T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

BEBEK GIDALARINDA ISIL İŞLEM BASAMAĞINDA ORTAYA ÇIKAN 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL'IN (5-HMF) HPTLC İLE TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Müh. Laman MEHDİYEVA

İSTANBUL, 2022

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

BEBEK GIDALARINDA ISIL İŞLEM BASAMAĞINDA ORTAYA ÇIKAN 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL'IN (5-HMF) HPTLC İLE TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Müh. Laman MEHDİYEVA

İSTANBUL, 2022

İÇENDEKİLER

İÇENDEKİLER **4**

ÖNSÖZ **6**

1 GİRİŞ VE AMAÇ **9**

2 GENEL BİLGİLER **11**

2.1 BEBEK GIDALARINDA PEKMEZİN ÖNEMİ **11**

2.2 Bebek gıdalarında pekmez kaynaklı güvenlik sorunları 12

2.2.1 Fiziksel tehlike 13

2.3 Maillard Reaksiyonu 15

2.3.1. Maillard reaksiyonunu etkileyen faktörler 18

2.3.1.1 pH 19

2.3.1.2 Sıcaklık ve Zaman 20

2.4 GIDALARDA ENZİMATİK OLMAYAN ESMERLEŞME REAKSIYONU 21

2.4.1 ÇEŞİTLİ GIDALARDAKİ HMF OLUŞUMLARI 25

2.4.2 Pekmezde HMF Oluşumu 27

2.4.3 5- HMF'NIN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ 27

2.5 KROMATOGRAFİ 29

2.5.1. KROMATOGRAFİK YÖNTEMİN ÇEŞİTLERİ 31

2.5.2.YÜKSEK PERFORMANSLI İNCE TABAKA KROMOTOGRAFİSİ (YPİTK) . 33

2.5.2.1 ÖRNEĞİN PLAKA UYGLANMASI 34

2.5.2.2 PLAKIN YÜRÜTÜLMESİ 34

2.5.2.3 KROMOTOGRAMIN GÖRÜNTÜLENMESİ 35

2.5.2.4 KALİTATİF ANALİZ 36

2.5.2.5 KANTİTATİF ANALİZ 36

2.5.3. EKSTRAKSİYON (ÇEKİTLEME İŞLEMİ) 37
2.5.3.1 GIDALARA UYGULANAN ÇEKİTLEME İŞLEMLERİ 39
2.5.3.1.1 QUECHERS ÇEKİTLEME METODU 40
2.6 VALİDASYON ÇALIŞMASI 41
2.6.1 Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity) 42
2.6.2 Doğruluk (Accuracy) 43
2.6.3 Doğrusallık (Linearite) ve Çalışma Aralığı (Range) 43
2.6.4 Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ 44
3. GEREÇ VE YÖNTEM 45
3.1. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar 45
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 46
3.3. Örnek toplanması ve Çalışma Planı 46
3.4. YPİTK'da 5-HMF'nin Analizi 47
3.4.1. 5-HMF Analizinde Kullanılan Çözeltiler 47
3.4.1.1 5-HMF ANA STOK ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI 48
3.4.1.2 KAFEİN İÇ STANDART ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI 48
3.4.2. Örnek Hazırlama Prosedürü 49
Quechers prosedürü (Asetonitril / Q-ACE) 49
Quechers prosedürü (Etialsetat / Q-EA) 49
3.4.4. Validasyon Çalışmaları 49
3.4.5. Gıda Örneklerinin YPİTK ile Analizi 51
4. BULGULAR 52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 58
6. KAYNAKLAR 61

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimleriyle desteklerini eksik etmeyen saygıdeğer hocalarım ***Prof. Dr. Erdinç Öztürk ve Doç. Dr. Selda Mercan'a,***

Her koşulda zorlukları ve engelleri aşmama yardımcı olan, bilgi birikimi ile bir hoca; güler yüzü ve pozitifliği ile danışman hocam ve mentorum ***Doç. Dr. Zeynep Türkmen***'e,

Çalışmam boyunca her türlü destek veren ve bilgilerle aydınlatan saygıdeğer hocam ***Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN'a***,

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve manevi desteklerini hissettiğim dönem arkadaşım*larıma,* Adli Toksikoloji Laboratuvarı ekibi ***Arş.Gör. Dr. Merve Kuloğlu Genç;*** **Uzm.** ***Kim. Tuğba Tekin Bülbül*** ve ***Bio. Murat Yayla***'ya,

Bugünlere gelmemi sağlayan, uzakta olsalar dahi kendilerini hep yanımda hissettiğim babaannem Almaz Mehdiyeva'ya ve dedem Çingiz Mehdiyev'e teşekkürü bir borç bilirim.

Laman MEHDİYEVA

İstanbul, Mayıs 2022

SUMMARY

The presence of additives in food, regardless of origin, is a major concern for consumers. This worry is even greater when it comes to babies. It is a furanic compound that can be formed by the Maillard reaction of 5-HMF or the dehydration of hexose in an acid medium. These low molecular weight and furan ring-containing compounds have recently been found in a wide variety of foods, have genotoxic and carcinogenic risks due to α, ß unsaturated carbonyl groups and allylic hydroxyl groups, as well as being irritating to the upper respiratory tract, eyes, skin and mucous membranes. is reported to exist. Especially when the baby's body is weaker than an adult and it is predicted that the exposure will be higher, the daily intake limits should be evaluated in terms of future problems.

The legal limit for 5-HMF contamination in honey samples in the world for adults has been determined as 40 mg/kg by the Food Codex Committee. Our country is a leading country in molasses production as well as honey. For this reason, it has been reported by the Turkish Standards Institute (TSE) that the legal limit for adult individuals in food matrices such as grenadine syrup and molasses is 50 mg/kg and 75 mg/kg, respectively (18,19). On the other hand, molasses is an important food especially for babies and children who need urgent energy (20). However, there is currently no study showing the legal regulation limit and toxicological importance of 5-HMF in baby products.

In this study, HPTLC, which is one of the most effective detection methods for the determination of 5 HMF in locally collected baby food samples from the market, provided a fast, unique, easy, low detection limit, repeatability and high recovery method validity. Thus, with this developed method, the analysis of molasses samples (n=15) obtained from pharmacies in Istanbul (grape, mulberry, black mulberry and carob) was carried out.

High Performance Thin Layer Chromatography (YPITK-HPTLC) has become a modern analytical method by minimizing the errors of traditional Thin Layer Chromatography (TLC). Thanks to the special plates that offer a low level of quantitative analysis, the method offers extraordinary efficiency and applicability, especially in forensic medicine and food industry studies (5-9).

In the study, the linear range for 7-point calibration solutions and 5 HMF was determined as 1-) 100 ng/mL for molasses samples. In this range, the correlation coefficient was found to be r2=0.9981. The obtained LOD and LOQ values are 36 μg/mL and 46 μg/mL, respectively. The QUECHERS shrinking method, which has been preferred recently in food samples, was preferred, and with this method modified from the literature using two different solutions, 5-HMF was added to the sample before shrinking, and the recovery rate was 67.96±6.55% with acetonitrile; It was found to be 90.06±5.73% with ethylacetate.

Considering the average recovery rate determined by the YPITK method developed in food samples containing molasses specific to 15 babies collected from the market in our study, it was found between 75.5-360.1 μg/kg in 15 samples. In 10 samples collected, it was also found to be above the legal limit specific to an adult individual (160.8-360.1 μg/kg). Increasing cancer cases, the difficulties encountered in its treatment and the expenditures made are reaching increasingly large dimensions. Considering that there are some risky components in foodstuffs in the formation of cancer, studies on food safety of infants should be carried out urgently, the amount of possible risks such as 5-HMF in different foods should be determined and the necessary preventive food processes should be established and legislative studies should be initiated.

Keywords: Food samples containing molasses for infants, 5-HMF, public health

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Gıdalardaki katkı maddelerinin varlığı, kökeni ne olursa olsun, tüketiciler için önemli bir endişe kaynağıdır. Bu endişe, söz konusu bebekler olunca haliyle daha da fazladır.

5-HMF'nin Maillard reaksiyonu veya asit ortamda heksoz dehidrasyonu ile oluşabilen furanik bir bileşiktir. Düşük moleküler ağırlıklı ve furan halkası içeren bu bileşiklerin son dönemde geniş bir gıda çeşitliliğinin de bulunduğu, α,ß-doymamış karbonil grupları ve allilik hidroksil grupları nedeniyle genotoksik ve kanserojenik riskler içerdiğinin yanı sıra, üst solunuma, göz, deri ve mukoza membranlarına karşı tahriş edici özelliğinin bulunduğu bildirilmektedir. Özellikle bebek bünyesinin, bir yetişkinden daha zayıf olduğu ve maruziyetin daha yüksek olacağı ön görüldüğünde, günlük alım miktarına ilişkin limitlerin ileride karşılaşılacak sorunlar bakımından değerlendirilmesi gerekmektedir.

Dünyada bal örnekleri içinde 5-HMF kontaminasyonuna ilişkin yetişkin bireylerde yasal sınır Gıda Kodeks Komitesi tarafından 40 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bal kadar ülkemiz pekmez üretiminde de lider bir ülke konumdadır. Bu nedenle, ülkemizde Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından nar şurubu ve pekmez gibi gıda matrislerinde yetişkin bireylerde yasal sınırın sırasıyla 50 mg/kg ve 75 mg/kg olduğu bildirilmektedir [18,19]. Diğer taraftan pekmez, özellikle acil enerji ihtiyacı olan bebekler ve çocuklar için önemli bir besindir (20). Ancak, 5-HMF'nin bebek ürünlerinde yasal düzenleme sınırı ve toksikolojik önemi günümüzde net bir şekilde gösterildiğine dair çalışma bulunmakmaktadır.

Bu çalışmada piyasadan toplanan yöresel bazda bebek gıda örneklerinde 5-HMF'nin belirlenmesi için en etkili belirleme yöntemlerinden biri olan HPTLC ile hızlı, özgün, kolay, düşük tayin limitli, tekrar edilebilirliği ve geri kazanımı yüksek bir yöntem geçerliliği sağlanmıştır. Böylece geliştirilen bu yöntem ile İstanbul ili eczanelerinden temin edilen (üzüm, dut, karadut ve keçiboynuzu) pekmez örneklerinin (n=15) analizi gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK-HPTLC), geleneksel İnce Tabaka Kromatografisinin (TLC) hatalarını en aza indirerek modern bir analitik yöntem haline gelmiştir. Düşük seviyede kantitatif analiz imkanı sunan özel plakalar sayesinde, yöntem özellikle adli tıp ve gıda endüstrisi çalışmalarında olağanüstü verim ve uygulanabilirlik sunmaktadır (5-9).

Çalışmada, 7 noktalı kalibrasyon çözeltileri ile 5-HMF için doğrusal aralığı pekmez örnekleri için 1-100 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı r^2=0.9981 olarak bulunmuştur. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla 36 µg/mL ve 46 µg/mL'dir. Gıda örneklerinde son dönemde tercih edilen QUECHERS çekitleme yöntemi tercih edilmiş, iki farklı çöelti kullanılarak literatürden modifiye edilerek kullanılan bu yöntemle, 5-HMF'nin örneğe çekitleme öncesi katım yapılarak gerçekleştirilmiştir ve geri kazanım oranı asetonitril ile %67.96±6.55; etilasetat ile %90.06±5.73 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda piyasadan toplanan 15 bebeklere özgü pekmez içeren gıda örneklerinde geliştirilen YPİTK yöntemi ile belirlenen ortalama geri kazanım oranı göz önüne alındığında 15 örnekte 75.5-360.1 µg/kg arasında bulunmuştur. Toplanan 10 örnekte yetişkin bir bireye özgü yasal sınırın da üstünde olduğu görülmüştür (160.8-360.1 µg/kg).

Artan kanser vakaları, tedavisi konusunda karşılaşılan zorluklar ve yapılan harcamalar giderek daha çok büyük boyutlara ulaşmaktadır. Kanser oluşumunda gıda maddeleri içerisinde riskli olan bazı bileşenlerin bulunduğu göz önüne alındığında, özellikle bebeklerin gıda güvenliğini ilgilendiren çalışmaların ivedilikle yapılması, 5-HMF gibi olası risklerin değişik gıdalardaki miktarlarının belirlenmesi ve gerekli önleyici gıda proseslerinin oluşturularak, mevzuat çalışmalarının başlatılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bebeklere özgü pekmez içeren gıda örnekleri, 5-HMF, halk sağlığı

2 GENEL BİLGİLER

2.1 BEBEK GIDALARINDA PEKMEZİN ÖNEMİ

Bebeklerin gıda ihtiyacı anne sütü ve anne sütünden başka onlar için uygun olan gıdalarla karşılanmalıdır. Bebeklere verilen gıdalar anne sütüne en yakın besin içeriğine sahip olan bileşenlerden oluşmalıdır. Anne sütü ve ek verilen gıdaları kıyasladığımızda onların iki önemli faktörüne dikkat etmemiz gerekir- proteinler ve karbonhidratlar. Bebekler, sunulan karbonhidrat içerlikli gıdalardan yararlanabilmesi için hazm sistemlerindeki fermentler tarafından daha basit sakaridlere kadar ayırmaları gerekir. Üzüm dolasıyla pekmezin içermiş oldukları karbonhidaratların %80 kadarı monasakarid şeklinde oldukları için bebek ve çocukların beslenmesinde çok önemli yere sahiptir. Sakkarozun glikoz ve früktoza ayrılabilmesi için gerekli olan sukroz enzimi bebeklerin vücudu tarafından salgılanmamaktadır dolayısıyla küçük yaşdakı çocuk ve bebeklerin beslenmesinde sakkaroz (çay şekeri) kullanılması doğru değildir. Üzüm ve pekmezin içeriğinde olan karbonhidratlar glikoz ve früktoz şeklinde oldukları için sindirim sistemiminde ayrıştırılmadan kana geçmesi sağlanır ve ek çaba duyulmadan hücre dışından içine diffüzyonla bağlanır. Bu sebepten hızlı bir enerji kazanımı sağlar bu da yetişkin insana göre yoğun aktivetesi olan çocuk ve bebekler için büyük önemi vardır.

Pekmez farklı gıda hammaddelerinden çeşitli metotlarla yapılabilen gıda maddesidir. Ülkemizde sadece üzümden imal edilen pekmezle ilgili Türk Standartları Enstitüsü tarafından standart belirlemiştir (TS 3792). Bu da bize, diğer meyvelerden üretilen pekmezlerle ilgili bir standardın olmadığını göstermektedir. TS 3792'ye göre üzüm pekmezi; "Taze veya kuru üzüm şırasının asitliğini azaltmaksızın veya kalsiyum karbonat veya sodyum karbonat ile asitliğini azaltarak tanen, jelatin veya uygun enzimlerle durulttuktan sonra tekniğine uygun

olarak vakum altında veya açıkta koyulaştırılması ile elde edilen koyu kıvamlı veya bal, çöven, süt, süttozu, yumurta akı gibi maddeler ilavesi ile katılaştırılan bir mamuldür." Pekmez, Avrupa'da üretilen molasesden farklı üretim şeması ve özelliğine sahiptir.

		Sıvı Pekmez	Katı pekmez
Suda çözünür katı madde (Brix °) (en az, %)		68	80
Hidroksimetil furfural (HMF) (en çok, mg/kg)		75	100
Toplam Kül (en çok, %)		2,5	3
pH	tatlı pekmez için ekşi pekmez için	≤ 5.0 – 6.0 3.5 – 5.0 >	≤ 5.0 – 6.0 3.5 – 5.0 >
Sakaroz (en çok, %)		1	1
Fruktoz/Glukoz oranı		0,9 – 1,1	0,9 – 1,1
Ticari Glukoz		Bulunmamalı	
C13 (‰) binde		- 23,5'den daha negatif olmalı	- 23,5'den daha negatif olmalı
Organik Asitler	Fümarik asit	Bulunmamalı	
	Okzalik asit	Bulunmamalı	
	İzobütirik asit	Bulunmamalı	

TABLO.1 Ts 3782

Standartda bulunan 'PEKMEZİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ' içeriğine bakıcak olursak başlıca kalite değerleri çözünür katı madde miktarı (briks değeri), HMF değeri ve şeker değeridir. (TABLO1.) Briks değeri daha çok katı-akışkan yapıya sahiptir.

2.2 Bebek gıdalarında pekmez kaynaklı güvenlik sorunları

Bebek maması ve diğer bebek mamalarına yönelik standartlar ve düzenlemeler, yüksek düzeyde güvenlik sağlamayı amaçlar ve diğer gıda ürünlerine ilişkin düzenlemelerden çok daha katıdır (3, 7-9). Aslında, 1980'de ABD Bebek Formülü Yasası'nın kabul edilmesine yol açan ciddi bir güvenlik sorunuydu.

