x





T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RAFİNE YAĞLARDA 2-MCPD, 3-MCPD VE GLİSİDİL ESTER TAYİNLERİ İÇİN YENİ KROMATOGRAFİK METOT GELİŞTİRİLMESİ

Muhammed Raşit BAKIR

YÜKSEK LİSANS

Kimya Anabilim Dalı

Aralık-2018

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

RAFİNE YAĞLARDA 2-MCPD, 3-MCPD VE GLİSİDİL ESTER TAYİNLERİ İÇİN YENİ KROMATOGRAFİK METOT GELİŞTİRİLMESİ

Muhammed Raşit BAKIR

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2018, 64 sayfa

Jüri

Prof. Dr. Hüseyin KARA

Doç. Dr. Mustafa TOPKAFA

Öğr. Üye. Dr. Fatih DURMAZ

İnsan sağlığına etkileri son yıllarda tartışmalara neden olmuş; 2-kloro-1,3-propandiol (2-MCPD), 3-kloro-1,2-propandiol (3-MCPD) ve glisidil esterler (GE) gıda bulaşanları olarak adlandırılmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından, alınan gıdalar içerisinde bu bileşenlerin bulunmaları durumunda, insan sağlığı üzerine genotoksik ve karsinojenik etkilerinden dolayı olası riskler başlıklı bir risk değerlendirme raporu yayımlanmıştır.

Bu tez çalışmasında; insan sağlığı açısından vücuda enerji veren, esansiyel yağ asitlerinin kaynağı olan, vitaminlerin bir kısmının vücuda alınmasını sağlayan rafine yağlarda oluşan; 2-MCPD, 3-MCPD ve GE'lerin tayinleri için yeni bir GC-FID yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılmış ve bu bulaşanların palm, ayçiçek ve soya yağlarındaki miktarları tespit edilmiştir.

Geliştirilen yeni yöntemde LOD değerleri 3-MCPD için 0.0004 mg/kg, 2-MCPD için 0.013 mg/kg olarak, LOQ değerleri ise sırasıyla; 0.012 mg/kg ve 0.039 mg/kg bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik olarak gün içi ve günler arası en yüksek %RSD değerleri sırası ile 4.605 ve 4.772 bulunmuştur. Doğruluk değerleri % geri kazanım olarak hesaplanmış ve 3-MCPD için % 96.81±10.92, 2-MCPD için % 99.42±10.70 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yeni metodun, GC-MS cihazı SIM modunda gerçekleştirilen AOCS Cd 29c-13 standart metodu ile istatistiksel olarak karşılaştırılması için t testi uygulanmıştır. t testi sonucuna göre geliştirilen yeni metot ile AOCS resmi standart metodu arasında % 95 güven sınırları içerisinde anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; tarafımızca geliştirilen yeni metodun, 2-MCPD, 3-MCPD ve GE tayini için alternatif bir metot olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: 2-MCPD, 3-MCPD, Glisidil Ester, Kromatografi, Rafine Yağlar, Validasyon.

ABSTRACT

MS THESIS

DEVELOPMENT OF NEW CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF 2-MCPD, 3-MCPD AND GLYCIDYL ESTER IN REFINED OILS

Muhammed Raşit BAKIR

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2018, 64 Pages

Jury

Prof. Dr. Hüseyin KARA

Assoc. Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

Asst. Prof. Fatih DURMAZ

2-monochloropropane 1,3-diol (2-MCPD), 3-monochloropropane 1,2-diol (3-MCPD) and glycidyl esters (GE) which human health impacts have caused controversy in recent years; are called as food contaminants. A risk assessment report titled possible risks to due to genotoxic and carcinogenic effects on human health has been published in the presence of these components in the foods by the European Food Safety Authority (EFSA).

In this thesis; a new GC-FID method has been developed for the determination of 2-MCPD, 3-MCPD and GEs which are formed in refined oils which provide energy to the body in terms of human health, is the source of essential fatty acids and, some of the vitamins are taken in the body. The developed new method was validated and the quantities of these contaminants were determined in palm, sunflower and soybean oil.

LOD values were 0.0004 mg/kg for 3-MCPD, 0.013 mg/kg for 2-MCPD, although LOQ values were found 0.0012 mg/kg and 0.039 mg/kg, respectively, in the developed new method. The highest RSD values as repeatability for intraday and inter-day were 4.605 and 4.772, respectively. Accuracy were calculated as % recovery and found to be 96.81%±10.92 for 3-MCPD and 99.42%±10.70 for 2-MCPD. t test for the developed new method was applied for statistical comparison with standard AOCS Cd 29c-13 method carried out with GC-MS in SIM mode. According to the results of the t-test, there was no significant difference between the developed new method and the AOCS official standard method within 95% confidence limits.

As a results, it has been shown that the developed new method by us is an alternative method for the determination of 2-MCPD, 3-MCPD and GE.

Keywords: 2-MCPD, 3-MCPD, Glycidyl Ester, Chromatography, Refined Oils, Validation.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hüseyin KARA danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada konu seçiminden, tez oluşumuna kadar her safhasında her an desteğini hissettiğim üç buçuk yıl boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hüseyin KARA'ya minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince, sonuçların değerlendirilmesi ve olgunlaşmasında çok büyük emekleri olan, karşılaştığım her zorlukta kendilerini yardıma seferber eden, maddi ve manevi destelerinden dolayı hayatım boyunca minnettar kalacağım saygıdeğer hocalarım; sayın Doç. Dr. H. Filiz AYYILDIZ ve Doç. Dr. Mustafa TOPKAFA'ya sonsuz teşekkürler ederim.

Desteklerinden ötürü Araştırma Grubumuzda yer alan Dr. Öğr. Üyesi Fatih DURMAZ, Arş. Gör. Dr. İsmail TARHAN'a ve Doktora Öğrencisi Aslan TAŞ'a ayrı ayrı saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen çok kıymetli ev arkadaşlarım, dostlarım Oktay KALKAN ve M. Ender PEKCİCİ'ye, lisans ve yüksek lisans hayatımda değişimin bir başlangıç olduğunu öğrenmimi sağlayan her daim desteğini hissettiğim dostum Orhan ARAZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım kararlarda beni destekleyen, benden dualarını esirgemeyen beni yetiştiren en sevdiklerim annem Ümmühan BAKIR ve babam İdris BAKIR'a, ablam Merve ABANUZOĞLU'na, kardeşim Ü. Alper BAKIR'a, abim Mikail ABANUZOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, ailemizin yeni üyesi gülüşüyle bize umut veren yeğenim Furkan ABANUZOĞLU'na teşekkür ederek, bu tezi Furkan'a atfediyorum.

Muhammed Raşit BAKIR

KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Yağların Tanımı ve Önemi 2
1.1.1. Yağların Rafinasyonu 3
1.2. 2-MCPD, 3-MCPD ve Glisidil Esterin Kimyasal Yapıları ve Oluşum Mekanizmaları 4
1.3. Rafine Yağlarda 2-MCPD, 3-MCPD, Glisidil Ester Miktarları 7
1.4. 2-MCPD, 3-MCPD ve Glisidil Esterin Sağlık Üzerine Etkileri 8
1.5. 2-MCPD, 3-MCPD ve Glisidil Ester Tayinlerinde Kullanılan Analiz Yöntemleri 9
1.5.1. BSTFA ile Türevlendirme 10
1.5.2. Fenil Boronik Asit Türevlendirmesi 11
1.5.3. Heptafluoro Butiril (HFB) Ester Türevlendirmesi 11
1.5.4. TsOH İle Dioksolan Türevlendirmesi 12

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **14**

2.1. Çalışmanın Amacı 17

3. MATERYAL VE YÖNTEM **18**

3.1. Kullanılan Standartlar ve Kimyasal Maddeler 18
3.2. Kullanılan Cihazlar 19
3.3 Standartların Hazırlanması 19
3.4. Türevlendirme İşleminin Optimizasyon Çalışmaları 20
3.4.1. Çözücü Seçimi 20
3.4.2. BSTFA Miktar Çalışması 21
3.5. Kromatografik Şartların Optimizasyon Çalışmaları 22
3.6. Kalibrasyonu Çözeltileri 24
3.7. Yağlardaki MCPD ve GE analizleri 25
3.7.1. Toplam 3-MCPD (Serbest 3-MCPD, Bağlı 3-MCPD ve GE) ve Toplam 2-MCPD (Serbest 2-MCPD, Bağlı 2-MCPD ve GE) analizleri 25
3.7.2. Serbest ve Bağlı 3-MCPD analizi 27
3.8. Geliştirilen Metoda Göre Sonuçların Hesaplanması 28
3.8.1. Toplam 2-MCPD (Serbest 2-MCPD, Bağlı 2-MCPD ve GE) 28
3.8.2. Toplam 3-MCPD (Serbest 3-MCPD, Bağlı 3-MCPD ve GE) 29
3.8.3. Serbest ve Bağlı 3-MCPD 30
3.8.4. Glisidil Ester 31
3.9. AOCS Resmi Metoduna Göre Sonuçların Hesaplanması 31
3.9.1. Toplam 2-MCPD (Serbest 2-MCPD, Bağlı 2-MCPD ve GE) 31
3.9.2. Toplam 3-MCPD (Serbest 3-MCPD, Bağlı 3-MCPD ve GE) 31

