	2	0,00*±0,00	0,30*±0,42
CMC	2	0,11*±0,16	4,16*±5,88
Salep	61	14,28±10,24	42,62±12,48

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

Çizelge 4.26'daki bilgiler doğrultusunda, glukomannan analizleri yönünden salep ile benzerlikler içeren konyak sakızındaki nişasta düzeyi $1,21 \pm 1,15$ olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.6'da sadece enzim analizlerinden yararlanarak bir örneğin salep olup olmadığının belirlenmesinde uygulanabilecek pratik bir yöntem sunulmaktadır. Yapılan analizlerde salep örnekleri ile TTK maddeleri arasındaki farklılıkların tespit edilebilmesi amacıyla düzenlenen iki boyutlu saçılma grafiği şekil 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Enzimatik analizler kullanılarak salepte taklit ve tağşişinin karar verilmesinde izlenebilecek olası prosedür



Şekil 4.7. Enzimatik analiz sonuçlarına uygulanan iki boyutlu saçılma grafiği

Şekil 4.7'de sunulan iki boyutlu saçılma grafiği, glukomannan ve nişasta yönünden salep örneklerinin kendi aralarında sınıflanmakta olduklarını göstermektedir. Bu nedenle örneklerin glukomannan ve nişasta içeriklerinin belirlenmesi salep ve TTK maddeleri arasındaki ayrımın gerek nitel gerekse nicel olarak belirlenmesinde büyük önem taşıdığı sonucuna varılmıştır.

4.3.3. Aletsel analizleri

4.3.3.1. Elementel bileşen analizleri

Salep örneklerine ve TTK maddelerine ait elementel analizlerinin sonuçları (ortalama±standart sapma) salep ile % 95 önem seviyesinde farklı gösteren TTK maddeleri çizelge 4.27'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.27. TTK maddelerine ait elementel analizlerinin sonuçları

TTK maddeleri	n	Demir (mg/kg)	Çinko (mg/kg)	Mangan (mg/kg)	Bakır (mg/kg)	Stronsiyum (mg/kg)	Nikel (mg/kg)	Titanyum (mg/kg)
GUM	3	49,41 [*] ±13,55	3,90 [*] ±0,09	3,38 [*] ±1,34	1,92 [*] ±0,23	9,68±2,45	1,17±0,82	2,34 [*] ±1,03
GAR	2	60,09 [*] ±9,96	0,07 [*] ±0,10	1,98 [*] ±1,21	2,14 [*] ±0,27	109,18 [*] ±2,04	0,12 [*] ±0,17	3,49 [*] ±1,12
KBG	4	130,70±164,53	8,99 [*] ±4,45	5,25 [*] ±4,99	4,96±0,43	4,77 [*] ±2,46	3,12±4,17	3,21 [*] ±1,55
KJG	3	36,17 [*] ±6,72	17,32±6,79	10,09 [*] ±2,25	1,13 [*] ±0,91	4,74 [*] ±0,20	1,29±0,01	3,81 [*] ±0,24
KSG	3	100,12±17,24	2,26 [*] ±0,88	4,50 [*] ±0,80	0,99 [*] ±0,35	45,17 [*] ±2,50	1,44±0,33	4,00 [*] ±0,48
BNT	3	13,92 [*] ±6,07	18,70±31,83	0,52 [*] ±0,07	51,34±88,93	1,91 [*] ±1,23	1,39±1,30	2,50 [*] ±1,18
MNT	3	63,31±91,14	0,01 [*] ±0,17	0,23 [*] ±0,08	<LOD	1,51 [*] ±1,18	2,15±2,42	2,09 [*] ±1,26
PAN	3	4,52 [*] ±3,83	<LOD	0,31 [*] ±0,13	0,64 [*] ±1,10	1,12 [*] ±1,09	0,34 [*] ±0,59	1,79 [*] ±1,28
PIN	2	6,02 [*] ±2,45	<LOD	2,72 [*] ±0,25	0,05 [*] ±0,07	0,11 [*] ±0,04	<LOD	0,89 [*] ±0,13
SKR	3	10,00 [*] ±6,13	14,47 [*] ±10,49	0,12 [*] ±0,08	<LOD	0,19 [*] ±0,23	2,40±3,52	1,98 [*] ±1,63
YST	3	20,90 [*] ±11,70	7,62 [*] ±11,22	0,25 [*] ±0,08	0,02 [*] ±0,03	7,37±6,00	0,46 [*] ±0,26	13,76±8,26
VNL	3	6,59 [*] ±4,51	<LOD	0,09 [*] ±0,08	<LOD	0,07 [*] ±0,07	0,60 [*] ±0,61	1,68 [*] ±1,33
TRC	3	999,03 [*] ±1557,11	10,26±6,00	262,14 [*] ±51,62	4,37±3,90	110,33 [*] ±31,08	13,03±21,23	48,15±71,10
GLT	3	27,10 [*] ±13,39	8,58 [*] ±0,68	8,46 [*] ±0,49	2,14 [*] ±0,19	1,36 [*] ±0,28	1,08 [*] ±0,11	4,03 [*] ±0,24
OMK	3	30,39 [*] ±4,86	7,67 [*] ±2,06	12,00±3,48	2,79 [*] ±0,59	2,46 [*] ±1,29	3,77±4,79	3,69 [*] ±0,18
OPR	3	8,49 [*] ±4,01	8,94±0,14	9,39 [*] ±3,47	1,34 [*] ±0,16	0,09 [*] ±0,16	0,89 [*] ±0,44	3,82 [*] ±0,58
OBL	3	21,14 [*] ±13,44	10,65±2,11	14,40±7,25	3,45 [*] ±0,40	1,36 [*] ±0,25	1,13±0,45	4,41 [*] ±0,50
BUN	3	20,57 [*] ±9,67	5,18 [*] ±1,94	9,15 [*] ±3,87	1,82 [*] ±0,46	7,11±8,66	1,01 [*] ±0,57	3,46 [*] ±0,46
SSA	3	12,22 [*] ±12,74	4,25 [*] ±7,36	0,17 [*] ±0,24	0,01 [*] ±0,02	0,13 [*] ±0,18	5,06±7,46	2,06 [*] ±1,61
SKA	2	501,82 [*] ±139,42	<LOD	12,55±5,89	0,36 [*] ±0,02	123,07 [*] ±54,75	5,82±0,40	151,04 [*] ±52,42
CMC	2	33,67 [*] ±27,54	<LOD	1,15 [*] ±1,10	1,56 [*] ±0,00	3,14 [*] ±2,75	1,06±0,38	3,21 [*] ±0,12
Salep	57	165,73±94,34	15,60±7,65	17,56±9,14	6,62±2,80	13,34±4,32	5,07±5,96	10,09±4,99

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.27'nin devamı

TTK maddeleri	n	Rubidyum (mg/kg)	Molibden (mg/kg)	Vanadyum (mg/kg)	Kobalt (mg/kg)	Galyum (mg/kg)	Selenyum (mg/kg)	Krom (mg/kg)
GUM	3	3,14±1,66	1,21*±0,11	0,04*±0,04	0,09±0,02	0,01*±0,01	0,22*±0,04	1,28*±1,51
GAR	2	8,05±1,67	0,04*±0,01	0,13±0,02	0,04*±0,01	3,73*±0,25	0,01*±0,01	0,67*±0,22
KBG	4	3,90±1,36	0,33±0,21	0,05*±0,04	0,27±0,47	0,05*±0,07	0,11±0,07	1,78*±1,61
KJG	3	1,08*±0,54	0,20±0,06	0,08*±0,05	0,04*±0,01	0,08±0,02	0,07±0,03	3,53±1,24
KSG	3	0,30*±0,04	0,36±0,28	0,07*±0,03	0,04*±0,01	0,12±0,03	0,07±0,05	2,13±0,42
BNT	3	0,06*±0,07	0,09*±0,08	0,01*±0,01	0,01*±0,01	0,02*±0,02	0,03*±0,03	2,21±1,56
MNT	3	0,06*±0,06	0,07*±0,06	0,00*±0,01	0,14±0,23	0,02*±0,02	0,02*±0,03	2,19±1,43
PAN	3	0,18*±0,08	0,03*±0,06	<LOD	0,01*±0,01	0,01*±0,01	0,03*±0,03	1,06*±1,33
PIN	2	0,60*±0,45	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,25*±0,25
SKR	3	0,00*±0,01	0,07*±0,06	<LOD	0,02*±0,02	<LOD	0,02*±0,02	1,38*±1,01
YST	3	10,13±6,53	0,27±0,08	0,10*±0,09	0,00*±0,01	0,01*±0,02	0,35*±0,23	1,28*±0,60
VNL	3	0,01*±0,01	0,09*±0,08	<LOD	0,01*±0,01	<LOD	0,02*±0,02	0,99*±0,51
TRC	3	18,76*±3,63	0,19±0,11	2,05±3,26	0,26±0,33	2,17*±0,69	0,65*±0,84	4,49±5,89
GLT	3	1,12*±0,31	0,34±0,70	0,04*±0,04	0,02*±0,00	0,04*±0,02	0,09±0,04	1,51±0,57
OMK	3	1,27*±0,39	0,44±0,14	0,03*±0,02	0,01*±0,01	0,04*±0,03	0,15±0,07	1,04*±0,20
OPR	3	0,94*±0,34	0,52*±0,04	0,02*±0,02	0,01*±0,01	0,01*±0,01	0,04±0,05	1,04*±0,39
OBL	3	1,35*±0,15	0,29±0,12	0,01*±0,01	0,01*±0,01	0,03*±0,02	0,04±0,04	1,16*±0,44
BUN	3	0,92*±0,29	0,87±0,94	0,01*±0,02	0,01*±0,01	0,04*±0,02	0,11±0,05	0,92*±0,53
SSA	3	0,01*±0,01	0,06*±0,52	0,00*±0,01	0,01*±0,01	<LOD	0,02*±0,03	1,16*±0,69
SKA	2	0,05*±0,06	0,80*±0,15	1,37*±0,21	0,24±0,10	0,05±0,01	0,17±0,03	0,99*±0,40
CMC	2	<LOD	0,10*±0,00	<LOD	0,02*±0,01	0,03*±0,02	0,02*±0,02	3,15±1,54
Salep	57	7,27±12,06	0,33±0,26	0,33±0,24	0,18±0,14	0,15±0,13	0,09±0,08	7,05±7,96

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.27'nin devamı

TTK maddeleri	n	Lityum (mg/kg)	Baryum (mg/kg)	Sezyum (mg/kg)	Berilyum (mg/kg)	Talyum (mg/kg)	Bizmut (mg/kg)
GUM	3	0,02*±0,03	0,53*±0,15	0,00*±0,01	<LOD	<LOD	0,01±0,01
GAR	2	0,06*±0,01	126,69*±7,04	0,02±0,02	<LOD	<LOD	<LOD
KBG	4	0,02*±0,03	2,22±3,16	0,01*±0,01	<LOD	<LOD	<LOD
KJG	3	0,07*±0,03	2,68±0,06	0,00*±0,01	<LOD	0,01±0,01	0,00±0,87
KSG	3	0,25±0,04	3,51±0,82	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BNT	3	0,04*±0,03	0,36*±0,10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MNT	3	0,04*±0,03	0,14*±0,13	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PAN	3	0,02*±0,03	0,13*±0,03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PIN	2	0,09±0,04	0,11*±0,01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SKR	3	<LOD	0,01*±0,02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
YST	3	0,22±0,26	0,80*±0,61	0,09±0,08	<LOD	<LOD	<LOD
VNL	3	0,00*±0,01	0,02*±0,03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
TRC	3	0,08±0,10	75,09*±12,57	0,26*±0,05	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
GLT	3	0,05*±0,04	0,99*±0,24	0,00*±0,01	<LOD	<LOD	<LOD
OMK	3	0,07*±0,04	1,34*±0,63	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
OPR	3	<LOD	0,03*±0,05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
OBL	3	0,01*±0,01	1,01*±0,51	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BUN	3	0,15±0,22	1,27*±0,58	0,00*±0,01	<LOD	<LOD	<LOD
SSA	3	0,00*±0,01	0,08*±0,14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SKA	2	0,07*±0,02	1,53±0,88	0,01*±0,01	<LOD	<LOD	<LOD
CMC	2	0,06*±0,06	0,87*±0,83	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Salep	57	0,25±0,16	4,13±3,09	0,24±0,55	<LOD	<LOD	<LOD

*salep örnekleri ile $p < 0,05$ düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.27'ye göre salep örneklerinde tespit edilen demir, nikel ve vanadyum düzeyleri, çalışmalar kapsamında izlenen tarçın, katı salep aroması hariç diğer tüm TTK örneklerinde belirlenen düzeylerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, çinko buğday nişastası ve konyak sakızında; mangan tarçında; bakır buğday nişastasında; stronsiyum arabik sakız, tarçın, ksantan sakız ve katı salep aromasında; titanyum tarçın, yağsız süt tozu ve katı salep aromasında; rubidyum arabik sakız, yağsız süt tozu ve tarçında; baryum arabik sakız ve tarçında; molibden guar sakız, öğütülmüş makarna, buğday unu, galette unu, pirinç unu ve katı salep aromasında; kobalt keçiboynuzu sakızı, tarçın ve katı salep aromasında; galyum arabik sakız ve tarçında; selenyum guar sakız, keçiboynuzu sakızı, yağsız süt tozu, öğütülmüş makarna, tarçın, buğday unu ve katı salep aromasında; sezyum tarçında salep örneklerinde tespit edilen düzeylerden daha yüksek olarak belirlenmiştir

İlgili çizelgeye göre; salebin titanyum, vanadyum ve sezyum yönlerinden 19; demir, mangan, bakır, stronsiyum ve galyum yönlerinden 18; rubidyum ve baryum yönlerinden 17; çinko, kobalt ve lityum yönlerinden 16; krom yönünden 14; selenyum ve molibden yönlerinden 12 ve nikel yönünden ise 8 adet TTK maddesi ile istatistiksel olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Salep numunelerinde tespit edilen ortalama krom ($7,05 \pm 7,96$ mg/kg) ve lityum ($0,25 \pm 0,16$ mg/kg) elementleri incelenen tüm TTK maddelerinde tespit edilen ortalama lityum düzeylerinden daha yüksek olarak bulunmuştur. Elde edilen verilere göre, lityum ve krom'un taklit ve taşıması belirlemede belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, salep örneklerinin çoğunda tespit edilemeyen antimuan, berilyum, talyum ve bizmut elementlerinden talyum ve bizmut elementleri, incelenen tüm konyak sakız ürünlerinde farklı düzeylerde belirlenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, bu elementlerin yapısal olarak ülkemiz salepleri ile büyük benzerlik gösteren konyak sakızının ayırımında önemli parametreler olabileceği sonucuna varılmıştır.

4.3.3.2. İzotop oranları analizleri

Çizelge 4.28'de salep örneklerine ve TTK maddelerine ait izotop oranları analizlerinin sonuçları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve % 95 önem seviyesinde farklı bulunan TTK maddeleri sunulmaktadır.

Çizelge 4.28. TTK maddelerine ait izotop oranları analizlerinin sonuçları

TTK maddeleri	n	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (‰)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰)	$^1\text{H}/^2\text{H}$ (‰)
GUM	3	$-25,03^* \pm 0,16$	$0,86 \pm 6,67$	$38,08^* \pm 1,77$	$-76,61^* \pm 17,76$
GAR	2	$-26,09^* \pm 0,42$	$-1,32 \pm 3,00$	$35,56^* \pm 0,45$	$-74,37^* \pm 5,79$
KBG	4	$-26,49^* \pm 1,37$	$9,55^* \pm 1,88$	$39,12^* \pm 0,95$	$-70,53^* \pm 23,37$
KJG	4	$-26,57 \pm 3,04$	$7,66^* \pm 4,31$	$21,63^* \pm 1,89$	$-111,82 \pm 21,13$
KSG	3	$-11,75^* \pm 0,36$	$47,93^* \pm 24,66$	$28,39^* \pm 0,53$	$-66,76^* \pm 6,04$
BNT	3	$-26,09^* \pm 0,38$	$7,14^* \pm 2,76$	$22,72 \pm 8,11$	$-95,37^* \pm 19,08$
MNT	3	$-11,86^* \pm 0,22$	$6,82^* \pm 3,36$	$30,01 \pm 2,86$	$-66,10^* \pm 13,42$
PIN	3	$-27,51 \pm 0,28$	$4,06 \pm 1,04$	$31,31 \pm 0,04$	$-90,87^* \pm 0,72$
SKR	3	$-24,54^* \pm 0,39$	$5,44^* \pm 1,37$	$31,41 \pm 1,45$	$-137,70 \pm 15,24$
PAN	2	$-27,10 \pm 0,81$	$6,02^* \pm 3,64$	$29,06^* \pm 2,48$	$-135,06 \pm 15,19$

Çizelge 4.28'in devamı

TTK maddeleri	n	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (‰)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰)	$^1\text{H}/^2\text{H}$ (‰)
YST	3	-21,97*±1,89	14,65*±3,26	24,66±7,20	-87,46*±27,82
VNL	3	-19,58*±5,10	61,89*±95,16	9,57*±12,10	-28,97*±41,19
TRC	3	-29,66*±0,03	102,87*±85,26	25,39*±1,19	-110,87±18,96
GLT	3	-25,62*±0,18	13,17*±0,66	39,04*±0,61	-120,10±2,65
OMK	3	-25,28*±0,26	107,01*±83,62	39,00*±1,21	-96,99*±13,68
OPR	3	-26,94*±0,37	17,87*±1,43	35,19*±1,70	-116,53±20,90
OBL	3	-25,53*±1,24	21,35*±2,74	41,16*±1,19	-93,64*±9,63
BUN	3	-24,11*±1,52	24,95*±4,85	41,79*±1,70	-100,84±14,04
SSA	3	-27,25±0,60	6,48*±2,67	-4,37*±7,48	-119,72±11,43
SKA	2	-26,08±1,72	156,27*±208,22	10,59*±16,04	-110,15±14,28
CMC	2	-26,51*±0,95	5,70*±0,37	17,53*±0,88	-115,10±3,27
Salep	61	-27,97±0,76	1,46±2,56	32,10±1,64	-123,10±16,49

*salep örnekleri ile $p < 0,05$ düzeyinde farklılık göstermektedir.

TTK maddelerine ait izotop analiz sonuçlarına göre; örneklerde belirlenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^2\text{H}/^1\text{H}$ izotop oranlarının sırasıyla ‰-31,04 ile ‰-11,39; ‰-5,54 ile ‰303,50; ‰-12,58 ile ‰42,81 ve ‰-149,85 ile ‰8,52 aralıklarında değiştikleri tespit edilmiştir. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranı açısından TTK maddelerine ait değerler ile salep örneklerinde tespit edilen değerler (‰-26,61 ile ‰-29,76) karşılaştırıldığında, salebin konyak sakız, patates nişastası, pirinç nişastası, katı ve sıvı salep aroması hariç olmak üzere diğer TTK maddelerinden istatistiksel anlamda farklılıklar arz ettiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Benzer şekilde salep örneklerinde ‰-9,25 ile ‰6,66 arasında değişen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranının pirinç nişastası, guar sakız ve arabik sakız dışındaki tüm TTK maddelerindeki izotop oranı ile belirgin şekilde farklı olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). Karbon ve azot izotop oranlarının TTK maddelerinin çoğunda salep ile farklılık göstermesi, belirtilen maddeler ile yapılabilecek taklit ve tağşişin belirlenmesinde önemli olabileceği sonucuna varılmıştır.

Salep örneklerinde belirlenen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranlarının ise pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, yağsız süt tozu ve şeker dışındaki tüm TTK maddelerinde belirgin şekilde farklılıkların olduğu sonucuna varılmıştır ($p < 0,05$). Ayrıca elde edilen sonuçlara göre; tespit edilen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranı değerleri ülkemizde yetiştirilen salep örnekleri (‰28,09 ile ‰37,31) ile Avrupa salebi olarak bilinen konyak sakız (‰20,12 ile ‰24,05) arasında farklılıklar içerdiğini göstermektedir. Bu bakımdan kimyasal açıdan büyük ölçüde benzeşen bu iki ürün arasındaki farklılığın belirlenmesinde bu oranın kullanılabileceği düşünülmektedir. TTK maddelerindeki $^2\text{H}/^1\text{H}$ izotop oranları oldukça geniş bir aralıkta seyretmekte olup, konyak sakız, patates nişastası, şeker, tarçın, galeta unu, öğütülmüş pirinç, buğday unu, karboksimetil selüloz, katı ve sıvı salep aroması hariç tüm TTK maddelerinde tespit edilen değerlerin salep örnekleri ile istatistiksel olarak farklılıklar içerdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Hidrojen izotop oranlarının özellikle sakız grubundaki (konyak sakız hariç) TTK maddeleri bakımından büyük farklılıklar arz ettiği göze çarpmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, belirtilen maddeler ile yapılabilecek taklit ve tağşişin belirlenmesinde bu oranların göz önünde bulundurulması gerektiği tespit edilmiştir.

4.3.3.3. Kalorimetrik analizler

Salep örneklerine ve TTK maddelerine ait kalorimetrik analizlerin sonuçları (ortalama±standart sapma) çizelge 4.29’da sunulmaktadır.

Çizelge 4.29. TTK maddelerine ait kalorimetrik analizlerin sonuçları

TTK maddeleri	n	Erime (°C)	ΔH (j/g)	Tg/Step (°C/°C)
GUM	1	139,93	248,41	37,65
GAR	1	156,30	188,62	<LOD
KBG	3	148,62±31,99	186,54±109,17	50,51±22,18
KJG	2	174,64*±0,45	220,16*±8,03	77,90±14,39
KSG	3	166,70±14,17	248,80*±37,69	55,78±8,85
BNT	3	144,73±19,25	179,34±19,72	71,49±10,29
MNT	1	132,89	174,96	56,98
PAN	2	128,00*±4,11	273,94*±11,25	67,28±4,12
PIN	1	126,74	148,14	57,03
SKR	3	201,00*±1,74	98,09*±13,15	<LOD
YST	2	169,35*±0,86	270,02*±26,94	70,77
VNL	3	86,66*±8,41	71,82*±53,80	40,16
TRC	3	146,86±14,71	143,41±17,32	74,85±14,50
GLT	3	170,72*±5,41	173,40±16,24	58,06±9,87
OMK	3	158,19±10,98	197,70±47,91	59,37±7,67
OPR	3	154,78±18,09	208,26*±8,94	60,66±6,95
OBL	3	168,80*±4,67	218,30*±8,45	84,97±40,92
BUN	3	156,32±6,59	221,58*±21,54	58,81±8,88
SSA	3	<LOD	<LOD	<LOD
SKA	2	151,48±4,72	56,60*±14,50	117,81
CMC	2	177,95*±2,99	285,97*±2,90	83,45±35,20
Salep	59	148,46±15,52	157,09±34,85	60,21±11,07

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.29’dan elde edilen bulgular doğrultusunda, salep örnekleri ile izlenen TTK maddeleri arasındaki kalorimetrik ölçüm sonuçları istatistiksel açıdan, erime sıcaklığı ve entalpi farkında önemli bir fark olduğunu (p < 0,05) göstermektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda camsı geçiş sıcaklığı (Tg/Step) bakımından salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Salep örneklerinde tespit edilen ortalama, en az ve en çok kalorimetrik değerler dikkate alındığında sonuçların TTK maddelerinde tespit edilen değerler ile büyük oranda örtüştüğü sonucuna varılmıştır. Ancak, erime sıcaklığı açısından salep ile konyak sakız, patates nişastası, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, galeta, karboksimetil selüloz ve öğütülmüş bulgur arasında ve entalpi değerleri açısından ise salep ile karboksimetil selüloz, katı ve sıvı salep aroması, konyak sakız, ksantan sakız, patates nişastası, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş bulgur ve buğday unu arasında önemli farklar bulunduğu belirlenmiştir (p < 0,05).