Sorun, 1978'de ABD'deki büyük bir bebek maması üreticisi tarafından sodyum klorür içeriğinde belirgin bir azalmayla piyasaya sürülen iki soya bebek formülünün formülasyonundaki değişiklikti. Klor eksikliği olan bu formülasyonlar, onları alan bebeklerde

hipokloremik metabolik alkaloza ve büyümede duraksamalara ve daha sonra bunların gelişimsel sonuçlar ve davranışsal sorunlar üzerinde uzun vadeli olumsuz etkilerle ilişkili olduğu bulundu (10-13). Birleşik Devletler Kongresi konuyu gözden geçirdi ve bebek mamasıyla beslenen bebeklerin korunmasının, 1980 tarihli ABD Bebek Maması Yasası'na yol açan bebek maması üzerinde daha fazla düzenleyici kontrolle iyileştirilmesi gerektiğine karar verdi. Bu kanun ilk olarak bebek formülleri için minimum besin maddesi gerekliliklerini, tanımlanmış tağşiş ve kalite kontrol prosedürlerini ve belirlenmiş denetim gerekliliklerini ve ayrıca geri çağırma prosedürlerini belirlemiştir (9).

Bebek formülleri ve bebek mamalarına ilişkin bu ve daha fazla ulusal, bölgesel ve küresel standartların ve düzenlemelerin oluşturulması, bu tür ürünlerin günümüzde var olan çok yüksek güvenlik düzeyine katkıda bulunmuştur.

En büyük bebek maması güvenliği sorunu 2008'de Çin'de meydana geldi: bebek maması, daha yüksek bir protein içeriğini taklit etmek için melamin eklenmiş sütten üretildi, bu da çok sayıda bebekte ürolitiyazise ve buna bağlı hasara neden oldu (23-27) . 300.000'den fazla bebeğin bu şekilde karıştırılmış formüle maruz kaldığı ve on binlerce hastaneye yatış ve rapor edilen 6 ölümle birlikte tahmin edilmektedir (27, 28).

2.2.1 Fiziksel tehlike

Özellikle geleneksel yöntemle hazırlanan pekmezlerde yabancı madde kontaminasyonu olma riski yüksektir. Fiziksel tehlike hasat depolama ve üretim zamanı pekmezin hammaddesine öngörülemeyen kontrol noktalarından son ürünlere bulaşan taş, toptak, ağaç, metal, cam cisimlerden oluşmaktadır. Bu risklerin önlenmesi için HACCP ve GMP'nin öngördüğü tekniklere uyulması gerekmektedir .

2.2.2 Biolojik tehlike

Gıda zehirlenmelerine sebep olan patojen mikroorganizmalar genellikle gıda üretimi zamanı çalışan insanlardan doğrudan ve dolaylı olarak kirli araç-gereçlerden, haşereler ve kemirgenlerden, toprak gibi kaynaklardan da bulaşabilmektedir. Gıdalara kontamine olan ve mikroorganizmaların üremesini engelleyecek önlemler alınmadan üretilen veya uygun saklama koşulları sağlanmadıkta hızla üreyen mikroorganizmalar (küfler, parazitler, bakteriler), virüsler ve mikrobiyal toksinler oluşmaktadır. Bir diğer tehlike kaynağı genetiği değiştirilmiş organizmalarıdır (GDO).

2.2.3 Kimyasal tehlike

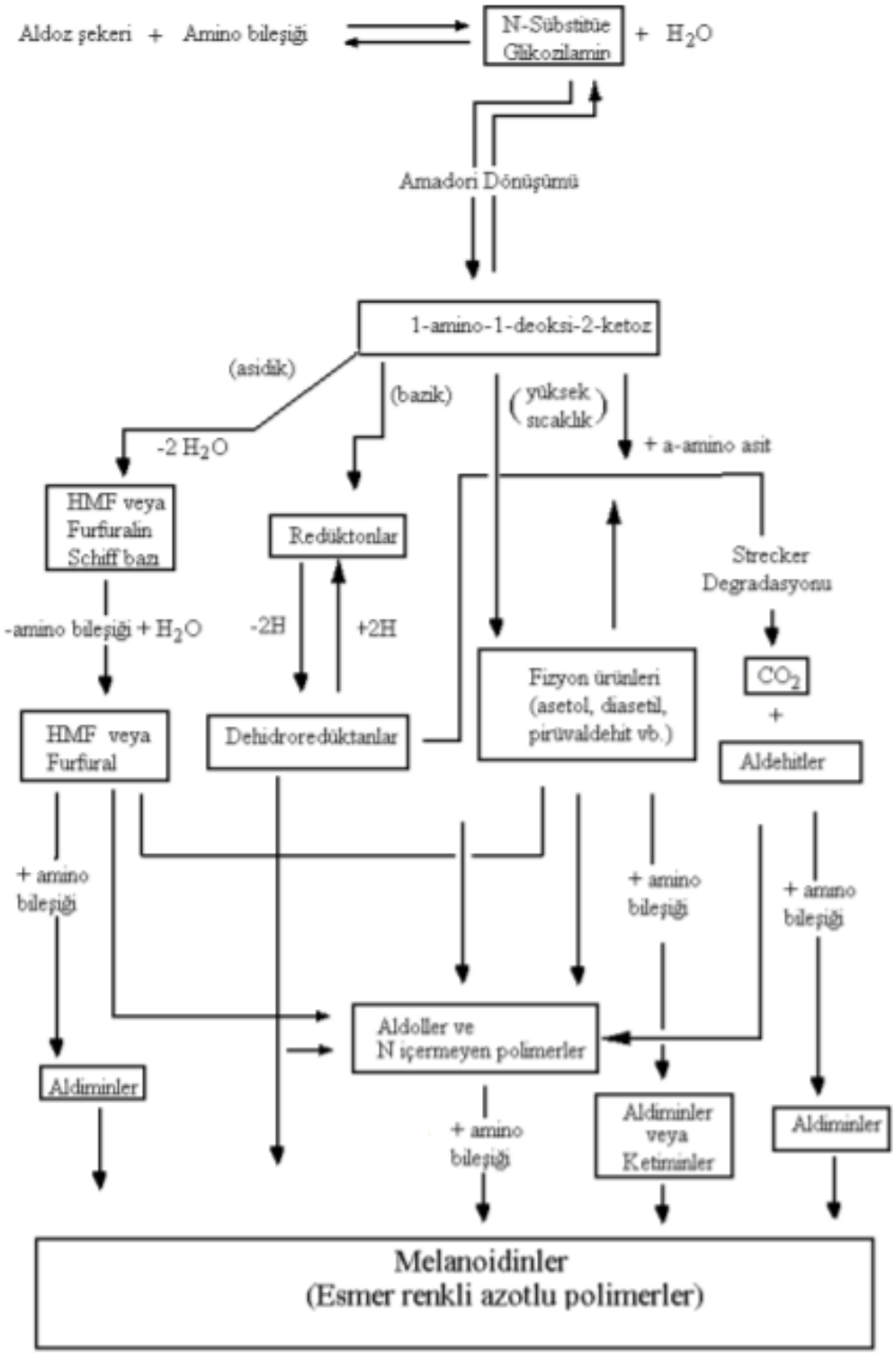
Gıdalarda ısıl işlem nedeniyle HMF sentezi, bir dereceye kadar arzu edilen duyusal özelliklerin geliştirilmesinden sorumludur. Pekmez ısıl işlemle üretilen gıda ürünü olduğu için karamelizasyon ektikisiyle kimyasal tehlike ortaya çıkıyor. Maillard reaksiyonunun ara basamağında 5-HMF oluşabildiği gibi, karamelizasyon oluşumu pH değerinin 3'den küçük ve 9'dan büyük olduğu ortamlarda ve 120°C'den yüksek sıcaklıklarda hızlanmaktadır. 5-HMF Konsantrasyonu, işlenmiş meyveler, pekmez, kahve, süt vb. için kalite belirteci olarak kullanılabilir. 5-Hidroksimetil-2-furfural, şekerlerin termal bir bozunma ürünüdür; ve farklı ara ürünleri ve öncüleri içeren birden çok yolu izleyen farklı reaksiyonların bir kombinasyonu ile oluşur. 5-HMF oluşumunun daha çok sıcaklık, şeker türü, pH, su aktivitesi ve ortamda yoğunlaşan iki değerlikli katyonlara bağlı olduğu bildirilmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı ve furan halkası içeren bu bileşiklerin son dönemde geniş bir gıda çeşitliliğinin de bulunduğu, α,ß-doymamış karbonil grupları ve allilik hidroksil grupları nedeniyle genotoksik ve

kanserojenik riskler içerdiğinin yanı sıra, üst solunuma, göz, deri ve mukoza membranlarına karşı tahriş edici özelliğinin bulunduğu bildirilmektedir.

2.3 Maillard Reaksiyonu

Maillard reaksiyonu yiyeceklerin görünüşünü ve tadını iyileştirmede önemli bir rol oynar. Maillard reaksiyonu yüksek karbonhidrat ve protein içeren, pH 4-7 (18) arasındaki, sıcaklığında 50℃ nin üzerinde ki gıdalarda renk (melanoidler), tat (aldehit ve ketonlar), fonksiyonel özellikler ve besin değeri oluşumu ile tercih edilir (27). Reaksiyonu aroma, tat ve renk ile ilgili olduğundan, özellikle kahve ve kakao çekirdeklerinin kavrulması, ekmek ve keklerin pişirilmesi, pekmez yapımı gibi geleneksel işlemlerde, gıda endüstrisinde merkezi ve büyük bir zorluk oluşturmuştur. Ayrıca Maillard reaksiyonu sırasında, gıdaların besin değeri için büyük önem taşıyan çok çeşitli reaksiyon ürünleri oluşur.

Maillard reaksiyonu çeşitli reaksiyonlardan oluşan bütün bir ağı kapsar. Hodge (1)'in orijinal kapsamlı reaksiyon şeması o zamandan beri gıda teknolojisi uzmanları tarafından geliştirilmiş ve detaylandırılmıştır, bu nedenle reaksiyonun anlaşılması istikrarlı bir şekilde ilerlemektedir. Gıdayı işlemede yer alan çeşitli faktörler etkiler ve bunlar gıda işleme değişkenleri olarak kabul edilebilir. Kinetik yaklaşım, reaksiyonun hız belirleyici adımlarını dikkate aldığından, bu mekanizmanın tamamlayıcı bir görünümünü sunma eğilimindedir. Maillard reaksiyonu, adını onu ilk tanımlayan Fransız kimyager Louis Maillard'dan (2) almıştır, ancak ilk tutarlı şema ancak 1953'te Hodge (1) tarafından ortaya atılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Hodge Maillard reaksiyon şeması.

Maillard tepkimesi sonucunda oluşan HMF, aldehit keton ve indirgen şekerlerle, aminler, aminoasitler, peptitler ve proteinler arasında oluşan bir dizi tepkimedir. Reaksiyonun başlaması için bu sistemde karbonil grubu ve amino grubu bulunması mutlaktır. Tepkime sıcaklık, pH ve su aktivitesi gibi faktörlere göre değişkenlik gösterir. Proteinler ve peptitler amino asitlerin kaynağını oluşturmaktadır. Gıdalarda serbest halde bulunan protein ve peptitler gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında proteinlerin hidrolizi ile oluşmaktadır. Amino asitler Maillard tepkimesinde reaksiyona katılma öncelikleri değişkenlik göstermektedir. Araştırmalar gösteriyor ki, amino asitlerin karboksil grubunun amino grubunun aktivitesini engellemektedir. Bu sonucun, karboksil grubu ile amino grubunun arasındaki uzaklık ilişkisine göre belirtilmektedir (11).

Serbest aminoasitler özellikle lisin ve arginin hızlı reaksiyona girdiği halde aspartik ve glutamik asit daha yavaş reaksiyona girer (12).

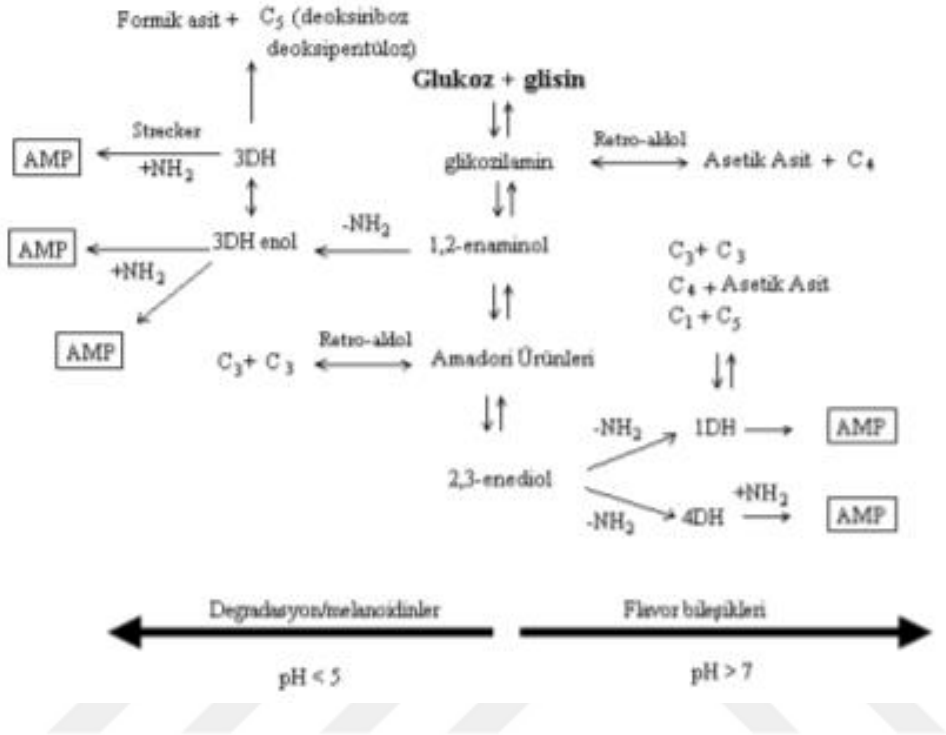
Maillard reaksiyonuna bakıcak olursak tepkime sıralamasına göre şekerler; riboz, ksiloz, arabinoz, mannoz, fruktoz, glukoz olarak sıralanabilir (13).

Maillard reaksiyonu asidik veya bazik ortamda gerçekleşmektedir. İdeal çalışabildiği su aktivitesi değeri 0,6-0,7dir . Tepkime hızı sıcaklık artışı ile doğru orantıda artar (14).

Şekerlerin serbest aldehit ya da keton içermesi azotla kolayca tepkimeye girmesine sebep olmaktadır.

Maillard reaksiyon ürünlerinin karmaşıklığı ve çeşitliliği, yıllar boyunca bilim adamlarının farklı araştırma alanlarına olan ilgisini artırdı (3-9). Hodge tarafından açıklanmayan yeni önemli yollar oluşturulmuştur (10) renk oluşumundaki en önemli ara maddelerin 3-deoksiosulosozlar ve 3,4-dideoksiosulos-3-en olduğunu, bunun glikoz durumunda 3-deoksiheksosuloz (DH) ve 3,4-dideoksiheksosuloz-3-en olduğunu bildirmiştir (DDH). 1990'da (12) ısıtılmış Amadori ürünlerinden 1-deoksi- ve 3-deoksiglukozonları izole ve

karakterize etti. (13) 13C etiketli şekerler kullanarak, reaksiyon mekanizmasına yeni bir bakış açısı kazandırmışlardır (Şekil 2). Anahtar ara maddelerin 1-, 3- ve 4-deoksiheksosulozlar olduğu farklı reaksiyon yollarını içerir.



Şekil 2. Tressl tarafından düzenlenmiş Maillard reaksiyonu şeması (Tressl ve ark., 1995)

Tressl'in bakış açısına uygun olarak, Maillard reaksiyonu için "kimyasal havuzlar" olarak adlandırılan bir sınıflandırma önerdi. Bu yaklaşım, Amadori ürününün oluştuğu geleneksel bozunmaya ek olarak, Maillard reaksiyonu sırasında amino asitlerin ve şekerlerin de bağımsız bozunmaya uğradığı gözlemine dayanmaktadır.

2.3.1. Maillard reaksiyonunu etkileyen faktörler

Gıdalardaki Maillard reaksiyonu, başlangıç maddelerinin miktarı, pH, su içeriği veya su aktivitesi gibi kimyasal faktörlerden ve ayrıca sıvı nemlendiriciler ve bisülfit gibi maddelerin varlığından etkilenir. Ek olarak, proses ve depolama sıcaklığı, O2 ve depolama boyunca paketleme gibi fiziksel faktörlerin gıdalardaki Maillard reaksiyonu üzerinde etkisi olacaktır.