3.9.3. Serbest ve Bağlı 3-MCPD 32
3.9.4. Glisidil Ester 32

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 33

4.1. Türevlendirme İşleminin Optimizasyon Çalışmaları 33
4.1.1. Çözücü Seçimi 34
4.1.2. BSTFA Miktar Çalışması 37
4.2. Kromatografik Şartların Belirlenmesi 38
4.2.1. Metod Validasyonu 42
4.3. Gerçek Yağ Numunelerinde 2-MCPD, 3-MCPD ve GE Miktar Tayinleri 47
4.3.2. Geliştirilen Metoda Göre 2-MCPD, 3-MCPD ve GE Miktar Tayinleri 47
4.3.3. AOCS Resmi Cd 29c-13 Metoduna Göre 2-MCPD, 3-MCPD ve GE Miktar Tayinleri 49

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 58

KAYNAKLAR 60

ÖZGEÇMİŞ 64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikro litre
H	: Tabaka yüksekliği
g	: Gram
kg	: Kilo gram
mg	: Mili gram
k`	: Kapasite faktörü
m/z	: Kütle/yük oranı
m	: Analitik eğrinin eğimi
M	: Molarite
N	: Tabaka sayısı
ppm	: mg/kg
Rs	: Ayırma gücü
R^2	: Korelasyon katsayısı
t	: T testi
td	: Kritik T değeri
α	: Seçicilik

Kısaltmalar

2-MCPD	: 2-kloro-1,3-propandiol
2-MCPD-d5	: 2-kloro-1,3-propandiol-d5
3-MCPD	: 3-kloro-1,2-propandiol
3-MCPD-d5	: 3-kloro-1,2-propandiol-d5
3-MBPD	: 3-bromo-1,2-propandiol
3-MBPD-d5	: 3-bromo-1,2-propandiol-d5
3-MCPD-di-TMS	: 3-kloropropan 1,2 diol di-tri metil silil
2-MCPD-di-TMS	: 2-kloropropan 1,3 diol di-tri metil silil
AOCS	: Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği
AOAC	: Resmi Analitik Kimya Derneği
BSTFA	: N, O- Bis (trimetilsilil) trifloroasetamit
d5	: Döteryum 5
dk	: Dakika
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı
GC-FID	: Gaz Kromatografisi- Alev İyonlaşma Dedektörü
GC-MS	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi
GE	: Glisidil Ester
Gly-Pal	: Glisidil Palmitat
Gly-Pal-d5	: Glisidil Palmitat-d5
HFB	: Heptafluoro Butiril
HFBA	: Hepta Fluoro Butirik Asit Anhidrit
PBA	: Fenil Boronik Asit
RSD	: Bağıl Standart Sapma
tBME	: Tesiyer Bütil Metil Eter
TMS	: Tri Metil Silil
TsOH	: Toluen-4-sülfonik asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

İnsan sağlığı açısından yağlar, vücuda enerji vermesi, esansiyel yağ asitlerinin kaynağı olması, vitaminlerin bir kısmının vücuda alınmasını sağlaması gibi nedenlerden dolayı en önemli besin kaynaklarından bir tanesidir. Yağların, % 95-99'u trigliseritlerden, % 1-5'lik kısmı ise mono ve digliseridler, serbest yağ asitleri, fosfatidler, tokoferoller, steroller, wakslar, yağda çözünen vitaminler, fenolik bileşikler, peroksitler, metaller, renkli maddeler, ester bileşikleri, aldehit ve ketonlar, polimerik maddeler, 2-MCPD, 3-MCPD, GE'ler gibi bileşenlerden oluşmaktadır (Ayyıldız, 2010).

İyi bir tada ve görünüme sahip, raf ömrü uzun, safsızlık içermeyen sağlıklı bir yağ elde etmek için ham yağlar, belirli aşamalardan geçirilmelidir. Fiziksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılan ve farklı proses basamaklarını içeren bu işleme, yağ rafinasyonu denir (Topkafa, 2013). Yağ rafinasyon prosesi basamaklarının sonuncusu olan deodorizasyon basamağında, yağda bulunan kötü tat ve koku veren maddelerin uzaklaştırılması hedeflenmektedir. Ancak söz konusu hedefler doğrultusunda gerçekleştirilen proses şartlarının yüksek sıcaklık ve düşük basınç içermesi, yağlarda insan sağlığı açısından son derece tehlikeli olan 2-MCPD, 3-MCPD ve GE gibi türlerin oluşumuna sebep olmaktadır (EFSA, 2016).

3-kloropropan-1,2-diol (3-MCPD) ilk defa 1978 yılında asitle hidrolize edilmiş bitkisel proteinlerde (asit-HVP) ve soya sosu gibi ürünlerde tespit edilmiştir. 3-MCPD, 2-MCPD ve diğer bazı kloropropandiol (CPD) esterleri bu tarihten itibaren işlem bulaşanı olarak adlandırılmaktadırlar (Velíšek ve ark., 1978). Yapılan pek çok araştırma sonucunda; işlem bulaşanlarının yetişkinler tarafından yüksek miktarlarda tüketilmesinin, ağır sağlık sorunlarına sebep olabileceği, çocuklarda ise düşük dozlarda dahi alınmasının çok daha büyük zararlara yol açabileceği vurgulanmıştır. Bu bileşenlerin sürekli tüketilmesinin en önemli sonuçlarından bir tanesi de ileriye dönük kanser olma riskini artırmasıdır (Barocelli ve ark., 2011; Knutsen ve ark., 2018).

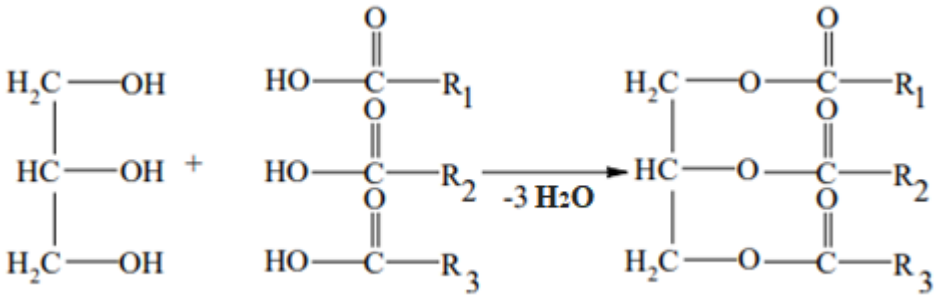
Ülkemizde üretimi yapılmamasına rağmen, sanayi odaklı üretimlerde oldukça yaygın bir şekilde kullanılan yağlardan bir tanesi olan rafine palm yağının, yüksek oranda 2-MCPD, 3-MCPD ve GE içerdiği yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. Rafine palm yağının yanı sıra ayçiçek, fındık, soya ve benzeri yağların da bu kirleticileri düşük miktarlarda içerdikleri bilinmektedir (EFSA, 2016). Gıda bulaşanlarının varlığı ve miktar tespitine yönelik geliştirilmiş birçok resmi metot mevcuttur (AOCS, 2013; Fry ve ark., 2013). Ancak var olan bu metotların oldukça fazla ön işlem gerektirmesi ve

bir kütle dedektörüne ihtiyaç duyması kullanımlarını oldukça kısıtlamaktadır. Bu nedenle 2-MCPD, 3-MCPD ve GE gibi gıda bulaşanlarının tespitinde kullanılabilecek hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve düşük maliyetli alternatif metotların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Sunulan tez çalışmasında; palm, soya, ayçiçek yağlarında bulunan 2-MCPD, 3-MCPD ve GE tayinleri için gaz kromatografisi esaslı yeni bir metotgeliştirilmiş ve valide edilmiştir

1.1. Yağların Tanımı ve Önemi

Yağlar (trigliseritler), çift karbon sayılı (4-24) doymuş ve doymamış yağ asitlerinin gliserol ile meydana getirdiği esterlerdir (**Şekil 1. 1**) (Ayyıldız, 2010).