4.3.3.4. Karbonhidrat bileşenleri analizleri

Salep örneklerine ve TTK maddelerine ait karbonhidrat bileşenlerinin analiz sonuçları (ortalama±standart sapma) çizelge 4.30'da sunulmaktadır.

Çizelge 4.30. TTK maddelerine ait karbonhidrat bileşenlerinin analiz sonuçları

TTK maddeleri	n	Sakkaroz (mg/kg)	Glikoz (mg/kg)	Fruktoz (mg/kg)
GUM	3	<LOD	<LOD	<LOD
GAR	2	2329,25±778,88	3594,00±0,71	1086,75±231,58
KBG	4	6045,75±4267,85	6489,00±10237,83	19301,25±24566,41
KJG	4	524,50*±713,51	207,13±362,88	63,00*±126,00
KSG	3	<LOD	<LOD	<LOD
BNT	3	1460,17±2529,08	42,33±44,95	<LOD
MNT	2	<LOD	<LOD	<LOD
PAN	3	104,17*±180,42	10,33±17,90	133,50*±231,23
PIN	2	1799,75±1696,00	345,50±488,61	<LOD
SKR	3	664051,17*±311073,16	<LOD	<LOD
YST	3	387250,50*±207741,71	9835,17±17035,01	696,50±1206,37
VNL	3	19408,50±18813,32	3324,33±3846,22	157,17*±272,22
TRC	3	1406,00*±658,52	9580,67*±7428,23	10789,17*±7516,42
GLT	3	1574,50*±298,03	10576,83*±4219,35	1524,67±1840,40
OMK	3	81656,00±80147,60	801,50±1180,40	517,83±730,58
OPR	3	6703,33±9008,33	5555,33±7222,13	330,67±338,24
OBL	3	520,33*±219,38	277,83±210,61	307,33±532,32
BUN	3	7808,67±9233,82	4220,67±7310,41	620,00±974,72
SSA	3	<LOD	217,33±376,43	<LOD
SKA	2	2821,00±907,22	538,50±761,55	<LOD
CMC	2	<LOD	<LOD	<LOD
Salep	57	6820,10±8089,50	2726,36±6371,21	3810,55±8573,62

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.30'da sunulan bulgulara göre, bazı TTK maddelerinin çalışma kapsamında izlenen karbonhidrat bileşenlerinden bir veya birkaçının bulunmaması veya salep örnekleriyle farklılık göstermesinden dolayı taklit ve tağşişin belirlenebilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bunlara örnek olarak; guar sakız, ksantan sakız, mısır nişastası, sıvı salep aroması, katı salep aroması ve karboksimetil selüloz verilebilir. Ayrıca yine düzeyler dikkate alındığında salep örneklerinin yağsız süt tozu, öğütülmüş makarna ve şeker örneklerinden farklılıklar içerdiği tespit edilmiştir. Diğer TTK maddeleri ile ayırım konusunda kemometrik yöntemlerden faydalanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

4.3.3.5. Organik asit bileşenleri analizleri

Salep örneklerine ve TTK maddelerine ait organik asit bileşenlerinin analiz sonuçları (ortalama±standart sapma) çizelge 4.31'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.31. TTK maddelerine ait organik asit bileşenlerinin analiz sonuçları

TTK maddeleri	n	Tartarik asit (mg/kg)	Malik asit (mg/kg)	Fumarik asit (mg/kg)	Sitrik asit (mg/kg)
GUM	3	43,99*±14,07	81,56*±6,30	<LOD	1407,62±504,12
GAR	2	51,19*±2,07	<LOD	<LOD	<LOD
KBG	4	11,19*±15,46	2440,68*±4587,61	426,02*±770,39	1292,11±1820,30
KJG	4	1619,47*±2412,02	1576,17*±1123,84	306,09*±233,73	2108,68±1920,13
KSG	3	4,68*±4,90	16,47*±4,40	<LOD	1551,49±1148,34
BNT	3	145,25*±149,71	188,08*±198,49	<LOD	865,01±805,10
MNT	3	<LOD	42,16±36,84	<LOD	857,45±1485,15
PAN	3	28,21±48,86	20,95±36,29	<LOD	231,17±400,40
PIN	2	27,50±38,88	29,50±41,71	<LOD	17,01±24,05
SKR	3	<LOD	98,42±121,42	<LOD	351,10±321,79
YST	3	40,71*±35,52	42,49±37,20	74,82±129,59	1798,08±1562,18
VNL	3	17,48*±30,28	117,01*±114,34	<LOD	494,69±442,49
TRC	3	2,00±3,46	447,99*±396,14	172,07*±149,11	960,29±768,95
GLT	3	16,12*±10,45	1372,84*±473,17	481,01*±175,50	1482,08±456,26
OMK	3	3,08±5,34	337,27±584,17	162,07±280,72	609,05±1054,91
OPR	2	3,11±4,40	165,52±234,08	<LOD	401,97±512,72
OBL	3	1,29*±1,32	773,16*±244,88	316,01*±106,15	959,08±77,56
BUN	3	12,86*±16,19	1472,76*±1502,08	557,31*±597,71	1394,92±1439,42
SSA	3	28,86*±18,28	19,10±21,08	69,13±119,74	495,73±435,27
SKA	2	6,00±8,49	11,81±16,69	100,98±142,81	265,22±375,08
CMC	2	13,27±18,76	31,72±44,86	<LOD	1457,80±1942,43
Salep	59	6,38±17,59	103,65±441,43	92,67±372,60	907,63±2699,24

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

TTK maddelerine ait organik asit analiz sonuçlarına göre; incelenen organik asit bileşenlerinden bütirik, propionik ve laktik asitlerden hiçbirisi tespit edilmezken, farklı konsantrasyonlarda tartarik (<LOD-5126,77 mg/kg), malik (<LOD-9314,81 mg/kg) fumarik (<LOD-1578,18 mg/kg) ve sitrik asit (<LOD-4138,59 mg/kg) bileşenleri belirlenmiştir. Çizelge 4.31'e göre, örneklerdeki en yüksek ortalama tartarik asit, malik asit, fumarik asit ve sitrik asit bileşenleri sırasıyla konyak sakızı, keçiboynuzu sakızı, buğday unu ve konyak sakızı örneklerinde belirlenmiştir.

Sitrik asit bakımından salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı, salepte baskın organik asit olan sitrik asidin taklit ve tağşişinin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılamayacağı belirlenmiştir. Malik asit ve fumarik asit açısından TTK maddelerinden keçiboynuzu sakızı, konyak sakız, galeta unu ve buğday unun değeri salep örneklerinden elde edilen değerin sırasıyla yaklaşık 15 katı ve 3 katı olduğu ve bu maddelerin salep taklit ve tağşişinin belirlenmesinde belirleyici unsur olabileceği düşünülmektedir.

Fumarik asit bakımından (yağsız süt tozu, öğütülmüş makarna, sıvı ve katı salep aroması hariç) farklılıkların olduğu ve çoğu TTK maddesinde fumarik asit miktarının <LOD olduğu tespit edilmiştir. Malik asit ve tartarik asit açısından değerlendirildiğinde ise, salep ve bütün sakız çeşitleri (guar sakız, arabik sakız, keçiboynuzu sakızı, konyak sakız ve ksantam sakız) arasında farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.

TTK maddeleri ve salep örneklerindeki organik asit bileşenleri incelendiğinde konyak sakızın yüksek düzeyde (1619,47±2412,02 mg/kg) tartarik asit içermesi ve bunun karşılığında incelenen salep örneklerinde en fazla 60,28 mg/kg düzeyinde tartarik asit bulunması konyak sakızı ile ülkemizdeki salepler arasında belirleyici bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır.

4.3.3.6. Amino asit bileşenleri analizleri

Çizelge 4.32'de salep örneklerine ve TTK maddelerine ait amino asit bileşenlerinin analiz sonuçları (ortalama±standart sapma) gösterilmiştir.

Çizelge 4.32. TTK maddelerine ait amino asit bileşenlerinin analiz sonuçları

TTK maddeleri	n	Lizin (mg/kg)	Arjinin (mg/kg)	Histidin (mg/kg)	Aspartikasit (mg/kg)	Glutamik asit (mg/kg)
GUM	3	42,13*±21,64	27,73*±2,86	<LOD	68,32±50,53	78,62*±46,38
GAR	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
KBG	4	0,63*±1,26	3,47*±6,95	<LOD	24,92*±49,84	<LOD
KJG	4	51,39*±53,07	5,27*±10,62	1,02*±2,03	28,75*±33,41	48,64*±38,77
KSG	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BNT	3	<LOD	<LOD	3,31*±5,73	<LOD	5,84*±5,36
MNT	3	2,10*±3,64	0,13*±0,22	0,53*±0,91	2,12*±3,67	18,97*±20,91
PAN	3	1,88*±3,26	5,61*±6,77	1,21*±2,10	462,33*±800,78	630,33*±1091,77
PIN	2	29,08*±41,13	164,83*±233,10	11,04*±15,61	6,94±9,81	9,46±13,37
SKR	3	11,31*±19,59	2,92*±5,06	<LOD	<LOD	11,23*±19,45
YST	3	<LOD	4,85*±8,39	<LOD	<LOD	43,32*±19,20
VNL	3	0,09*±0,15	4,83*±8,36	<LOD	<LOD	<LOD
TRC	3	<LOD	<LOD	<LOD	292,05*±298,69	3,27*±5,66
GLT	3	9,09*±15,74	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
OMK	3	37,60*±11,63	9,48*±8,22	10,38*±17,97	43,72±43,46	66,90*±37,70
OPR	3	37,68*±18,92	0,82*±1,41	<LOD	65,84*±9,28	92,39*±6,58
OBL	3	19,88*±17,51	17,96*±10,45	<LOD	75,44±34,58	84,52*±47,99
BUN	3	88,90*±105,75	34,39*±59,57	3,76*±6,52	125,15±122,86	103,36*±103,63
SSA	3	3,44*±5,96	2,75*±1,41	5,24*±9,08	50,46±34,35	2,64*±4,57
SKA	2	<LOD	6,76*±9,55	4,15*±5,86	8,12*±11,48	<LOD
CMC	2	24,48*±34,62	567,31±315,57	34,09±11,66	<LOD	<LOD
Salep	61	452,66±298,44	2535,57±1903,90	128,95±97,31	108,04±72,39	259,05±142,54

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.32'nin devamı

TTK maddeleri	n	Serin (mg/kg)	Prolin (mg/kg)	Tirozin (mg/kg)	Lösin+İzolösin (mg/kg)	Fenilalanin (mg/kg)
GUM	3	<LOD	20,54±27,55	24,32±16,01	12,74*±18,95	16,35*±16,53
GAR	2	<LOD	3,05*±4,31	<LOD	0,97*±1,36	1,12*±1,58
KBG	4	<LOD	20,30±40,61	3,73*±7,45	11,00*±21,66	3,81*±7,06
KJG	4	<LOD	11,19*±13,44	186,32±351,02	7,29*±5,86	16,01*±14,15
KSG	3	<LOD	<LOD	<LOD	2,14±3,71	<LOD
BNT	3	13,62±23,59	0,71*±1,24	<LOD	<LOD	0,45*±0,77
MNT	3	<LOD	6,03*±6,31	5,77*±7,58	6,02*±6,25	14,25*±5,66
PAN	3	<LOD	0,57*±0,98	2,20*±3,82	<LOD	0,66*±1,14
PIN	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,79*±6,77
SKR	3	<LOD	<LOD	4,65*±8,06	<LOD	2,15*±3,72
YST	3	<LOD	4,03*±6,98	2,92*±5,06	1,32*±2,29	4,36*±7,56
VNL	3	10,68*±18,50	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
TRC	3	<LOD	4,21*±5,14	1,70*±2,94	2,01*±2,30	1,29*±1,17
GLT	3	<LOD	2,58*±4,47	<LOD	1,38*±2,39	2,15*±3,72
OMK	3	<LOD	4,55*±7,88	20,72*±9,45	10,77*±9,34	12,76*±4,78
OPR	3	<LOD	5,60*±4,86	9,06±1,41	5,12*±4,54	6,45*±0,13
OBL	3	13,14*±22,75	5,10*±6,37	14,52*±15,72	8,76*±6,44	10,79*±5,56
BUN	3	<LOD	61,24*±106,07	13,55*±11,73	22,10*±21,15	26,30*±33,81
SSA	3	15,17±26,28	<LOD	0,78*±1,35	0,22*±0,39	0,25*±0,43
SKA	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
CMC	2	<LOD	11,10±15,69	9,90*±14,00	7,86±11,12	48,66±68,81
Salep	61	243,11±259,86	82,26±112,94	331,24±318,57	120,77±176,38	335,25±449,49

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.32'nin devamı

TTK maddeleri	n	Sistein (mg/kg)	Treonin (mg/kg)	Valin (mg/kg)	Metiyonin (mg/kg)
GUM	3	<LOD	<LOD	18,24*±28,90	<LOD
GAR	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
KBG	4	<LOD	<LOD	37,44±74,87	1,03*±2,05
KJG	4	<LOD	<LOD	78,24±144,61	13,47±19,04
KSG	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BNT	3	<LOD	<LOD	<LOD	0,19*±0,33
MNT	3	<LOD	<LOD	4,95*±8,57	1,69*±2,93
PAN	3	<LOD	<LOD	1271,00*±2201,44	0,15*±0,25
PIN	2	<LOD	<LOD	19,07±26,96	<LOD
SKR	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
YST	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
VNL	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
TRC	3	1,75±3,03	4,40*±7,62	<LOD	3,81*±5,07
GLT	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
OMK	3	<LOD	6,99*±12,11	27,17*±26,22	1,66±2,88
OPR	3	<LOD	<LOD	9,84±8,53	2,07*±1,80
OBL	3	<LOD	<LOD	<LOD	0,69±1,19
BUN	3	<LOD	7,53*±13,04	33,61*±39,74	5,49*±5,31
SSA	3	61,79±107,33	<LOD	<LOD	0,30*±0,53
SKA	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
CMC	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Salep	61	1,41±6,01	91,71±70,36	199,57±332,06	20,81±32,24

*salep örnekleri ile p < 0,05 düzeyinde farklılık göstermektedir.

<LOD: Tespit sınırının altında

Çizelge 4.32’de belirtilen aminoasit bileşenleri analizleri sonuçlarına göre; TTK maddelerinin çoğunun amino asit yönünden LOD düzeyinin altında değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya konu olan TTK’lerin çoğunun toplam protein içeriğinin iz düzeyde (% 0–0,50) olması aminoasitlerin pek çoğu için LOD düzeyinin altında değer tespit edilmesini açıklamaktadır.

İlgili çizelgedeki veriler değerlendirildiğinde, treonin amino asidi tarçın, öğütülmüş makarna ve buğday unu hariç tüm TTK maddelerinde LOD değerinin altında belirlenmiştir. Salep örneklerinde ise bu amino asit sadece 5 tane örnekte LOD değerinin altında tespit edilirken geri kalan salep örneklerinde 1,02 ile 282,60 mg/kg aralığında değişmekte olup, ortalama $91,71 \pm 70,36$ mg/kg düzeyindedir. Treonin düzeyi açısından bakıldığında tüm TTK maddelerindeki düzeyin salepteki ilgili amino asidinin düzeyinin en fazla 1/12’si kadar olduğu belirlenmiş ve salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür. Bu nedenle ilgili amino asidin salep ile sakız grubu (guar sakız, arabik sakız, keçiyoynuzu sakızı, konyak sakız, ksantan sakız), nişasta grubu (buğday nişastası, mısır nişastası, patates nişastası, pirinç nişastası), şeker, yağsız süt tozu, vanilya, galeta unu, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş bulgur, karboksimetil selüloz, sıvı ve katı salep aroması arasında taklit ve tağşişin belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir.

Histidin amino asidi açısından, salep örneklerinden sadece 3 tanesinde LOD değerinin altında, geri kalan örneklerde ise 5,13 ile 560,55 mg/kg arasında değişen düzeylerde belirlenmiş ve ortalama $128,95 \pm 97,31$ mg/kg olarak bulunmuştur. Buna karşılık TTK maddelerinde bu amino asidin sadece nişasta grubu, konyak sakız, öğütülmüş makarna, buğday unu, karboksimetil selüloz, katı ve sıvı salep aromasından belirli düzeylerde tespit edilebildiği görülmüştür. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde ise bu TTK maddeleri ile salep arasında (karboksimetil selüloz hariç) önemli bir fark ($p < 0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Diğer TTK maddelerinde ise tespit edilen düzeyin LOD değerinin altında olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle belirtilen amino asidin salep ile karboksimetil selüloz hariç diğer TTK maddeleri arasındaki taklit ve tağşişin belirlenmesinde belirleyici nitelik taşıdığı düşünülmektedir.

Salep örneklerin lizin amino asidi sadece 3 örnekte LOD değerinin altında tespit edilirken geri kalan salep örneklerinde 3,36 ile 1275,05 mg/kg arasında değişen düzeylerde belirlenmiştir. Salepteki ortalama lizin düzeyi ($452,66 \pm 298,44$ mg/kg) açısından bakıldığında, tüm TTK maddelerindeki düzeyin salepteki ilgili amino asidinin düzeyinin en fazla 1/8’i kadar olduğu belirlenmiş ve salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında önemli bir fark ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür.

Benzer duruma sahip olan diğer amino asitte fenilalanin’dir. Fenilalanin amino asidi sadece 5 salep örneğinde LOD değerinin altında olduğu, geri kalan örneklerde 6,51 ile 2876,79 mg/kg aralığında değiştiği ve ortalama $335,25 \pm 449,49$ mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Fenilalanin düzeyi açısından tüm TTK maddelerindeki düzeyin salepteki ilgili amino asidinin düzeyinin en fazla 1/7’si olduğu belirlenmiş ve salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında (karboksimetil selüloz hariç) istatistiksel açıdan önemli bir fark ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür.

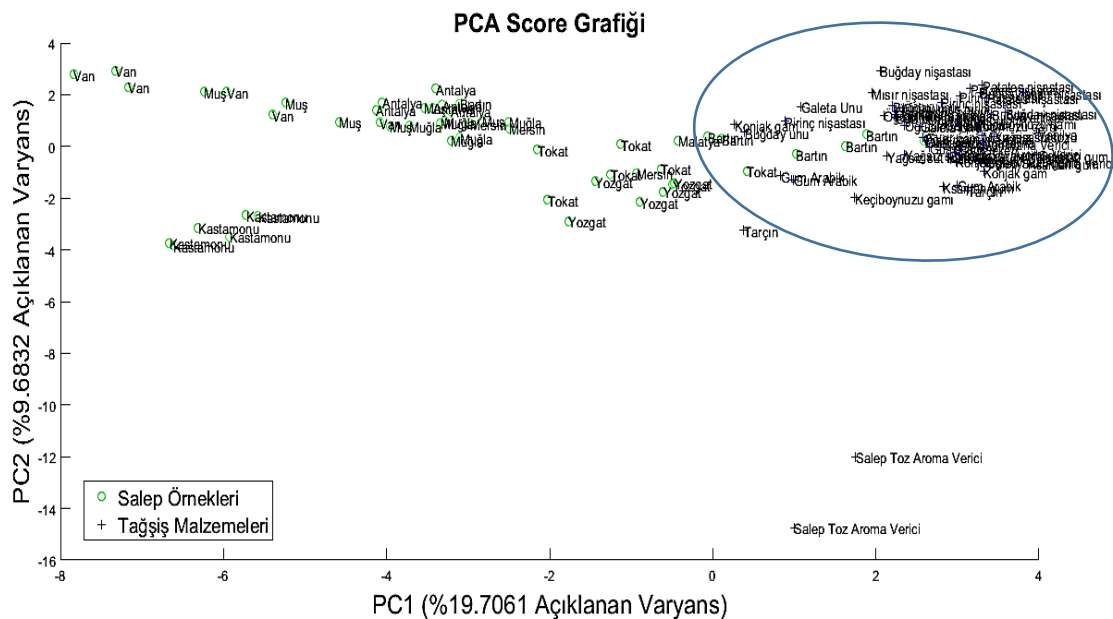
Arjinin amino asidi bakımından veriler incelendiğinde ise sadece 3 örnekte LOD değerinin altında olduğu belirlenirken geri kalan salep örneklerinde 36,80 ile 7169,55 mg/kg aralığında değişmekte olup, ortalama $2535,57 \pm 1903,90$ mg/kg düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Arjinin düzeyi açısından bakıldığında salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında (karboksimetil selüloz hariç) istatistiksel açıdan önemli bir fark ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde bahsi geçen treonin, histidin, lizin, fenilalanin ve arjinin amino asitleri kullanılarak salep ile TTK maddelerinin arasındaki taklit ve tağşişin belirlenmesinde kullanılabilecek bir belirteç olabileceği sonucuna varılmıştır.

4.4. Kemometrik Yöntemler

Kimyasal analizlerden elde edilen veriler birlikte değerlendirilerek saf salep ve TTK maddelerinin çok değişkenli yönlendirmesiz (temel bileşenler analizi (PCA)) ve yönlendirmeli (kısmi en küçük kareler ayırıcı analizi (PLS-DA)) sınıflandırma metodlarıyla tespit edilmesine yönelik modellemeler yapılmıştır. Değerlendirmeler sonrasında önemli olduğu tespit edilen parametreler üzerinden en uygun metot kombinasyonunun tespit edilmesi çalışması gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmaları

Bu yöntemler verinin geneli hakkında bilgi edinmeye ve eğer mevcutsa örneğin taklit malzemeleri ve saf salep arasında kolayca gözlenen bir ayrışma olup olmadığının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu bağlamda sıkça kullanılan temel bileşen analizi (PCA) metoduyla veriler incelenmiştir. Şekil 4.8’de salep örneklerine ve TTK maddelerine uygulanan PCA analiz sonuçları gösterilmektedir. İlgili şekilde X eksenini en çok varyansı açıklayan ilk temel bileşeni, Y eksenini ise en çok varyansı açıklayan ikinci temel bileşeni temsil etmektedir.