Belirli bir amino bileşiği ile bir indirgeyici şeker arasındaki Maillard reaksiyonunun başlangıç hızı, indirgeyici şeker halkasının indirgenebilir bir türe açıldığı hız ile doğrudan ilişkilidir. Laktozla hidrolize edilmiş süt ürününde proses ve depolama boyunca Maillard reaksiyonunu değerlendiren son çalışmalar, hidrolize edilmemiş sütten çok daha iyi protein kalitesi gösterdi. Bu fark genellikle indirgeyici şekerler D-galaktoz ve D-glukozun (disakkarit hidrolizinden) varlığına bağlanır, bu alan disakkarit laktozdan daha reaktiftir. Reaksiyon için sunulan indirgeyici şeker sayısı Maillard reaksiyonunun hızını etkileyecektir. Ayrıca, pH'ın önemli bir etkisi ifade edilir. Enolizasyon reaksiyonları ile birlikte, Amadori ürünü ve dikarbonil türevleri, hidroksiaseton türevleri, gliseraldehit ve diketonlar gibi daha reaktif C2, C3, C4 ve C5 şeker fragmanları üreten aynı anda retro-aldol reaksiyonlarına girebilir. Daha yüksek pH değerlerinde retro-aldol reaksiyonları daha önemli hale gelir. Ayrıca Yaylayan ve Huyghues-Despointes (14), bazik koşullar altında ARP'nin serbest amino aside ek olarak asetik asit ve piruvaldehit ve diğer düşük şekerleri üretebileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, yüksek pH'ın lezzet oluşumuna giden ana yol olduğu ileri sürülmektedir. Retro-aldol reaksiyonlarına ek olarak, a-hidroksi karboniller, a-dikarboniller ve formik asidin dahil olduğu üç redoks mekanizması tanımlanmıştır.

2.3.1.1 pH

pH ölçeği, reaksiyon sıcaklıkları, basınç, süre, indirgeyici şekerlerin ve amino bileşiklerinin türleri ve konsantrasyonu, tamponlar, su aktivitesi, oksijen ve metallerin varlığı vb. gibi parametrelerin tümü Maillard reaksiyonları üzerinde bir etkiye sahip olabilir. Ortamın pH ölçeği, ara ve nihai ürünün kalitatif ve kantitatif bileşimi üzerinde iyi bir etki içerir. Disakkarit (indirgeyici olmayan bir şeker), yalnızca gliyosidik bağ hidrolize edildiğinde ve ayrıca indirgeyici monosakarit bileşenleri serbest kaldığında Maillard reaksiyonuna katılır, bu da

düşük pH ölçeğinde ve yüksek nem içeriğinde kolaylaştırılır ve Maillard oranında bir artışa yol açar.

Maillard reaksiyonu üzerindeki su aktivitesinin etkisinin, reaksiyonun ilk adımlarında ilgili indirgeyici şekerin kimya durumundaki bir kaymadan da etkilenebileceğini göstermektedir. Maillard reaksiyonu sayesinde esmerleşmeyi önlemek için gıdalara bisülfit eklenmesi gıda ticaretinde standart bir uygulama olmuştur.

2.3.1.2 Sıcaklık ve Zaman

Model sistemler üzerinde yapılan araştırmalar, sıcaklık ve ısıtma süresindeki bir artışın renk gelişiminde, karbon-azot oranında ve doymamışlık derecesinde ve dolayısıyla kimyasal aromatiklikte artışa yol açtığını göstermiştir. Gıdaların depolanması ve işlenmesi boyunca, katalizör Maillard esmerleşme reaksiyonları, düşük sıcaklıklarda olduğu gibi yüksek sıcaklıklarda da yüzeye çıkar. Sıcaklığın 10°C artması ile reaksiyon hızı 2-3 kat artacaktır.

Atmosferik O2'nin Etkisi: Bir gıdayı kapsayan atmosferde oksijenin varlığı Maillard reaksiyonunun hızını etkileyecektir. Kimyasal elementin Maillard reaksiyonu üzerindeki etkisi, gıda sisteminin su içeriği veya su aktivitesi ve dolayısıyla depolama sıcaklığı ile birleştirilir.

Su Aktivitesi. En iyi veya en düşük su aktivitesi (aw) değerlerinde reaksiyonun hızı düşüktür. Bununla birlikte, ara değerlerde keskin bir şekilde artarlar ve ayrıca reaksiyon yaklaşık 0.7'lik bir su aktivitesi için, yani çoğu gıda sisteminde yaklaşık %40-70'lik bir oran için maksimumdur.

Paketlemenin Etkisi: Paketleme, Maillard reaksiyonunun hızını etkilemektedir. Model gıda sistemi durumunda, yeterli paketleme ile sağlanan oksijensiz bir atmosferde ilgili dereceli

depolama, Maillard reaksiyonunun hızını önemli ölçüde azaltarak, önemli ölçüde daha uzun bir raf ömrüne yol açar.

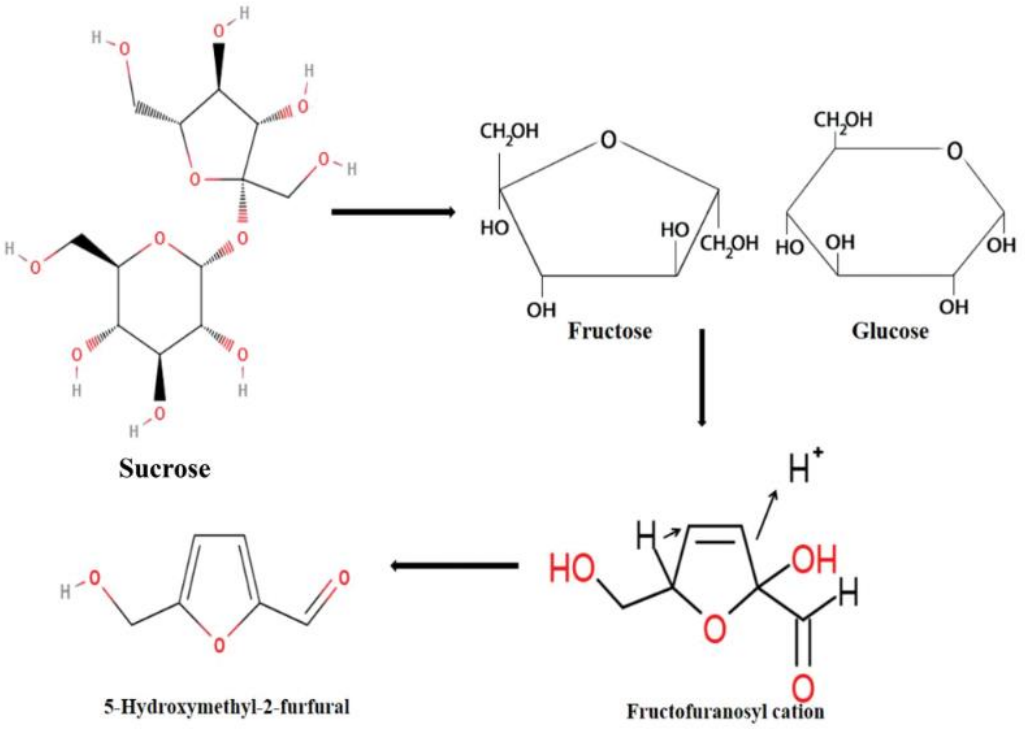
2.4 GIDALARDA ENZİMATİK OLMAYAN ESMERLEŞME REAKSIYONU

Enzimatik olmayan esmerleşme, gıdaların hazırlanması veya depolanması sırasında meydana gelen bir dizi kimyasal reaksiyonu içerir. Gıdaların duyusal kalitesini etkileyen uçucu lezzet molekülleri olan kahverengi bileşiklerin oluşumundan sorumludur. Sonuç olarak, enzimatik olmayan esmerleşme kahve ve kakao çekirdeklerinin kavrulmasında, ızgarada, ekmek ve pastane ürünlerinde, bira, balzamik sirke, viski ve hatta sert peynirler gibi bazı peynirlerin imalatında arzu edilir. Ayrıca, gıdanın besin değeri enzimatik olmayan esmerleştirme ile değiştirilebilir. Bazı örnekler, lizin gibi esansiyel amino asitlerin bozunmasını, protein sindirilebilirliğinin azalmasını, potansiyel olarak toksik bileşiklerin veya mutajenlerin oluşumunu veya gıdanın antioksidan kapasitesindeki bir değişikliği içerir. Bu nedenle, enzimatik olmayan esmerleşme ile ilgili olarak gıda endüstrisinin karşılaştığı zorluklardan biri, aynı zamanda besin değerlerini korurken, nihai ürünler için stabilite koşullarını ve istenen duyusal özellikleri elde etmektir.

Özellikle şeker içeren gıdaların uygun olmayan sıcaklıklarda saklanması ve üretimleri esnasında uygulanan ısıl işlemden dolayı meydana gelen kimyasal tepkimelerle kalite kriteri olarak görülen hidroksimetilfurfural (HMF) oluşmaktadır. HMF-nin molekül ağırlığı 126,11gr/mol, yoğunluğu 1,29 gr/cm3 , kimyasal formülü C6O6H3 şeklindedir (1) . Asitli ortamda hegsozun parçalanması ile veya maillard reaksiyonu sonucunda HMF ara ürün olarak meydana geliyor (2; 3).

HMF nin oluşum reaksiyonunda ısı değeri, aw katalizator miktarı şekerin türüne göre sonuçlanmaktadır.

Gıdalarda HMF oluşumunun iki ana yolu vardır. Birincisi, asit katalizi ve ısıl işlem altında şekerlerin karamelize edilmesini içerir. Bu şekilde, sakaroz, daha sonra enolizasyon ve dehidrasyonda fruktofuranosil katyonu oluşturan toglukoz ve fruktoz ayrıştırılabilir. Bu reaksiyon kuru pirolitik koşullar altında 250°C 'nin üzerindeki bir sıcaklıkta devam ederken, fruktofuranosil katyonu Şekil 3'te gösterildiği gibi HMF'ye dönüştürülebilir.



Şekil 5. HMF-Karamelizasyon reaksiyonu oluşturmak için şekerlerin yüksek sıcaklıklarda ayrışması.

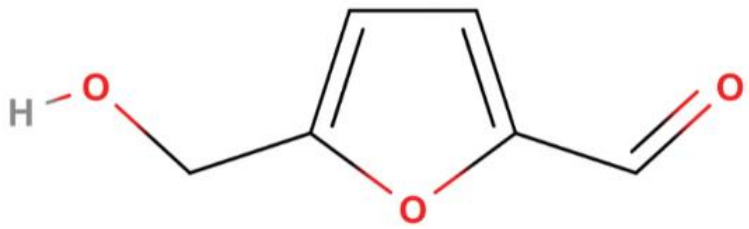
HMF aromatik alkol, aromatik aldehit ve furan halkasından oluşmaktadır.

5-Hidroksimetilfurfural HMF moleküler formülü C6H6O3, moleküler ağırlık 126.11 g/mol, yoğunluk 1.2062 g/cm3, kırılma indisi 1.5627 (18 ^{o}C 'de), parlama noktası 79 ^{o}C , erime

noktası 31.5^{o}C, kaynama noktası 110–116 (2.67 Pa'da) ve 114 ^{o}C –116 ^{o}C (133.32 Pa'da), karbonhidrattan zengin gıdaların ısıl işlemi sırasında sentezlenir.

5-Hidroksimetilfurfural (5-HMF) Özellikle asidik koşullar altında, ısıl işlem sırasında gıdalarda ortaya çıkan neo-oluşumlu bir kirleticidir. Genel olarak HMF, meyve, sebze, tahıllar, mahsuller, şekerleme ürünleri, sıvı duman, odun dumanı vb.'den hazırlanan farklı gıda ürünlerinde bulunur. Gıdalarda aroma verici bir madde olarak ve ısıl işlem ve depolama kapsamının bir göstergesi olarak kullanılır. Taze gıdaların kurutulmuş meyveler veya işlenmiş gıdalar ile işlenmesi sırasında esansiyel pigmentlerin (likopen) ve besin maddelerinin (askorbik asit) vb. parçalanması ile HMF konsantrasyonu artar.

Bugüne kadar, endişe verici bir konu olan ve sürdürülebilir gıda güvenliği ve güvenliği için dikkat edilmesi gereken HMF'nin (sadece birkaç üründe) sınırını belirlemek için yalnızca birkaç kılavuz oluşturulmuştur. Bu derleme, eksiksiz bir 5-HMF veri seti sağlamak için gıda işlemenin sentezini, oluşumunu, etkisini, sağlık etkilerini ve güvenlik kurallarını tanımlamayı ve oluşabilecek risklerin önlenmesini amaçlamıştır.



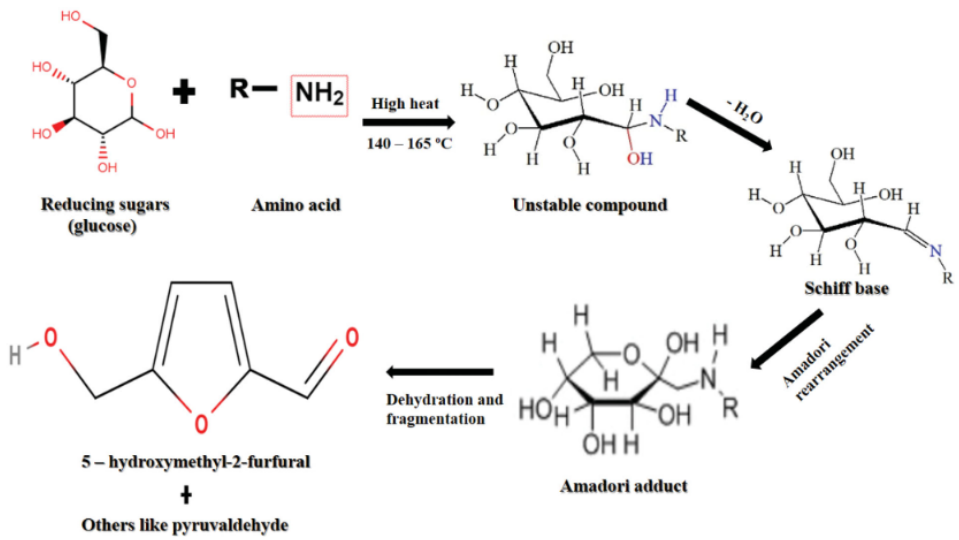
Şekil 3. 5-Hidroksimetil-2-furfuralın Yapısı

Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu ile ilgili çalışmaların çoğunda Maillard reaksiyonu öncelikli olarak rapor edilmiştir. Maillard reaksiyonu, bir amino asit, peptit, protein veya aminin serbest amino grubunun, tipik olarak glikoz, fruktoz ve diğerleri gibi bir

indirgeyici şekerin karbonil grubu ile yoğunlaştığı bir dizi karmaşık reaksiyondur. Genel olarak furfural, 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF) gibi furan bileşikleri ve enzimatik olmayan esmerleşme ile üretilen bazı bilinmeyen ürünler, gıdaların işlenmesi sırasında aroma, renk, tat ve besin değerinde önemli rol oynar. Tüm bu furan bileşikleri arasında 5-HMF, enzimatik olmayan esmerleşmenin önemli bir ara maddesidir.

5-HMF, 1,2-enolizasyon, dehidrasyon, heksoz şekerlerinin siklizasyon reaksiyonlarından ve Maillard reaksiyonu sırasında amadori ürünlerinin bozunmasından türetilir. Asidik koşullar altında (düşük sıcaklıklarda bile), şeker pirolizi (karamelizasyon) ayrıca 5-HMF oluşumundan sorumludur. 5-HMF, çeşitli işlenmiş meyveler , sirke, şarap, pekmez , kahve ve tahıl ürünleri için bir kalite belirteci olarak gerçekleştirilir. 5-HMF oluşumu sıcaklık, pH, şekerin türü ve oranı, su aktivitesi, destekleyiciler, inhibitörler ve gıda bileşimi gibi çeşitli faktörlerden etkilenir.

Önceki çalışma , sirkelerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilen 5-HMF konsantrasyonuna göre dört gruba ayrılabileceğini göstermiştir. Sherry sirkesi ve bazı elma sirkeleri daha yüksek miktarlarda 5-HMF (35 mg/L'ye kadar) içerirken, diğer örneklerin çoğu, 10 mg/L gibi daha düşük 5-HMF içeriğine sahipti. Ancak 5-HMF'nin çeşitli fizyolojik işlevleri vardır, 75 mg/kg'ı aşan alımı insan sağlığına zarar verebilir. Örneğin, vücut tarafından emilen belirli bir 5-HMF dozu, iç organlara zarar verir ve oküler mukozayı ve üst solunum yolu Mukozasını güçlü bir şekilde uyarır. Bu nedenle dünya ülkeleri gıda maddelerindeki 5-HMF içeriğinin sınırlarını belirlemiştir. Dünya Sağlık Örgütü ve Avrupa Birliği Codex Alimentarius tarafından belirlenen bal için izin verilen miktarlar 40 mg/kg ve elma suyu için 50 mg/kg , pekmez gibi gıda matrislerinde yetişkin bireylerde ise yasal sınır kilogramında 75 mg seviyelerine izin verildiği bildirilmektedir .