Şekil 1. 1. Trigliseritlerin oluşum reaksiyonu

Yağlar, insan beslenmesinde önemli bir enerji kaynağı olmasının yanı sıra; hücre yapısı için gerekli olan, insan vücudunun sentezleyemediği esansiyel yağ asitlerini (linoleik ve linolenik asit) içermesi ve yağda çözünen A, D, E ve K vitaminlerini taşıması gibi özellikleri nedeniyle önemli bir yere sahiptirler (De Greyt, 2013; Topkafa, 2013). Yağlar birçok gıda formülasyonunda bileşen ya da yardımcı madde olarak kullanılmaktadırlar (Ermacora ve Hrnčiřík, 2014).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO); günlük toplam enerji ihtiyacının % 25-30'unun yağlardan alınmasını tavsiye etmiş ve yetişkin bireylerin günlük faaliyetlerini sürdürebilmesi için en az 2000 kcal enerjiye ihtiyacı olduğunu bildirmiştir. Söz konusu enerjinin 650–700 kcal'lik kısmının yağlardan sağlanması gerektiği dikkate alınırsa, günde yaklaşık 75 g yağ tüketimine ihtiyaç duyulmaktadır (Nas ve Gökalp, 2001). Bu miktarın önemli bir bölümü yemeklik yağlardan (bitkisel sıvı yağlar, margarin, tereyağı), geriye kalan kısmı ise gıda maddelerinin içerisinde bulunan yağlardan sağlanmaktadır (Taşan ve Geçgel, 2007).

Endüstriyel uygulamalarda yağlar, bitkisel yağlı tohumlardan veya meyvelerden muhtelif fiziksel ve kimyasal işlemlerle elde edilmekte ve bu ürün **"ham yağ"** olarak isimlendirilmektedir. Ham yağların eldesi öncesinde, sırasında ve sonrasında yer alan fiziksel ve kimyasal işlemlerin sıcaklık, nem, basınç, çözücü kullanımı gibi unsurları içermesi, yağda çeşitli yabancı madde ve kirleticilerin oluşmasına sebep olmakta, ve yağın kalitesi azalmaktadır. Oluşan yabancı maddeler hem insan sağlığını tehdit etmekte hem de yağların yapısını bozabilmektedirler.

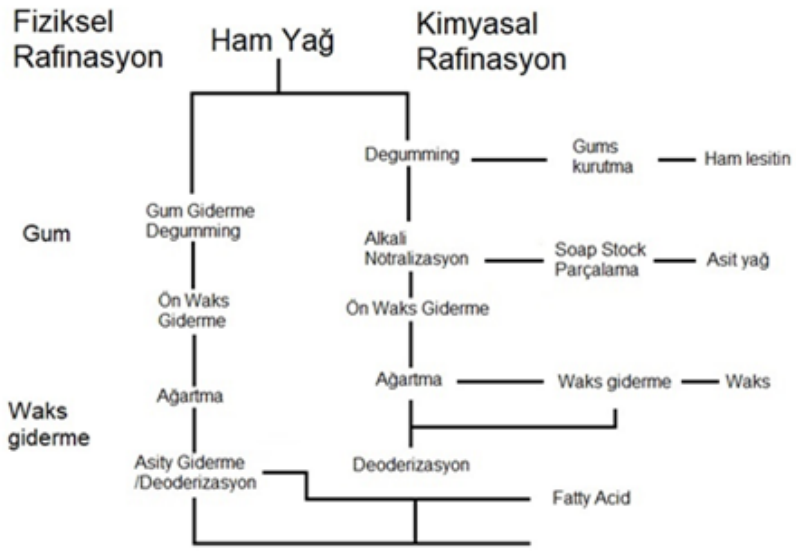
Ham yağ içinde bulunan yabancı maddeler, sahip olduğu özelliklere göre şöyle sınıflandırılabilirler;

- Bitkilerden gelen yabancı maddeler,
- Depolama esnasında oluşan yabancı maddeler,
- İşlemler esnasında oluşan yabancı maddeler.

1.1.1. Yağların Rafinasyonu

Bitkilerin meyve ve çekirdeklerinden elde edilen ham yağın tabi özelliğini bozmadan ve yapısını değiştirmeden, içerdikleri safsızlıklardan uzaklaştırılması ve yenilebilir hale getirilmesi amacıyla yapılan işleme **"rafinasyon"** , rafinasyon işlemi sonunda elde edilen yağa da **"rafine yağ"** denilmektedir. Rafinasyon işleminin verimli olabilmesi için, ham yağ eldesi sırasında yüksek sıcaklıklardan kaçınmak, depolamayı uygun koşullarda yapmak, hava ile teması en aza indirgemek, uygun oranlarda ve hızda karıştırma yapmak, rafinasyon esnasında ise sıcaklık, süre, basınç ve yardımcı madde miktarlarını iyi ayarlamak gereklidir. Bunun için karıştırma, aktarma, ısıtma-soğutma, süzme, kristallendirme ve destilasyon gibi rafinasyon işlemlerinin otomasyonlu sürekli sistemlerde yapılması daha uygundur (Topkafa, 2013).

Rafinasyon prosesi yaklaşık olarak 30-35 saat süren, temelde ticari olarak uygulanan ve kimyasal ve fiziksel rafinasyon olmak üzere çoğunlukla iki uygulamayı içeren bir süreçtir (**Şekil 1. 2**). Bunlardan, kimyasal rafinasyon; degumming, nötralizasyon, ağartma, vinterizasyon ve deoderizasyon kademelerini içerirken, fiziksel rafinasyonda; nötralizasyon ve deodorizasyon kademeleri, degumming, ağartma ve vinterizasyon basamakları sonrasında, tek kademeli olarak yapılmaktadır. (Başoğlu, 2006; Ayyıldız, 2010).



Şekil 1. 2. Fiziksel ve Kimyasal Rafinasyon Kademeleri

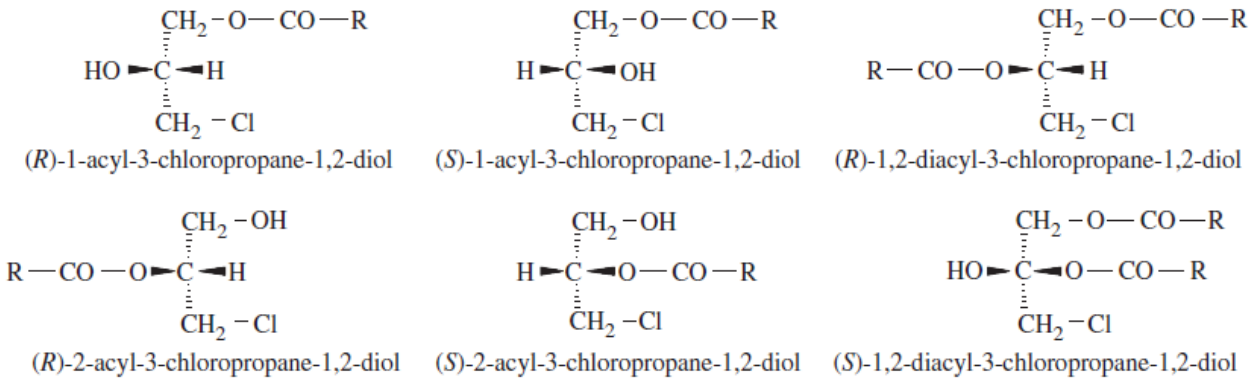
Bir ham yağın rafinasyonunda hangi yöntemin uygulanacağı, rafine edilecek yağın serbest yağ asidi içeriğine göre belirlenmektedir. Örneğin; yüksek asitli yağların kimyasal yöntemle asitliğinin giderilmesi, nötr yağ kaybının artmasına neden olmaktadır. Rafinasyon işlemi, ham yağın yapısındaki istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması ya da miktarlarının kabul edilebilir düzeye düşürülebilmesi amacıyla uygulansa da, yağın yapısında bazı istenmeyen değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişikliklerden bir tanesi, deodorizasyon basamağında, yüksek sıcaklık ve ortamda bulunan Cl^- iyonlarının varlığı sebebiyle 2-MCPD, 3-MCPD ve GE'in bileşiklerinin oluşumudur (El-Mallah ve ark., 2011; De Greyt, 2013). Rafinasyon işleminin 3-MCPD'nin oluşumu açısından etkileri üzerine yapılan çalışmalarda; serbest yağ asidi, monogliserit ve digliserit gibi öncü maddeleri yüksek miktarlarda içeren yağların rafinasyonunun çok daha kritik olduğu, dolayısıyla bu özelliğe sahip yağların rafinasyonunun daha dikkatli yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Hamlet ve ark., 2011).