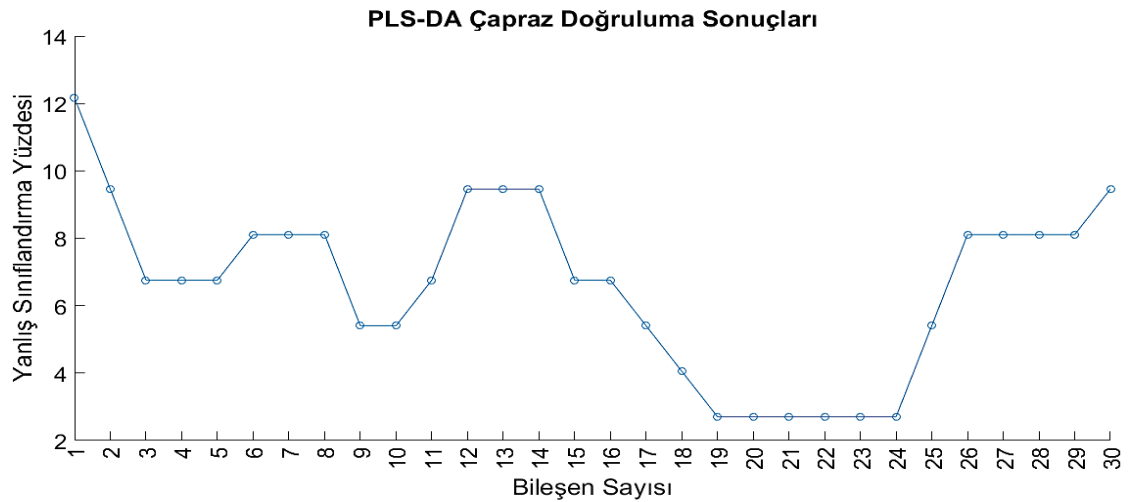


Şekil 4.8. Salep örnekleri ve taklit/tağşiş maddelerine uygulanan PCA sonuçları

Şekil 4.8'e göre, sırasıyla X eksenini toplam varyansın % 19,71'ini ve Y eksenini % 9,69'unu olmak üzere bu PCA projeksiyonu toplamda varyansın % 29,40'ını açıklamaktadır. Örneklerin dağılımı incelendiğinde 2 boyutta verideki varyansın ancak % 29,40'ının açıklanabilmesine karşın taklit malzemeleri ile saf salep örnekleri arasında bir ayrışma olduğu çoğu örnek için gözlemlenebilmektedir. Taklit malzemeleri kendi içlerinde bir kümelenme göstermese de çoğu saf salep örneğinin, özellikle Van, Muş, Kastamonu, Antalya, Muğla, Mersin, Yozgat ve Tokat'tan alınan salep örneklerinin kendi içlerinde kümelendiği görülmektedir.

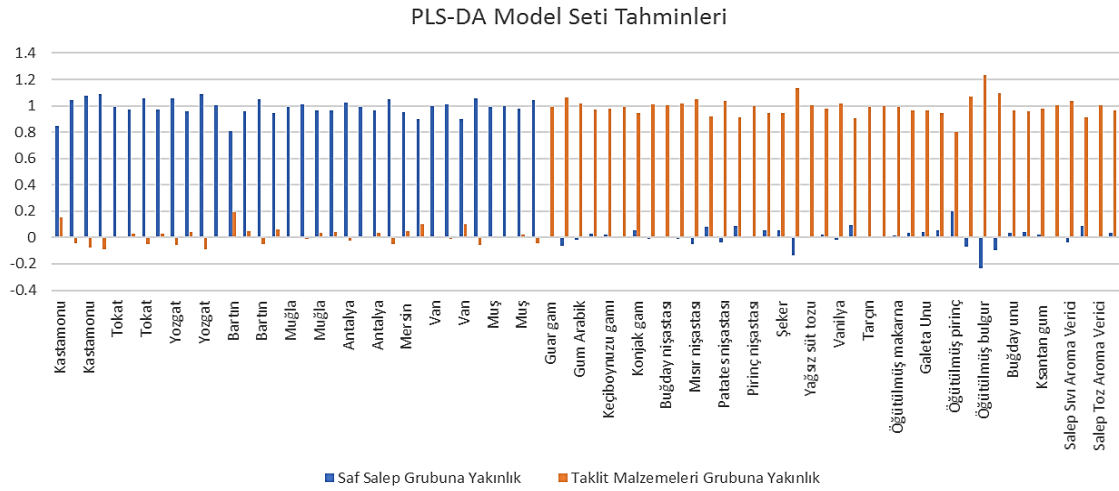
4.4.2. Yönlendirmeli sınıflandırma çalışmaları

Örneklerin kimyasal analizleri kullanılarak TTK maddelerinin ayırt edilmesini sağlayacak yönlendirmeli sınıflandırma çalışmalarında kısmi en küçük kareler ayırıcı analizi (PLS-DA) kullanılmıştır. Tüm PLS tabanlı algoritmalarda olduğu gibi PLS-DA'de de bileşen sayısının seçilmesi modelleme için gerekmektedir ve bu amaçla en tutarlı bileşen sayısı seçme yöntemlerinden biri olan tek örneği dışarıda bırakan çapraz doğrulama model setine uygulanmış ve sonuçları Şekil 4.9'da sunulmaktadır.

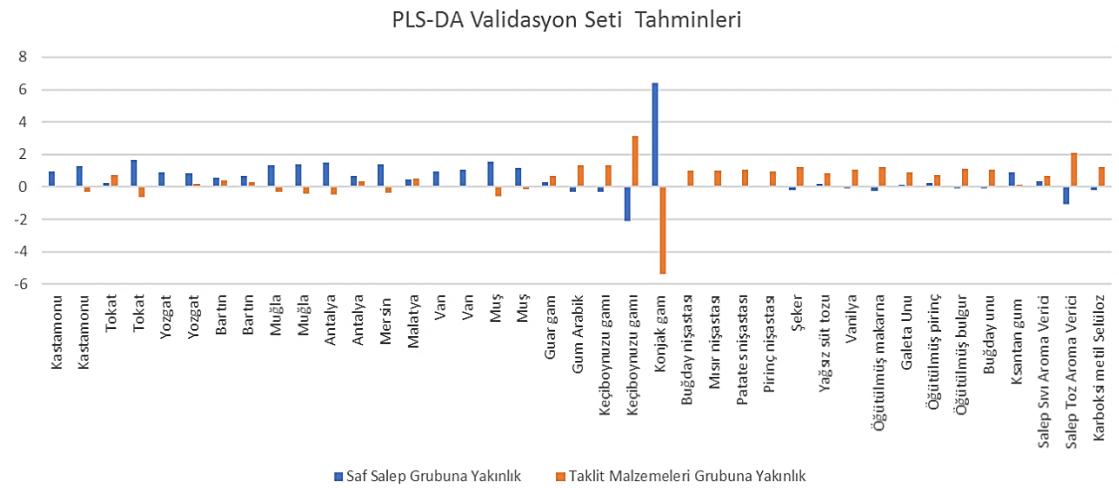


Şekil 4.9. Çapraz doğrulama ile elde edilen yanlış sınıflandırma yüzdesine karşılık bileşen sayısı sonuçları

Bileşen sayısı Şekil 4.9'a bakarak en düşük sınıflandırma hatasına tekabül eden en küçük bileşen sayısı olan 19 olarak seçilmiştir. Ardından 19 bileşen ile kurulan nihai PLS-DA modeli ile model setinin kendisi ve validasyon seti tahmin ettirilmiştir, sonuçlar model seti için Şekil 4.10'da, validasyon seti için Şekil 4.11'de sunulmaktadır.



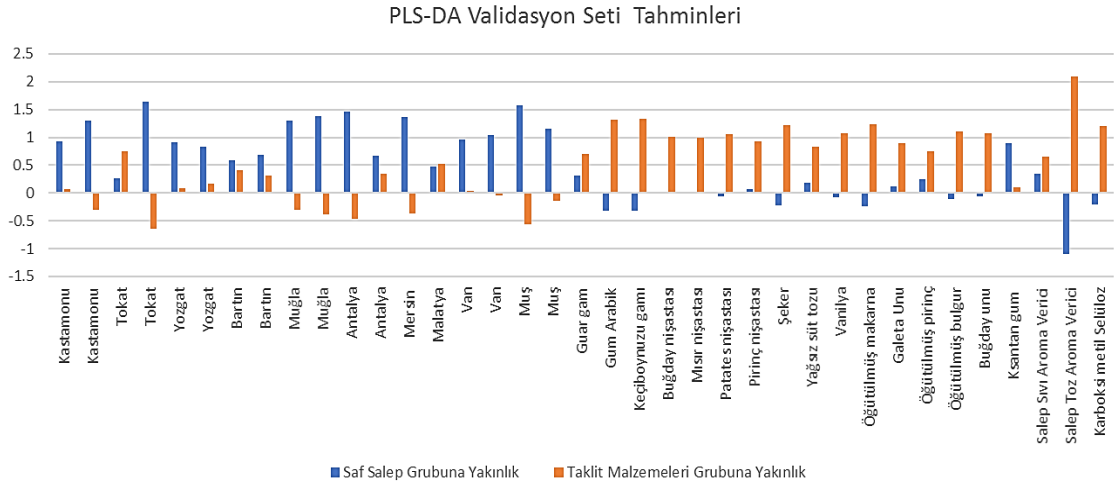
Şekil 4.10. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile model setinin tahmin sonuçları



Şekil 4.11. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile validasyon setinin tahmin sonuçları

PLS-DA sonuçları her bir örnek için incelendiğinde model seti için % 100 tahmin başarısı elde edildiği tespit edilmiştir. Ancak validasyon tahminlerinde normalde 0 ile 1 arasında olması beklenen gruba yakınlık değerlerinin çok daha küçük ya da çok daha büyük değerler almasına bakılarak konyak sakız ve keçiyoynuzu sakızının sapan değerler olduğu ya da iyi modellenemediği söylenebilmektedir. Modellemede sorun oluşturma ihtimali bulunan bu maddeler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen grafik şekil 4.12’de sunulmaktadır.

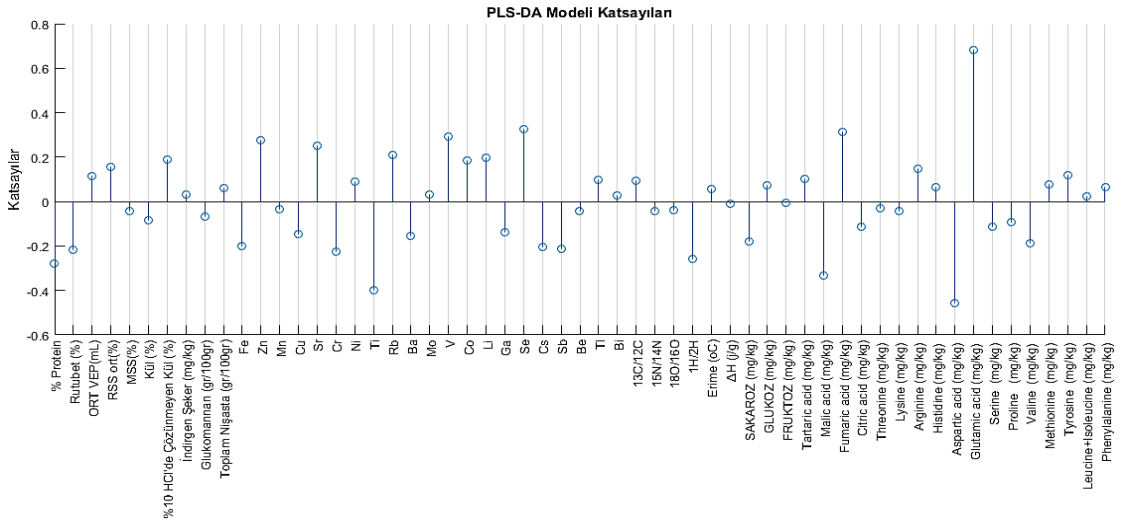
Şekil 4.12 incelendiğinde sadece Malatya’dan alınan salep örneğinin ve ksantan sakızın yanlış sınıflandırıldığı görülmüştür. Çıkarılan örnekler de dahil olmak üzere validasyon tahminleri % 89,7 doğruluk oranıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.12. Hatalı örnekler ayıklandıktan sonra elde edilen PLS-DA modeli ile validasyon tahminleri grafiği

4.4.3. TTK maddelerinin tespitine yönelik en uygun metot kombinasyonlarının belirlenmesi

Kimyasal analizlerin PLS-DA sınıflandırmasındaki etkileri karşılaştırılmak istendiğinde analizlere karşılık gelen katsayıların incelenmesi gerekmektedir. PLS-DA modelinden elde edilen, analizlere karşı sınıflandırmada kullanılan katsayılar grafiği şekil 4.13'te gösterilmiştir. Burada sayının işaretinden ziyade 0'a mutlak uzaklık dikkate alınmıştır. Ayrıca PLS-DA modellemesinde kullanılan girdi matrisinin (kimyasal analiz sonuçları) ve çıktı matrisinin (örneklerin hangi gruba ait olduğu bilgisinin ikili sistemde gösterildiği matris) normalize edildikten sonra modellenmesi katsayıları doğrudan birbirleriyle büyüklük olarak karşılaştırılabilir hale getirilmiştir.



Şekil 4.13. PLS-DA modelinden elde edilen, analiz adlarına karşı sınıflandırmada kullanılan katsayılar grafiği

Katsayılar incelendiğinde neredeyse tüm kimyasal analizlerin PLS-DA modelinde etkili olduğu, buna karşın elementel analiz ve özellikle aspartik asit ve glutamik asidin göreceli olarak daha yüksek etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan yönlendirmeli sınıflandırma modeli incelendiğinde neredeyse tüm analiz sonuçlarından faydalanılabildiği görülse de çalışmanın amacı olan daha az sayıda analiz ile aynı veya benzer sınıflandırma performansının yakalanması hedeflenmiştir. Bu nedenle yeteri kadar değişken içeren ve sınıflandırmaya katkısı önceki çalışmada da gözlemlenmiş olan anabilesenler analizleri, enzimatik analizler ve aletsel analizlerden elementel analizler, izotop analizleri, aminoasit analizleri ve organik asit analizleri her biri ile ayrı PLS-DA modelleri optimal bileşen sayıları (PRESS) seçilerek oluşturulmuştur. Çizelge 4.33'te analiz grupları ile PLS-DA kullanılarak yapılan modelleme çalışmalarının başarı oranları sunulmaktadır.

Çizelge 4.33. Analiz grupları ile PLS-DA kullanılarak yapılan modelleme çalışmalarının başarı oranları

Analiz grubu	Model seti doğru tahmin oranı (%)	Validasyon seti doğru tahmin oranı (%)
Amino asit analizleri	94,60	92,30
Elementel analizler	97,30	89,70
Enzimatik analizler	79,70	84,60
İzotop analizleri	79,70	79,50
Karbonhidrat bileşenleri	77,00	72,40
Organik asit analizleri	73,00	69,20
Anabilesen analizleri	66,20	69,20

Çizelge 4.33 incelendiğinde en yüksek validasyon seti tahmin başarısının % 92,30 ile aminoasit analizlerinin sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca elementel analizler ile de tüm analizler kullanılarak oluşturulan modeldeki başarıya ulaşılabilirdiği görülmüştür. Oluşturulan modellerde her bir analizin sınıflandırmaya katkısını incelemek amacıyla, standardize edilmiş veriye uygulanarak elde edilen ve kendi içinde karşılaştırılabilir. PLS-DA regresyon katsayıları çizelge 4.34'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.34'teki regresyon katsayıları incelendiğinde analizlerin katkılarında özellikle aminoasit analizlerindeki glutamik asit miktarının diğer analizlere göre oldukça baskın olarak sınıflandırmada etkisi olduğu görülmektedir. Ayrıca elementel analizler ile kurulan PLS-DA modeli ile ilişkili kısımda Zn, Cu, Sb, V, Mo ve Li elementlerinin, organik asit bileşenlerinden malik ve fumarik asidin ve enzimatik bileşenlerden ise glukomannanın öne çıktığı tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen kemometrik bulgular ile SPSS çalışmasında elde edilen bulguların paralellik gösterdiği ve bundan sonraki yapılacak olan karışımlardaki salep miktarının belirlenmesi çalışmalarının bu veriler göz önüne alınarak yapılması gerektiğine karar verilmiştir.

Çizelge 4.34. Her bir analiz grubuna ait kimyasal analiz sonuçlarının sınıflandırmaya katkılarını gösterir katsayılar

Elementel bileşen		Amino asit bileşenleri		Temel bileşenler		İzotop oranları		Organik asit bileşenleri		Karbonhidrat bileşenleri		Enzimatik bileşenler	
Parametre	Katkı	Parametre	Katkı	Parametre	Katkı	Parametre	Katkı	Parametre	Katkı	Parametre	Katkı	Parametre	Katkı
Zn	0,36	Glutamik asit	0,90	Rutubet	-0,24	¹ H/ ² H	-0,27	Malik asit	-0,71	Sakkaroz	0,21	Glukomannan	0,54
Cu	-0,29	Histidin	0,19	Kül	-0,43	¹³ C/ ¹² C	-0,25	Fumarik asit	0,61	Glikoz	0,02	Toplam Nişasta	0,21
Sb	-0,28	Serin	-0,18	%10 HCl'de Ç. Kül	0,31	¹⁸ O/ ¹⁶ O	0,15	Sitrik asit	-0,31	Fruktoz	-0,20		
V	0,27	Lisin	0,17	Protein	0,04	¹⁵ N/ ¹⁴ N	-0,15	Tartarik asit	-0,07				
Mo	-0,26	Aspartik asit	-0,16	İndirgen Şeker	0,09								
Li	0,24	Valin	-0,14										
Se	-0,19	Prolin	-0,13										
Fe	0,13	Fenilalanin	0,10										
Cr	0,13	Tirosin	-0,09										
Co	0,10	Lösin+İzolösin	-0,07										
Be	-0,10	Arjinin	0,02										
Tl	0,09	Treonin	0,02										
Ti	-0,07	Metiyonin	-0,00										
Ga	-0,06												
Ni	-0,05												
Ba	-0,04												
Mn	0,03												
Rb	-0,02												
Cs	-0,02												
Sr	0,02												
Bi	0,01												

4.5. Karışımlardaki Salep Miktarlarının Belirlenmesi Çalışmaları

Ticari piyasa örneklerine incelendiğinde, piyasalarda satılan salepleri 2 grup altında sınıflandırmak mümkündür. Bunlardan ilki, hazır tüketime sunulan toz paket veya sıvı salep içecekleri, bir diğeri ise doğal salep adı altında satılan tüketicilerin kendilerinin hazırlayacağı ürünlerdir. Hazır tüketime sunulan ürünlerin çoğunda kullanılan salep miktarlarının oldukça düşük düzeylerde olduğu (% 0-10 salep) görülmektedir. Diğer ticari piyasa örnekleri ise, saf salep (% 100 veya doğal salep) olarak ifade edilmekte ve bu şekilde satılmaktadır. Bu aşamada çizelge 3.4'te belirtilen şekilde 40 farklı oranda salep içecek şekilde hazırlanan reçetelerdeki salep miktarı ile istatistiksel ve kemometrik olarak önemli bulunan analitik parametreler (enzimatik analizler, elementel analizler, izotopik analizler, amino asit ve organik asit analizleri) arasındaki korelasyon ve doğrusallık incelenmiş ve elde edilen bulgular çerçevesinde kullanılacak olan yöntem veya yöntemler belirlenmiştir.

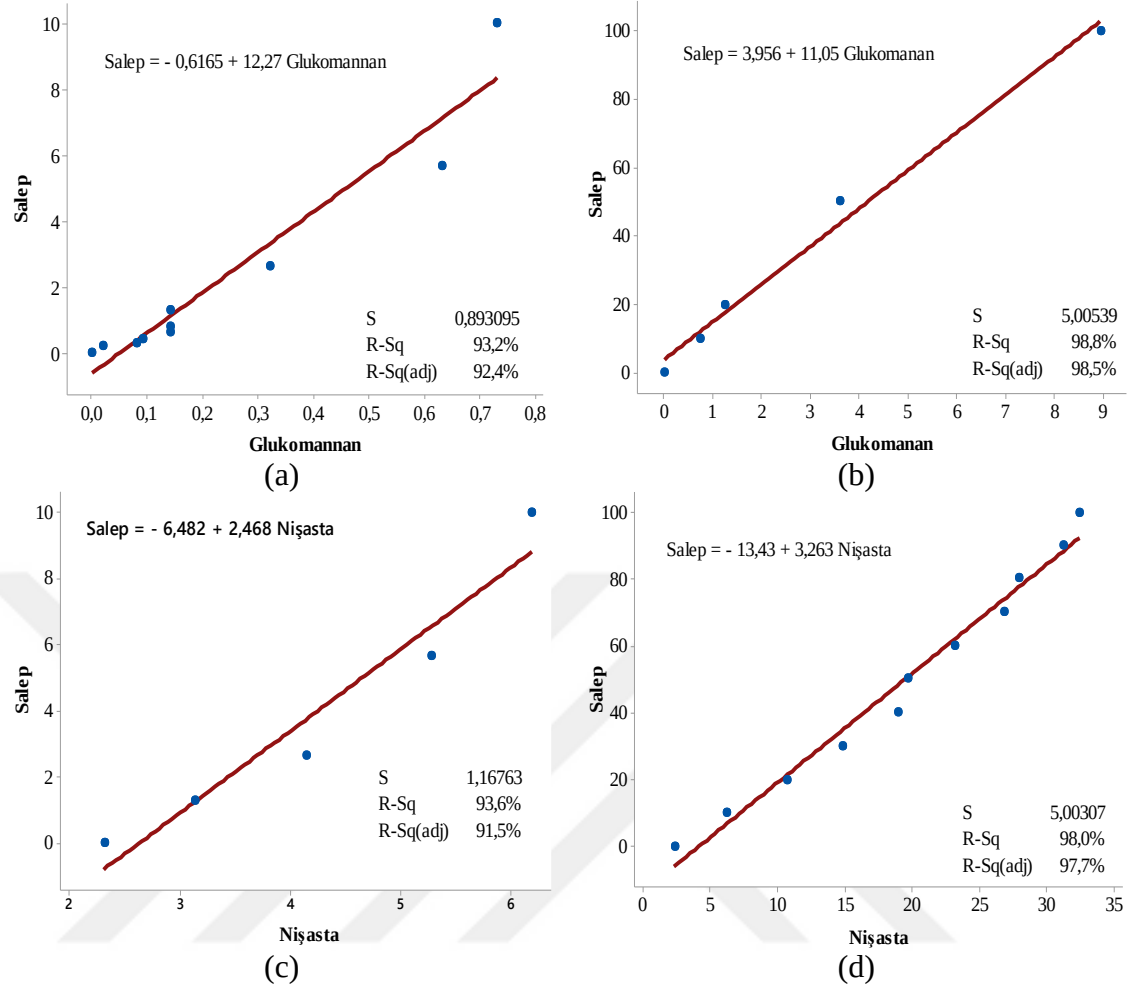
4.5.1. Enzimatik analizler

Salebin kimyasal yapısının büyük bir kısmının glukomannan ve nişastadan oluşması ve ayrıca salep ile TTK maddeleri arasında enzimatik analiz sonuçları istatistiksel açıdan önemli farklılıklar göstermesi, karışımlarda enzimatik analizlerin gerçekleştirilmesini elzem kılmaktadır. Çizelge 4.35'te hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile enzimatik bileşenler arasında tespit edilen korelasyon değeri sunulmaktadır. Sonuçlar % 0-10 oranında salep içeren ve % 0-100 oranında salep içeren karışım örnekleri şeklinde gruplandırılarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.35. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile enzimatik bileşenler arasındaki korelasyon

Enzimatik bileşen	Salep % 0-10		Salep % 0-100	
	Korelasyon	p- değeri	Korelasyon	p- değeri
Glukomannan	0,97	0,00	0,99	0,00
Toplam nişasta	0,97	0,00	0,99	0,00

Çizelge 4.35'ten elde edilen korelasyon değerlerine göre hem düşük ve yüksek salep konsantrasyonlarının her ikisinde de salep miktarı ile hem glukomannan hemde toplam nişasta değerleri arasında çok yüksek pozitif ($0,90 < r$) bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir değişle örnek içersindeki salep miktarına göre glukomannan ve toplam nişasta değerinin de arttığı ifade edilebilir. Şekil 4.14'te hazırlanan reçetelerdeki salep miktarı (% 0-10 ve % 0-100) ile karışımların glukomannan ve toplam nişasta düzeyine ait doğrusallığı gösteren grafikler sunulmaktadır.