Şekil 4. Maillard reaksiyonunda HMF oluşum mekanizması.

2.4.1 ÇEŞİTLİ GIDALARDAKİ HMF OLUŞUMLARI

Özellikle ısıl işlem görmüş şekerli gıdalarda HMF oluşumu önemli bir kalite kriteri olmaktadır. Meyve suyunda belirli derecede ısıl işlem istenmeyen mikrobiyal gelişmelerin önlenmesi ve enzimatik bozulmaların önüne geçmek için uygulanmaktadır. Sebep ne olursa olsun ısıtma meyve suyunda enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarına neden olmaktadır (20,22).

Telatar (23) tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli elma türlerinden hazırlanan meyve sularının HMF içerikleri ölçülmüştür. Asitliği en yüksek olan hüryemez çeşidinde saptanan HMF miktarı en yüksek, asitliği en düşük olan Amasya çeşidinde ise en düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum organik asitlerin HMF oluşum reaksiyonunu katalizlediğini düşünmemizi sağlamaktadır.

En önemli besin maddelerinden olan ekmek yaşantımızda yer alan besin maddelerinden önemli konuma sahiptir. Ekmeğin pişirilmesi zamanı proteinler denatüre olup iç sıcaklık 60°C-

80 ^{o}C ye ulaşmaktadır. Bu üretim basamaklarında oluşan kimyasal reaksiyonlardan en önemlileri maillard reaksiyonu ve karamelizasyondur.

HMF nin daha önce maillard reaksiyonlarında bir ara ürün olarak ortaya çıktığı belirtilmişti. Ayrıca şekerlerin yüksek sıcaklıkta parçalanarak HMF oluştuğu tespit edilmiştir. HMF tahıl ürünleri, bebek besinleri ve pekmezlerde ısının etkisini belirlemek için bir gösterge olarak kullanılır (29).

Sütlerde dehidratasyon yolu ile ısıl işlem sonucunda glukozdan 5-hidroksimetil-2-furfural oluşumu gerçekleşebilir. Süt şekeri olan laktoz sadece çözelti halinde iken değil kristal haldeyken de ısıtma sonucunda kahverengi renk oluşumları meydana gelir, renk ve tatta değişimler oluşur. Asidik ve hafif alkali laktoz çözeltisi ısıtıldığında kahverengi rengin oluşmasına neden olan madde 5-hidroksimetil-2- furfuraldır (30). Maillard reaksiyonunun sonucunda sterilize süt ürünlerinde ve vals yöntemi ile elde edilen süt tozunda karşılaşılan kahverengi renk oluşmaktadır. Aynı zamanda uzun süre depolanan UHT sütlerde hafif esmer renge rastlanır. Başlangıçta renksiz olan ara maddeler sonrasında melanoidler ve koyu renkli bileşikler oluşur. Yapılan araştırmalar sonucunda HMF seviyelerini meyve tabanlı bebek gıdalarında 5.5-37.7 mg/kg, yağsız süt tozunda 2.4 – 16.7 mg/kg (39) olarak belirlenmiştir;

Tüm dünyada tüketilen doğal ürünlerden olan bal kaynağına göre - çiçek balı, salgı balı olarak ayrılabilir (40).

· Bozulmaya sebep olucak mikroorganizmaların özelliklede şekere dirençli ozmofilik mayaların gelişiminin önlemesi ve sayısını azaltması amacıyla ısıl işlem uygulanmaktadır. HMF oluşumunu engellemek için depolama koşullarının sıcaklığı ısıl işlem sıcaklığı ve süresine dikkat edilmelidir. Balda HMF, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliğinde 40 mg/kg a kadar izin verilmektedir (41).

2.4.2 Pekmezde HMF Oluşumu

Ülkemizde geleneksel yolla pekmez üretimi: hammaddeden şıranın üretilmesi, şıradaki serbest asitliğin düşürülmesi amacıyla kestirme işlemi ve şıranın filtre edilmesi, durultulması ve koyulaştırılması işlemlerini kapsar. Üretimde karamelizasyon reaksiyonları renk ve tat oluşturması açısından istenen reaksiyonlar olmakla birlikte, tepkimenin belli aşamalarında oluşan 5-Hidroksimetil furfural (5-HMF) oluşması nedeniyle kontrol altında tutulmanı gerektiriyor. 5-HMF bazik ortam değerlerinde Amadori ürünlerinin parçalanması sonucu oluşmaktadır.

HMF miktarı ile ısıl işlemin şiddeti (süre ve sıcaklık) arasında doğrudan ilişkilidir (44).

2.4.3 5- HMF'NIN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

HMF ve türevlerinin baskıcı genotoksik, mutajenik, kanser nedeni, zararlı DNA, organotoksik ve katalitik etkilerinin bunlara neden olduğundan şüphelenilmektedir.

Bir enzim inhibitörü olarak HMF'nin rolü16 DNA'lar, DNA ile özdeş insan genomudur. Üçü atomik DNA sentezine katkıda bulunur, ancak bu dinlenme sabit standartta yer alır (42). İnsan polimeraz ■ bir polimeraz DNA, terminal taşıma olarak, 5′-deoksiriboz fosfat (dRP) liyaz ve polinükleotit sentezi araştırma çalışmalarıdır. Bir nükleer sınırlama sinyali, BRCA1'in karboksi ucu, prolinden zengin bir bölge, polβ'ye benzer bir bölge ve pol X bölgesi polimerazın temel yapısıdır (43,44).

Gıdalardan elde edilen 5-HMF'nin insanlarda bir sağlık sorunu oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir (54). Yüksek miktarda HMF'nin zehirli olmasının yanı sıra üst solunum sistemini, gözleri, cildi ve mukozaları tahriş ettiği gözlemlenmiştir. Oral HMF'nin LD50 (ölümcül doz) vücut ağırlığına göre kobaylarda 3.1 g/kg olarak belirlenmiştir (55). Ek olarak,

sıçanlarda ve farelerde 5-HMF'nin tümörijenik etkilerinin spesifik belirtileri tarif edilir; 5-HMF, kolon anormalliklerinin gelişimi ile bağlantılıdır (ACF: anormal kript odakları) (56; 57).

Farelerde tek doz HMF uygulamalarında, ağızdan verilen HMF dozuna (0-300 mg/kg vücut ağırlığı) bağlı olarak ACF sentezinde bir artış görülmüştür (57). Surh ve Tannenbaum (58) farelerin deri yüzeyine 10-25 mol 5-HMF uygulanmasının deride papillom oluşumuna yol açtığını bulmuşlardır. Farelere deri altı HMF enjeksiyonu (200 mg/kg vücut ağırlığı) başka bir araştırmada lipomatöz tümörlere neden olmuştur (59). HMF'nin kişi başına günlük tüketimi 30-150 mg'dır, bu kişi başına 2.5 mg/kg vücut ağırlığı ile karşılaştırılabilir (55; 60).

Serbest radikaller, vücutta metabolik süreçlerin bir sonucu olarak üretilen kimyasal bileşiklerdir. Oksijen türevli serbest radikaller biyolojik sistemde en önemli olanlardır. Reaktif oksijen türleri (ROS) genellikle vücutta doğal yollarla üretilen radikal parçalayıcı antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılır. Bununla birlikte, çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan sistemlerin yetersiz kalması sonucu oksidatif stres olarak bilinen bir dizi patojenik süreç meydana gelir (62). Oksidatif stresin DNA'ya (deoksiribonükleik asit) zarar verdiği bilinmektedir. Baz ve şeker değişiklikleri, tek ve çift zincir kırılmaları, abazik alanlar ve çeşitli işlemler yoluyla DNA-protein çapraz bağlanması gibi lezyonlar üretir (63; 64).

Genetik bilginin depolanması ve üretilmesinin her ikisi de nükleik asitlere ihtiyaç duyar. DNA, bir organizmanın gelişimine rehberlik eden bilgileri taşır ve kodlar (65). Çevresel değişkenler nedeniyle DNA'nın bütünlüğü sürekli olarak tehlikeye girer. Hücre yapısındaki endojen değişiklikler, DNA replikasyonu ve DNA rekombinasyonu gibi hücresel aktiviteler sırasında meydana gelebilir (66). DNA hasarı, iç ve dış nedenlerden kaynaklanan DNA'nın moleküler bütünlüğündeki değişiklikleri ifade eder. DNA hasarı genellikle bir hücrenin yaşam

döngüsü sırasında meydana gelir ve mutasyonlara, kansere, yaşlanmaya ve hücre ölümüne neden olabilir. Yaşam boyunca DNA, hücresel metabolitler (ROS) ve dış etkenler tarafından sürekli olarak değiştirilir.

Antioksidan savunma mekanizmaları, hücreleri reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korur. Enzimatik savunma sistemleri (Methemoglobin redüktaz, Süperoksit dismutaz, Katalaz, Glutatyon peroksidaz, Glutatyon redüktaz, Glutatyon S-transferaz) ve enzimatik olmayan savunma sistemleri (Glutatyon, E vitamini, C vitamini, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit-NADH-, indirgenmiş Glutatyon-DNA (GSH), hücre, doku ve organ sistemlerinin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korumak için kritik bir antioksidan moleküldür.GSH, kanser, yaşlanma, ateroskleroz ve nörolojik hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli bozuklukların patofizyolojisinde rol oynar (67) .

2.5 KROMATOGRAFİ

HPTLC plakaları küçük parçacık boyutuna (5-10 μm) sahiptir ve geleneksel plakalardan daha fazla verim sağlar. Bununla birlikte, HPTLC ve ters fazlı plakalar, geleneksel plakalardan daha pahalıdır ve daha düşük bir numune kapasitesine sahiptir, mevcut analit miktarlarının sıradan TLC plakalarını bile kolayca alt edebileceği aşırı doz toksikolojisinde önemli bir husustur.

Laboratuvarlarda toksik madde analizinde kullanılan birçok teknikler mevcuttur. bunlardan birkaçı ise İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresidir (LC-MS), immünoassay, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) (40).

Bilinmeyen madde analizi adli toksikolojideki analizlerin en önemli parçalarından biridir ve bunu yapabilmek için genellikle 2 önemli analiz işlemi ; ayrışma ve tanıma işlemidir yapılmaktadır. Günümüzde en sık kullanılan önemli yere sahip olan ve en gelişmiş ayrışma teknolojilerinden biri de kromatografik yöntemlerdir (41).

Kromatografik yöntemin çalışma prensibi, bir ya da birden fazla kimyasal madde içeren bir karışımdan elde etmek istediğimiz tek bir maddeyi iki faz arasındaki (mobil faz ve sabit faz) etkileşimleri sağlanarak saflaştıran bir ayrışma tekniğidir. Daha sonra saf halinde elde ettiğimiz maddeyi tanıma analizi için işlev görür.

Ayırma işlemi bittikten sonra tanıma işlemi gerçekleştirmek için çeşitli dedektörlere ihtiyaç vardır. Bu dedektörler, cihazdan çıkan analitin varlığını ve miktarını saptamak için kullanılır. Kromatografik yöntemlere bağlı olan dedektörler, içinden geçen maddeyi zamana karşı sayar ve miktarını kaydederek bir grafiğe dönüştürürler, buna kromatogram denir.

Kütle spektrometresi genellikle madde tespiti için kromatografik yöntemlerle beraber en çok kullanılan detektörlerden biridir. Kromatografik yöntemlerin her biri için kendine özgü farklı dedektör tipi vardır. Uygun dedektör seçerken analitin özellikleri dikkate alınır. Birkaç dedektörün çeşitleri aşağıda verilmiştir:

Kromatografik yöntemin ayırma işlemini iki faz arasında yapılır; bunlar sabit faz ve mobil fazdır. Sabit faz, kolon içinde bulunan eşit bir şekilde dağılmış bir katı ya da sıvı maddedir. Mobil faz ise, analiti taşıyan bir sıvı (ya da sıvı solüsyonu) ya da basınç altında olan bir gazdır.

Madde ayrımı sağlayan faktörler arasında molekül büyüklüğü, polaritesi ve molekül yükü sayılabilir. Maddelerin ayrımını sağlayan faktörlerden en önemlisi maddenin kolon ve fazlara karşı olan afiniteleridir (maddenin birbirlerine gösteren tepkileşmesidir).

Analit maddeyi taşıyan mobil faz, sabit fazdan geçerek maddenin ilgisine göre sabit fazla etkileşim yaparak hızlı ya da yavaş kolondan geçer ve madde ayrımı gerçekleşir.

Kromatografik yöntemlerde kullanılan önemli terimler:

- Eluent: ekstraksiyonda yıkama işlemi esnasında solventleri ayırmada kullanılan madde
- Analit: analiz edilen madde
- Kolon: maddeleri geçiren, madde ayırımını sağlayan cisim
- Sabit faz (adsorban): mobil fazın etkileşime girdiği, çeşitli materyalden tasarlanmış maddenin tutunmasını sağlayan bir kolondur.
- Mobil faz (taşıyıcı): fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip, analiti taşıyan çözücü bir karışımdır
- Elüsyon: maddenin kolondan yıkama aşaması
- Eluat: elüsyon işlemiyle meydana gelen çözelti
- Alıkonma: maddenin fazlar arasında etkileşime girmesiyle belirli oranda tutulması, yavaşlatılması ve bu sayede daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır

2.5.1. KROMATOGRAFİK YÖNTEMİN ÇEŞİTLERİ

Bir kimyasalın varlığını ve/veya miktarını belirlemek için farklı kromatografik teknikler kullanılabilir. Her malzemenin kimyasal yapısına ve özelliklerine göre uygun bir kromatografik teknik seçilmelidir. Tablo III, kromatografik yöntemlerin sınıflandırmasını göstermektedir (42).

Tablo I. Ayrılma süreçlerine göre, faz tiplerine göre ve uygulama biçimine göre kromatografik yöntemin sınıflandırılması

Ayrılma Süreçlerine Göre Kromatografiler	Uygulama Biçimine Göre Kromatografiler	Faz Tiplerine Göre Kromatografiler
Adsorpsiyon Kromatografisi	Düzlemsel Kromatografisi • Kağıt Kromatografisi • TLC	Sıvı Kromatografisi
Partisyon Kromatografisi		Sıvı-Katı Kromatografisi
İyon Değiştirme Kromatografisi		Sıvı-Sıvı Kromatografisi
Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi	Kolon Kromatografisi • GC	GC

	• HPLC	

Birçok kromatografik prosedürün özellikleri, kullanılan hareketli ve durağan fazlar ve ayırma modeli Tablo IV'te (43) listelenmiştir.

Tablo II. Kromatografik yöntemin özellikleri, kullanılan mobil ile sabit fazları ve ayrışma şekli

Metod	Mobil Faz	Sabit Faz	Ayrışma Şekli
Gaz-Sıvı Kromatografisi	Gaz	Sıvı	Molekül büyüklüğü/polarite
Gaz-Katı Kromatografisi	Gaz	Katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Süperkritik Akışkan Kromatografisi	Süperkritikal sıvı	Katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Ters Faz Karomatografisi	Polar sıvı	Apolar sıvı veya katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Normal Faz Kromatografisi	Az polar sıvı	Daha polar sıvı veya katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Iyon Değişim Kromatografisi	Polar sıvı-iyonik katı	Iyonik katı	Molekül yükü
Büyüklük Dışlanımlı Kromatografisi	Sıvı	Katı	Molekül büyüklüğü
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	Polar sıvı	Apolar sıvı veya katı	Molekül büyüklüğü/polarite
Afinite Kromatografisi	Su	Bağlanma bölgesi	Spesifik yapı

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

TLC, sabit faz (bir plaka üzerine kaplanmış madde) ve hareketli faz (bir geliştirme tankında buhar olarak bulunan madde) arasındaki çözünürlük değişimlerini kullanarak bir karışımdan incelenecek malzemeyi izole etmek için bir yöntemdir (49).

TLC, numunenin veya numunenin partiküllerinin tanımlanmasında kesin bir sonuç veremese de, sorgulanan adli numunelerin standartlarını tanınan bileşiklerle (örneğin pozitif kontrol numunesi) karşılaştırarak bir ön tanımlama sağlayabilir. Sorgulanan analit ve standart numune

aynı TLC plakası üzerinde çalıştırıldığında, aynı hizada aynı anda sürüklenip sürüklenmediği belirlenebilir (50).

2.5.2. YÜKSEK PERFORMANSLI İNCE TABAKA KROMOTOGRAFİSİ (YPİTK)

Yüksek Performanslı İnce Katman Kromatografisi (HPTLC), daha iyi ve gelişmiş ayırma verimliliği ve algılama sınırları ile ince katman kromatografisinin (TLC) gelişmiş ve otomatikleştirilmiş bir şeklidir. Yüksek Basınçlı İnce Katman Kromatografisi/Düzlemsel kromatografi veya Düz yataklı kromatografi olarak da bilinir. Nitel ve nicel analitik görevler için eşit derecede uygun güçlü bir analitik yöntemdir (1,2). Ayırma, plakalarda kullanılan adsorbanların doğasına ve geliştirme için kullanılan solvent sistemine bağlı olarak, adsorpsiyon veya bölme veya her ikisi ile sonuçlanabilir. HPTLC temellerinin farklı yönleri: ilke, teori, anlayış; enstrümantasyon: uygulama, optimizasyon, doğrulama, otomasyon ve nitel ve nicel analiz; uygulamalar: fitokimyasal analiz, biyomedikal analiz, bitkisel ilaç miktar tayini, analitik analiz, parmak izi analizi ve tireleme potansiyeli (HPTLC-MS, HPTLCFTIR ve HPTLC-Scanning Diode Laser) bildirilmiştir (3).