1.2. 2-MCPD, 3-MCPD ve Glisidil Esterin Kimyasal Yapıları ve Oluşum Mekanizmaları

3-MCPD, yağ ve tuz içeren ürünlerin yüksek sıcaklıklarda işlem görmesi ile oluşan ve ilk olarak 1978 yılında asitle hidroliz edilmiş bitkisel proteinlerde ve soya sosu gibi ürünlerde tespit edilmiş ve bu tarihten itibaren işlem bulaşanı olarak tanımlanmış bir bileşiktir. (Velíšek ve ark., 1978). Yapılan birçok çalışma, 3-MCPD bileşeninin sadece asitle hidrolize edilmiş olan sebze proteinlerinde oluşmadığını, et,

süt, yağ ve birçok tahıl ürününde de gıdaların işlenmesi sırasında oluşabildiğini ortaya koymuştur. 3-MCPD, gıda matriksi içerisinde serbest halde bulunabildiği gibi yağ asitleri ile esterleşmiş olarak da bulunabilmektedir (Zelinkova et al., 2006).

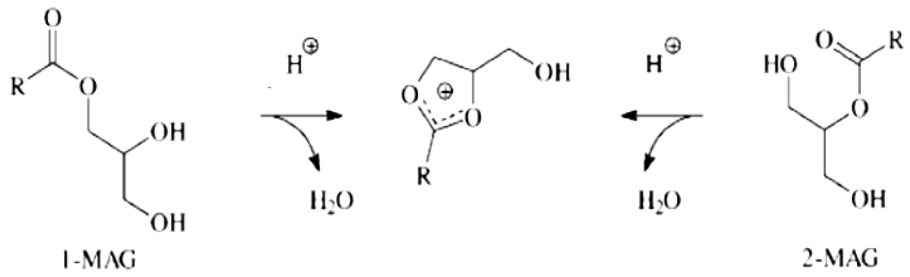
Kloropropan esterleri arasında, mono esterler çoğunlukta iken di esterler çok daha az miktarlarda oluşmaktadır (**Şekil 1. 3**). Sindirim sisteminde pankreatik lipaz enzimi aktivitesi ile bağlı formdaki mono ve di esterlerin tamamının, serbest formdaki 3- MCPD'ye hidroliz olduğu bilinmektedir. Bu nedenle toplam MCPD miktarlarının tespit edilmesi çok daha önemlidir (Seefelder ve ark., 2008).



Şekil 1. 3. 3-MCPD'nin yağlı asit monoesterleri ve diesterlerinin yapısı.(Zelinková ve ark., 2006)

Kloropropan esterleri, açilgliserollerle benzer fiziksel ve kimyasal özellikler gösterirler. Dietil eter, hekzan, aseton, etil asetat gibi organik çözücülerde çözünebilen bu esterler, sıcaklık, asidik ortam ve çözücü etkisi ile açil migrasyonu gösterirebilmektedirler (Hamlet ve ark., 2011).

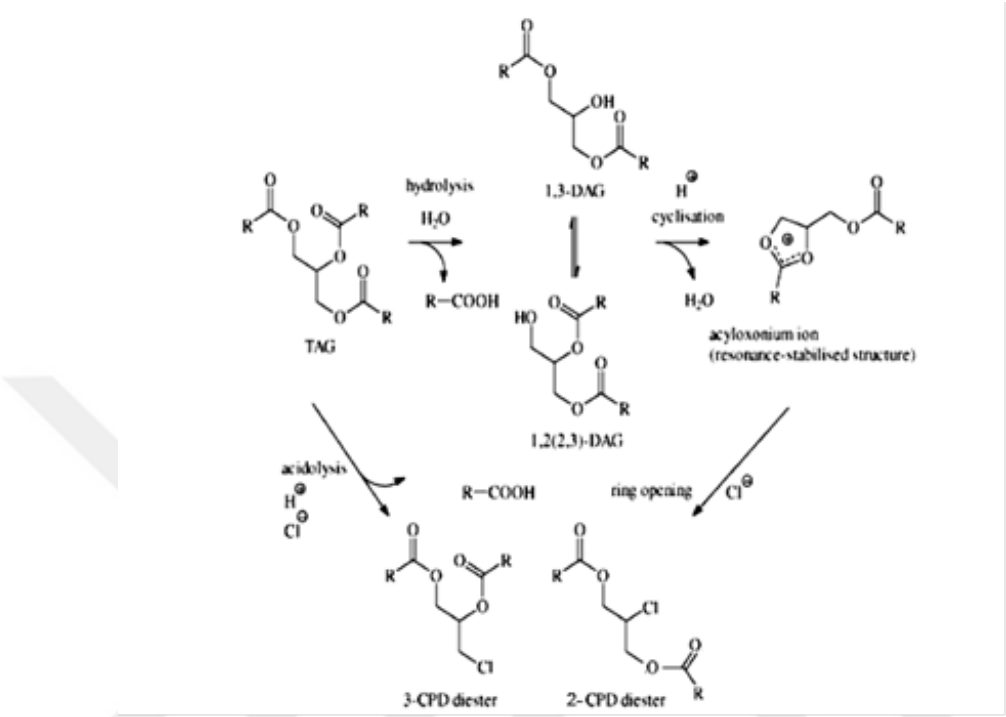
3-MCPD oluşumunun ilk aşamasını; monoaçilgliserol (MAG), diaçilgliserol (DAG) ve triaçilgliseroller (TAG) gibi öncü bileşiklerin H^+ iyonları varlığında siklik açiloksonyum iyonlaşması oluşturmaktadır (**Şekil 1. 4**).



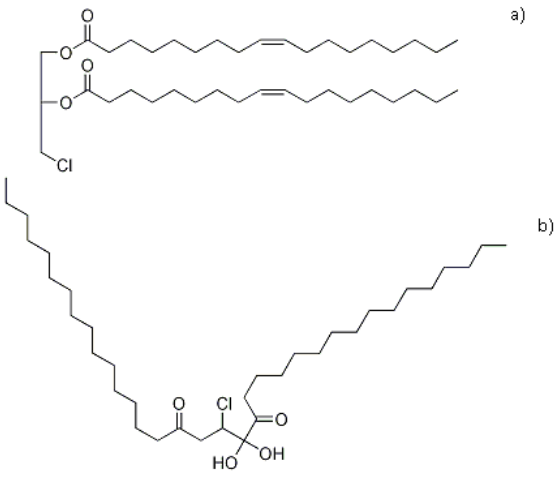
Şekil 1. 4. Açiloksonyum iyonunun oluşum mekanizması

Oluşan açiloksonyum iyonun halkalı yapısının açılarak Cl^- iyonları ile reaksiyona girmesiyle ise kloropropan esterleri oluşmaktadır (**Şekil 1. 5**). Kloropropan

esterlerinden en çok 3-MCPD'nin oluşumu gözlenmekte, 2-MCPD'nin çok daha düşük miktarlarda oluştuğu bilinmektedir. Bu durum, gliserol bileşiklerinin 2 pozisyonundaki bağların diğerlerine kıyasla daha stabil olması ve yeni bağların oluşumuna izin vermemesi şeklinde açıklanabilir (**Şekil 1. 6**) (Dubois ve ark., 2012).

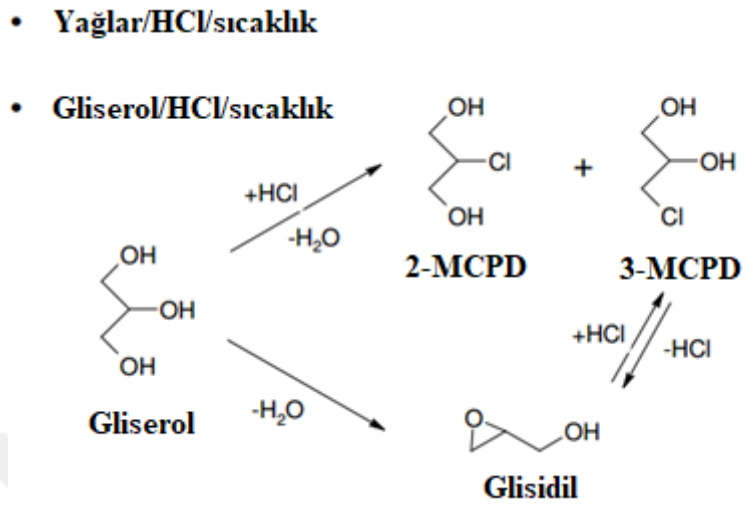


Şekil 1. 5. 3-MCPD ve 2-MCPD oluşum mekanizmaları



Şekil 1. 6. a) 1,2 dioleoil 3-kloropropan (3-MCPD esteri) b) 1,3 dipalmitol 2-kloropropan (2-MCPD esteri)

Yapılan çalışmalar sonucunda, yağlarda bulunan gliserolün asidik ortamda 3-MCPD ve 2-MCPD ye dönüştüğü, yüksek sıcaklıklarda ise 3-MCPD'nin GE'e dönüştüğü gözlemlenmiştir (**Şekil 1. 7**).