Şekil 4.14. Salep içecek tozu reçetelerindeki % salep miktarları ile enzimatik analiz sonuçları arasındaki doğrusallık; **(a)** % 0-10 salep miktarları ile glukomannan, **(b)** % 0-100 salep miktarları ile glukomannan, **(c)** % 0-10 salep miktarları ile toplam nişasta, **(d)** % 0-100 salep miktarları ile toplam nişasta

Şekil 4.14'e göre, hem düşük hemde yüksek düzeyde gerçek salep içeren içecek toz karışımlarındaki salep oranları ile karışımların glukomannan düzeyleri arasında önemli düzeyde doğrusallığın ($R^2 \geq 0,93$) olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar ve istatistiksel incelemeler ile literatür bilgileri ışığında glukomannanın salep ile TTK maddeleri arasında en önemli ayırt edici madde olması, hazırlanmış olan karışım reçetelerinde de korelasyon ve regresyon değerlerinin yüksek olması salebin taklit ve taşışında glukomannan analizlerinin önemli bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır.

İlgili şekil incelendiğinde, yine salep ile nişasta düzeyleri arasında hem düşük salep ve hem de yüksek salep konsantrasyonlarında doğrusallığın yüksek olduğu ($R^2 \geq 0,93$) belirlenmiştir. Ancak salep örnekleri ile toplam nişasta arasında yüksek bir korelasyon elde edilmiş olmasına rağmen, karışımlardaki nişasta düzeylerinin belli bir salep yüzdesine kadar aynı olduğu ve belli bir salep yüzdesini geçtikten sonra doğrusal olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda aşılması gereken kritik eşik düzeyinin yaklaşık % 2 olduğu tespit edilmiştir.

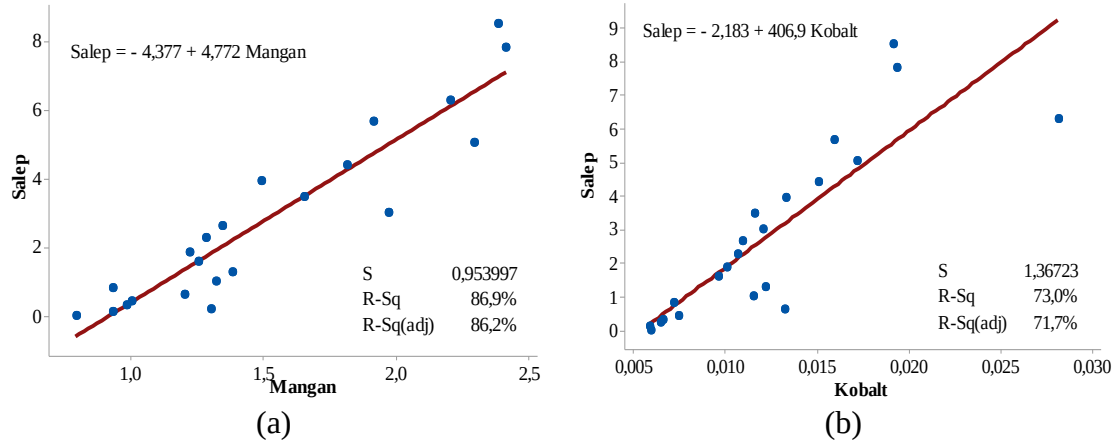
4.5.2. Aletsel analizler

Salebin taklit ve tağşişinin belirlenmesinde belirteç olabileceği düşünülen aletsel analizlerden elementel analizler, izotop analizler, organik asit ve amino asit analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elementel bulguların % 0-10 arasında salep içeren içecek tozu karışımlarının ile olan korelasyonu çizelge 4.36’da sunulmaktadır.

Çizelge 4.36. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen (% 0-10) salep miktarları ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon

Elementler	Korelasyon	p- değeri	Elementler	Korelasyon	p- değeri
Fe	0,66	0,00	Tl	0,55	0,01
Ba	0,63	0,00	Rb	-0,01	0,65
Mn	0,93	0,00	Ni	0,61	0,00
Cu	0,68	0,00	Zn	0,49	0,01
Sr	0,56	0,01	As	-0,40	0,05
Li	0,31	0,14	Cr	0,46	0,02
Cs	0,51	0,01	V	0,59	0,00
Al	0,24	0,26	Sb	0,10	0,64
Co	0,86	0,00	Ga	0,68	0,00
Se	-0,47	0,02	Bi	0,22	0,31
Be	0,35	0,09			

Çizelge 4.36’daki verilere göre, düşük düzeylerde gerçek salep içeren (% 0-10) salep içecek tozu karışımlarındaki salep yüzde oranları ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon incelendiğinde karışımlardaki mangan düzeyi ile salep arasında çok yüksek pozitif bir ilişkinin olduğu ($0,90 < r$) ve kobalt düzeyi ile salep arasında yüksek pozitif ilişkinin olduğu ($0,70 < r < 0,90$) tespit edilmiştir. Demir, baryum, bakır, stronsiyum, sezyum, talyum, nikel, çinko, vanadyum, galyum düzeyleri ile salep arasında orta düzeyde ($0,50 < r < 0,70$) pozitif bir ilişki tespit edilirken; selenyum ile salep arasında düşük düzeyde ($0,20 < r < 0,50$) negatif bir ilişki olduğu görülmektedir. Lityum, alüminyum, berilyum, rubidyum, arsenik ve antimuan düzeyleri ile salep arasında yapılan istatistiksel olarak yapılan değerlendirmede $p \geq 0,05$ olması sebebiyle değerlendirilmeye alınmamıştır. Elde edilen bilgilerden yola çıkılarak mangan ve kobalt elementleri ile salep arasında doğrusallığın incelenmesinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.15’te % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile karışımın mangan ve kobalt düzeylerine ait doğrusallığı gösteren grafikler sunulmaktadır.



Şekil 4.15. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren elementler arasındaki doğrusallık; **(a)** mangan, **(b)** kobalt

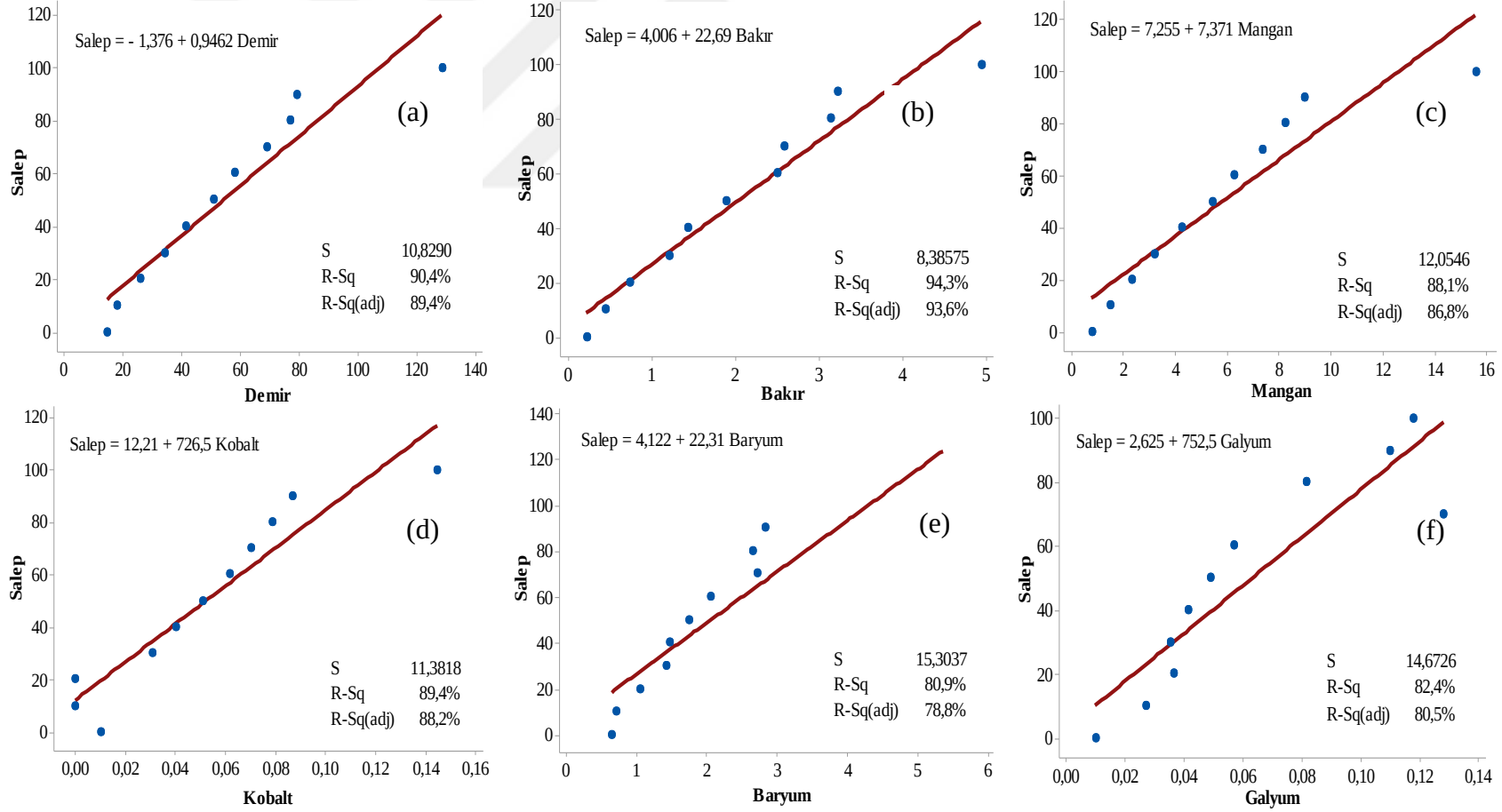
Şekil 4.15'e göre, mangan ve kobalt düzeyi ile salep arasında yüksek pozitif bir korelasyon tespit edilmesine rağmen doğrusallığın ($R^2 \leq 0,90$) düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenden dolayı, düşük düzeyde salep içeren örneklerde tek başına elementel bileşen değerlendirilerek salepte taklit ve taşışın belirlenmesinde etkili bir cevabın alınamayacağına karar verilmiştir.

Salep oranı % 0-100 arasında olan içecek tozu karışımlarındaki salep miktarı ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon çizelge 4.37'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.37. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen (% 0-100) salep miktarları ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon

Salep % 0-100					
Elementler	Korelasyon	p- değeri	Elementler	Korelasyon	p- değeri
Fe	0,95	0,00	Tl	0,55	0,08
Ba	0,90	0,00	Rb	0,21	0,53
Mn	0,94	0,00	As	0,09	0,80
Cu	0,97	0,00	Al	0,41	0,21
Sr	0,80	0,00	Sb	0,44	0,18
Li	0,61	0,05	Be	0,45	0,16
Cs	0,68	0,02	Bi	0,64	0,03
Ga	0,91	0,00	V	0,55	0,08
Co	0,95	0,00	Zn	0,51	0,11
Se	-0,68	0,00	Cr	0,84	0,00
Ni	0,75	0,01			

Çizelge 4.37'ye göre, % 0 ile % 100 arasında farklı oranlarda salep içeren reçetelerle oluşturulan kalibrasyon denkleğine göre karışımdaki salep oranları ile bakır, demir, kobalt, mangan, galyum ve baryum elementleri ile arasında yüksek pozitif ilişki ($0,90 < r$); stronsiyum, sezyum, nikel, krom elementleri ile orta düzeyde pozitif bir ilişki ($0,50 < r < 0,70$); selenyum düzeyi ile orta düzeyde negatif ilişki ($0,50 < r < 0,70$) olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.16'da salep oranı % 0-100 arasında olan içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile karışımın demir, bakır, mangan, baryum, kobalt ve galyum düzeyleri arasındaki değişimleri sunulmaktadır.



Şekil 4.16. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren elementler arasındaki doğrusallık; (a) demir, (b) bakır, (c) mangan, (d) kobalt, (e) baryum, (f) galyum

Şekil 4.16'ya göre demir ve bakır elementinin salep miktarı ile doğrusallıklarının yüksek olduğu ($R^2 \geq 0,90$) olduğu görülmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde yüksek miktarda salep içeriğine sahip toz içecek karışımlarında bu iki elementin incelenmesi durumunda salep ile TTK maddeleri arasında ayrımın yapılabileceği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, literatürde yer alan bilgilerde de, elementel içeriğin toprağa, meteorolojik koşullara ve gıdaların çeşidine bağlı olarak değişebileceğini ve bundan dolayı farklılıkların görülebileceği ifade edilmiştir (Sun 2008; Yücel vd. 2016). Diğer bir ifade ile elde edilen salebin farklı cins ve tür yumrularından oluşmasından dolayı kesin bir elementel bileşimden söz edilememektedir. Bundan dolayı da, yapılan istatistiksel çalışmalarda yüksek salep içeriğine sahip karışımlarda salep miktarı ile demir ve bakır elementi arasında yüksek korelasyon ve doğrusallık tespit edilmesine rağmen, kesin olarak "elementel bileşimden yola çıkarak salep ile TTK maddeleri arasında ayrımın yapılmasının mümkün olduğu" ifadesini kullanmanın doğru olmayacağı düşünülmektedir.

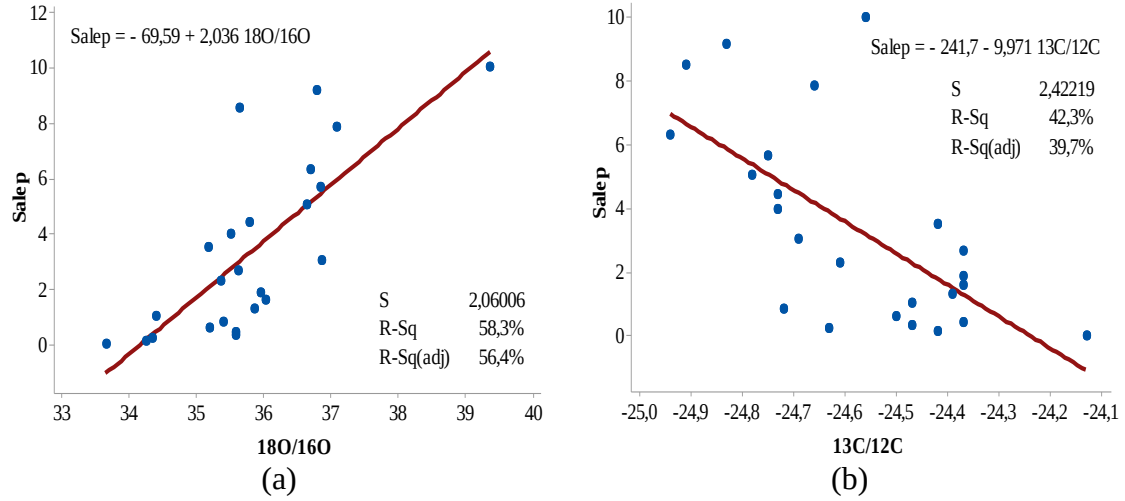
Hazırlanan karışımlardaki salep miktarları (%) ile izotop oranları arasındaki korelasyon çizelge 4.38'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.38. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile izotop oranları arasındaki korelasyon

İzotop oranı	Salep % 0-10		Salep % 0-100	
	Korelasyon	p- değeri	Korelasyon	p- değeri
$^1\text{H}/^2\text{H}$	-0,17	0,43	0,28	0,41
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,76	0,00	-0,47	0,15
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0,63	0,01	-0,62	0,04
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	-0,65	0,00	-0,99	0,00

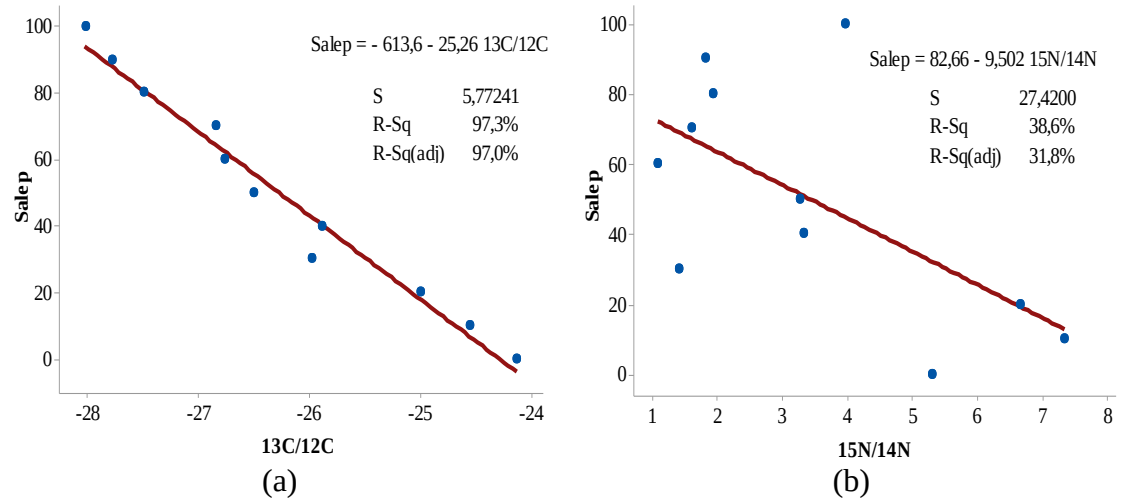
Çizelge 4.38'den elde edilen verilere göre, % 0-10 salep içeren karışımlardaki salep miktarı ile $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ izotop oranları arasında orta pozitif düzeyde ($0,50 < r < 0,70$) bir ilişki tespit edilirken; salep miktarı ile $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranı arasında negatif orta düzeyde ($0,50 < r < 0,70$) bir ilişki tespit edilmiştir. Salep miktarı ile $^1\text{H}/^2\text{H}$ izotop oranı arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede $p \geq 0,05$ olması nedeniyle değerlendirilmeye alınmamıştır.

İlgili çizelgede % 0-100 salep içeren karışımlardaki salep miktarı ile $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranı arasında çok yüksek negatif ($0,90 < r$) bir ilişki tespit edilirken; $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ izotop oranı arasında negatif orta düzeyde ($0,50 < r < 0,70$) bir ilişki tespit edilmiştir. Salep miktarı ile $^1\text{H}/^2\text{H}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ izotop oranları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede $p \geq 0,05$ olması nedeniyle değerlendirilmeye alınmamışlardır. Salep miktarları % 0-10 olan karışımlardan elde edilen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranlarına ait doğrusallığı gösteren grafikler şekil 4.17'de sunulmaktadır.



Şekil 4.17. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren izotop oranları arasındaki doğrusallık; (a) $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranları, (b) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranları

$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranları ile salep arasında bir korelasyon tespit edilmesine rağmen doğrusallığın ($R^2 < 0,60$) düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenden dolayı, düşük düzeyde salep içeren örneklerde tek başına izotop oranlarına bakılarak salepte taklit ve tağşişin belirlenmesinde etkili bir cevabın alınamayacağına karar verilmiştir. Salep miktarları % 0-100 olan karışımlardan elde edilen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ve $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranlarına ait doğrusallığı gösteren grafikler Şekil 4.18’de sunulmaktadır.