HPLC, spektrofotometri, titrimetri, vb. gibi diğer tekniklere kıyasla bileşiklerin analizi için HPTLC kullanmanın çeşitli avantajları vardır. HPTLC'nin avantajlarından bazıları bunlardır: (10-12):

1. Çok bileşenli ham numuneleri analiz edebilme.
2. Ayırma işlemi özellikle renkli bileşiklerle takip edilmesi kolaydır.
3. Aynı plaka üzerinde birkaç numune birbirine paralel olarak ayrılabilir, bu da yüksek çıktı, zaman tasarrufu ve hızlı düşük maliyetli analiz sağlar.
4. HPTLC gelişimi için solvent seçimi, tespit adımından önce mobil fazlar tamamen buharlaştığından geniştir.
5. İki boyutlu ayırmaların gerçekleştirilmesi kolaydır. Kromatografi sırasındaki kararlılık, iki boyutlu gelişim için test edilmelidir.

6. Ayrılmış noktaları tespit etmek için özel ve hassas renk reaktifleri kullanılabilir (Dragendroff reaktifi/Kedde reaktifi).
7. HPTLC, farklı ışık absorpsiyon özelliklerine veya farklı renklere sahip bileşiklerin tanımlanmasına izin vererek, farklı değerlendirme modları için birleştirilebilir ve sonuç olarak kullanılabilir.
8. Temas tespiti, radyoetiketli bileşiklerin izlenmesine ve noktalardaki mikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesine olanak tanır.
9. HPTLC yöntemi, toksik organik atıkların maruz kalma riskini en aza indirmeye yardımcı olabilir ve bertaraf sorunlarını önemli ölçüde azaltarak çevre kirliliğini azaltır.

2.5.2.1 ÖRNEĞİN PLAKA UYGLANMASI

Analizi yapılacak olan madde uygun çözücüde çözüldükten sonra ATS4de (Automatic TLC Sampler 4) bulunan otomatik pipetle özenli bir şekilde ölçülerek plaka üzerine gereken miktarda uygulanır.

Analiz edilecek örneğin uygulandığı 32 yer plakanın alt kenarından yaklaşık 1.5–2 cm yukarıda olmalıdır. Bu şekilde, analiz edilecek olan maddenin silika jel üzerinde istenilen darlıkta ve genişlikte bir leke oluşturması sağlanır. Bunun gibi referenas maddeye ait kalibrasyon çözeltilerinin de istenilen miktarda uygulanması sağlanır. Örnek çözeltisinin standartlardan önce uygulanması çapraz kontaminasyon riskini minimuma indirmek içindir (82).

2.5.2.2 PLAKIN YÜRÜTÜLMESİ

Kromatografide kullanılan plakanın büyüklüğüne göre değişik boyutlarda iyi kapanan cam tanklar kullanılır. Kullanılacak tankın içine uygulama noktasının seviyesini geçmeyecek şekilde hareketli faz çözeltisi konur. Spot hareketli çözeltiye batmamalıdır. Plaka, hareketli

faz ile doyurulmuş tanka yerleştirilir ve çözücünün yükselmesi gözle takip edilir. Çözücü yükselirken örnekteki bileşenleri de sürükler ve yukarıya çıkarır. Yükselme yaklaşık 10 cm olduğu zaman kromatograma son verilir, plaka tankın dışına çıkarılır ve kurutulur (83).

Hareketli faz için çözücü veya çözücü sistemi seçiminde, çalışılan maddenin yapısı ve kullanılan tabaka dikkate alınmaktadır. Polar olması beklenen maddeler için polar, apolar olması beklenenler için apolar çözücüler kullanılır. Polar çözücüler maddelerin Rf değerini arttırır. Sıklıkla, uygun kuvvette bir çözücü sistemi hazırlamak için birkaç çözücü karıştırılır. Maddeleri plakanın ortalarına kadar yürüten çözücü sistemi en uygun sistemdir (84).

2.5.2.3 KROMOTOGRAMIN GÖRÜNTÜLENMESİ

Kromatografide maddenin varlığının belirlenmesi için çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılır. Söz konusu İnce Tabaka Kromatografisi olunca, plakadaki leke ilgili analitin varlığına işaret eder. Bunun görüntülenmesi, yürütme işleminin hemen arkasından plakalardan mobil faz çözeltileri iyice uzaklaştırıldıktan sonra mümkündür. Plaka üzerindeki maddeye ait leke gözle görülebilir dalga boyunda ise kolaylıkla tespit edilebilir. Eğer leke/lekeler gözle görülemiyor ise, kromatogram karanlıkta UV (254 veya 366 nm) ışık altında incelenebilir. Maddelerin çoğu UV ışını absorpladığından karanlıkta lekeler halinde gözlenir. Ayrıca fluoresans özellik içeren tabaka kullanılarak da görüntüleme kolaylaştırılabilmektedir. Bu durumda ise plakadaki lekeler uygun dalga boyundaki UV ışık altında, parlak fluoresans zeminde karanlık lekeler halinde görülecektir (84).

Diğer taraftan çeşitli bileşik grupları için görünürlüğü ve kimyasal tanımlamayı sağlamak amacıyla renk veren belirteçlere ait reçeteler bildirilmektedir (85). Plakalar bu belirtece/belirteçlere daldırma veya püskürtme yolu ile uygulanmaktadır. Bu sayede çeşitli

belirteç kombinasyonları, fonksiyonel grupların ve bilinmeyen maddelerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (82).

2.5.2.4 KALİTATİF ANALİZ

Biyoanalitik kimyada kalitatif analizin kullanımı, tipik olarak biyolojik orijinli numunelerdeki organik moleküllerin tanımlanması ile ilgilidir. Bu, biyobelirteç tanımlaması veya bir metabolitin yapısının aydınlatılması ile ilgili olabilir.

Bir biyobelirteç molekülünün yapısı, çok küçük bir molekülden proteinler veya nükleik asitler gibi büyük biyomoleküllere kadar değişebilir. Olası biyolojik belirteçleri belirlemek için kullanılan süreç, bir dizi zahmetli görevi içerir. İlk olarak, belirli bir hastalığı taşıyan kişilerden alınan numunelerdeki tüm bileşiklerin resimleri, omik teknikleri kullanılarak sağlıklı kişilerden elde edilen karşılık gelen numunelerle karşılaştırılır. Bu, küçük moleküller için LC-MS veya proteinler için 2D elektroforez olabilir. Küçük moleküller söz konusu olduğunda, farklılıklar değerlendirilir ve olası biyobelirteç adayları daha sonra yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRMS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) kullanılarak daha fazla fraksiyonlamadan sonra tanımlanır. Proteinler için, LC fraksiyonasyonu veya 2D elektroforez, MALDI-TOF-MS (matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi) ve diğer proteomik tekniklerle (örneğin, proteinin triptik sindirilmesiyle elde edilen peptitlerin dizilenmesi) birleştirilir.

2.5.2.5 KANTİTATİF ANALİZ

Kromatografik analiz kullanılarak yapılan kantitatif ölçümler, konsantrasyonu bilinmeyen bir numuneden alınan pik yüksekliğinin veya pik alanının ölçümlerine ve bunu bilinen

konsantrasyona sahip bir kalibrasyon standardının karşılık gelen ölçümüyle karşılaştırmaya dayanır. Bu nedenle, kromatografik analiz mutlak bir ölçüm değil, izlenebilir ve iyi tanımlanmış bir kalibrasyon standardına göre izlenebilir.

Pik yüksekliklerinin ölçümü yüksek hassasiyetle yapılabilir ve kolon koşullarındaki değişikliklerin pik genişliğini değiştirmemesi koşuluyla doğru sonuçlar verir. Pik yüksekliği, pik genişliği ile ters orantılı olduğundan, pik genişliğini etkileyebilecek tüm parametreler sabit tutulmalıdır. Pik yüksekliğini etkileyen parametreler, tutma faktörü, teorik plaka sayısı ve simetri faktörüdür. Retansiyon faktörü arttığında pik genişlemesi meydana gelir ve pik yüksekliği azalır. Teorik plaka sayısındaki azalma ve simetri faktörünün artması da pik yüksekliklerini azaltır.

Tepe alanı, tepe genişleme etkilerinden neredeyse bağımsızdır. Bu nedenle, bu açıdan tepe alanı, tepe yüksekliğinden daha tatmin edici bir analitik parametredir. Modern cihazlarda, tepe alanı simetrik değilse de yüksek derecede doğruluk ve hassasiyetle ölçülür ve tepe alanı genellikle kantitatif belirlemeler için önerilen parametredir.

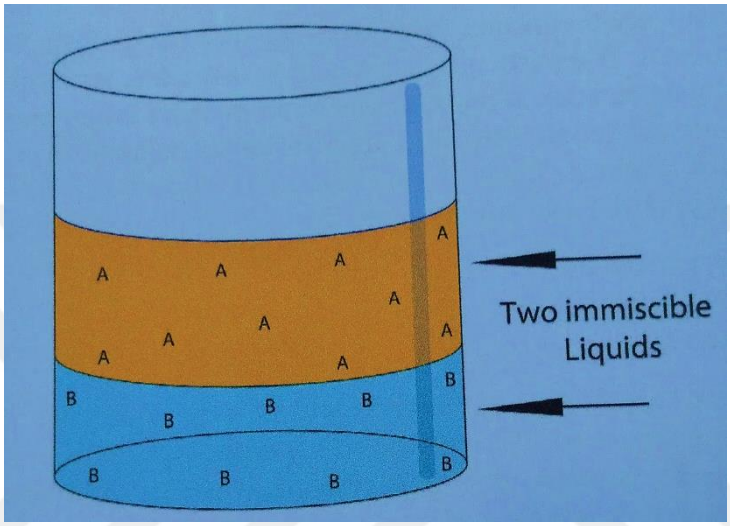
2.5.3. EKSTRAKSİYON (ÇEKİTLEME İŞLEMİ)

İncelenecek numuneler, analitin kromatografik aparata eklenmesinden önce ön işleme tabi tutulmalıdır; bu prosedür ekstraksiyon olarak bilinir. Bu prosedürlerin amacı, istenmeyen bileşenleri (safsızlıkları) ortadan kaldırırken aynı zamanda matris numunesinden gerekli bileşeni çıkarmaktır. Ekstraksiyon prosedürleri iki kategoriye ayrılır: sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu.

Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (LLE)

Bir analitin ayrılması için, iki (veya daha fazla) karışmaz çözücü arasındaki rekabete dayanan bir bölme prosedürüdür. Şekil 7'deki grafik bu prosedürü göstermektedir. Polarite ve pH, analit dağılımını etkileyen en kritik iki kimyasal değişkendir (44).

Çözünürlük, asit-baz dengesi ve analitin sulu ve organik fazlar arasındaki dağılımı sıvı-sıvı ekstraksiyonunun temellerini oluşturur (62).

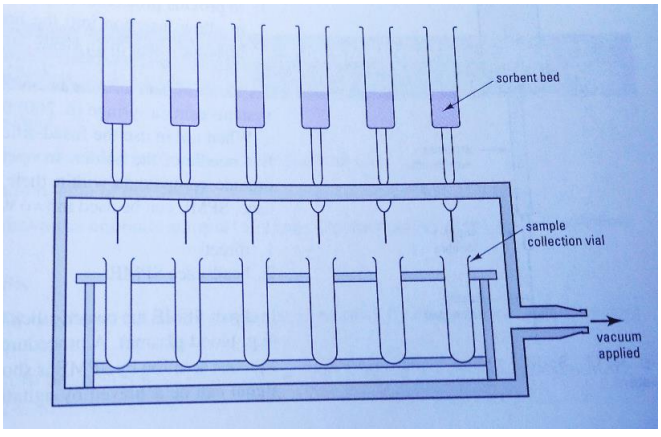


Şekil 1 : Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonun temel prensibi

Yoğunluğu daha düşük olan, yoğunluğu daha yüksek olan çözücünün üstünde yer alır.

Biri diğerinden daha polardır. Polar analitler, polarkarışımında daha kolay çözünür.

Katı Faz Çıkarma, bir kartuş aletinin adsorbe etme (yüzeye yapışma) yeteneğine dayanan bir ayırma işlemidir. Analitler, maddeleri ayırmak için kartuştaki adsorbanlarla etkileşime girer.



Şekil 8, çoklu bir SPE manifoldunu göstermektedir.

Şekil 2: Çoklu SPE manifold

2.5.3.1 GIDALARA UYGULANAN ÇEKİTLEME İŞLEMLERİ

Gıdadaki endüstriyel gelişime paralel olarak insanlar tükettiği gıda ürünlerinin güvenliği konusunda giderek daha fazla endişe duymaktadır ve gittikçe daha fazla gıda kontaminasyonu olayı ve yaygın geri bildirim olguları görülmktedir.

Dolayısıyla, gıda analizleri için güvenilir ve verimli analitik yöntemler gerekliliği aşikârdır. Modern analiz yöntemlerindeki hassasiyet her ne kadar artsa da karmaşık gıda matrisleri nedeniyle analiz öncesi verimli örnek hazırlama teknikleri gereklidir. Bu nedenle çekitleme gıda örneklerinin analizinde oldukça önemli bir adımdır.

Günümüzde analitik gıda güvenliği çalışmalarının amaçlarından biri, analitik sonuçların doğruluğunu ve kesinliğini artırabilen ve analitik prosedürleri basitleştirebilen yeni çekitleme tekniklerini geliştirmek olmuştur.

Gıda güvenliği çalışmalarında kullanılan geleneksel numune çekitleme teknikleri, uygun çözücü seçimi ve istenen bileşiklerin çözünürlüğünü ve kütle transferini arttırmak için ısı ve ajitasyon kullanımına dayanmaktadır. Matriksten etkilenmeyen ve eser miktardaki analitleri örnek zenginleştirlmesi yoluyla izole eden farklı çekitleme tekniklerine sahip cihazlar geliştirilmiş ve gıda analizleri için uygun hale getirilmiştir.

Bir çekitleme işleminin başarılı olması doğru çözücü şeçimine bağlıdır. En çok kullanılan çözücüler eter, benzen, toluen, petrol eteri, heksan, broform, metilen klorür ve karbon tetraklorürdür. Bunların hiçbiri suda çözünmez ve organik bileşikler için iyi çözücülerdir.

2.5.3.1.1 QUECHERS ÇEKİTLEME METODU

QuEChERS" (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) metodu pestisit analizlerinde en yaygın kullanıma sahip olan ektraksiyon metodudur. Orijinal metot 2003 yılında Anastassiades ve ark. tarafından (98) yayınlanmış ve meyve ve sebzelerde farklı yapıdaki yüksek sayıda pestisitin farklı matrikslerde analiz edilmelerine olanak sağlayan hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli çekitleme metodu olarak tanımlanmıştır (99,100).

Orijinal QuEChERS metodu ile sınırlı sayıda GC uyumlu pestisit analiz edilebilmesine rağmen metodun orijinal versiyonu düzinelerce farklı ürün grubunda yüzlerce pestisitin analizinde kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda, yapılan ileri çalışmalarda metodun orjinal versiyonunda bazı pestisitlerin daha düşük stabilite gösterdiği ve/veya geri kazanım verimlerinin pH'ya bağımlı olduğu ortaya konmuştur (100).

QuEChERS yaklaşımını ortaya koyan ekip tarafından, çekitleme sırasında pH'nın 3-5 seviyelerinde tutulmasının, pH'ya duyarlı bazı pestisitler için matriks yapısından bağımsız olarak kabul edilebilir geri kazanım (> % 70) elde edilebilmesi için en uygun dengeyi sağladığı ortaya konmuştur. Bu noktada, orijinal metodu ortaya koyan ekibin iki üyesi, Anastassiades ve Lehotay, farklı modifikasyonlar üzerinde çalışmaya yönelmişler ve Lehotay ve ark. nispeten kuvvetli asetat tamponlama koşulları kullanarak metodu modifiye ederken; Anastassiades ve ark. daha zayıf sitrat tamponlama koşullarını tercih etmişlerdir. Oldukça fazla sayıda laboratuvar çalışmasında metodun bu her iki versiyonu kullanılmıştır.