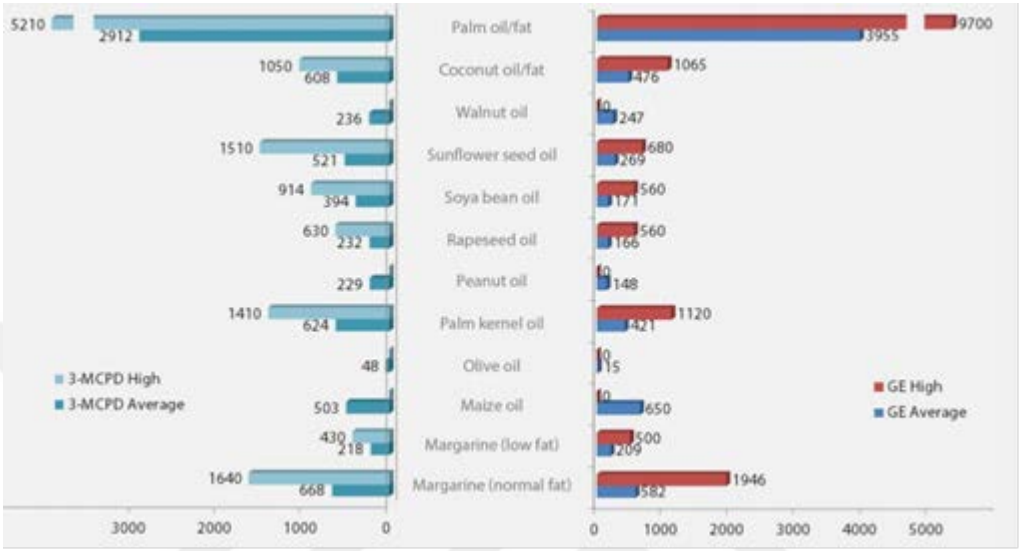
Şekil 1. 7. Gliserolun asitli ortamda 2-MCPD, 3-MCPD ve glisidile dönüşüm reaksiyonları (Crews ve ark., 2013)

1.3. Rafine Yağlarda 2-MCPD, 3-MCPD, Glisidil Ester Miktarları

Palm yağı, palmiye ağacının meyvesinden elde edilen bitkisel bir yağ olmasına rağmen; yüksek miktarlarda (% 50) doymuş yağ içermekte ve oda koşullarında yarı katı halde bulmaktadır. Palm yağının, tokoferol ve karotenler vb. antioksidanları fazlaca içermesi nedeniyle kalp-damar hastalıkları, kanser, diyabet gibi tehlikeli hastalıklardan koruyucu özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Macit ve Şanlıer, 2014). Gıda sanayinde kullanılan diğer yağlara göre ucuz olması sebebiyle palm yağı, gıda sektöründe bisküvi, kek, çikolata gibi hazır gıda ve margarin yapımında sıklıkla tercih edilmektedir. Ülkemiz gıda sanayinde de yaygın bir şekilde kullanılmakta olan palm yağının üretim alanları, artan talep sebebiyle ana üreticileri ve ithalatçıları (Malezya ve Endonezya) tarafından gün geçtikçe artırılmaktadır.

Palm yağının gıda sanayinde yaygın kullanımı, son yıllarda palm yağına olan ilgiyi artırmış ve palm yağıyla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Söz konusu çalışmalar sonucunda ulaşılan önemli verilerden bir tanesi, palm yağında bulunulması istenmeyen 2-MCPD, 3-MCPD ve GE gibi gıda bulaşanlarının, yağda yüksek miktarlar da tespit edilmesidir. Yine, yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; en yüksek 3-MCPD miktarının, sıcaklık etkisine bağlı olarak rafine palm ve zeytinyağında bulunduğu naturel sızma yağlardaki 3-MCPD miktarının ise tespit edilebilir düzeyin altında olduğu belirtilmiştir (Zelinková ve ark., 2006). Rafine palm yağı ve rafine zeytinyağı gibi

meyve yağlarında 3-MCPD miktarlarının tohum yağlarına kıyasla çok daha yüksek bulunması; söz konusu yağların, yüksek su aktivitesine sahip meyve pulpundan elde edilmelerinden, Cl^- iyonları içeriğine sahip bir ortamın bulunmasından ve lipaz aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Franke ve ark., 2009). **Şekil 1. 8**'de bazı yağlarda bulunan 3-MCPD ve GE miktarları verilmiştir.



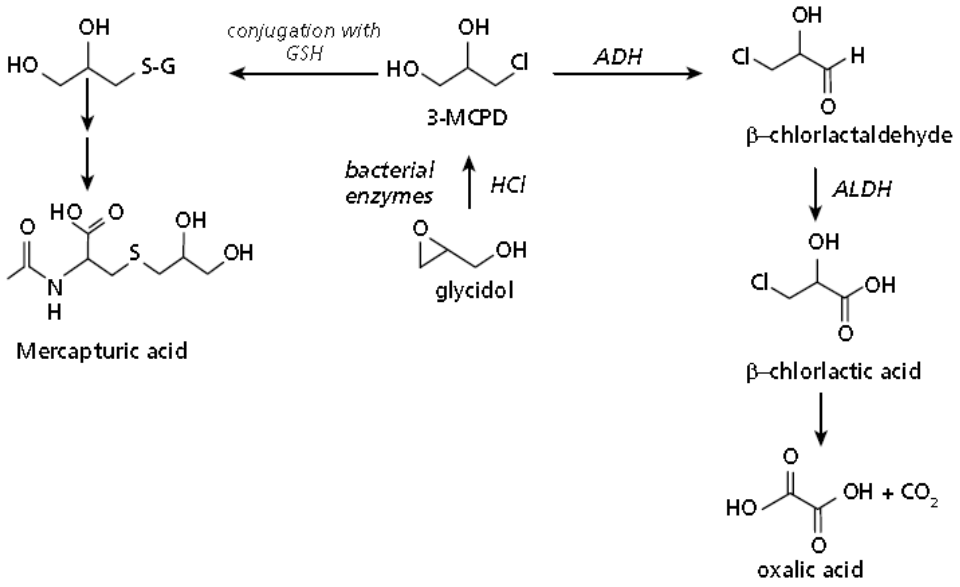
Şekil 1. 8. Bazı yağlarda bulunan 3-MCPD ve GE miktarları (Knutsen ve ark., 2018)

3-MCPD esterleri ve ilişkili bileşenlerin miktarları kolza yağı ve soya yağı gibi örneklerde 1 mg/kg'dan az bulunurken, palm yağı, mısır yağı ve hindistan cevizi yağında 14 mg/kg gibi çok daha yüksek bir oranda bulunmuştur. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, meyve yağı olmasına rağmen avokado yağında yine bir meyve yağı olan palm yağına göre çok daha düşük miktarda 3-MCPD esterleri ve ilişkili bileşenlerin olduğu gözlemlenmiştir (Matthäus ve Pudel, 2013).