Şekil 4.18. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren izotop oranları arasındaki doğrusallık; (a) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranları, (b) $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranları

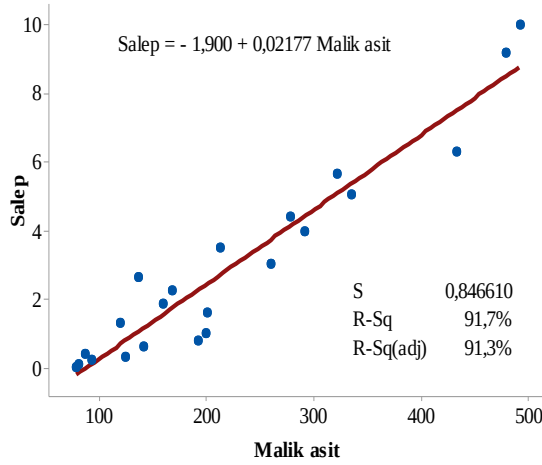
Şekil 4.18'ye göre, % 0-100 arasında salep içeren karışımlarda salep ile $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranı değişimi arasında yüksek bir doğrusallığın ($R^2 \geq 0,90$) olduğu tespit edilmiştir. Salep ve TTK maddelerinin ayrı ayrı izotop oranları analizleri sırasında yapılan istatistiksel çalışmalarda da konyak sakız, patates nişastası, pirinç nişastası, katı ve sıvı salep aroması hariç olmak üzere diğer TTK maddelerinden istatistiksel anlamda farklılıklar arz ettiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu farklılığın tespit edilmesinin en önemli sebebi, farklı fotosentez grubunda içerisinde yer alması veya aynı fotosentez grubu içerisinde yer alsa bile delta değerinin farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır. Tüm yapılan incelemeler doğrultusunda salep ile TTK maddeleri arasında ayırımı $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranlarının bir belirteç olarak kullanılabileceği, ancak çizelge 4.38 ve şekil 4.17'den elde edilen bilgiler göz önüne alındığında karışımlardaki $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranlarının belli bir salep yüzdesine kadar aynı olduğu ve belli bir salep yüzdesini geçtikten sonra doğrusallık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda aşılması gereken kritik eşik düzeyinin yaklaşık % 9 olduğu tespit edilmiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde salep ve TTK maddeleri arasında ayırımı $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotop oranları kullanılacaksa % 9 ve üzerinde salep içeren karışımlarda veya saf salep olduğu bildirilen örneklerde kullanılmasının doğru olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen organik asit bulguların karışımlardaki yüzde salep miktarları ile olan korelasyonu ise çizelge 4.39'da sunulmaktadır.

Çizelge 4.39. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile elementel bileşenler arasındaki korelasyon

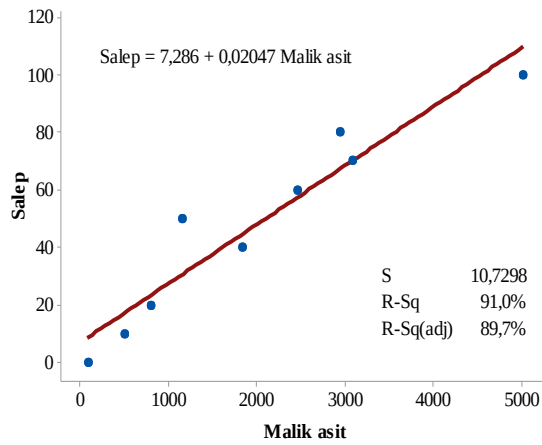
Elementler	Salep % 0-10		Salep % 0-100	
	Korelasyon	p- değeri	Korelasyon	p- değeri
Tartarik A.	-0,21	0,36	0,59	0,13
Sitrik A.	0,01	0,97	-0,42	0,27
Malik A.	0,96	0,00	0,95	0,00
Fumarik A.	0,23	0,30	0,95	0,00

Çizelge 4.39'daki verilere göre, % 0-10 oranında salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki salep oranları ile malik asit düzeyi arasında çok yüksek korelasyon ($0,90 < r$) olduğu tespit edilmiştir. Aynı çizelgeye göre, salep miktarı ile sitrik, tartarik ve fumarik asit düzeyleri arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede $p \geq 0,05$ olması nedeniyle değerlendirilmeye alınmamışlardır. İlgili çizelgede, % 0-100 oranında salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki salep oranları ile malik asit ve fumarik asit düzeyleri arasında çok yüksek korelasyon ($0,90 < r$) olduğu tespit edilmiştir. Salep miktarı ile sitrik ve tartarik asit düzeyleri arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede $p \geq 0,05$ olması nedeniyle değerlendirilmeye alınmamışlardır. % 0-10 oranında salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki malik asit düzeylerindeki değişimin karışıma ilave edilen salep miktarı ile olan doğrusallığı gösteren grafik şekil 4.19'da sunulmaktadır.

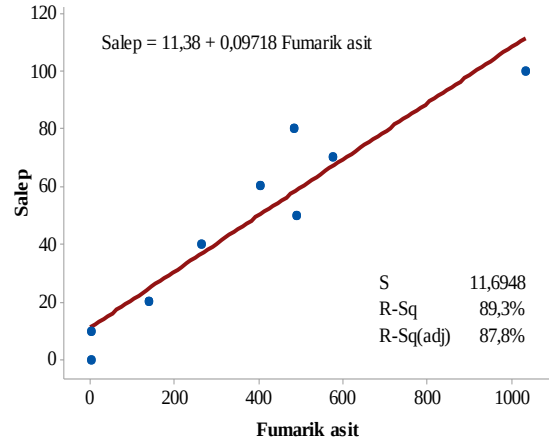


Şekil 4.19. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile malik asit arasındaki doğrusallık

Çizelge 4.39 ve şekil 4.19’den elde edilen bilgiler doğrultusunda, organik asit bileşenleri ve salep miktarları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, % 0-10 oranında salep içeren salep içecek tozu karışımları ile malik asit düzeyi arasında ilave edilen salep miktarına bağlı olarak doğrusal bir artışın olduğu ($R^2 \geq 0,91$) dikkat çekmektedir. Bundan dolayı, düşük miktarda salep içeren ticari salep içecek tozu karışımında malik asit düzeylerinin, salep taklit ve taşımasını belirlemede önemli bir parametre olabileceği sonucuna varılmıştır. % 0-100 oranında salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki malik ve fumarik asit düzeylerindeki değişimin karışıma ilave edilen salep miktarı ile olan doğrusallığı gösteren grafikler şekil 4.20’de sunulmaktadır.



(a)



(b)

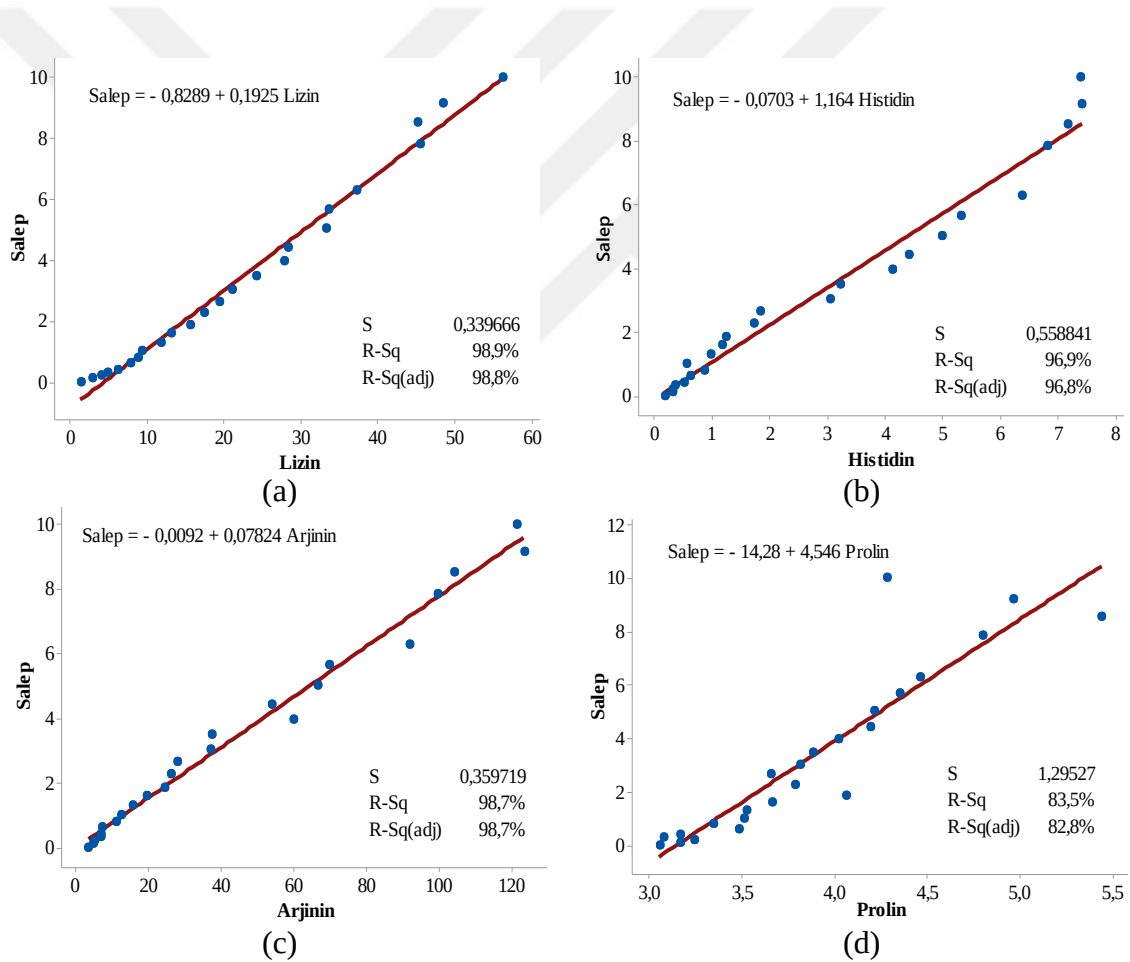
Şekil 4.20. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren organik asitler arasındaki doğrusallık; (a) malik asit, (b) fumarik asit

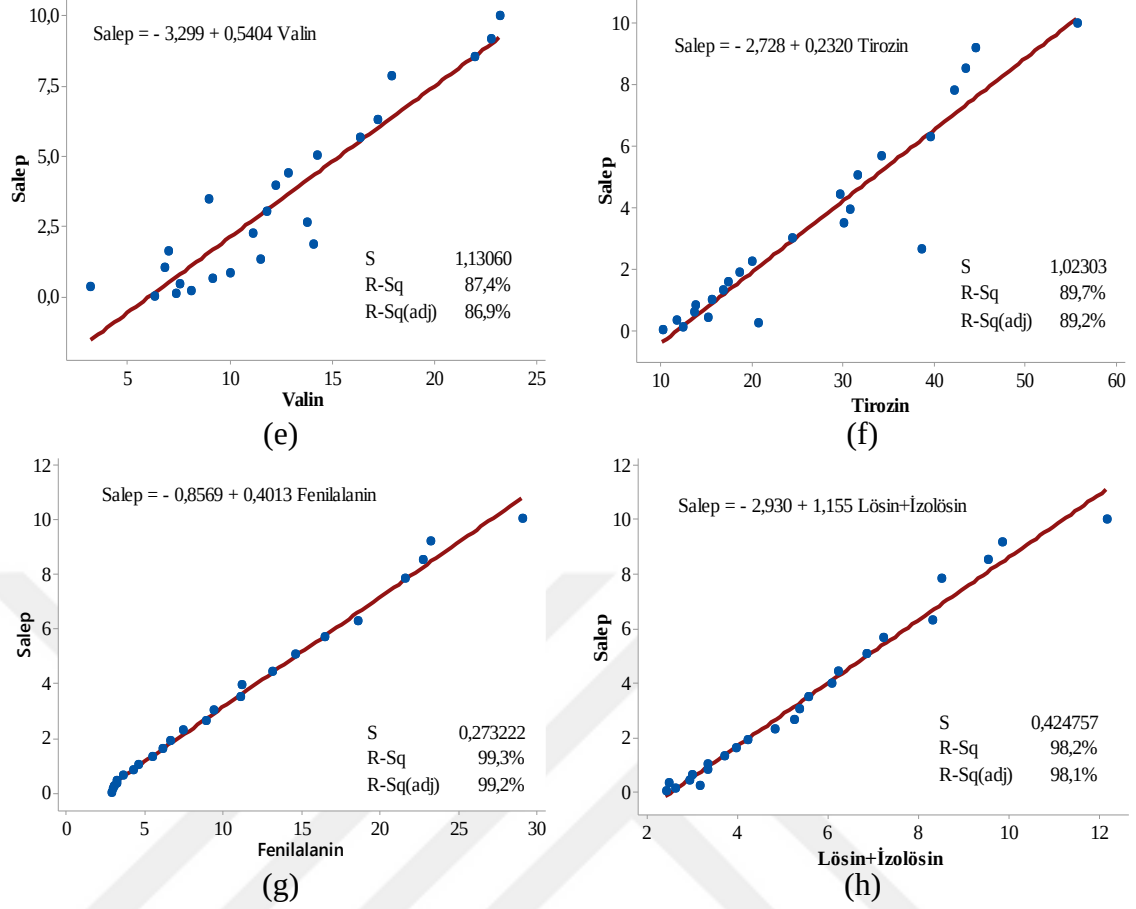
Şekil 4.20’ye göre, % 0-100 oranında salep içeren salep içecek tozu karışımları ile malik asit düzeyi arasında ilave edilen salep miktarına bağlı olarak doğrusal bir artışın olduğu ($R^2 = 0,91$) dikkat çekmektedir. Amino asit bulgularının karışımlardaki salep miktarları ile olan korelasyonu ise çizelge 4.40’da sunulmaktadır.

Çizelge 4.40. Hazırlanan salep içecek tozu karışımlarına ilave edilen salep miktarları ile amino asitler arasındaki korelasyon

Salep % 0-10			Salep % 0-100		
Amino asit	Korelasyon	p-değeri	Amino asit	Korelasyon	p-değeri
Arjinin	0,99	0,00	Arjinin	1,00	0,00
Metiyonin	0,65	0,00	Metiyonin	0,95	0,00
Fenilalanin	1,00	0,00	Fenilalanin	1,00	0,00
Tirozin	0,95	0,00	Tirozin	0,99	0,00
Histidin	0,99	0,00	Histidin	0,98	0,00
Lösin+İzolösin	0,99	0,00	Lösin+İzolösin	1,00	0,00
Valin	0,94	0,00	Valin	1,00	0,00
Lizin	0,99	0,00	Lizin	1,00	0,00
Aspartik Asit	0,04	0,85	Serin	0,87	0,00
Serin	-0,22	0,13	Treonin	0,99	0,00
Glutamik Asit	0,53	0,01	Glutamik Asit	0,98	0,00
Prolin	0,91	0,00	Prolin	0,99	0,00
Sistein	-0,16	0,40	Aspartik Asit	0,96	0,00
Treonin	-0,26	0,16			

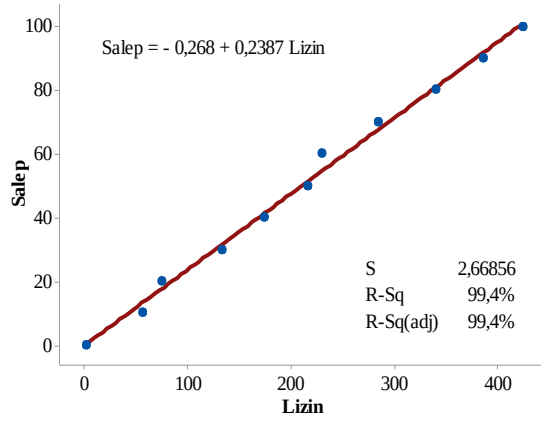
Çizelge 4.40'daki verilere göre, % 0-10 oranında gerçek salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki salep oranları ile amino asit bileşenleri arasındaki korelasyon incelendiğinde; arjinin, fenilalanin, lösin+izolösin, lizin, histidin, tirozin, prolin ve valin amino asitleri ile yüksek pozitif ($0,70 < r < 0,90$) bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Salep ile metiyonin ve glutamik asit arasında orta düzeyde ($0,50 < r < 0,70$) pozitif bir ilişki tespit edilirken, aspartik asit, serin, sistein ve treonin düzeyleri arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede $p \geq 0,05$ olması nedeniyle değerlendirilmeye alınmamışlardır. % 0-10 oranında gerçek salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki salep oranları ile amino asit bileşenleri arasındaki korelasyon incelendiğinde ise sistein hariç tüm amino asit değerlerinde salep miktarının artmasıyla birlikte bir artış olduğu yani çok yüksek ($0,90 < r$) pozitif bir ilişkinin söz konusu olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.21'de % 0-10 oranında gerçek salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki salep miktarları ile karışımdaki lizin, histidin, arjinin, prolin, valin, tirozin, lösin+izolösin ve fenilalanin düzeyleri arasındaki doğrusallığı gösteren grafikler sunulmaktadır.



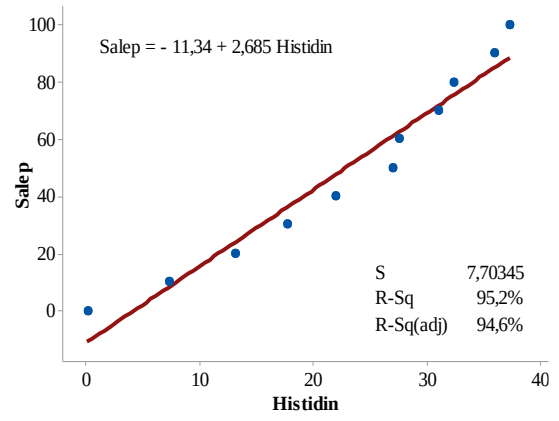


Şekil 4.21. % 0-10 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren amino asit arasındaki doğrusallık; (a) lizin, (b) histidin, (c) arjinin, (d) prolin, (e) valin, (f) tirozin, (g) fenilalanin, (h) lösin+izolösin

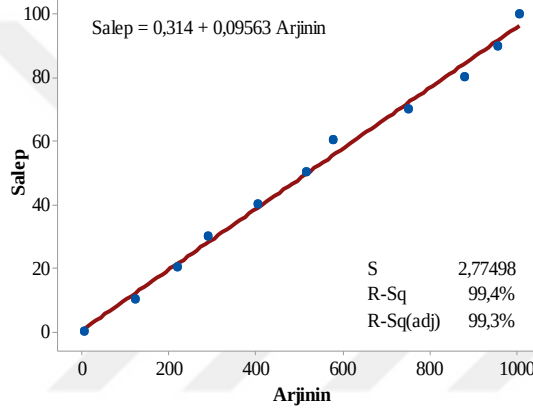
Şekil 4.21’de sunulan verilere göre, ticari salep içecek tozu reçetelerine eklenen salep miktarına bağlı olarak % 0-10 aralığında gerçek salep içeren karışımlarda lizin, histidin, arjinin, lösin + izolösin ve fenilalanin amino asit düzeyleri ile doğrusal ($R^2 \geq 0,98$) bir artışın bulunduğu tespit edilmiştir. Salep ile TTK maddelerin ayrı ayrı yapılmış olan amino asit çalışmalarında, TTK maddelerinin çoğunun toplam protein içeriğinin iz düzeyde olması nedeniyle amino asit yönünden LOD düzeyinin altında değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, çizelge 4.32’de veriler değerlendirildiğinde çoğu TTK maddesi ile salep örnekleri arasında yukarıda adı geçen 5 amino asit bakımından istatistiksel farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Tüm veriler değendirildiğinde, % 0-10 aralığında gerçek salep içeren karışımlarda amino asit düzeyine bakılarak salepte taklit ve tağşişin belirlenmesinde kullanılabilecek bir belirteç olduğuna karar verilmiştir. Şekil 4.22’de ise % 0-100 oranında gerçek salep içeren salep içecek tozu karışımlarındaki salep miktarları ile karışımdaki lizin, histidin, arjinin, aspartik asit, prolin, treonin, glutamik asit, serin, valin, metiyonin, tirozin, lösin + izolösin ve fenilalanin düzeyleri arasındaki doğrusallığı gösteren grafikler sunulmaktadır.



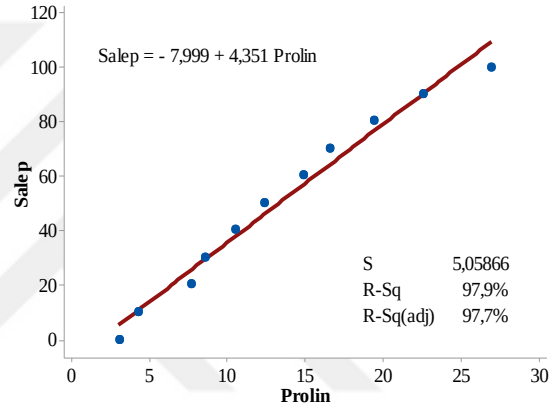
(a)



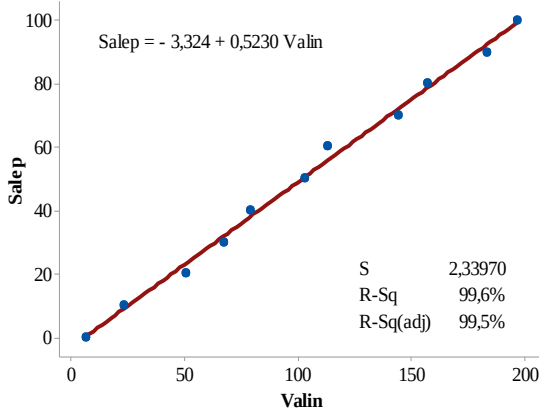
(b)



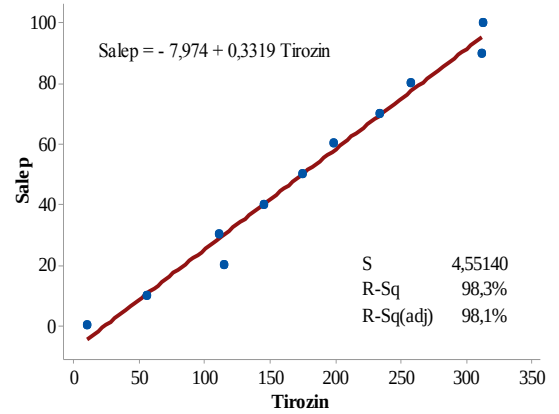
(c)



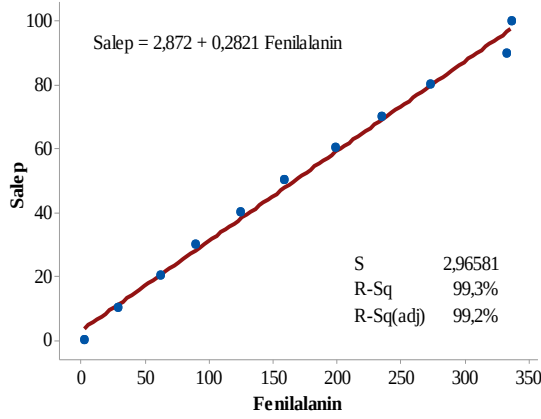
(d)



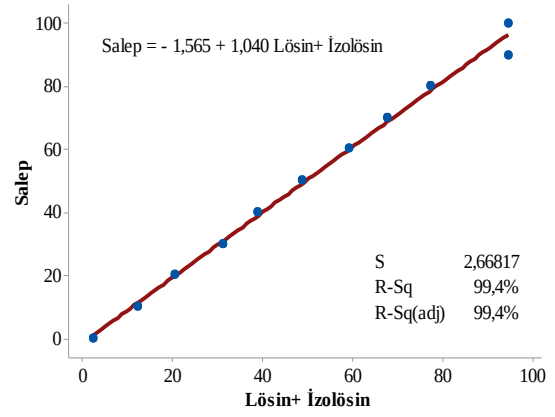
(e)