2.6 VALİDASYON ÇALIŞMASI

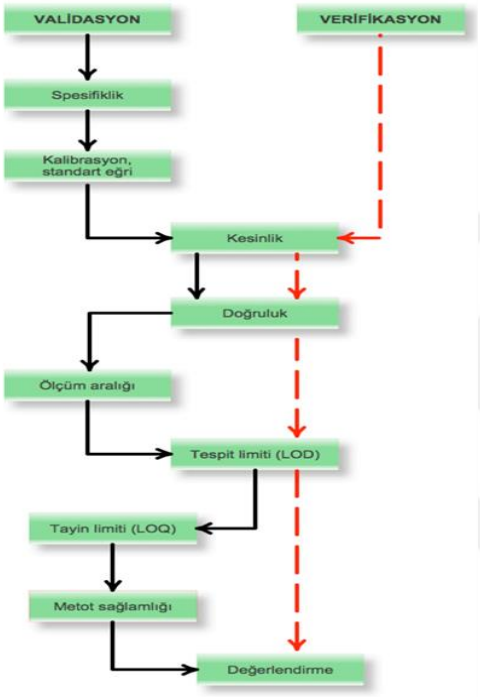
Meşru kabul edilmek için, bir analitik teknik bir dizi kılavuza uygun olarak gerçekleştirilmelidir. Validasyon, analitik tekniğin belirtilen gereksinimleri karşılayabilmesini sağlama sürecidir (63).

Bir doğrulama araştırması düzenlerken, hem tekrarlanabilirlik, hem de tekrarlanabilirlik ve geçerlilik araştırmalarını içeren bir çalışma düzeni oluşturmak için matris özelliklerini, konsantrasyon seviyelerini, personel becerisini ve doğrulama parametrelerini dikkate alın. (64).

Tam doğrulama için yeni bir yöntem geliştirme analizinde (64) kullanılan doğrulama parametreleri:

- Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Specificity)
- Ölçüm Tespit Limiti (Limit of Detection)
- Limiti (Limit of Quantification)
- Ölçüm Aralığı/Doğrusallık (Range/Linearity)
- Doğruluk
    - Kesinlik (Presicion)
        - Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
        - Tekrar Üretilebilirlik (Laboratuvarlar arası) (Reproducibility- Inter Laboratory)
    - Gerçeklik (Trueness)
        - Bias
        - Geri kazanım
- Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)

Validasyon (validation) ve doğrulama (doğrulama) bu çalışmada yanlış anlaşılabilecek iki önemli kavramdır. Validasyon, yöntem parametrelerinin uygulanacakları çalışma grubu için uygun olup olmadığını belirleyen bir araştırmadır; doğrulama ise, laboratuvarlar arasında üzerinde anlaşmaya varılan kriterleri kullanan laboratuvar ayarları altında bir tekniğin gösterilmesidir (65). Bu ikisi arasındaki ayrım Şekil 9'da bir diyagram olarak gösterilmektedir.



Şekil 3: Validasyon ve verifikasyon ayrımı (65)

2.6.1 Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)

Bir tekniğin aynı numunedeki diğer analitlerden aranan analiti tanımlama kapasitesi seçicilik/özgüllük olarak bilinir. Teknik analite özgüyse, bu özellik bunu gösterir.

Kör numunede kromatografik prosedürlerde hedef analite müdahale edebilecek hiçbir pik olmamalıdır (64).

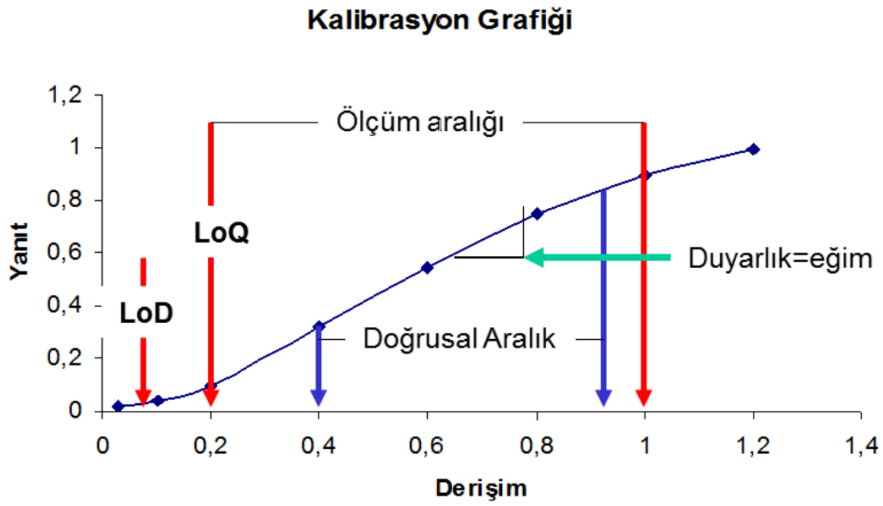
2.6.2 Doğruluk (Accuracy)

Kullanılan prosedürlerle elde edilen ölçüm bulgularının referans (doğru) değere yakınlığı doğruluk (64) olarak adlandırılır. Sonuçların doğruluğu sistematik ve rastgele hatalar dikkate alınarak değerlendirilir. İki temel unsurdan oluşur: doğruluk ve kesinlik.

2.6.3 Doğrusallık (Linearite) ve Çalışma Aralığı (Range)

Konsantrasyonla orantılı olarak belirtilen konsantrasyon aralıklarında ölçüm bulgularının dalgalanması doğrusallık olarak adlandırılır. Eurachem el kitabına göre en az 6 kez ve 3 tekrar ile ölçüm yapılmalıdır. Bir referans konsantrasyonuna karşı bir ölçüm sonucu olarak veya sonuç grafiksel olarak gösterilen bir ölçüm sinyali olarak gösterilebilir. Doğru denklemi (y=ax+b) ve korelasyon katsayısı (r) ifade etmek için kullanılır. Korelasyon katsayısı 1'e yakınsa kalibrasyon eğrisi doğrusaldır (64). Doğrusallık, F değeri ile birleştirilerek de test edilebilir.

Operasyonel aralık, yöntemin izin verilen belirsizliğinin bir sonucu olarak sunulan aralıktır. LOQ, çalışma aralığının alt sınırıdır (belirleme sınırı). Analitik duyarlılıkta önemli bir kaybın belirlendiği konsantrasyon, çalışma aralığının (63) üst sınırıdır.



Şekil 4: Cihaz ve metodun çalışma aralığının belirlenmesi için çizilen kalibrasyon grafiği (66)

2.6.4 Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ

Tespit sınırı (LOQ), altında analitin tepe noktasının arka plan gürültüsünden ve tespit edilen kimyasalın varlığından ayrılabileceği konsantrasyondur. Algılama sınırı olarak da adlandırılır. Yöntemin performansının kabul edilebilir olarak belirlenebileceği en düşük konsantrasyon, belirleme sınırı (LOQ) olarak bilinir.

Kimyasal Analiz Kılavuzlarında TURKLAB Metot Validasyon ve Doğrulamasına dayalı hesaplamalar; Boş numune sonuçları, az miktarda analit, yöntemin standart sapması veya cihazın sinyal-gürültü oranı kullanılarak yapılabilir. Ayrıca, türetilen LOD ve LOQ değerlerinin doğrulanması gerekir (65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar

Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar

Çalışmada Tabloda gösterilmiş cihaz,araç ve gereçleri kullanılmıştır.

Tablo 3: Çalışmada kullanılan gereçlerin adı, markası ve modeli

ADI	MARKA\MODEL
Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) - Otomatik TLC Örnekleyici Ünitesi - Otomatik Yürütme Tankı Ünitesi - TLC Tarama 3 - Wincats İşletim Sistemi	CAMAG ATS4 ADC2 1.4.2. 8121
Hassas Terazi	Precisa
Vorteks	IKA
Santrifüj	Hettich
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Çeker Ocak	Başaran
Buzdolabı (+4oC)	Arçelik
Cam vial	Agilent
Tüp sporları	ISOLAB
Falkon Tüp – 15 mL	Isolab
Falkon Tüp – 50 mL	Isolab
Azot altında uçurma düzeneği	Hyper Vap HV-300
Balon Joje (5 mL)	Isolab

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan standart ve kimyasal maddelere ait bilgiler Tablo 8 verilmiştir.

Tablo 4: Çalışmada kullanılan sarf ve kimyasal maddelerin adı ve kodları

ADI	MARKASI
Etil asetat	Merck 109623.2500
Formik asit	Merck 100264.2500
Metanol	Merck 106009.2500
Caffeine (Iç Standart)	Sigma C0750-5 mg
Quechers Çekitleme Kiti	Restek SPE Q-sep Q150
Toluen	
Asetonitril	
5-HMF	Sigma Aldrich W501808-1G-K

3.3. Örnek toplanması ve Çalışma Planı

Bu çalışmada İstanbuldaki eczane ve aktarlardan yerli üretim olan ve bebeklere tavsiye edilen pekmez içerikli bebek gıdası satın alınmıştır. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarlarına getirilen numunelerin etiketde yer alan içerik ve menşei kayda alınmıştır. Çalışmada toplam 15 adet pekmez ve pekmez özü satın alındı. Ürünler 15 farklı markadan seçildi. Bu ürünlerin içeriklerine bakıldığında tümünde keçiboynuzu ve dut bulunmaktaydı. Markalara göre ürün sayılarının dağılımı Tablo 10'daki gibidir. Analiz için toplam 10 ürün kullanılmıştır.

Tablo 5: Ürünlerin marka kodları ve ürün sayıları

MARKA ADI	SAYISI
A	1
B	1
C	1
D	1
E	1
F	1
G	1
H	1
L	1
M	1
TOPLAM ÜRÜN SAYISI	10

3.4. YPİTK'da 5-HMF'nin Analizi

Örnekler 5000 rpmde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan üst fazın tamamı 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve azot altında uçması için bekletildi. Numuneleri tamamen uçurduktan sonra üzerine 1 ml MeOH eklenerek vortekslenip viallere konuldu.

Daha sonra 1 ml örnek vial tüplerine alınarak HPLC'ye enjeksiyon edilmiştir.

3.4.1. 5-HMF Analizinde Kullanılan Çözeltiler

- **Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması**

  Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması için Tablo 9'da belirtilen miktarlarda 5-HMF ve kafein ana stok çözeltileri kullanıldı. Her bir kalibrasyon noktası için 1.5 mL hacimli cam viallerde çözeltiler hazırlandı ve analiz edildi. Vialler analiz için HPTLC cihazına verildi.

Tablo 9: Kalibrasyon çözeltisi hazırlama prosedürü

Kalibrasyon Noktaları	MeOH	Coffein	5-HMF
10 ppb	700 µL	200 µL	100 µL
20 ppb	600 µL	200 µL	200µL
30 ppb	500 µL	200 µL	300 µL
40 ppb	400 µL	200 µL	400µL
50 ppb	300 µL	200 µL	500µL
60 ppb	200 µL	200 µL	600 µL

Hareketli faz çözeltisinin hazırlanması

Toluen: Etil asetat: Formik asit (5:4:1).

5 mL toluen, 4 mL etil asetat ve 1 mL formik asit karışımı her yürütmeden önce taze olarak hazırlandı.

3.4.1.1 5-HMF ANA STOK ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

5-HMF standartı 10 µg tartılarak 10 ml balon joje içinde hacme tamamlandı. +4 C' muhafaza edilen ana stok çözeltsi kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Standart maddenin saflığı >% 99.0 olduğundan hesaplamalarda safsızlık oranı göz ardı edildi

3.4.1.2 KAFEİN İÇ STANDART ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

Kafein standartı 10 µg tartılıp 10 ml balon joje hacme tamamlandı. + 4 C muhafaza edilen ana stok çözeltsi kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Standart maddenin saflığı >%99.0 olduğundan hesaplamalarda safsızlık oranı göz ardı edildi.

3.4.2. Örnek Hazırlama Prosedürü

Quechers prosedürü (Asetonitril / Q-ACE)

5 g pekmez tartıldı ve üzerine 10 mL asetonitril ve 25 µL kafein eklendi. Her bir tüpün içine 1 tam paket Quechers eklendi ve 1 dk. boyunca 5000 rpm'de vortekslendi. Sonrasında tüpler 3000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası yaklaşık 6 mL olan üst faz alınarak 15 mL'lik falkon tüp içerisine aktarıldı ve azot altında kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı, 1000 µL MeOH eklenerek vortekslendi ve analize hazır hale getirilerek YPİTK sisteminde analiz edildi.

Quechers prosedürü (Etialsetat / Q-EA)

5 g pekmez tartıldı ve üzerine 10 mL etilasetat ve 25 µL kafein eklendi. Her bir tüpün içine 1 tam paket Quechers eklendi ve 1 dk. boyunca 5000 rpm'de vortekslendi. Sonrasında tüpler 3000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası yaklaşık 6 mL olan üst faz alınarak 15 mL'lik falkon tüp içerisine aktarıldı ve azot altında kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı, 1000 µL MeOH eklenerek vortekslendi ve analize hazır hale getirilerek YPİTK sisteminde analiz edildi.

3.4.4. Validasyon Çalışmaları

Bölüm 3.4.1'te hazırlanışı açıklanan kalibrasyon çözeltileri aynı cam plaka üzerinde her kalibrasyon basamağından 3'er adet olmak üzere plakaya tatbik edildi ve bir plakada 3 seri kalibrasyon çözeltisi analiz edildi. Bu analizin sonucunda her bir kalibrasyon noktasından elde edilen 5-HMF ve iç standart olan kafein (K) pik alanlarının birbirlerine oranı (5-HMF/K) hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinde korelasyon katsayının kabul kriteri >0,99 olarak belirlendi.

Kalibrasyon eğrisinin denkleminden yola çıkılarak Tayin Limiti (LOD) ve Ölçüm Limitlerinin (LOQ) Belirlenmesi için aşağıda verilen eşitlikler kullanıldı (101).

$$LOD = \frac{3.3 \times SD}{\text{eğim}} \qquad LOQ = \frac{10 \times SD}{\text{eğim}}$$

SD = Kalibrasyon eğrisine ait standart sapma

Eğim = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Geri kazanım deneyleri için analite ait üç farklı konsantrasyon noktası, literatüre göre ve modifiye edilene göre olmak üzere her iki quechers ekstraksiyon yönteminde (Q-ACE ve Q-EA) kullanıldı. Her iki çekitleme yöntemi için üç farklı konsantrasyonda (50, 75 ve 100 ng/µL) 6'şar tekrarlı analizler yapıldı. Geri kazanım çalışmaları, 5-HMF içermeyen pekmez örneği olmadığından, "katım yolu ile" boş örneklerin ekstraksiyonu sonrası elde edilen alandan, 100 ppm katım yapılarak edilen örnekler ile elde edilen miktar çıkarılarak % geri kazanım hesaplamaları (%GK) gerçekleştirildi. Geri kazanım için kabul kriterleri %80-120 olarak belirlendi. Çekitleme yöntemlerinin detayları bölüm 3.4.1, 3.4.2 ve 3.4.3'de belirtildiği gibidir. Her bir 6 tekrarlı yapılan geri kazanım çalışmalarından elde edilen standart sapma ve ortalama değerler elde edilerek bağıl standart sapma (%RSD) hesaplandı. Bu veriler için kabul kriteri %15 olacak şekilde belirlendi. Geri kazanım ve %RSD değerlerinden elde edilen sonuçlara göre çekitleme yöntemlerinden en yüksek geri kazanım yüzdesine sahip olan yöntem seçilerek gerçek numuneler analiz edildi.

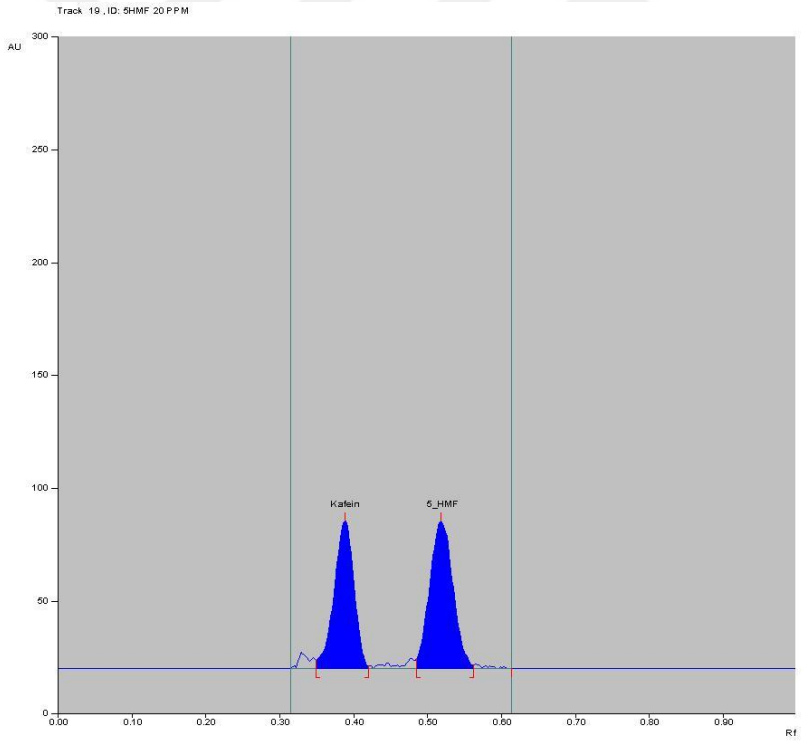
3.4.5. Gıda Örneklerinin YPİTK ile Analizi

Çalışmamızda 20 x 10 cm boyutlarında silika jel 60 F254 HPTLC cam plaka (Merck Kat. No: 1.05649) kullanıldı. Tüm çözeltiler için enjeksiyon hacmi 1 µL olarak ayarlandı ve bant uzunluğu 5 mm olacak şekilde plakaya uygulandı. Hareketli faz olarak 10 Ml toluen: etil asetat: formik asit (5:4:1) çözücü sistemi kullanıldı. Plaka 80 mm'ye kadar yürütüldü ve 5 dk. sıcak hava akımında kurutuldu. Ayrımın sağlanmasının ardından plaka densitometrik tarama ünitesine yerleştirildi. Tarama parametreleri; döteryum lambası dalga boyu, 274 nm; slit ölçüleri, 4.00 x 0.10 mm; tarama hızı 20 mm/s olacak şekilde seçildi. Spektrumlar 200 ile 400 nm arasında 20 nm/s hızla kaydedildi. Kantitatif analiz için tek dalga boylu reflektans modunda elde edilen pik alanı dikkate alındı.