1.4. 2-MCPD, 3-MCPD ve Glisidil Esterin Sağlık Üzerine Etkileri

3-kloropropan-l, 2-diol (3-MCPD) yağ asidi esterlerinin, rafine yağlar, katı yağlar ve bebek mamaları gibi bitkisel yağ içeren ürünlerde bulunduğu bilinmektedir. Şimdiye kadar 2-MCPD, 3-MCPD ve GE'lerin sağlık üzerine etkileri üzerine yapılmış birçok çalışma mevcut olup, çalışmaların çoğu gıdalarda 2-MCPD'ye oranla daha fazla bulunan, 3-MCPD ve GE ile ilgilidir. Bu bileşiklerin gıdalardaki varlığı, insan sağlığı için olası tehlikelerden dolayı endişe kaynağıdır. Son yıllarda sıçanlar üzerine gerçekleştirilen in vivo çalışmalardan elde edilen veriler, 3-MCPD'nin önemli bir yüzdesinin, gastrointestinal sistemdeki enzimatik hidroliz ile 3-MCPD esterlerinden salınabileceğini ve kan, organ ve dokulara dağılabileceğini göstermiştir (Abraham ve

ark., 2013). 3-MCPD'nin esterlerden salınması toksikolojik bir endişe kaynağıdır, 3-MCPD'nin kemirgenler üzerinde yapılan uzun süreli çalışmalarında; tümörleri indüklediği tespit edilniş, 3-MCPD ile indüklenen toksisite için ise böbrek ve erkek üreme sistemleri ana hedef organlar olarak tanımlanmıştır (Stadler, 2015). 3-MCPD ve GE'in insan vücudunda 2 farklı biyotransformasyon yolu gözlemlenmiştir (**Şekil 1. 9**). Biri glutatyon ile konjügasyona ve merkapturik asitlerin oluşumuna yol açar, diğeri ise oksalatta sonlanır ve bu yapılar insanlarda toksik etkisi olan zararlı bileşenlerdir (Bakhiya ve ark., 2011).



Şekil 1. 9. 3-MCPD'nin metabolik reaksiyonları (Lynch ve ark., 1998)

EFSA tarafından belirtildiği üzere 3-MCPD'nin maksimum tolere edilebilir günlük alım limiti 2 µg 3-MCPD/kg vücut ağırlığıdır (Authority, 2013). Yapılan çalışmalar sonucunda, 70 kg ağırlığındaki bir bireyin 2 µg 3-MCPD/kg vücut ağırlığı limitine ulaşması için tüketebileceği maksimum patates cipsi miktarı, 70 gram cips içeren paket adedi cinsinden hesaplanmıştır (Önal ve ark., 2016).

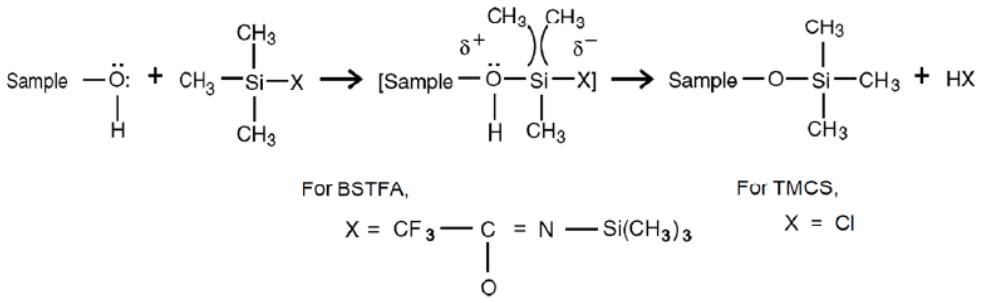
1.5. 2-MCPD, 3-MCPD ve Glisidil Ester Tayinlerinde Kullanılan Analiz Yöntemleri

Gıdalarda bulunan 3-MCPD ve 2-MCPD gibi kloropropan esterlerinin büyük bir kısmının yağ asitleriyle esterleşmiş (bağlı formda) olduğu, çok az bir kısmının ise serbest halde (diol formunda) bulunduğu bilinmektedir. Kloropropanollerin gıdalardaki iz konsantrasyon analizleri, yapılarında uygun bir kromofor grup bulunmaması sebebiyle oldukça zordur. Bu nedenle, kloropropanollerin gıdalardaki tayininde yüksek

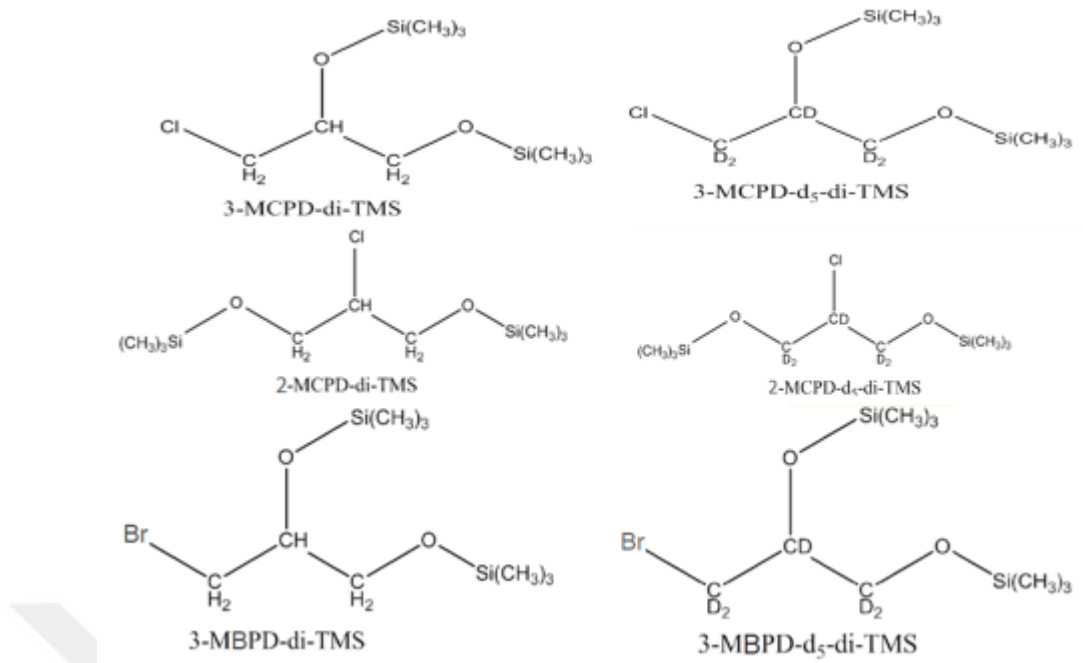
performanslı sıvı kromatografisine (HPLC) dayalı yaklaşımların geçerliliği oldukça sınırlıdır. Ancak sıvı kromatografisi sistemleriyle birleştirilmiş olan MS dedektörleri ile bu kirleticilerin tayini için de birçok yöntem geliştirilmiştir. Kloropropanollerin GC-MS ile analizleri yaygındır fakat kloropropanollerin düşük moleküler ağırlıklı hedef iyonlarını arka plan gürültüsünden ayırt etmek oldukça zor olduğundan GC-MS ile analizleri türevlendirme esaslı yapılmaktadır. Türevlendirme işlemi, uçuculuğu yüksek MCPD türevlerinin ve güvenilir karakteristik iyonların elde edilmesi ve GC sistemlerinde kloropropanollerin diğer bileşenlerle istenmeyen etkileşimlerinin önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Türevlendirme esaslı GC-MS analizlerinde; ester formunda olan kloropropandiol, transesterifikasyon ile serbest forma dönüştürülür, ardından saflaştırılır (sıvı sıvı ekstraksiyonu), saf haldeki molekülü PBA, HFBI veya BSTFA/TMCS gibi ajanlar kullanılarak türevlendirilir ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisiyle tayin edilir (Dubois ve ark., 2012; Liu, 2012).

1.5.1. BSTFA ile Türevlendirme

BSTFA [N, O-bis (trimetilsil) trifloroasetamit] ve TMCS (trimetilklorosilan), 99:1 kombinasyonunu içeren, hidroksil grupları gibi karasız yapıları kolaylıkla kararlı bir trimetilsilil türevine dönüştürebilen bir türevlendirme reaktifidir. BSTFA ile gerçekleştirilen sililleme reaksiyonu **Şekil 1. 10**'de gösterilmiştir (Liu, 2012). Yağlarda bulunan kloropropan esterleri bazik ortamda transesterifikasyon yöntemiyle serbest forma dönüştürülür. Ortama ilave edilen BSTFA reaktifiyle serbest formda bulunan 3-MCPD, 2-MCPD ve 3-MBPD reaksiyona girer. Oluşan ürünler **Şekil 1. 11**' de verilmiştir.