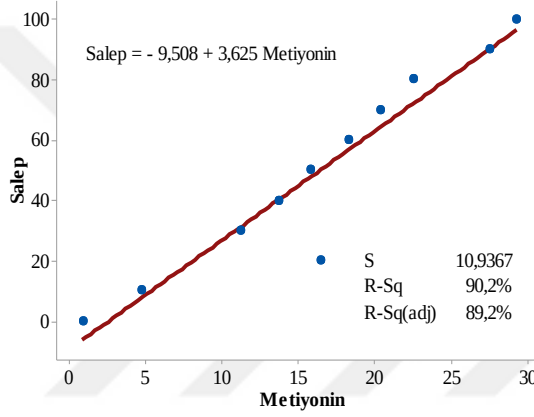
(f)



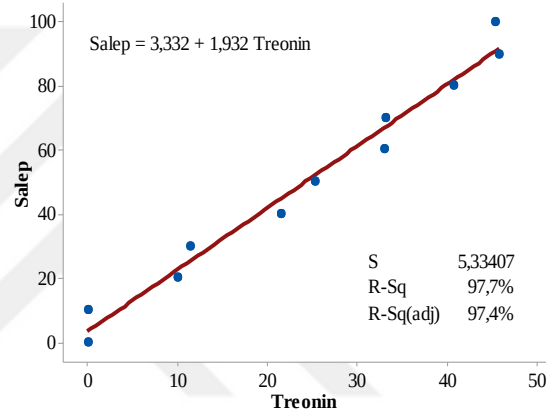
(g)



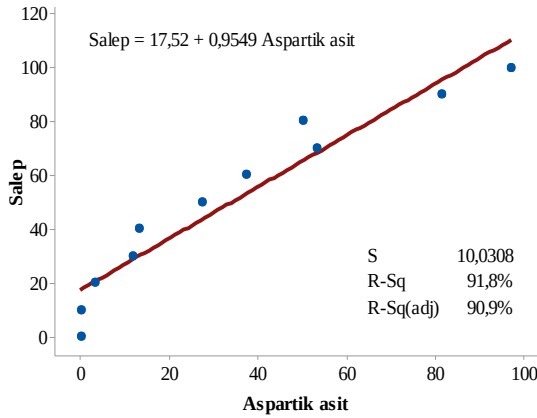
(h)



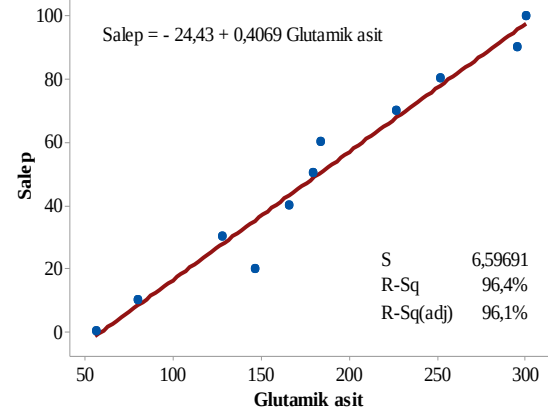
(j)



(k)



(l)



(m)

Şekil 4.22. % 0-100 salep içeren içecek tozu karışımındaki gerçek salep miktarı ile yüksek korelasyon gösteren amino asit arasındaki doğrusallık; **(a)** lizin, **(b)** histidin, **(c)** arjinin, **(d)** prolin, **(e)** valin, **(f)** tirozin, **(g)** fenilalanin, **(h)** lösin+izölösın, **(j)** metiyonin, **(k)** treonin, **(l)** aspartik asit, **(m)** glutamik asit

Şekil 4.22’de sunulan verilere göre, ticari salep içecek tozu reçetelerine eklenen salep miktarına bağlı olarak % 0-100 gerçek salep içeren karışımlarda lizin, histidin, arjinin, aspartik asit, prolin, treonin, glutamik asit, valin, metiyonin, tirozin, lösin+izolösin ve fenilalanin amino asitleri düzeyleri ile doğrusal ($R^2 \geq 0,90$) bir artışın bulunduğu tespit edilmiştir. Bu kapsamda adı geçen amino asitlerin salebin taklit ve tağşişin belirlenmesinde kullanılabilecek bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır.

4.5.3. Salep miktarlarının belirlenmesinde kullanılacak yöntemin seçimi

Homojen toz karışımlardaki salep miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda en yüksek korelasyon ($r \geq 0,90$) ve regresyon değerine sahip ($R^2 \geq 0,90$) parametreler dikkate alınarak piyasa izleme çalışmalarında kullanılacak yöntemle karar verilmiştir. % 0-10 aralığında gerçek salep içeren karışımlar için korelasyon ve regresyon katsayıları $\geq 0,90$ olan parametreler ve bu parametreler ait elde edilen korelasyon ve regresyon katsayıları çizelge 4.41’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.41. % 0-10 oranında salep içeren karışımlarda yüksek korelasyon ve regresyon değeri tespit edilen parametreler ve bu parametrelere ait katsayıları

% 0-10 salep					
Parametre	r	R ²	Parametre	r	R ²
Fenilalanin	1,00	0,99	Toplam nişasta	0,97	0,94
Lizin	0,99	0,99	Glukomannan	0,97	0,93
Arjinin	0,99	0,99	Malik A.	0,96	0,92
Lösin + İzolösin	0,99	0,98	Tirozin	0,95	0,90
Histidin	0,99	0,97			

Çizelge 4.41’den elde edilen bilgiler sonucunda, % 0-10 oranında salep içeren karışımlarda yüksek düzeyde korelasyonun ($r \geq 0,90$) ve doğrusallığın ($R^2 \geq 0,90$) sırasıyla amino asit (fenilalanin, lizin, arjinin, lösin + izolösin, ve histidinin) analizleri ve enzimatik (glukomannan ve toplam nişasta) analizler ve organik asit (malik asit) analiziden sağlandığı tespit edilmiştir. % 0-100 aralığında gerçek salep içeren karışımlar için korelasyon ve regresyon katsayıları $\geq 0,90$ olan parametreler ve bu parametreler ait korelasyon ve regresyon katsayıları çizelge 4.42’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.42. % 0-100 oranında salep içeren karışımlarda yüksek korelasyon ve regresyon değeri tespit edilen parametreler ve bu parametrelere ait katsayıları

% 0-100 salep					
Parametre	r	R ²	Parametre	r	R ²
Valin	1,00	1,00	Prolin	0,99	0,98
Lösin+İzolösin	1,00	0,99	¹³ C/ ¹² C	-0,99	0,97
Arjinin	1,00	0,99	Glutamik Asit	0,98	0,96
Lizin	1,00	0,99	Histidin	0,98	0,95
Fenilalanin	1,00	0,99	Aspartik A.	0,99	0,92
Glukomannan	0,99	0,99	Bakır	0,97	0,94
Tirozin	0,99	0,98	Malik A.	0,95	0,91
Toplam nişasta	0,99	0,98	Demir	0,95	0,90
Treonin	0,99	0,98	Metiyonin	0,95	0,90

Çizelge 4.42'ye göre, % 0-100 oranında salep içeren karışımlarda ise yüksek düzeyde korelasyonun ($r \geq 0,90$) ve doğrusallığın ($R^2 \geq 0,90$) sırasıyla amino asit (valin, lösin + izolösin, arjinin, lizin, fenilalanin, tirozin, treonin, prolin, glutamik asit, histidin, aspartik asit ve metiyonin) analizleri ve enzimatik (glukomannan ve toplam nişasta) analizler, izotop oranı ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) analizi, elementel bileşen (bakır, demir) analizleri ve organik asit (malik asit) analizinden sağlandığı tespit edilmiştir.

Tüm veriler değerlendirildiğinde, hem tüketime hazır ticari toz salep karışımlarında hemde saf salep olduğu bildirilen örneklerdeki % salep miktarının belirlenmesinde glukomannan içeriğini analiz edilmesi gerektiğine karar verilmiştir. Glukomannan analizinin seçilmesindeki başlıca önemli nedenler;

- Glukomannanın salep bileşiminde yer alan en yüksek miktara sahip bileşen olması,
- Türkiye'deki salep örnekleri arasında glukomannan değerlerinin bölgeler arası istatistiksel açıdan bir farklılık göstermemesi nedeni ile ülkemiz salep profiline yönelik standart değerleri yansıtmakta olması ($0,05 < p$),
- İstatiksel olarak salep ile TTK maddelerinin neredeyse hepsi ile önemli düzeyde farklılıkların tespit edilmesi ($p < 0,05$),
- % 0-10 oranında gerçek salep içeren karışım reçetelerinde korelasyonun ($r \geq 0,97$) ve doğrusallığın ($R^2 \geq 0,93$) olması,
- % 0-100 oranında gerçek salep içeren karışım reçetelerinde korelasyonun ($r \geq 0,99$) ve doğrusallığın ($R^2 \geq 0,99$) olması,
- Oluşturulan karışım reçetelerinden elde edilen veriler değerlendirilirken çizelge 4.41 ve çizelge 4.42'de yer alan diğer parametrelere ait verilere kıyasla sonuçların daha tutarlılık göstermesi ve salep miktarının belirlenebilmesi için aşılması gereken bir kritik değerinin olmaması,
- LC-MS/MS, IR-MS, ICP-MS, Orbitrap-MS gibi belirtilen sistemlerin oldukça yüksek bir yatırım maliyeti gerektirmesi ve bundan dolayı her kamu kurumuna ait laboratuvarlarda bulunma ihtimallerinin düşük olması, bunun yerine glukomannan analizi için sadece bir kit ve basit bir spektrofotometreden yararlanılması olarak ifade edilmektedir.

4.6. Piyasa İzleme Çalışmaları

Salep taklit ve taşımasının belirlenmesi çalışmaları kapsamında, piyasadan toplanan 40 farklı markaya ait tüketime hazır ticari toz salep karışımları ve 20 farklı saf salep olduğu bildirilen örneklerdeki % salep miktarının belirlenmesinde glukomannan analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular belirtilmiş ise etiket bilgileri ile karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.43'de piyasadan temin edilen saf salep olduğu bildirilen örneklerde tespit edilen salep miktarları sunulmaktadır.

Çizelge 4.43. Piyasadan temin edilen saf salep olduğu bildirilen örneklerde tespit edilen salep miktarı

Örnek Kodu	Salep (%)	Örnek Kodu	Salep (%)
PS01	43,62	PS11	0,00
PS02	12,30	PS12	51,95
PS03	71,33	PS13	13,60
PS04	32,34	PS14	3,96
PS05	48,29	PS15	5,95
PS06	45,39	PS16	4,36
PS07	36,87	PS17	20,48
PS08	23,21	PS18	5,84
PS09	7,85	PS19	61,37
PS10	11,48	PS20	22,20

Çizelge 4.43'ten elde edinilen bilgiler doğrultusunda, % 100 salep olarak piyasada satılan ürünlerin 3 tanesinin % 50 ve üzerinde salep içerdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte saf salep diye nitelenenler olarak satılan örneklerin % 45'inin salep oranının % 15'in altında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde piyasada salep tüketicilerini veya sanayi ölçeğinde salep kullananları yanıltmaya yönelik taklit ve taşıyıcı uygulamaların olduğu, % 100 salep olarak satılan ürünün aslında saf olmadığı içerisinde salep yerine farklı ikame edici maddelerin bulunduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.44'te piyasada satılan tüketime hazır salep karışımlarında tespit edilen salep miktarları sunulmaktadır.

Çizelge 4.44. Piyasadan temin edilen tüketime hazır toz salep karışımlarında tespit edilen salep miktarları

Örnek Kodu	Etiketledeki salep miktarı (%)	Salep (%)	Örnek Kodu	Etiketledeki salep miktarı (%)	Salep (%)
TS01	B.E.	1,59	TS21	0,40	0,13
TS02	B.E.	0,00	TS22	B.E.	0,00
TS03	B.E.	2,61	TS23	B.E.	0,00
TS04	0,30	0,00	TS24	B.E.	0,00
TS05	0,01	0,00	TS25	B.E.	0,00
TS06	1,00	3,42	TS26	6,00	4,56
TS07	0,30	0,00	TS27	B.E.	0,38
TS08	0,10	1,63	TS28	0,40	0,27
TS09	B.E.	0,00	TS29	B.E.	2,15
TS10	B.E.	0,00	TS30	B.E.	27,98
TS11	0,10	3,42	TS31	B.E.	1,89
TS12	B.E.	0,00	TS32	B.E.	4,12
TS13	B.E.	0,00	TS33	B.E.	100,00
TS14	B.E.	0,00	TS34	2,00	4,59
TS15	B.E.	0,00	TS35	B.E.	0,00
TS16	0,30	0,00	TS36	1,00	2,06
TS17	6,50	1,96	TS37	1,00	2,40
TS18	B.E.	0,00	TS38	B.E.	24,44
TS19	B.E.	28,81	TS39	100,00	100,00
TS20	B.E.	3,66	TS40	0,30	0,22

B.E.: Etiketle salep miktarı beyan edilmemiştir

Çizelge 4.44'e göre, piyasadan temin edilen 40 örnek içerisinde sadece 16 örneğin etiket bilgileri arasında salep miktarının belirtildiği tespit edilmiştir. Buna göre, piyasadaki birçok ticari toz salep içecek karışımı üreten firmaların 29.12.2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği gereğince gıda maddelerinin etiketlenmesinde uyulması gereken kurallar gereğince "net miktarının etiket üzerinde belirtilmesi zorunludur" ifadesine uymadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada salep miktarı beyan edilen örneklerden 7 tanesi beyan edilen miktarda veya beyan edilen miktardan daha yüksek salep içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Net miktarı etikette belirtilen ve belirtilmeyen ancak saf salep olduğu ifade edilen 3 ticari örnekten 2'sinin % 100 saf olduğu belirlenmiştir. Kalan 9 tane örneğin ise % 100 ile % 24 arasında hatalı salep oranı beyan ettikleri hesaplanmıştır.

5. SONUÇLAR

Tez kapsamındaki çalışmalar üç basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada Türkiye saleplerini temsil edebilecek şekilde, salebin doğal olarak bol miktarda bulunduğu bölgelerden (Kuzey Anadolu, Güneybatı Anadolu, Güney Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu) yaş yumrular temin edilmiş ve toplanan örnekler uygun şekilde yabancı materyalden arındırıldıktan sonra sırasıyla haşlama, güneşte kurutma ve öğütme işlemine tabi tutulmuştur. Eş zamanlı olarak, literatürde yer alan olası taklit, tağşiş ve katkı maddeleri (TTK) dikkate alınarak, sakızlar (guar sakız, arabik sakız, keçiyoynuzu sakızı, konyak sakız ve ksantan sakız), nişastalar (buğday nişastası, mısır nişastası, patates nişastası ve pirinç nişastası), ticari katkıları (şeker, yağsız süt tozu, vanilya ve tarçın) ve diğer taklit ve tağşiş maddeleri (öğütülmüş makarna, galeta unu, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş bulgur, buğday unu, salep sıvı aroma verici, salep katı aroma verici ve karboksimetil selüloz) olmak üzere 4 grup altında sınıflandırılmıştır. TTK maddelerinin her biri, piyasada satışa sunulan en az iki farklı tedarikçiden temin edilmişlerdir.

İkinci aşamada, olası hileler ve yöntemler dikkate alınarak çeşitli metotlar ve literatürde yer alan analiz talimatları uygun modifikasyonlar yapılarak geliştirilmiş, her analiz talimatının ve metodun doğruluğunun belirlenmesi amacıyla validasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen bulgulara göre; R^2 değerinin elementel analiz, karbohidrat analizi, organik asit ve amino asit analizlerindeki tüm parametreler için 0,99 olduğu tespit edilmiştir. Tespit sınırı elementel analizler için 0,01-1,73 $\mu\text{g/kg}$; karbohidrat analizleri için 58,93-94,26 mg/kg ; organik asitler için 8,50-10,24 $\mu\text{g/kg}$; amino asitler için 4,41-7,62 mg/kg arasında değiştiği belirlenmiştir. Tayin sınırının ise elementel analizler için 0,03-5,77 $\mu\text{g/kg}$; karbohidrat analizleri için 196,33-313,91 mg/kg ; organik asitler için 26,97-39,29 $\mu\text{g/kg}$; amino asitler için 14,61-25,53 mg/kg arasında değiştiği belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında % RSD değeri salebin taklit ve tağşişinin belirlenmesinde kullanılabilecek olan rutubet için 6,09; kül için 0,71; % 10 HCl asitte çözünmeyen kül için 13,61; protein için 2,95; glukomannan için 4,46; toplam nişasta için 3,77; elementel analizler için 1,74 ile 12,87 arasında; karbohidrat için 2,35 ile 3,36 arasında; organik asit için 6,51 ile 10,55; amino asitler için 2,33 ile 4,10 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak yöntemlerin örneklerde beklenen konsantrasyon düzeyleri için doğrusal, geri kazanım değerleri, tespit ve tayin sınırları için yeterli düzeyde ve tekrarlanabilir oldukları belirlenerek analizlerin gerçekleştirilebilmesi için uygun oldukları sonucuna varılmıştır. Valide edilmiş yöntemlerle salep örneklerinin ve TTK maddelerinin ayrı ayrı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Belirtilen analizler çerçevesinde Güneybatı Anadolu Bölgesi'nden temin edilen salep örneklerinin kül, % 10 HCl'de çözünmeyen kül ve protein düzeyleri açısından en yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Rutubet düzeyleri açısından en yüksek değerlere sahip olan örnekler Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden temin edilmiştir. Örneklerdeki indirgen şeker düzeylerinin ise geniş bir aralıkta seyrettiği göze çarptığında bu açıdan da en yüksek düzeyin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan örneklerde olduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte Kuzey Anadolu Bölgesi'nden temin edilen örneklerin en yüksek glukomannan düzeyine sahip olduğu belirlenirken, bu bölgenin aynı zamanda en düşük nişasta düzeyine sahip örnekleri ihtiva ettiği sonucuna varılmıştır. Doğu Anadolu Bölgesi'nde ise tersi durumun söz konusu olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla salepler arasında glukomannan ve nişasta içeriği açısından negatif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Salep örneklerindeki elementel bileşenler genel hatları ile değerlendirildiğinde ise; örneklerdeki hakim elementlerin sırasıyla demir, mangan ve çinko oldukları sonucuna varılırken, en yüksek demir oranının Kuzey ve Doğu Anadolu Bölgelerinden toplanan saleplerde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek düzeyde mangan, krom, nikel, titanyum, baryum, molibden, vanadyum, kobalt ve galyum Kuzey Anadolu Bölgesi saleplerinde; bakır, stronsiyum ve selenyum Güneybatı Anadolu Bölgesi saleplerinde; çinko Güney Anadolu Bölgesi saleplerinde ve rubidyum Doğu Anadolu Bölgesi saleplerinde belirlenmiştir. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden temin edilen salep yumrularında sezyum düzeylerinin diğer bölgelerden temin edilenlere göre 10-20 kat daha fazla sezyum içerdiği tespit edilmiş olması ilgi çeken bir ayrıntıdır. Benzer şekilde krom ve nikel elementleri de Kuzey Anadolu saleplerinde diğer bölgelere göre sırasıyla 2-3 kat daha yüksek oranda belirlenmiştir. Antimuan, berilyum, talyum ve bizmut elementleri Güney, Güneybatı ve Kuzey Anadolu bölgelerinden toplanan salep örneklerinin hiçbirinde belirlenemezken, Doğu ve Güneydoğu bölgesinden temin edilen saleplerden sadece 2-3 örnekte iz düzeyde antimuan, berilyum ve talyum elementleri tespit edilmiştir. Örneklerde tespit edilen elementlerin salebin yetiştiği toprağın yapısı ile ilişkili olabileceği gibi çevresel faktörlerin de etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

Salep örneklerinin kalorimetrik ölçümlerinde benzer spektrumlar veya değerler ürettiği belirlenerek salebin yapısal anlamda bölgelerarası farklılıklarının bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Aynı durum $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ izotop oranları için de geçerli olmakla birlikte örneklerdeki $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ ve $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranının bölgelere göre farklılıklar arz ettiği ortaya çıkmıştır. Karbon izotop oranları açısından en yüksek değerler Kuzey Anadolu Bölgeleri'nden temin edilen salep örneklerinde belirlenirken, en yüksek azot ve hidrojen izotop oranlarının ise sırasıyla Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Güney Anadolu Bölgesi'nden elde edilen salep örneklerinde bulunduğu tespit edilmiştir.

Salep örneklerindeki karbonhidrat ve organik asit bileşenleri düzeylerinin geniş bir aralıkta değişmekte olduğu tespit edilmekle birlikte, hakim karbonhidratın sakkaroz olduğu; hakim organik asitin ise sitrik asit olduğu belirlenmiştir. En yüksek sakkaroz içeriğine sahip bölgenin Güney Anadolu Bölgesi; en yüksek sitrik asit içeriğine sahip bölgenin Doğu Anadolu Bölgesi olduğu bulunmuştur. Salep örneklerindeki baskın amino asidin ise arjinin olduğu tespit edilmiştir. Esansiyel amino asit bileşenleri açısından en zengin salep örneklerinin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden temin edilen örnekler olduğu sonucuna varılmıştır.

Salep taklit ve tağşişinde kullanılan maddelerin en uygun hale getirilen yöntemlerle yapılan analizlerinde; protein düzeylerinde farklılıklar bulunmakla birlikte, salebin ortalama protein düzeyine yakınlık açısından keçiyoynuzu sakızı ve öğütülmüş pirinçle benzerlikler gösterdiği tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen enzimatik analiz sonuçlarına göre ise; TTK maddelerinin konyak sakız hariç glukomannan düzeylerinin

salepte tespit edilen düzeylere kıyasla çok düşük seviyelerde kaldıkları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede konyak sakızındaki glukomannan düzeylerinin salepteki düzeylerle benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Konyak sakızın nişasta düzeyinin ise salebe oranla düşük seviyelerde kalması glukomannan–nişasta parametrelerinin salep ile TTK maddeleri arası ayrımında önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

TTK maddelerinin elementel analiz sonuçları en zengin TTK maddesinin tarçın olduğunu göstermektedir. İncelenen elementlerden demir mangan, nikel, rubidyum, vanadyum, krom, sezyum ve selenyumun tarçında, çinko ve bakırın buğday nişastasında; stronsiyum ve titanyumun katı salep aromasında, molibdenin buğday ununda ve baryum ve galyumun ise arabik sakızda en yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Salep örneklerinde tespit edilen ortalama krom ve lityum elementleri incelenen tüm TTK maddelerinde tespit edilen ortalama düzeylerinden daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu açıdan krom ve lityum elementlerinin taklit ve tağşişi belirlemede bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Buna ilave olarak, çalışmalar kapsamında salep örneklerinde tespit edilemeyen talyum ve bizmut elementleri incelenen tüm konyak sakız örneklerinde farklı düzeylerde belirlenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde bu elementlerin Avrupa salebi olarak adlandırılan ve yapısal olarak ülkemiz salepleri ile büyük benzerlikler gösteren konyak sakız ile ayrımında önemli parametreler olabileceği sonucuna varılmıştır.