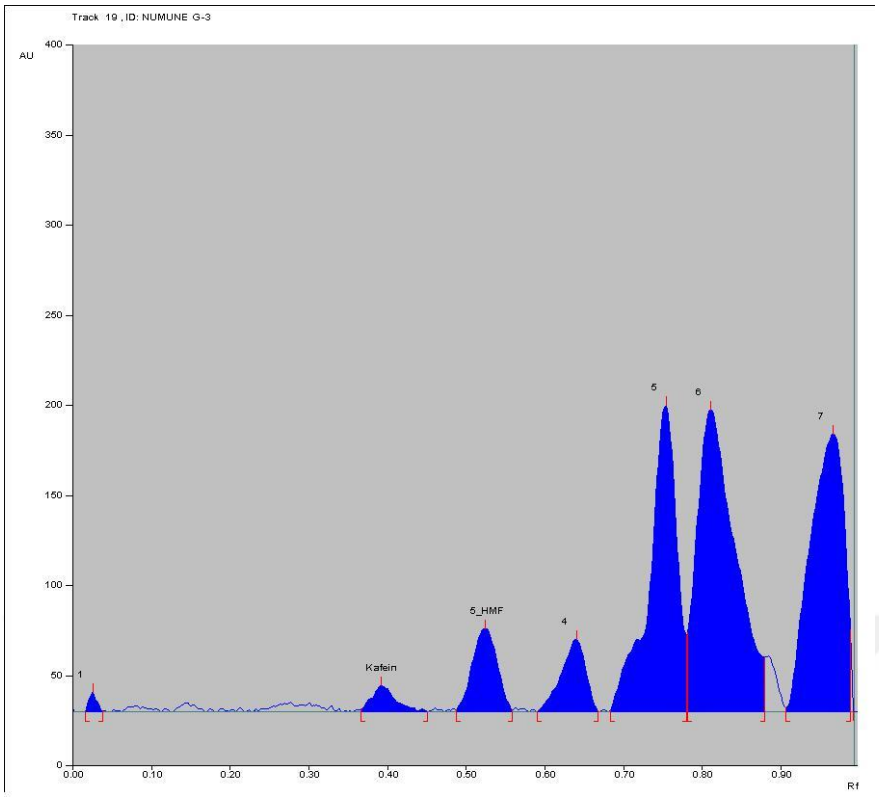
Analiz edilen her bir plakaya bir adet yalnızca metanol ve kafein içeren çözelti tatbik edildi. Ayrıca her bir analizde örnekler ile beraber kalibrasyon noktalarından 10 ng/µL 5-HMF çözeltisi bilinmeyen örnek şeklinde kontrol amaçlı analiz edildi. Bu konsantrasyondan elde edilen ±%15'lik sapma olması durumunda analiz tekrar edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada bir gıdadan kaynaklı toksin olarak kabul edilen 5-HMF etken maddesinin YPİTK sistemi ile tayini için bir yöntem geliştirildi ve bu yöntem kullanılarak bebeklere özgü satılan pekmez içerikli bebek gıdalarında 5-HMF miktarı tespit edildi. 5-HMF ve iç standart olarak kullanılan kafein maddelerinin standart çözelti ile yapılan analizine ait YPİTK kromatogramı Şekil 6'daki gibidir. Aynı şekilde 5-HMF ve IS çözeltilerinin katım yapılarak elde edilen YPİTK kromatogramı Şekil 7'de gösterilmektedir. 5-HMF etken maddesinin alıkonma faktörü (Rf) 0,63 (±0,02) dak., iç standart olan kafeinin Rf değeri ise 0,42 (±0,04) dak.dır.

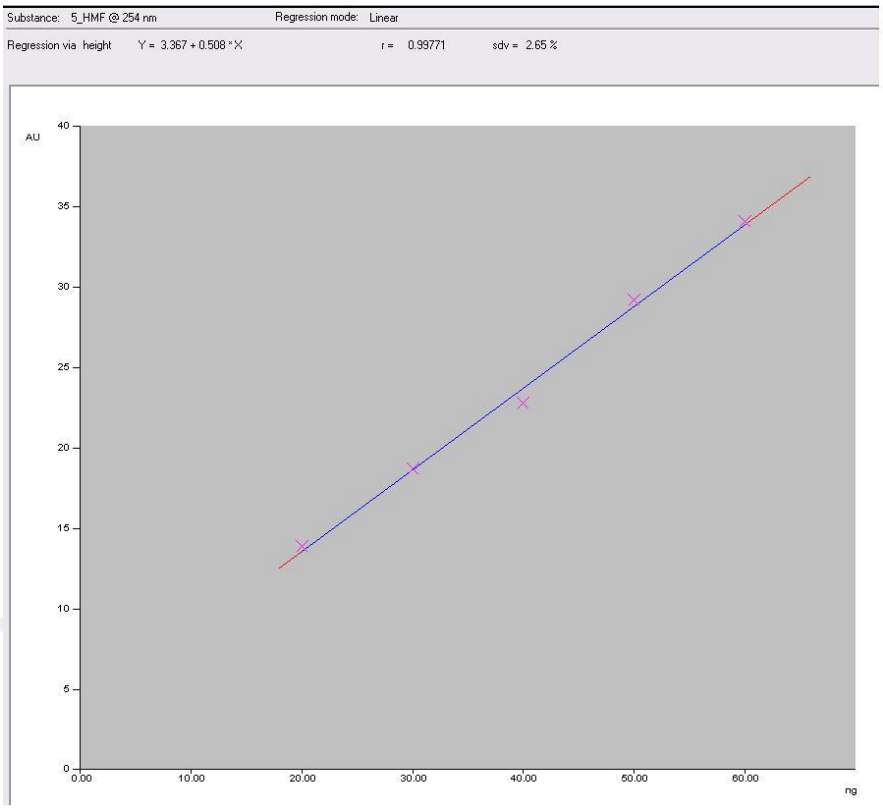


Şekil 5: 5-HMF ve iç standart olarak kullanılan kafein maddelerinin standart çözelti ile birlikte yapılan analizine ait YPİTK kromatogramı



Şekil 7. Düşük konsantrasyonda 5-HMF içeren bir pekmez örneğinin analizinden elde edilen YPİTK kromatogramı

5-HMF etken maddesinin kalibrasyon aralığı 20-80 ng/spot olarak belirlendi (5 nokta). Kalibrasyon eğrisi, kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısı Şekil 8'de gösterildiği gibidir.



Şekil 6: 5-HMF etken maddesinin YPİTK analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisi
5-HMF/K oranı: 5-HMF alanı/Kafein alanı

Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ≥0,99 olması sebebiyle tatmin edici bulundu. Bu eğri denklemine göre hesaplanan LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla 36 ve 46 ng/µL (spot) bulundu. Bu değerler kalibrasyon arlığı içerisinde kaldığından kalibrasyon eğrisi geçerli sayıldı.

Yapılan geri kazanım çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre çekitleme verimi (%90.06) en yüksek olan Q-EA yöntem seçilerek bu yöntem gerçek pekmez ürünlerine uygulandı. Her iki yöntemin 50, 75 ve 100 ng/µL konsantrasyonların katım yolu ile 6'şar kez tekrar etmek sureti ile yapıl karşılaştırması sonucu geri kazanım verimleri Tablo 11'deki gibidir.

Tablo 6: İki farklı çekitleme yöntemi kullanılarak 3 farklı konsantrasyon ile yapılan geri kazanım sonuçlarının karşılaştırması

	Ortalama Geri Kazanım Yüzdeleri (%)	
	Q-EA	**Q-ACE**
50 ng/µL (n=6)	**88.6**	62.4
75 ng/µL (n=6)	**89.0**	69,2
100 ng/µL (n=6)	**92,6**	72,3

Tablo 11'den de anlaşılacağı üzere Q-EA yöntemi matriks etkisinin en az görüldüğü, geri kazanım yüzdelerinin her 3 konsantrasyon da kabul edilebilir sınırlarda (%80-120) olduğu, en verimli çekitleme yöntemi olarak seçildi ve gerçek numuneler bu yöntem ile çekitlenerek analiz edildi. Q-EA yönteminin geçerlilik çalışmalarına ait detaylı bilgi Tablo 12'de gösterilmektedir.

Burada sunulan sonuçlara bakıldığında % geri kazanım sadece Q-EA için kabul edilebilir aralıkta bulundu. Bu veriler ışığında çekitleme yönteminin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan kabul edilebilir hata yüzdelerinin ≤3,8 olduğu tespit edildi. Her bir konsantrasyon için 6'şar kez yapılan tekrar edilebilirlik çalışmalarının standart sapma değerleri ≤4 bulunurken, %RSD değerleri ise ≤1,57 bulundu. Böylelikle geçerli bir çekitleme yöntemi belirlenmiş oldu.

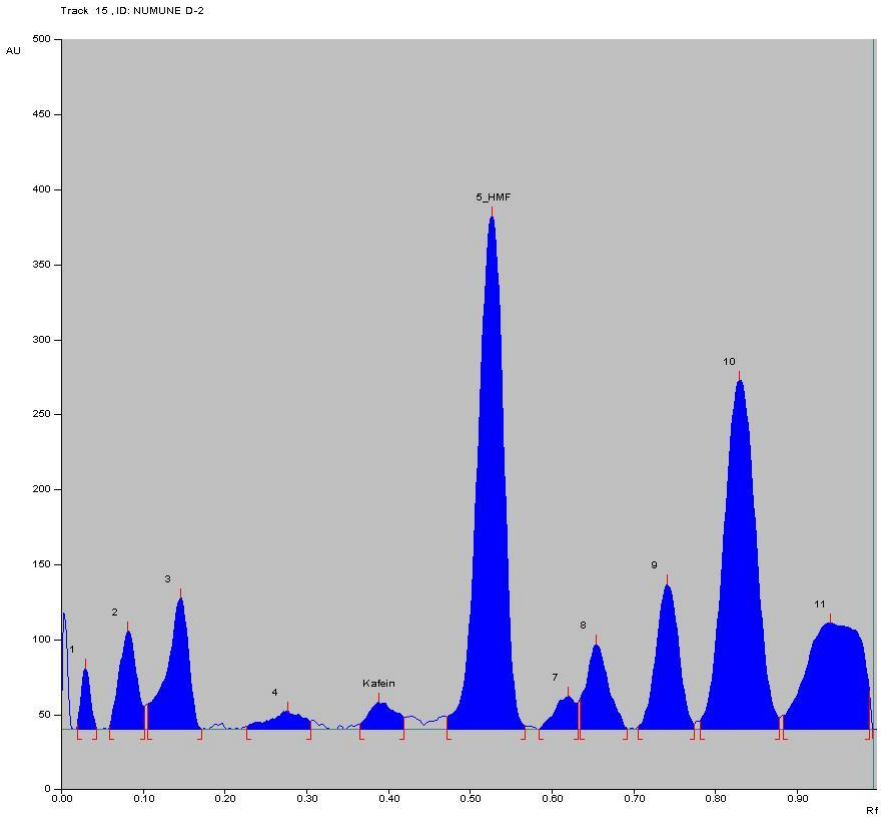
Tablo 7: Q-EA yöntemi ile yapılan geçerlilik çalışmalarının bulguları

	50 ng/µL			75 ng/µL					
	%GK	**SD**	**%RSD**	**%GK**	**SD**	**%RSD**	**%GK**	**SD**	**%RSD**
1. tekrar	88,2	2	1,57	86,2	1,83	1,72	96,2	2,13	1,45
2. tekrar	81,1			98,6			98,6		
3. tekrar	86,6			92,7			92,7		
4. tekrar	86,3			87,2			97,2		
5. tekrar	82,9			85,1			95,1		
6. tekrar	89,4			96,3			96,3		

Pekmez içerikli bebek gıdalarında tespit edilen 5-HMF miktarları

Çalışmada meyve içerikli toplam 15 adet pekmez içerikli bebek gıdası satın alındı. 10 farklı markadan seçilen bu ürünlerin tümü Quecher EA yöntemi ile çekitlendi. Tüm örnekler YPİTK ile analiz edildi. Yapılan miktar tayini hesaplamalarında örnek başlangıç miktarı, tatbik hacmi dikkate alındı ve nihai konsantrasyon ng/µL şeklinde hesaplandı. Bu bulgulardan yola çıkıldığında 5 gram numune çekitleyerek 1 mL'ye hapsedilen numunelerde bulunan 5-HMF konsantrasyonları µg/kg cinsinden geri hesaplama yapılarak bulundu. Her örnekten en az 3 tekrarlı örnek alınarak analizler gerçekleştirilerek ortalaması alındı.

Buna göre, çalışmamızda piyasadan toplanan 15 adet bebeklere özgü pekmez içeren gıda örneklerinde geliştirilen YPİTK yöntemi ile belirlenen ortalama geri kazanım oranı göz önüne alındığında 75.5-360.1 ug/kg konsantrasyon aralığında 5-HMF bulunmuştur. Toplanan 10 örnekte yetişkin bir bireye özgü yasal sınırın da üstünde olduğu görülmüştür (160.8-360.1 ug/kg).



Şekil 7: Yüksek konsantrasyonda 5-HMF içeren bir pekmez örneğinin analizinden elde edilen YPİTK kromatogramı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde sayısı çoğalan kanser vaka sayıları ve kanserle mücadele karşılaşılan zorluklar çok büyük ölçektedir. Kanseri tetikleyen faktörler arasında gıda maddelerinin rölü'nü gözönüne aldığımızda, konunun önemi ortaya çıkıyor. Gıda güvenliği ve hıfzıssıhha açısından 5-HMF'nin farklı gıdalardakı miktarının takip edilmesi ve gıdaların depolama sırasındakı arrtışların ne düzeyde olmasını araştırlması gerekir. Bunun yanısıra 5-HMF nin gıdalar oluşumunun engellenmesini, en aza indirilmesi konusunda bilimsel çalışmaların yürütülmesi gerekiyor. (69)

Duttan imal edilmiş pekmez üzerinde yapılan bir çalışmada genel olarak, 6 ay süreyle 20±2°C'de 6 ay tutulan dut pekmezlerinin besin değerlerinde özellikle fenollik miktarında ve antioksidan aktivitesinde düşüş, 5-HMF nin miktarında yükselme gözlenmiştir. Bu yüzden pekmezin depolanması daha düşük sıcaklıklarda olmalıdır. Dolayısıyla pekmezin toplam fenolik madde miktarının ve antioksidan aktivitesinin korunması ya da azalamanın en az seviyede saklanması ve 5-HMF miktarının artmasının karşısını almak için uygun depolama şartlarının belirlenmesi yönünde çalışmalar yapılmalıdır. Sıvı pekmezin Türk Gıda Kodeksinde en fazla 75 mg/kg, katı pekmezde ise en fazla 100 mg/kg olması gerektiği belirtilmiştir. 5- HMF miktarının, evlerde geleneksel yöntemlerle evlerde açık kazanda yapılan pekmezlerde vakum altında üretilen pekmezlerden daha fazla olduğuna saptanmıştır. 5-HMF'yi dut pekmezlerinde 12.8-152 mg/kg, üzüm pekmezinde 18.4-200 mg/kg arasındadır (Kus ve ark). Çalışmayı değerlendirdiğimizde, analizi yapılmış dut örneklerinden, 2'si, üzüm pekmezlerinin ise 1 tanesi dışında diğerlerinin HMF içeriği bilgisi etiket üzerinde olan bilgilendirme ile benzerlik göstermiştir. Batu ve ark. nın yapmış olduğu çalışmada açık kazan ve vakum altında üretilen pekmezlerin HMF değerleri arasında önemli derecede farklar vardır. Vakumda imal edilen %76 kuru madde (suda çözünür) içeren pekmez, 35.3 mg/kg HMF diğer yöntemle üretilen pekmezin 681.4 mg/kg HMF içerdiği görülmüştür. Bu

yöntemde HMF nin yüksek oluşu açık kazan yönteminin yüksek sıcaklıklara ulaşmasıdır. HMF, düşük pH veya asidik koşulların varlığında düşük sıcaklıklarda kolayca oluşur [93], yüksek sıcaklık ve uzun depolama süresi konsantrasyonunu büyük ölçüde artırır. Bununla birlikte, HMF'nin fruktoz ve sakarozdan oluştuğu kuru ve pirolitik koşullarda farklı bir yol önerilmektedir. Baldaki HMF oluşum hızı, sıcaklık ve pH'a ek olarak balın nem içeriğine de bağlıdır [62, 63]. Bu nedenle, HMF oluşumunu engellemek için gama ışıması ve ısıl işlem dahil olmak üzere bal numunelerinde düşük nem içeriğini korumak için birçok adım atılır. Halil vd., balın fizikokimyasal özellikleri ile HMF oluşumu arasındaki ilişkiyi araştırmış ve serbest asitler ile toplam asitlik arasında güçlü bir ilişki olduğunu, pH ile laktonlar arasında ise sadece orta düzeyde bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Dört bal örneği (okaliptüs, sulla portakalı ve kestane) üzerinde yapılan bir başka çalışmada Fellico ve ark., HMF konsantrasyonu ile ısıtma süresi, asitlik ve pH arasında bir ilişki olduğunu bildirdi. Benzer bir ilişki, sıcaklıkta bir derecelik artış, nem içeriği ve su aktivitesi ile HMF oluşumunda orantılı bir artış bildiren başka bir çalışmada [30] belirtilmiştir. Ayrıca balda bulunan manganez, çinko, magnezyum ve demir(II) gibi metalik iyonların konsantrasyonlarının da HMF oluşumu üzerinde olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir.