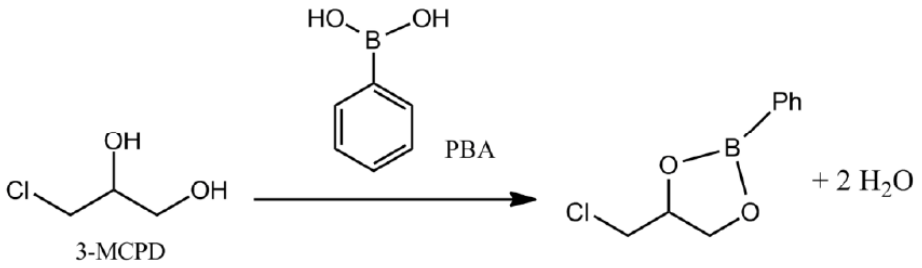
Şekil 1. 10. BSTFA reaktifi ile türevlendirme reaksiyonu



Şekil 1. 11. 3-MCPD, 3-MCPD-d5 2-MCPD, 2-MCPD-d5, 3-MBPD ve 3-MBPD-d5'in BSTFA ile türevlendirilmesi sonucu oluşan ürünler

1.5.2. Fenil Boronik Asit Türevlendirmesi

Kloropropan esterlerinin analizlerinde yaygın olarak kullanılan türevlendirme reaktiflerinden bir tanesi de fenil boronik asittir. EFSA tarafından yayınlanan raporda kullanılan ve AOCS'nin de resmi metodları arasına giren fenil boronik asit türevlendirmesi, serbest forma dönüştürülen 3-MCPD'nin GC-MS ile analizini içermektedir (Küsters ve ark., 2010; Liu, 2012). 3-MCPD'nin FBA ile türevlendirme reaksiyonu **Şekil 1. 12**' de verilmiştir.



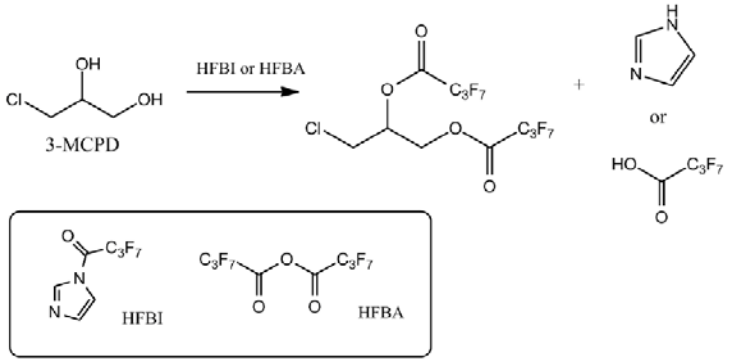
Şekil 1. 12. 3-MCPD'nin FBA ile türevlendirme reaksiyonu (Hamlet ve Sadd, 2009)

1.5.3. Heptafluoro Butiril (HFB) Ester Türevlendirmesi

İlk kez 1992 yılında gerçekleştirilen metot ile, protein hidrolizatlarında kloropropanollerin belirlenmesi için HFBI ile yeni analitik bir yöntem geliştirilmiştir

(Van Bergen ve ark., 1992). Hamlet (1998), aynı türevlendirme reaktifini kullanarak bazı gıdalarda bulunan 3-MCPD analizlerini gerçekleştirmiştir. Bu iki çalışmaya dayanarak, Brereton ve ark. (2001), GC-MS ile HFBI türevi olarak 3-MCPD'nin belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirmiş, yöntemi geniş bir gıda yelpazesinde test etmiş ve laboratuvarlar arası çalışma ile doğrulamıştır. Bu yöntem Avrupa Standardı tarafından tavsiye edilir ve aynı zamanda AOAC'nin resmi yöntemidir (Hamlet, 1998; Liu, 2012).

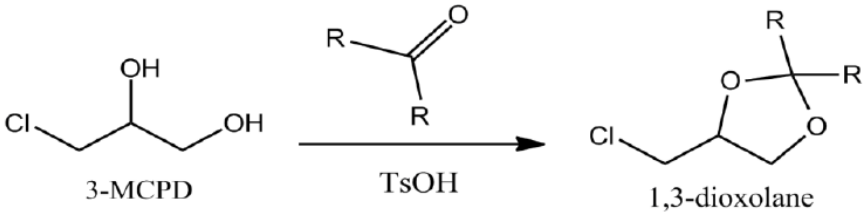
Aynı prosedürle 3-MCPD ve 1,3-DCP'nin eşzamanlı olarak belirlenmesi için, katı faz ekstraksiyon aşamasında farklı elüsyon çözücüsü, HFBI yerine Hepta Fluoro Butirik Asit Anhidrit (HFBA) kullanılarak farklı bir metot daha geliştirilmiştir. HFBA daha ucuz bir seçenek olduğu ve aynı zamanda HFB ester türevlerini de oluşturduğu bilinmektedir (Chung ve ark., 2002; Nyman ve ark., 2003; Xu ve ark., 2006). 3-MCPD'nin HFBI ve HFBA ile reaksiyon mekanizmaları **Şekil 1. 13**'de verilmiştir.



Şekil 1. 13. 3-MCPD nin HFBI / HFBA ile türevlendirme reaksiyonu (Hamlet ve Sadd, 2009)

1.5.4. TsOH İle Dioksolan Türevlendirmesi

Toluen-4-sülfonik asit (TsOH) varlığında siklik asetalleri oluşturmak için diollerin ketonlarla reaksiyonu kullanılarak yeni bir metot geliştirilmiştir. Bu yöntem modifiye edilmiş ve çok çeşitli gıdalarda kloropropanollerin analizine uygulanmıştır (Meierhans ve ark., 1998; Rétho ve Blanchard, 2005). 3-MCPD'nin TsOH ile reaksiyon mekanizması **Şekil 1. 14**'de verilmiştir.



Şekil 1. 14. 3-MCPD nin TsOH ile türevlendirme reaksiyonu

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Önal ve ark. (2016) patates cipslerinde bulunan 3-MCPD ve glisidil esterlerinin miktarları üzerine yapmış oldukları çalışmada, üretim yönteminin ve kızartma amacıyla kullanılan yağ tipinin etkisini istatistiksel olarak incelemişlerdir. Ortalama vücut ağırlığına sahip bir bireyin, 3-MCPD esteri içeren patates cipsi tüketim sınırları ve tolere edilebilir günlük alım miktarları üzerinden hesaplama işlemini gerçekleştirmişler ve en yüksek toplam 3-MCPD miktarını 2.97 mg/kg ve en yüksek GE miktarını ise 6.01 mg/kg olarak tespit etmişlerdir.

Yamazaki ve ark. (2013), 3-kloro-l,2-propandiol yağ asit esterlerinin (3-MCPD esterleri) tayin edilmesi için yeni ve doğrudan analitik bir yöntem sunmuşlardır. Araştırmacılar bu yöntemde; yağları, ter-bütil metil eter ve etil asetat (4:1) karışımı içinde çözmüşler, katı faz ekstraksiyonu (SPE) kartuşu (C18 ve silika) ile saflaştırarak, LC-MS/MS cihazı ile analiz etmişlerdir. Çalışma sonunda; tayin sınırını (LOQ), 3-MCPD esterinin türüne bağlı olarak 0.02 ile 0.08 mg/kg arasında, bağıl standart sapma (RSD%) değerinin ise % 5.5 ila % 25.5 arasında değişim gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar geliştirdikleri yöntemin, çeşitli ticari yenilebilir yağlara uygulanabilir olduğunu ve gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre 0.58 ile 25.35 mg/kg arasında değişen 3-MCPD esterler seviyelerini gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Mono ve diester seviyelerini ise sırasıyla, 0.10 ile 0.69 mg/kg ve 0.06 ile 16 mg/kg arasında bulmuşlardır.

Ermacora ve Hrncirik (2013), 2-MCPD, 3 MCPD ve GE'nin eşzamanlı tayini için yeni ve dolaylı bir yöntem sunmuşlardır. Yöntemde; glisidil esterlerin, MCPD esterlerine yapısal benzerliklerinden dolayı, daha önce MCPD esterlerinin analizi için optimize edilen, glisidil esterlerin 3-monobromopropanediol (3-MBPD) monoesterlerine asit-katalizli dönüşümüne dayanan prosedür kullanılmıştır. Metodun kritik aşamasını teşkil eden glisidil esterlerin dönüşümü basamağı, farklı reaktif konsantrasyonlarının ve değişen diğer durum ayarlarının test edilmesiyle optimize edilmiştir. LOD değeri bağlı 2-MCPD ve 3-MCPD için 0.04 mg/kg, bağlı glisidil için ise 0.06 mg/kg olarak bulunmuştur.