TTK maddelerine uygulanan izotop oranları analizlerine göre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^2\text{H}/^1\text{H}$ izotop oranları dağılımlarının oldukça geniş bir aralıkta seyrettiği belirlenirken, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranı açısından salebin konyak sakız, patates nişastası, pirinç nişastası, katı ve sıvı salep aroması hariç olmak üzere diğer TTK maddelerinden; $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranının pirinç nişastası, guar sakız ve arabik sakız dışındaki tüm TTK maddelerinden; $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranlarının ise pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, yağsız süt tozu ve şeker dışındaki tüm TTK maddelerinden ve $^2\text{H}/^1\text{H}$ izotop oranlarının ise konyak sakız, patates nişastası, şeker, tarçın, galeta unu, öğütülmüş pirinç, buğday unu, karboksimetil selüloz, katı ve sıvı salep aroması hariç tüm TTK maddelerinde tespit edilen değerlerden istatistiksel olarak farklılıklar ($p < 0,05$) içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca izotop oranlarının iki boyutlu saçılma grafiklerinde salep örneklerinin özellikle $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ grafiğinde kendi aralarında gruplanmakta oldukları belirlenmiştir.

Kalorimetrik ölçümler kapsamında yapılan analizlerde camsı geçiş sıcaklığı bakımından salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında bir farklılık tespit edilemezken, erime sıcaklığı açısından salep ile konyak sakız, patates nişastası, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, galeta ve öğütülmüş bulgur arasında; entalpi değerleri açısından ise konyak sakız, ksantan sakız, patates nişastası, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş bulgur, buğday unu, katı salep aroması ve karboksimetil selüloz arasında istatistiksel açıdan önemli farklar ($p < 0,05$) bulunduğu belirlenmiştir.

İncelenen TTK maddelerinin çalışma kapsamında izlenilen karbonhidrat bileşenlerinden birini veya birkaçını içermediği belirlenmiş olup, bu bileşenlerin salebin taklit ve tağşişinin belirlenebilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bunlara örnek olarak; guar sakız, ksantan sakız, pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, sıvı salep aroması, katı salep aroması ve karboksimetil selüloz verilebilir. Ayrıca yine

düzeyler dikkate alındığında salep örneklerinin yağsız süt tozu, öğütülmüş makarna, tarçın ve şeker örneklerinden farklılıklar ($p < 0,05$) arz ettiği belirlenmiş olup, diğer TTK maddeleri ile ayırım konusunda kemometrik yöntemlerden faydalanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Sitrik asit bakımından salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı belirlenmiş; malik asit ve fumarik asit açısından TTK maddelerinden keçiyoynuzu sakızı, konyak sakız, galeta unu ve buğday unun değerinin salep örneklerinden elde edilen değerlerden sırasıyla yaklaşık 15 katı ve 3 katı yüksek olduğu ve bu maddelerin belirlenmesinde belirleyici unsur olabileceği düşünülmektedir. Tartarik asit açısından salep ile bütün sakız çeşitleri (guar sakız, arabik sakız, keçiyoynuzu sakızı, konyak sakız ve ksantam sakız) arasında farklılıklar ($p < 0,05$) arz ettiği dikkat çekmektedir. Ayrıca, saleble yapısal benzerlikler içeren ve Avrupa salebi olarak yurtdışından ucuz bir şekilde getirilerek gerçek salep yerine satılan konyak sakız ile salep arasında tartarik asit yönünden farklılıklar ($p < 0,05$) bulunması dikkat çekmektedir. Gerçekleştirilen analizlerde konyak sakızın yüksek düzeyde ($1619,47 \pm 2412,03$ mg/kg) tartarik asit içermesi ve buna karşılık incelenen salep örneklerinde en fazla 60,28 mg/kg düzeyinde tartarik asit bulunması Avrupa salebi olarak bilinen konyak sakız ile ülkemiz salepleri arasında belirleyici bir unsur olabileceği sonucuna varılmıştır.

TTK maddelerinde belirlenen amino asit düzeylerine göre ise; salebin lizin açısından tüm TTK maddeleri ile, glutamik asit açısından pirinç nişastası harici tüm TTK maddeleri ile, arjinin ve histidin açısından karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile, serin açısından buğday nişastası ve sıvı salep aroması harici tüm TTK maddeleri ile, prolin açısından guar sakız, keçiyoynuzu sakızı ve karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile, valin açısından keçiyoynuzu sakızı, konyak sakız, pirinç nişastası ve öğütülmüş pirinç harici tüm TTK maddeleri ile, metiyonin açısından konyak sakız, öğütülmüş makarna ve öğütülmüş bulgur harici tüm TTK maddeleri ile, tirozin açısından guar sakız, öğütülmüş pirinç ve konyak sakız harici tüm TTK maddeleri ile, lösün+izolösün açısından ksantan sakız ve karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile ve fenilalanin açısından ise karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile istatistiksel anlamda farklılıklar ($p < 0,05$) içerdiği sonucuna varılmıştır.

Taklit ve tağşiş tespitine yönelik en uygun kemometrik ve aletsel metot kombinasyonlarının belirlenmesi çalışmalarında yönlendirmeli ve yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kemometrik çok değişkenli sınıflama ve kümeleme analizleri çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, analiz sonuçları PCA analizi ile 2 boyuta yansıtıldığında verideki tüm varyansın oldukça küçük bir bölümünün açıklanmasına karşın, salep ve TTK maddelerinin özellikle PC1 ekseninde ayrıştığı görülmektedir. Ayrıca lokasyonlar arasında da görülen kümelenme, bilinmeyen örneklerin analizleri bu düzleme yansıtıldığında (eğer saf salep ise) hangi şehirden olduğu hakkında bilgi sağlayabileceği tespit edilmiştir. Çalışmanın asıl amaçlarından olan TTK maddeleri ve saf salep örneklerinin sınıflandırılması PLS-DA ile model seti için % 100 ve model başarısını yansıtan validasyon seti için % 89 doğruluk oranıyla gerçekleştirilmiştir.

Salep ile TTK maddelerini ayırımı için yapılan tüm analizler birlikte değerlendirildiğinde özellikle amino asit analizlerindeki glutamik asit miktarının,

elementel analizlerden çinko ve bakırın, organik asitlerden malik ve fumarik asidin ve enzimatik analizlerden ise glukomannan düzeylerinin diğer analizlere göre oldukça baskın şekilde sınıflandırmada etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Analizlerden elde edilen verilere kemometrik yöntemler uygulanarak salep taklit ve tağşişinin belirlenmesinde önemli olan analitik parametreler tespit edilmiştir.

Bundan sonraki gerçekleşen çalışmalarda ticari olarak piyasada satılan salep içecek tozu karışımlarındaki salep miktarının belirlenmesi amacıyla karışım reçeteleri hazırlanmıştır. İlk etapta Prof. Dr. Ekrem SEZİK tarafından bildirilen, ülkemizde satışa sunulan ticari salep içecek tozu içeren karışımların bileşim oranı göz önünde bulundurularak farklı oranlarda gerçek salep içeren 40 farklı reçete oluşturulmuştur. Elde edilen reçeteler % 0-10 ve % 0-100 salep oranları olmak üzere iki grupta sınıflandırılarak salep ile TTK maddeleri arasındaki ayırma istatistiksel ve kemometrik olarak önemli bulunan yöntemlerle analiz edilmiştir. Elde edilen analitik bulgular, karışımdaki gerçek salep miktarı ile ilişkilendirilerek ilave edilen salep ile analitik parametre arasındaki doğrusallık incelenmiştir.

Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmalarda, % 0-10 aralığında gerçek salep içeren reçetelerde ise enzimatik analiz parametrelerinden glukomannan ve toplam nişastanın, organik asit bileşenlerinden malik asitin ve aminoasit bileşenlerinden ise fenilalanin, lizin, arjinin, lösin + izolösin, ve histidin parametrelerine ait değerlerin karışımdaki gerçek salep oranı ile yüksek düzeyde doğrusal ($R^2 \geq 0,90$) ve korelatif ($r \geq 0,90$) olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, enzimatik analiz parametrelerinden glukomannan ve toplam nişastanın, elementel bileşenlerden bakır ve demir; izotop bileşenlerinden $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranının, organik asit bileşenlerinden malik asitin ve aminoasit bileşenlerinden valin, lösin + izolösin, arjinin, lizin, fenilalanin, tirozin, treonin, prolin, glutamik asit, histidin, aspartik asit ve metiyonin % 0-100 oranlarındaki salep miktarı ile önemli düzeyde doğrusal ($R^2 \geq 0,90$) ve korelatif ($r \geq 0,90$) sonuçlar ürettiği belirlenmiştir. Elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde; glukomannan hem tüketime hazır toz formdaki salep karışımlarında, hemde saf salep olarak tüketime sunulan ürünlerde salebin taklit tağşişin tanımlanmasında kullanılabileceği belirlenmiştir.

Üçüncü ve son aşamada, piyasada satılan saleplerden örnekler alınarak, seçilen yöntemle analizleri yapılmıştır. Önerilen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen piyasa izleme çalışmalarında 40 farklı markaya ait salep toz içecek örneği ile gerçek salep adı altında satışa sunulan 20 farklı ürünlerdeki salep oranları incelenmiştir. Saf salep olduğu belirtilen örneklerde yapılan çalışmada, örneklerin 3 tanesinin % 50 ve üzerinde salep içerdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte saf salep diye nitelendirilerek satılan örneklerin % 45'inin salep oranının % 15'in altında olduğu belirlenmiştir. Ticari tüketime hazır toz salep örneklerinde yapılan çalışmalarda; örneklerin sadece % 40'nın etiketinde salep miktarının net beyanının bulunduğu gözlenmiş olup, net beyan edilen örneklerden 7 tanesinin beyan edilen miktarda veya beyan edilenden daha yüksek miktarda salep içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Piyasa araştırmasından elde edilen veriler doğrultusunda, saf salep adı altında ticaret yapan üreticilerin birçoğunun yanlış beyan vererek salep tüketicilerini veya sanayi ölçeğinde salep kullananları yanıltılmaya yönelik taklit ve tağşiş uygulamaları yaptığı ifade edilebilmektedir. Aynı zamanda yönetmelik gereğince salep miktarının her türlü salep ürününün etiketinde net olarak belirtilmesi gerekliliği kurallının çiğnendiği tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Aktaş, N. and Kaya, M. 2001. Detection of beef body fat and margarine in butterfat by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 66, (3): 795-801.
- Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., Che Man, Y.B., Dhahi, T.S., Kashif, M., Uddin, M.K. and Abd Hamid, S.B. 2012. Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Meat Science*, 91, (4): 454-459.
- Alonso-Sande, M., Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C. and Alonso, M. 2009. Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, (2): 453-462.
- Altıkat, A., Doğru, S., Argun, Y.A. and Bayram, T. 2015. New Chernobyl? metsamor nuclear power plant. ICOCCE, ss. 2057-2066, 20-23 May, Nevşehir, TURKEY.
- Anonim. 1991. 22.05.2018. Resmi gazete. <http://www.resmigazete.gov.tr/main.aspx?home=http://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/21016.pdf&main=http://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/21016.pdf>. [Son erişim tarihi: 22.05.2018].
- Anonim. 1998. 20.05.2018. Resmi Gazete. <http://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/23407.pdf>. [Son erişim tarihi: 20.05.2018].
- Anonim. 2010. Veteriner hizmetleri, bitki sağlığı, gıda ve yem kanunu. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/06/20100613-12.htm>. [Son erişim tarihi: 10.12.2018].
- Anonim. 2017. Doğal çiçek soğanlarının 2018 yılı ihracat listesi hakkında tebliğ. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/12/20171230-11.htm>. [Son erişim tarihi: 22.05.2018].
- Anonim. 2018a. <https://magaza.ammaddeler.com/>. [Son erişim tarihi: 22.05.2018].
- Anonim. 2018b. İklim verileri. <https://tr.climate-data.org/>. [Son erişim tarihi: 10.12.2018].
- Anonim. 2018c. Türkiye maden rezervleri. <http://www.mta.gov.tr/v3.0/bilgi-merkezi/maden-rezervleri>. [Son erişim tarihi: 10.12.2018].
- Antolovich, M., Li, X. and Robards, K. 2001. Detection of adulteration in Australian orange juices by stable carbon isotope ratio analysis (SCIRA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, (5): 2623-2626.
- Ayar, A., Sert, D. and Akbulut, M. 2009. Effect of salep as a hydrocolloid on storage stability of 'incir uyutması' dessert. *Food Hydrocolloids*, 23, (1): 62-71.
- Balkır, P. 2006. Taze kaşar peynirlerine yapılan hilelerin belirlenmesi ve taklit taze kaşar peynirlerinin ayırt edilme yöntemleri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 108 s.
- Brereton, R.G. 2003. Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons, 479 s.

- Bulut-Solak, B., Alonso-Miravalles, L. and O'Mahony, J.A. 2017. Composition, morphology and pasting properties of *Orchis anatolica* tuber gum. *Food Hydrocolloids*, 69, 483-490.
- Calderone, G. and Guillou, C. 2008. Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. *Food Chemistry*, 106, (4): 1399-1405.
- Cengiz, M.F., Durak, M.Z. and Ozturk, M. 2014. In-house validation for the determination of honey adulteration with plant sugars (C4) by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IR-MS). *LWT-Food Science and Technology*, 57, (1): 9-15.
- Cheajesadagul, P., Arnaudguilhem, C., Shiowatana, J., Siripinyanond, A. and Szpunar, J. 2013. Discrimination of geographical origin of rice based on multi-element fingerprinting by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 141, (4): 3504-3509.
- Chiavaro, E., Vittadini, E., Rodriguez-Estrada, M.T., Cerretani, L., Capelli, L. and Bendini, A. 2009. Differential scanning calorimetry detection of high oleic sunflower oil as an adulterant in extra- virgin olive oil. *Journal of Food Lipids*, 16, (2): 227-244.
- Chudzinska, M. and Baralkiewicz, D. 2010. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. *Food and Chemical Toxicology*, 48, (1): 284-290.
- Chudzinska, M. and Baralkiewicz, D. 2011. Application of ICP-MS method of determination of 15 elements in honey with chemometric approach for the verification of their authenticity. *Food and Chemical Toxicology*, 49, (11): 2741-2749.
- Citil, O.B. and Tekinsen, K.K. 2011. A comparative study on fatty-acid composition of salep obtained from some Orchidaceae species. *Chemistry of Natural Compounds*, 46, (6): 943-945.
- Coni, E., Di Pasquale, M., Coppolelli, P. and Bocca, A. 1994. Detection of animal fats in butter by differential scanning calorimetry: a pilot study. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, (8): 807-810.
- Cordella, C., Antinelli, J.-F., Aurieres, C., Faucon, J.-P., Cabrol-Bass, D. and Sbirrazzuoli, N. 2002a. Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (1): 203-208.
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A.-C., Sbirrazzuoli, N. and Lizzani-Cuvelier, L. 2002b. Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (7): 1751-1764.
- Çağlayan, K., Ayşe, Ö. and Eskalen, A. 1998. In vitro multiplication of salep Orchids, growing commonly in the East Mediterranean region of Turkey by embriyo culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, (2): 187-192.

- Çınar, S.B., Ekşi, A. and Coşkun, İ. 2014. Carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of pine honey and detection of HFCS adulteration. *Food Chemistry*, 157, 10-13.
- D'Archivio, A.A., Giannitto, A., Incani, A. and Nisi, S. 2014. Analysis of the mineral composition of Italian saffron by ICP-MS and classification of geographical origin. *Food Chemistry*, 157, 485-489.
- Danezis, G.P., Tsagkaris, A.S., Camin, F., Brusic, V. and Georgiou, C.A. 2016. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132.
- Di Anibal, C.V., Odena, M., Ruisánchez, I. and Callao, M.P. 2009. Determining the adulteration of spices with Sudan I-II-III-IV dyes by UV-visible spectroscopy and multivariate classification techniques. *Talanta*, 79, (3): 887-892.
- Dinç, E. 2007. Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi, *Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27, (1): 61-92.
- Dogan, M. and Kayacier, A. 2004. Rheological properties of reconstituted hot salep beverage. *International Journal of Food Properties*, 7, (3): 683-691.
- Doğruer, Y., Gürbüz, Ü. and Nizamlioğlu, M. 1995. Konya'da tüketime sunulan pastirmaların kalitesi. Selçuk Üniversitesi, *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 11, (2): 77-81.
- Domingues, D.S., Pauli, E.D., de Abreu, J.E., Massura, F.W., Cristiano, V., Santos, M.J. and Nixdorf, S.L. 2014. Detection of roasted and ground coffee adulteration by HPLC by amperometric and by post-column derivatization UV-Vis detection. *Food Chemistry*, 146, 353-362.
- Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H. and Dongowski, G. 2007. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids*, 21, (7): 1101-1112.
- Ekici, Ç. and Dinleyici, M.S. 2016. Detection of olive oil adulteration using diffraction method. Electrical, Electronics and Biomedical Engineering (ELECO), National Conference on, ss. 194-196,
- Erzurumlu, G.S. and Doran, İ. 2011. Türkiye'de salep orkideleri ve salep kültürü. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 15, (1): 29-34.
- Esslinger, S., Riedl, J. and Fauhl-Hassek, C. 2014. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189-204.
- FAO. 1990. 27.07.2018. Roots, tubers, plantain and bananas in human Nutrition. <http://www.fao.org/docrep/t0207e/T0207E00.htm>. [Son erişim tarihi: 27.07.2018].
- Farhoosh, R. and Riazi, A. 2007. A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 21, (4): 660-666.
- Georgiadis, N., Ritzoulis, C., Charchari, E., Koukiotis, C., Tsiptsias, C. and Vasiliadou, C. 2012. Isolation, characterization and emulsion stabilizing properties of polysaccharides from orchid roots (salep). *Food Hydrocolloids*, 28, (1): 68-74.

- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 2017. Türk gıda kodeksi etiketleme ve tüketicileri bilgilendirme yönetmeliği. <http://www.resmigazete.gov.tr/main.aspx?home=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229m3.htm&main=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229m3.htm>. [Son erişim tarihi: 13.12.2018].
- Gök, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I. and Severcan, F. 2015. Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 170, 234-240.
- González, C.A., Fernández, M.N., Sahagún, A., García, V.J., Díez, L.M., Calle, P.A., Castro, R.L. and Sierra, V.M. 2004. Glucomannan: properties and therapeutic applications. *Nutricion Hospitalaria*, 19, (1): 45-50.
- GTHB. 2018. Salep, toz, Maraş. Salep, toz, Maraş. <http://www.turkomp.gov.tr/food-salep-toz-maras-477>. [Son erişim tarihi: 10.12.2018].
- Güler, A., Bakan, A., Nisbet, C. and Yavuz, O. 2007. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chemistry*, 105, (3): 1119-1125.
- Güler, A., Kocaokutgen, H., Garipoğlu, A.V., Onder, H., Ekinci, D. and Biyik, S. 2014. Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C3 and C4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. *Food Chemistry*, 155, 155-160.
- Gümüş, C. 2009. Batı Karadeniz bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan bazı orkide türlerinin (*Orchidaceae*) çoğaltım yöntemleri üzerinde araştırmalar. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 200 s.
- Güney, H. 2014. Gıda güvenliği açısından bal taşımasının aydınlatılması. Yüksek Lisans, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 48 s.
- Gürdeniz, G. and Özen, B. 2009. Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food Chemistry*, 116, (2): 519-525.
- Hafıza, E. 2000. Süt tozunun peyniraltı suyu tozu ile taşımasının araştırılması. Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 60 s.
- Heussen, P., Ye, P., Menard, K. and Courtney, P. 2011. Practical food applications of differential scanning calorimetry (DSC). https://www.perkinelmer.com.cn/PDFs/downloads/APP_DSC_Food_Applications.pdf. [Son erişim tarihi: 10.12.2018].
- Hossain, M.M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances—an overview. *Fitoterapia*, 82, (2): 102-140.
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. and Graham Cooks, R. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry*, 40, (4): 430-443.

- Jahromi, H.K., Pourahmad, M., Abedi, H.A. and Jahromi, Z.K. 2018. Protective effects of salep against isoniazid liver toxicity in wistar rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8, (1): 239-243.
- Javidipour, I. 1998. Sığır içyağı, koyun kuyruk yağı ve tereyağına karıştırılan domuz yağının saptanması. Doktora, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 86 s.
- Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and Soil*, 205, (1): 25-44.
- Kabacaoğlu, E. 2018. Salep içeriğinin tespitinde kullanılabilecek moleküler marker geliştirilmesi üzerine araştırmalar. Doktora, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 96 s.
- Kahyaoğlu, D.T. and Çakmakçı, S. 2016. Determination of the adulteration of butter with margarine by using fat constants. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 22, (1): 1-8.
- Kalra, K. 2011. Method development and validation of analytical procedures. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. Y. Shoyama. InTech, http://cdn.intechopen.com/pdfs/23463/InTech-Method_development_and_validation_of_analytical000036AA_procedures.pdf
- Karadeniz, F. 2004. Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, (4): 267-271.
- Karaman, S., Yilmaz, M.T., Ertugay, M.F., Baslar, M. and Kayacier, A. 2012. Effect of ultrasound treatment on steady and dynamic shear properties of glucomannan based salep dispersions: optimization of amplitude level, sonication time and temperature using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 19, (4): 928-938.
- Karamanoğlu, A.A. 2016. Kakao tozuna keçiboynuzu tozu ilavesi ile yapılan tağşışının belirlenmesi amacıyla yeni bir metodun geliştirilmesi. Yüksek Lisans, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 49 s.
- Kasperek, M. and Grimm, U. 1999. European trade in Turkish salep with special reference to Germany. *Economic Botany*, 53, (4): 396-406.
- Kaya, S. and Tekin, A.R. 2001. The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering*, 47, (1): 59-62.
- Keithley, J. and Swanson, B. 2005. Glucomannan and obesity: a critical review. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 11, (6): 30.
- Kesmen, Z., Büyükkiraz, M.E., Kahraman, N. and Yetim, H. 2017. Gıdalarda hile amacıyla kullanılan bazı bitki kaynaklı bileşenlerin gerçek zamanlı PZR ile tespiti. *Gıda*, 42, (3): 305-314.
- Kılıç, S. 2012. Bağntı analizi sonuçlarının yorumlanması. *Journal of Mood Disorders*, 2, (4): 191-193.
- Kindap, T. and Chen, S.-H. 2005. Threat to turkey from potential accidents at the soviet-designed metsamor nuclear power plant, Armenia: tracer and trajectory analyses and episode studies. Proceedings of the 10th International Conference on Harmonisation within Atmospheric Dispersion Modelling for Regulatory Purpose, ss. 551-555, 17-20 October, Girit.