Alpcan (2021) tecrübelerine dayanarak, meyveleri pişirirken fazla ateş verilirse fruktozun yanabileceğini ve bu da HMF-5`in oluşa bileceğini riskinin altını çizmektedir. Bu kanserojen maddenin ortaya çıkmaması için meyveleri pişirirken yüksek ateşte kısa zamanda değil de, düşük ateşte (buhar yöntemi gibi) daha uzun bir sürede pişirilmesi gerekir. (70) Bu çalışma ile pekmez içeren bebek gıdalarında ısıl işlem basamağında ortaya çıkan, 5-Hidroksimetilfurfural (5-HMF) için HPTLC cihazında bir yöntem geliştirilmiş ve bu yöntemin limit değerlere ve piyasadaki ürünlerdeki hedef analitin yoğunluğuna göre uygun bir doğrusal aralıkta geçerli kılınmıştır. Yöntemin gıda güvenliğini belirlemek üzere hızlı, basit, uygun ve hassas analizler için yeterli ve ucuz olduğu görülmüştür. Geliştirilen yöntemle

analiz edilen örneklerde belirlenen 5-HMF konsantrasyonları çocuk kitle indeksi göz önünde bulundurularak değerlendirilmmiştir. En azından çocuklar için geliştirilen bu ürünlerde daha sıkı önlemler alınması gerekmektedir. Çalışmanın analitik basamakları değerlendirildiğinde ise Türk Gıda Kodeksinin belirlediği limitin rahatlıkla tespit edilebildiği bir yöntem geliştirilmiş olduğu görülmektedir. Yetişkin insanların bile maruz kalabileceği en düşük limit değerlerin çok üstünde belirlenen 5- HMF konsantrasyonu, bebek gıda ürünlerinde acilen mercek altına alınmalıdır. Bu durumun kısa süre içinde adli yönden tüketici mahkemelerine, gümrükler yolu ile ürünün ithalatı sırasında üreticileri ilgilendiren mali yükümlülüklere konu olacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Hodge, J.E. (1953)‘Chemistry of Browning Reactions in Model Systems’ in J. Agric. Food Chem. 1, 928–943
2. Maillard, L-C. (1912)‘Action Des Acides Amine´s Sur Les Sucres. Formation Des Melanoidins Par Voie Methodique’ in Compt. Rend. 154, 66–68
3. Ericksson, C., ed (1981)‘Maillard Reaction in Food: Chemical, Physiological and Technological Aspects’ in Progress in Food and Nutrition Science 5, Pergamon Press
4. Waller, G.R. and Feather, M.S. (eds)(1983) The Maillard Reaction in Foods and Nutrition, ACS Symp. Ser. 215, Washington, DC
5. Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrel, R.F. and Liardon, R. (1990)‘The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology’, Birka¨user Verlag, Basel, Switzerland
6. Ikan, R. (1990)‘The Maillard Reaction: Consequences for the Chemical and Life Sciences’, John Willey and sons Ltd, Chischester, UK
7. McWeeny, D.J., Knowels, M.E. and Hearne, J.F. (1974)‘The Chemistry of Non-enzymic Browning and Its Control by Sulphites’ in J. Sci. Food Agric. 25, 735–746
8. Ghiron, A.F., Quack, B., Mahinney, T.P. and Feather, M.S. (1988) ‘Studies on the Role of 3-deoxy-d-erythro-glucosulose (3-glucosone)in Nonenzymatic Browning. Evidence for Involvement in a Strecker Degradation’ in J. Agric. Food Chem. 36, 677
9. Huber, B. and Ledl, F. (1990)‘Formation of 1-amino-1,4- dideoxy-2,3-hexodiulose and 2-aminoacetylfurans in the Maillard Reaction’ in Carbohydrate Res. 204, 215–220
10. Yaylayan, V.A. and Huyghues-Despointes, A. (1996)‘Retroaldol and Redox Reactions of Amadori Compounds: Mechanistic Studies with Various Labeled D-[13C] Glucose’ in J. Agric. Food Chem. 44, 672–681

11. Van Boekel, M.A.J.S. and Brands, C. (1998)‘Heating of Sugarcasein Solutions: Isomerization and Maillard Reactions’ in The Maillard Reaction in Foods and Medicine (O’Brien, J., Nursten, H.E., Crabbe, M.J.C., Ames, J.M., eds), pp. 154–158, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
12. Berg, H.E. (1993) Reactions of Lactose During Heat Treatment of Milk: A Quantitative Study, PhD thesis, Wageningen University, NL
13. Fu, M.X., Wells-Knecht, K.J., Blackledge, J.A., Lyons, T.J., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1994)‘Glycation, Glycoxidation, and Cross-linking of Collagen by Glucose: Kinetics, Mechanisms, and Inhibition of Late Stages of the Maillard Reaction’ in Diabetes 43, 676–683
14. 1 Buckholz, L.L. (1988)‘The Role of Maillard Technology in Flavoring Food Products’ in Cereal Foods World 33, 547–551
15. Ho, C.T. (1996)‘Thermal Generation of Maillard Aromas’ in The Maillard Reaction: Consequences for the Chemical and Life Sciences (Ikan, R., ed), pp. 27–53, John Willey and sons Ltd, Chischester, England
16. Taylor, A.J. and Mottram, D.S. (1996)‘Flavour in Science. Recent Developments’, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
17. Chuyen, N.V. (1998)‘Maillard Reaction and food processing. Application aspects’ in Processed-Induced Chemical Changes in Food (Shahidi, F., Ho, C-T., Chuyen, N. eds), pp. 213–235
18. Fors, S. (1983)‘Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds. A literature review.’ in The Maillard Reaction in Foods and Nutrition. ACS symp. series, 215, 185-286
19. Teranishi, R., Wick, E.L. and Hornstein, I. (1999)‘Flavour Chemistry. Thirty Years of Progress’, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York

20. Ledl, F. and Schleider, E. (1990)‘New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body’ in Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 29, 565–594 3
21. Ames, J.M., Apriyantono, A. and Arnoldi, A. (1993)‘Low Molecular Weight Colored Compounds Formed from Xylose-lysine Model Systems’ in Food Chem. 46, 121–127
22. Tressl, R., Wondrack, G.T., Garbe, L-A., Kru¨ger, R-P. and Rewicki, D. (1998)‘Pentoses and Hexoses as Sources of New Melanoidin Like Maillard Polymers’ in J. Agric. Food Chem. 46, 1765–1776
23. Feather, M.S. (1985)‘Some Aspects of the Chemistry of Nonenzymatic Browning (Maillard reaction)’ in Chemical Changes in Food during Processing, pp. 289-303, AVI publ. Co
24. Namiki, H.E. (1988)‘Chemistry of Maillard Reactions: Recent Studies on the Browning Reaction Mechanism and the Developments of Antioxidants and Mutagens’ in Adv. Food Research 32, 115–184
25. Hashiba, H. (1982)‘The Browning Reaction of Amadori Compounds Derived from Various Sugars’ in Agricultural and Biological Chemistry 46, 547–548
26. Hoffman, T. (1999)‘Quantitative Studies on the Role of Browning Percursores in the Maillard Reaction of Pentoses and Hexoses with L-alanine’ in Eur. J. Food Technol. 209, 113– 121
27. Arvidsson, P., Van Boekel, M.A.J.S., Skog, K. and Jagerstad, M. (1998)‘Formation of Mutagenic Maillard Reaction Products’ in The Maillard Reaction in Foods and Medicine (O’Brien, J., Nursten, H.E., Crabbe, M.J.C., Ames, J.M., eds), pp. 219–224, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
28. Lee, H., Jiaan, C.Y. and Tsai, S.J. (1992)‘Flavone Inhibits Mutagen Formation During Heating in a Glycine/creatinine/glucose Model System’ in Food Chem. 45, 235–248

29. Brands, M.J., Alink, G.M., Van Boekel, M.A.J.S. and Jongen, W.M.F. (2000)‘Mutagenicity of Heated Sugar-casein Systems: Effect of the Maillard Reaction’ in J. Agric. Food Sci. 48, 2271– 2275
30. Griffith, T. and Johnson, J.A. (1957)‘Relation of the Browning Reaction to Storage of Sugar Cookies’ in Cereal Chem. 34, 159–169
31. Chuyen, N.V., Ijichi, K., Umetsu, H. and Moteki, K. (1998) ‘Antioxidative Properties of Pproducts from Amino Acids Or Peptides in the Reaction with Glucose’ in Process-induced Chemical Changes in Food (Shahidi, F., Ho, C-T., Van Chuyen, N., eds), pp. 201–235, Advances in Experimental Medicine and Biology 434, Plenum Press, New York
32. Ames, J.M. (1998)‘Applications of the Maillard Reaction in the Food Industry’ in Food Chem. 62, 431–439
33. Shahidi, F., Ho, C-T. and Van Chuyen, N. (eds)(1998) Process-Induced Chemical Changes in Food in Advances in Experimental Medicine and Biology 434, Plenum Press, New York
34. Sloof, M., Tijskens, L.M.M. and Wilkinson, E.C. (1996)‘Concepts for Modelling the Quality of Perishable Products’ in Trends Food Sci. Technol. 7, 165–171
35. Ames, J.M. (1990)‘Control of the Maillard Reaction in Food Systems’ in Trends Food Sci. Technol. 1, 150–154
36. Labuza, T.P. and Baisier, W.M. (1992)‘The Kinetics of Nonenzymatic Browning’ in Physical Chemistry of Foods (Schwartzberg, H., ed), pp. 595–640, Dekker, New-York
37. Angyal, J.S. (1992)‘The Composition of Reducing Sugars in Solution: Current Aspects’ in Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. 42, 19–35

38. Martins, S.I.F.S, Van Boekel, M.A.J.S. and Jongen, W.M.F. (2000) 'Kinetic Modelling: A Tool to Understand Maillard Reaction Mechanisms' in Czech. J. Food Sci. 18, 281–282
39. Stewart, W.E., Caracotsios, M. and Sørensen, J.P. (1992)'Parameter Estimation from Multiresponse Data' in AIChE J. 38, 641–650
40. Stewart, W.E., Shon, Y. and Box, G.E.P. (1998)'Discrimination and Goodness of Fit of Multiresponse Mechanistic Models' in AIChE J. 44, 1404
41. Abdulkarim BG, Smith JS. Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998; 46(11):4680-4687.
42. Adrian J. Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. World review of nutrition and dietetics. 1974; 19:71-122.
43. Albala-Hurtado S, Veciana-Nogues MT, Marine-Font A, Vidal-Carou MC. Progress of browning reactions during storage of liquid infant milks. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999; 47:4033-4037.
44. Ames JM. Control of the Maillard reaction in food systems. Trends Food Science and Technology. 1990; 1:150-154.
45. Anese M, Manzocco L, Nicoli MC, Lerici CR. Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999; 79(5):750-754.
46. Beleggia R, Platani C, Papaetal R. Metabolomics and food processing: from semolina pasta, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011; 59(17):9366-9377.
47. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Coffee, tea, cocoa. Food Chemistry, 2009, 938-970.

48. . Billaud C, Maraschin C, Chow YN, Cheriot S, Peyrat MN. Maillard and Nicolas J. Maillard reaction products as “natural antibrowning” agents in fruit and vegetable technology. Molecular Nutrition and Food Research. 2005; 49(7):656-662.
49. Carpenter KJ, Booth VH. Damage to lysine in food processing: its measurement and significance. Nutrition Abstracts and Reviews. 1973; 43:424-51.
50. Carpenter KJ. The estimation of available lysine in animal protein foods. Biochemistry journals. 1960; 77:604-10.
51. Chawla SP, Chander R, Sharma A. Antioxidant formation by g-irradiation of glucose-amino acid model systems. Food Chemistry. 2007; 103:1297-1304.
52. Cheng KW, Chen F, Wang M. Heterocyclic amines: chemistry and health. Molecular Nutrition & Food Research. 2006; 50(12):1150-1170.
53. Crozier A, Ashihara H, Tomas-Barberan F. Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2011.
54. Eichner K, Karel M. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1972; 20:218-23.
55. .Einarson H, Eriksson C. The antibacterial effect of Maillard reaction products and sorbic acid at different pH levels and temperatures. In The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology. 1990, 227-232.
56. Evangelisti F, Calcagno C, Zunin P. Relationship between blocked lysine and carbohydrate composition of infant formulas. Journal of Food Science. 1994; 59(2):335-337
57. Felton J, Knize M. Heterocyclic-amine mutagens carcinogens in foods in Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I, Springer, Berlin, Germany, 1990, 471-502.

58. Felton JS, Knize MG. Carcinogens in cooked foods: how do they get there and do they have an impact on human health? Special Publications of the Royal Society of Chemistry. 1998; 223:11-18.
59. Finot PA, Deutsch R, Bujard E. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. Progress in food & nutrition science. 1981; 5:345-55.
60. Gerrard J. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. Trends in Food Science & Technology. 2002; 13:391-399.
61. Ho CT. Thermal generation of Maillard aromas. In The Maillard Reaction: Consequences for the Chemical and Life Sciences. Ikan, R. (Editor). John Wiley & Sons, Ltd. 1996; 27-53.
62. Homma S, Aida K, Fujimaki M. Chelation of metal with brown pigments in coffee. In Development in Food Science, 13: Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, Fujimaki M, Namiki M, Kato H. (Editors). Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York and Kodansha Ltd., 1986, 165-172.
63. Jing H, Kitts DD. Chemical and biochemical properties of casein–sugar Maillard reaction products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2002; 40:1007-1015.
64. Abdulmalik, O.,et al., 2005. 5-hydroxymethyl-2-furfural modi-fies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sicklingof red blood cells.British journal of haematology, 128 (4),552–561.
65. Abraham, K.,et al., 2011. Toxicology and risk assessment of5-Hydroxymethylfurfural in food.Molecular nutrition &food research, 55 (5), 667–678.
66. Agila, A., and Barringer, S., 2012. Effect of roasting conditionson color and volatile profile including HMF level insweet almonds (Prunus dulcis).Journal of food science,77(4), C461–C468.

67. Akıllıoglu, H.G., Mogol, B.A., and G€okmen, V., 2011.Degradation of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fer-mentation.Food additives & contaminants: part A, 28 (12),1–1635.
68. Akpınar, K.,et al., 2011. Determination of HMF in roastedflour/oil mixtures and effect of solvent used in the extrac-tion procedure.Food chemistry, 128 (3), 790–794.
69. Al-Diab, D., and Jarkas, B., 2015. Effect of storage and ther-mal treatment on the quality of some local brands ofhoney from Latakia markets.Journal of entomology andzoology studies, 3 (3), 328–334.
70. Alizadeh, M.,et al., 2017. Assessing the effect of 5-hydroxy-methylfurfural on selected components of immuneresponses in mice immunised with ovalbumin.Journal ofthe science of food and agriculture, 97 (12), 3979–3984.