- Kirit, A.B. and Özdemir, Y. 2007. Organic acids, sugars, amino acids and flavonoids in Turkish orange juices and characterization for adulteration. *Advances in Food Sciences*, 29, (1): 35-41.
- Kıvrak, İ. 2015. Retracted article: Chemical constituents: water-soluble vitamins, free amino acids and sugar profile from *Ganoderma adspersum*. *Natural Product Research*, 29, (6): 518-523.
- Kıvrak, I., Kıvrak, Ş. and Harmandar, M. 2014. Free amino acid profiling in the giant puffball mushroom (*Calvatia gigantea*) using UPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 158, 88-92.
- Kuś, P.M. and Van Ruth, S. 2015. Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*, 62, (1): 69-75.
- Kutlu, M.A. and Bengü, A.Ş. 2015. Gaziantep’te üretilen balların kalite kriterlerinin belirlenmesi. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 4, (1): 48.
- Lalika, M.C., Dorah, H.M., Urio, P., Gimbic, D.M. and Stewart, J. 2013. Domestication potential and nutrient composition of wild orchids from two southern regions in Tanzania. *Time Journals of Biological Sciences and Technology*, 1, (1): 1-11.
- Luo, D., Dong, H., Luo, H., Xian, Y., Guo, X. and Wu, Y. 2016. Multi-element (C, N, H, O) stable isotope ratio analysis for determining the geographical origin of pure milk from different regions. *Food Analytical Methods*, 9, (2): 437-442.
- Luykx, D.M. and Van Ruth, S.M. 2008. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107, (2): 897-911.
- Magdas, D., Cristea, G., Puscas, R. and Tusa, F. 2013. The use of isotope ratios in commercial fruit juices authentication. *Romanian Journal of Physics*, 59, (3-4): 355-359.
- Makarov, A. and Scigelova, M. 2010. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, (25): 3938-3945.
- Malec-Czechowska, K. and Wierchnicki, R. 2013. A study of stable isotope composition of chosen foodstuffs from the Polish market. *Nukleonika*, 58, (2): 323-327.
- Marini, F. 2013. Chemometrics in food chemistry. Newnes, 498 s.
- Okay, N. 2004. Hatay'da üretilen zeytin yağlarında özgül absorbans ve trilinolein (trigliserit) değerlerinin belirlenmesi ve bu değerlerin zeytinyağı taşıdığındeki önemi. Yüksek Lisans, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 56 s.
- Ongan, E. 2016. Nar sularında taşıdığı tespiti için fenolik madde profilinin incelenmesi. Yüksek Lisans, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 73 s.
- Ortiz, R.S., de Cássia Mariotti, K., Fank, B., Limberger, R.P., Anzanello, M.J. and Mayorga, P. 2013. Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines? *Forensic Science International*, 226, (1-3): 282-289.

- Öziyici, H.R., Turhan, I., Tetik, N., Kulcan, A.A., Akkoyun, T., Yatmaz, E., Germec, M. and Karhan, M. 2015. Concentration of D-pinitol in carob extract by using multi-stage enrichment processes. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayını*, 40, (3): 125-131.
- Özocak, A. 2004. Çikolatalarda kakao yağı ikamelerinin tesbiti. Yüksek Lisans, İstanbul Teknik Üniversitesi, 74 s.
- Pauli, E.D., Barbieri, F., Garcia, P.S., Madeira, T.B., Junior, V.R.A., Scarminio, I.S., da Camara, C.A.P. and Nixdorf, S.L. 2014. Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. *Food Research International*, 61, 112-119.
- Pehlivanoğlu, H., Nazlı, B., İmamoğlu, H. and Çakır, B. 2015. Piyasada fermente sucuk olarak satılan ürünlerin kalite özelliklerinin saptanması ve geleneksel türk fermente sucuğu ile karşılaştırılması. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 41, (2): 191-198.
- Perez, D.R. and Narasimhan, G. 2017. So you think you can PLS-DA? *bioRxiv*, 207225.
- Pico, Y. 2015. Advanced mass spectrometry for food safety and quality. Elsevier: 68, Netherlands, 714 s.
- Pişkin, A. 2009. Van gölü sedimentlerinde Cs-137 ve doğal radyonüklitlerin profil dağılımının incelenmesi. Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, İzmir, 79 s.
- Primrose, S., Woolfe, M. and Rollinson, S. 2010. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 21, (12): 582-590.
- Regueiro, J., Vallverdú-Queralt, A., Simal-Gándara, J.s., Estruch, R.n. and Lamuela-Raventós, R. 2013. Development of a LC-ESI-MS/MS approach for the rapid quantification of main wine organic acids in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, (27): 6763-6768.
- Rodushkin, I., et al. 2011. Elemental and isotopic characterization of cane and beet sugars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, (1): 70-78.
- Saldamlı, İ. 2007. Gıda kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 587 s.
- Samancıoğlu, H. 2015. Development of rapid and simple spectroscopic techniques based on chemometrics data analysis for the determination of goat milk adulteration with cow milk. Yüksek Lisans, İzmir Institute of Technology, İzmir, 92 s.
- Sandal, G. and Söğüt, Z. 2010. Türkiye orkideleri (Salepler). *Mediterranean Agricultural Sciences*, 23, (2): 109-116.
- Sezer, B., Apaydin, H., Bilge, G. and Boyaci, I.H. 2018. Coffee arabica adulteration: detection of wheat, corn and chickpea. *Food Chemistry*, 264, 142-148.
- Sezik, E. 2002. Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44, 151-157.
- Sezik, E. 2012. Salep mi? orkideler mi? Türkiye II. Orkide ve Salep Çalıştayı. İzmir: 37-45.

- Sezik, E., İşler, N., Güler, N., Orhan, Ç., Aybeke, M., Deniz, İ.G. and Üstün, O. 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi. Tübitak, TBAG-Ç.SEK/23(103T008), Sonuç Raporu, Ankara.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R. 2007. Principles of instrumental analysis. Thomson Brooks/Cole, United States of America, 1039 s.
- Sun, D.-W. 2008. Modern techniques for food authentication. Academic Press, United States of America, 689 s.
- Şahin, N. 2000. Yüksek fruktozlu mısır şuruplarıyla tağşiş edilen ballarda karbonhidrat profilleri. Yüksek Lisans, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 75 s.
- Şen, M.A., Palabiyik, I. and Kurultay, Ş. 2018. Composition, viscosity and solubility of saleps from twenty different orchid (Orchidaceae) species. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, (2): 1334-1339.
- Şimşek, A., Bilsel, M. and Gören, A.C. 2012. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chemistry*, 130, (4): 1115-1121.
- Şimşek, A. 2008. Kızartma yağlarının kararlılığı ve termal yöntemlerle kalitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans, Çukurova Üniversitesi, Adana, 63 s.
- Şimşek, A., Artık, N. and Baspınar, E. 2004. Detection of raisin concentrate (Pekmez) adulteration by regression analysis method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, (2): 155-163.
- Tamer, C.E., Karaman, B. and Copur, O.U. 2006. A traditional Turkish beverage: salep. *Food Reviews International*, 22, (1): 43-50.
- Taş, T. 2008. Katışıklı zeytin yağlarında katıştırılan yağın cinsi ve oranının FTIR spektroskopisi ve kemometrik yöntemlerle belirlenmesi. Yüksek Lisans, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 66 s.
- Taverniers, I., De Loose, M. and Van Bockstaele, E. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, (8): 535-552.
- Tekinşen, K.K. and Güner, A. 2010. Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. *Food Chemistry*, 121, (2): 468-471.
- Tester, R. and Al-Ghazzewi, F. 2017. Glucomannans and nutrition. *Food Hydrocolloids*, 68, 246-254.
- Tezcan, F., Uzaşçı, S., Uyar, G., Kalaycı, Z. and Erim, F.B. 2017. Comparison of proline and arginine contents of pomegranate and grape juices in Turkey for the detection of juice adulteration. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 45, (4): 557-569.
- Tezcan, F., Uzaşçı, S., Uyar, G., Öztekin, N. and Erim, F.B. 2013. Determination of amino acids in pomegranate juices and fingerprint for adulteration with apple juices. *Food Chemistry*, 141, (2): 1187-1191.
- Thomas, R. 2013. Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners. CRC press, United States of America, 409 s.

- Tomaszewska-Gras, J. 2016. Rapid quantitative determination of butter adulteration with palm oil using the DSC technique. *Food Control*, 60, 629-635.
- Tosun, M. 2013. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food Chemistry*, 138, (2-3): 1629-1632.
- Türk Gıda Kodeksi. 2013. Baharat tebliği. <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=9.5.17268&sourceXmlSearch=baharat&MevzuatIliski=0>. [Son erişim tarihi: 27.05.2018].
- Usta, B. and Yilmaz-Ersan, L. 2017. Evalution of prebiotic potential of salep obtained form some orchidaceae species. *Fresenius Enviromental Bulletin*, 26, (10): 6191-6198.
- Uysal, R.S., Boyaci, I.H., Genis, H.E. and Tamer, U. 2013. Determination of butter adulteration with margarine using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 141, (4): 4397-4403.
- Van Wetten, I., Van Herwaarden, A., Splinter, R., Boerrigter-Eenling, R. and Van Ruth, S. 2015. Detection of sunflower oil in extra virgin olive oil by fast differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 603, 237-243.
- Vardin, H., Tay, A., Ozen, B. and Mauer, L. 2008. Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 108, (2): 742-748.
- Vatansever, C. 2016. Gıda endüstrisinde kullanılan glukomannan yapılı biyopolimerlerin kompozisyonel, moleküler, termal ve arayüzey (hava/su) özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 55 s.
- Yaman, K. 2013. 1920'den günümüze TC resmi gazete arşivinde salep ve ticareti ile ilgili yasal düzenlemeler. *Journal of History Culture and Art Research*, 2, (1): 172-180.
- Yazman, M.M. 2014. Pirinçte tağşişin kalite özelliklerine göre belirlenmesi ve piyasadaki pirinçlerin türk gıda kodeksine uygunluğunun saptanması. Yüksek lisans, Harran Üniversitesi, Harran, 96 s.
- Yılmaz, A. 2015. Farklı formülasyonlarla hazırlanan salep benzeri içeceklerin reolojik ve duyuşal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans, Akdeniz üniversitesi, Antalya, 47 s.
- Yılmaz, M. 2011. Gıda ürünlerinde şeker yerine kullanılan doğal ve sentetik maddelerin analizi için yeni yöntem geliştirmek. Doktora, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 144 s.
- Yılmaz, M.T., Tatlisu, N.B., Toker, O.S., Karaman, S., Dertli, E., Sagdic, O. and Arici, M. 2014. Steady, dynamic and creep rheological analysis as a novel approach to detect honey adulteration by fructose and saccharose syrups: Correlations with HPLC-RID results. *Food Research International*, 64, 634-646.
- Yücel, P., Güçlü, H., Köseoğlu, T., Mert, Y. and Oktar, O. 2016. Gıda izlenebilirliğinde kararlı izotop ölçümlerinin uygulanması. 1, 35.

- Yücesoy, D. and Özen, B. 2013. Authentication of a Turkish traditional aniseed flavoured distilled spirit, raki. *Food Chemistry*, 141, (2): 1461-1465.



7. EKLER

EK-1. Bu çalışmada kullanılan katkı maddesi, taklit ve taşıyıcı örnekleri ve kullanılan markalar

İsim	Marka
Guar sakız	Tito
Guar sakız	Alfasol
Guar sakız	Havancızade
Arabik sakızı	Tito
Arabik sakızı	Alfasol
Keçiboynuzu sakızı	Tito
Keçiboynuzu sakızı	Alfasol
Keçiboynuzu sakızı	Benoset Lbg A1
Keçiboynuzu unu (özü)	Havancızade
Konjak sakız	Zen
Konjak sakız	Konjacfoods
Glukomannan tozu	Herbal Island
Buğday nişastası	Sinangil
Buğday nişastası	Dr. OETKER
Buğday nişastası	Güneş
Mısır nişastası	Bizim Mutfak
Mısır nişastası	Alfasol
Mısır nişastası	Dr. OETKER
Patates nişastası	Tito
Patates nişastası	Alfasol
Patates nişastası	Güneş
Pirinç nişastası	Tito
Pirinç nişastası	Alfasol
Şeker	Doğuş
Şeker	Pakmaya
Şeker	Kübi
Yağsız süt tozu	Pınar
Yağsız süt tozu	Alfasol
Yağsız süt tozu	Dr. GUSTO
Vanilya	Dkt Vanıllın
Vanilya	Arifoğlu
Vanilya	Rough Diamond
Tarçın	Antik
Tarçın	Alfasol
Tarçın	Kübi
Öğütülmüş makarna	Selva
Öğütülmüş makarna	Piyale (Spaghetti)
Öğütülmüş makarna	Nuhun Ankara
Galeta unu	Bağdat
Galeta unu	Akman

Ek 1'in devamı

İsim	Marka
Galeta unu	Piyale
Öğütülmüş pirinç	Tito
Öğütülmüş pirinç	Pakmaya
Öğütülmüş pirinç	Bizden
Öğütülmüş bulgur	Duru
Öğütülmüş bulgur	Doğalsan
Öğütülmüş bulgur	Anadolu Mutfağı
Buğday unu	Selva
Buğday unu	Tito
Buğday unu	Ova
Ksantan sakız	Tito
Ksantan sakız	Alfasol
Ksantan sakız	Havancızade
Salep Sıvı Aroma Verici	Aromedrops
Salep Sıvı Aroma Verici	Aromani
Salep Sıvı Aroma Verici	Tito
Salep Toz Aroma Verici	Aromedrops
Salep Toz Aroma Verici	Tito

EK-2. Çalışma kapsamında incelenen parametreler bakımından salep örneklerinde tespit edilen en düşük, en yüksek ve ortalama değerler

	Protein (%)	Rutubet (%)	Kül (%)	% 10 HCl'de Çözünmeyen Kül (%)	İndirgen Şeker (mg/kg)	Glukomannan (gr/100gr)	Toplam Nişasta (gr/100gr)
En az-en çok	1,97 - 12,71	5,63 - 10,85	1,36 - 4,30	0,03 - 0,93	160,50 - 66297,50	2,04 - 47,03	15,42 - 74,34
Ortalama	6,32	7,67	2,13	0,41	6536,57	13,88	42,97
	Demir (mg/kg)	Çinko (mg/kg)	Mangan (mg/kg)	Bakır (mg/kg)	Stronsiyum (mg/kg)	Krom (mg/kg)	Nikel (mg/kg)
En az-en çok	57,05 - 417,58	4,76 - 56,82	5,12 - 52,40	3,56 - 15,71	6,67 - 27,83	0,60 - 35,59	0,22 - 23,95
Ortalama	158,74	1559	17,49	6,71	13,65	7,25	5,30
	Titanyum (mg/kg)	Rubidyum (mg/kg)	Baryum (mg/kg)	Molibden (mg/kg)	Vanadyum (mg/kg)	Kobalt (mg/kg)	Lityum (mg/kg)
En az-en çok	4,10 - 24,12	0,63 - 44,25	0,70 - 15,86	0,03 - 1,22	0,04 - 1,31	0,05 - 0,66	0,09 - 0,70
Ortalama	10,32	5,45	4,29	0,31	0,34	0,19	0,23
	Galyum (mg/kg)	Selenyum (mg/kg)	Sezyum (mg/kg)	Antimon (mg/kg)	Berilyum (mg/kg)	Talyum (mg/kg)	Bizmut (mg/kg)
En az-en çok	0,02 - 0,68	0,00 - 0,31	0,00 - 2,18	0,00 - 29,04	0,00 - 7,48	0,00 - 52,81	0,00 - 1,41
Ortalama	0,16	0,09	0,16	0,94	0,13	0,98	0,03
	¹³C/¹²C (‰)	¹⁵N/¹⁴N (‰)	¹⁸O/¹⁶O (‰)	¹H/²H (‰)	Erime (°C)	ΔH (j/g)	Tg (°C)
En az-en çok	(-29,76) - (-26,61)	(-9,25) - (6,66)	28,09 - 37,31	(-144,86) - (-84,20)	124,77 - 178,97	109,99 - 268,57	34,97 - 125,48
Ortalama	(-27,97)	1,46	32,10	(-123,26)	128,69	157,10	60,27
	Sakkaroz (mg/kg)	Glikoz (mg/kg)	Fruktoz (mg/kg)	Tartarik asit (mg/kg)	Malik asit (mg/kg)	Fumarik asit (mg/kg)	Sitrik asit (mg/kg)
En az-en çok	658,00 - 35894,50	0,00 - 27288,00	0,00 - 43609,00	0,00 - 60,28	0,00 - 2885,52	0,00 - 2777,71	0,00 - 17361,35
Ortalama	6820,10	2726,36	3810,55	6,38	103,65	92,67	907,63
	Treonin (mg/kg)	Lizin (mg/kg)	Arjinin (mg/kg)	Histidin (mg/kg)	Aspartik asit (mg/kg)	Sistein (mg/kg)	Glutamik asit (mg/kg)
En az-en çok	0,00 - 283,01	0,00 - 1275,05	0,00 - 7169,55	0,00 - 560,55	0,00 - 400,88	0,00 - 38,87	0,00 - 762,36
Ortalama	93,22	434,28	2483,03	125,54	107,57	1,51	258,61
	Serin (mg/kg)	Prolin (mg/kg)	Valin (mg/kg)	Metiyonin (mg/kg)	Tirozin (mg/kg)	Lösin+İzolösin (mg/kg)	Fenilalanin (mg/kg)
En az-en çok	0,00 - 689,64	0,00 - 771,28	0,00 - 1532,02	0,00 - 143,01	0,00 - 1066,56	0,00 - 821,97	0,00 - 2826,79
Ortalama	248,90	83,79	195,24	20,38	348,04	122,44	327,49

<LOD olan değerlerde sıfır "0,00" olarak gösterilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Kevser BİLGİN

kevserbilginn@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2015-	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği ABD, Antalya
Yüksek Lisans 2012-2015	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği ABD, Antalya
Lisans 2006-2010	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği ABD, Antalya

ESERLER

Yayınlar

- Boyacı Gündüz, C. P., Bilgin, A. K. and Cengiz, M. F. 2017. Acrylamide Contents of Some Commercial Crackers, Biscuits and Baby Biscuits. *Academic Food Journal/Akademik Gıda*, 15 (1).
- Cengiz M.F. and Bilgin A.K. 2016. Determination of major sodium iodide symporter (NIS) inhibitors in drinking waters using ion chromatography with conductivity detector. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 120, 190-197, 2016
- Cengiz M.F., Durak M.Z., Nilufer Ş. and Bilgin A.K. 2015. Ion Chromatographic Determination of Free Cyanide in Different Classes of Bottled Natural Mineral Water Consumed in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 18 (4), 746–756.
- Cengiz M.F., Catal M., Erler F. and Bilgin A.K. 2014. Rapid and Sensitive Determination of the Prochloraz Residues in the Cultivated Mushroom, *Agaricus Bisporus* (Lange) Imbach. *Analytical Methods*, 6 (6), 1970-1976.
- Cengiz M.F., Catal M., Erler F. and Bilgin A.K. 2014. The Effects of Heat Treatment on the Degradation of the Organophosphate Pesticide Chlorpyrifos-Ethyl in Tomato Homogenate”, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 7 (4), 537-544.
- Cengiz M.F. ve Bilgin A.K. 2013. İçme Suları ve Gıdalarda Perklorat Kontaminasyonu, *Akademik Gıda*, 11 (1), 69-75.

Hakemli kongre /sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

- Cengiz M.F.,Gümüş C., Tonguç T., Erkeymaz T., Basancelebi O., Bilgin A.K., “Composition of Amino Acids in Different Varieties of Salep”, 1. International congress on medicinal and aromatic plants, Konya, TÜRKİYE, 10-12 Mayıs 2017, pp.314.
- Cengiz M.F., Gümüş C., Karakaş B., Bilgin A.K., Basancelebi O., “Comparison of Some Important Glucomannan and Starch Contents of Salep Collected From Five Different Regions of Turkey”, International Conservation Platform for Orchids Native To Greece- Turkey (ICON), Antalya, TÜRKİYE, 18-21 Nisan 2017, pp.10
- Cengiz M.F., Bilgin A.K., Basancelebi O., “İçme Sularında Guatrojen Madde Kalıntıları”, 2. Uluslararası Su ve Sağlık Kongresi, Antalya, TÜRKİYE, 13-17 ŞUBAT 2017, pp.629-632.
- Cengiz M.F., Ayşe Kevser B., "Determination of Sodium Iodide Symporter NIS Inhibitors in Drinking Waters using Ion Chromatography with Conductivity Detector", 51th Florida Pesticide Residue Workshop, North American Chemical Residue Workshop,Florida, UNITED STATES of AMERICA, 20-23 Temmuz 2014, pp.56-56
- Cengiz M.F., Bilgin A.K., "Thiocyanate Determination In Drinking Water by Ion Chromatography", EuroFoodChem XVII, İstanbul, TÜRKİYE, 7-10 Mayıs 2013, pp.459-459
- Cengiz M.F., Bilgin A.K., "Direct Determination of Perchlorate in Drinking Water by Ion Chromatography", EuroFoodChem XVII, İstanbul, TÜRKİYE, 8-10 Mayıs 2013, pp.458-458
- Cengiz M.F., Bilgin A.K., Boyacı Gündüz C.P., "Thermal Degradation of Chlorpyrifos-Ethyl in Tomato Homogenate", EuroFoodChem XVII, İstanbul, TÜRKİYE, 7-10 Mayıs 2013, pp.450-450
- Cengiz M.F., Bilgin A.K., "Thiocyanate Determination in Drinking Water by Ion Chromatography", EuroFoodChem XVII, İstanbul, TÜRKİYE, 7-10 Mayıs 2013, pp.459-459
- Bilgin A.K., Ünver E.S., Karakaş B. and Erem F., " Effect of Partial Substitution of Buckwheat Flour with Starches and Formulation with Egg White on the Sensory and Textural Quality of Buckwheat Bread", Novel Approaches In Food Industry (NAFI 2010) Congress, Çeşme-İzmir, TÜRKİYE.