Ermacora ve Hrncirik (2014)`nin yapmış oldukları bir diğer çalışma da, açilgliserollerin ve klorlanmış bileşiklerin, MCPD esterlerinin oluşum verimliliği üzerindeki etkisini, yağ deodorizasyonunu simüle eden, geliştirmiş oldukları model sistemlerinde incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmada, degumming, nötralizasyon ve

ağartma gibi çeşitli rafinasyon adımlarını farklı uygulayarak yağların bileşimini, değiştirmişler vekısmi açilgliserollerden MCPD esterlerinin oluşumunun, triaçilgliserollerden MCPD esterlerinin oluşumuna kıyasla daha fazla olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte, ortamda bulunan klorür iyonlarının, MCPD esterlerinin oluşumunda ana sınırlayıcı faktör olduğunu vurgulanmış fakat bu iki parametre arasında doğrudan bir korelasyon tespit edilememiştir.

Calta ve ark. (2004) gliserol, triolein, soya lesitini ve sodyum klorür (NaCl) varlığında; farklı su aktivitesine sahip, ısıl işlem uygulanmış ürünlerde oluşan 3-MCPD miktarlarını araştırmışlardır. Oluşturulan modelde gliserol, triolein, lesitin bileşiklerinin farklı oranlarda su ve NaCl ile karışımları kullanılmıştır. Bu karışımlar farklı sıcaklıklarda ısıl işleme tabi tutulmuş ve 3-MCPD miktarları belirlenmiştir. Araştırmacılar, % 4-7 NaCl ve % 13-17 su varlığında, 3-MCPD miktarlarının maksimum değerine ulaştığını tespit etmişler, sıcaklığın 100°C'den 200°C düzeyine çıkarıldığı durumda da 3-MCPD miktarında artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Oluşturulan model sistemini salam, bisküvi, işlenmiş peynir, kraker gibi seçilen ürünlerle karşılaştırdıklarında da benzer sonuçlara ulaşmışlardır.

Zulkurnain ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, rafine palm yağında 3-monokloropropan-l,2-diolun (3-MCPD) ester oluşumunun azaltılmasını, renk ve koku giderilmesini incelemişlerdir. Modifiye rafine işlemi, beş işlem parametresi olan tepki yüzeyi metodolojisi (RSM) kullanılarak en düşük 3-MCPD ester oluşumu ve kabul edilebilir arıtılmış palm yağı kalitesi için optimize edilecek parametreleri: su dozu, fosforik asit dozu, degumming sıcaklığı, aktive kil dozajı ve deodorizasyon sıcaklığı olarak belirlemişlerdir. Kloroester öncüllerinin uzaklaştırılmasını, su dozajının arttırılmasıyla sağlamışlar. Optimizasyon sonucunda, 3-MCPD esterlerinin, geleneksel rafinasyon işleminde 2.9 mg/kg'dan 0.4 mg/kg'ya kadar düştüğünü, renk ve yağ kararlılığı endeksi değerlerinde ise 2.4 R ve 14.3 saat ile % 87.2 oranında azalma meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Steenbergen ve ark. (2013) gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile yağlardaki bozulmamış GE`i belirlemek için yeni ve doğrudan bir yöntem sunmuşlardır. Yöntem, GE`nin lipid matriksinden ekstraksiyonu, ekstraktın saflaştırılması ve GE'nin normal faz sıvı kromatografisiyle (NPLC) izole edilmesi basamaklarından oluşmuştur. GE için gözlenebilme sınırını (LOD) yaklaşık 0.01 mg/kg, 0.1 mg / kg'ın üzerindeki seviyelerde bağlı olmayan GE için tekrarlanabilirlik değerini ise % 5-12 aralığında bulmuşlardır.

Li ve ark. (2015), 3-kloro-1,2-propandiol yağ asit esterlerinin doğrudan tayini için seçici ve duyarlı UHPLC-MS/MS ile birlikte matris katı faz ekstraksiyonu dağılımı yöntemini geliştirmişlerdir. Araştırmacılar geliştirdikleri yöntemde, izotop seyreltme tekniğini, MCPD ekstraksiyonunu ve çok reaksiyonlu izleme modu (MRM) ile UHPLC MS/MS analizlerini birleştirmişler,matris eşleşmeli kalibrasyon eğrilerinin 0.01-10 mg L^{-1} aralığında iyi doğrusallık gösterdiğini tespit etmişlerdir, 3-MCPD esterlerinin LOD ve LOQ değerlerini ise sırasıyla; 0.0001-0.02 mg kg^{-1} ve 0.0004-0.05 mg kg^{-1} olarak bulmuşlardır. Sızma zeytinyağlarının geri kazanımının % 94.4 ile % 108.3 , bağıl standart sapmalarının ise (RSD) % 0.6 ila % 10.5 arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir.

Samaras ve ark. (2016) tarafından, basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) ile ekstrakte edilmiş ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) ile tayin edilmek üzere belirlenmiş gıda ürünlerinde; 3-MCPD'lerin, 2-MCPD'lerin ve GE'lerin aynı anda tespiti için dolaylı analitik bir metot sunulmuştur. MCPD'lerin ve GE'lerin farklılaşması için, GE'ler önce asit sulu sodyum bromür solüsyonunda monobromopropandiole (MBPD) dönüştürülmüştür. MCPD'ler ve MBPD'ler daha sonra asidik koşullar altında hidrolize edilmiş, bunu takiben fenil boronik asit (PBA) ile serbest formun türevlendirilmesi sağlamıştır. Geliştirilen yöntem, ekmek ve rulolar, ince unlu mamuller, füme balık ürünleri, kızarmış ve kavrulmuş et, patatesle hazırlanmış atıştırmalıklar ve kızartılmış patates ürünleri, tahıl esaslı aperitifler ve margarinler gibi ürünleri içeren 650'den fazla farklı gıda numunesindeki hedef bileşiklerin analizleri için başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Hori ve ark. (2012), 3-kloropropan-1,2-diol yağ asit esterlerinin (3-MCPD) ve glisidil yağ asit esterlerinin (GE) aynı anda tespiti için sıvı kromatografi uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC/TOF-MS) ile yeni bir metot geliştirmişler, üç tip 3-MCPD monoester, altı tip 3-MCPD diester ve beş GE türünü bu metot yardımıyla değerlendirmişlerdir. Bunun için öncelikle analitlerin katı faz ekstraksiyonu ile özünü çıkarmışlar, ardından Waters UPLC C18 kromatografi kolonu üzerinde, sodyum format ihtiva eden metanol hareketli fazı ile analizleri gerçekleştirmişlerdir. Sistem, GE'ler için 0.16 ng/mL'nin, 3-MCPD monoesterleri için 0.86 ng/mL ve 3-MCPD diesterleri için 0.22 ng/mL den daha düşük LOD ile oldukça hassas bulunmuştur.

Garballo-Rubio ve ark. (2017), GC-MS/MS cihazını kullanarak balık yağı numunelerindeki 3-monokloropropandiol (3-MCPD) ve glisidil esterlerin (GE) aynı anda tespiti için yeni bir yöntem üzerine çalışmışlardır. Yöntem, iç standart olarak

sadece 3-MCPD-d5'i kullanılması ve oda sıcaklığında esterlerin alkali hidrolizi ile 90°C'de fenilboronik asit (PBA) ile türevlendirilmesi üzerine kurulmuştur. Yöntemde, GC-MS/MS'in SIM modunun kullanılması ile, ekstraktların ek konsantrasyonuna ihtiyaç duymaksızın nicel analizlerde kullanılabilmesi ve hassasiyet sınırlarının iyileştirilmesi sağlanmışlardır. Yöntemde, LOD değerleri sırasıyla 3-MCPD ve GE için 100 ng g^{-1} ve 50 ng g^{-1} elde edilmiştir. Laboratuvar sonuçlarının doğruluğu, akredite edilmiş bir referans laboratuvar (SGS Almanya GmbH) tarafından elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak ve çeşitli numuneler için gerçekleştirilen deneylerden elde edilen geri kazanımlar hesaplanarak test edilmiştir.

Li ve arkadaşları (Li ve ark., 2016) tarafından yapılan çalışmada, ısıl işlem sırasında klor verici olarak NaCl içeren yenilebilir yağlarda, 3-MCPD esterlerinin oluşumu üzerine çeşitli faktörlerin etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar, modellerde üretilen 3-MCPD ester miktarlarının, sodyum klorür konsantrasyonu ile pozitif yönde ilişkili olduğunu ve Fe^{3+} iyonunun 3-MCPD esterlerinin oluşumunu önemli ölçüde desteklediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, 3-MCPD esterlerinin oluşumunun yağın pH değerine, ısıtma sıcaklığına ve zamana da bağlı olduğunu vurgulamışlar, en yüksek 3-MCPD ester oluşumunun; pH 4.0'de (2925.3 µg/kg) 220 ^{o}C'de (9509.8 µg/kg) ve 8 saatte (4852.4 µg/kg) meydana geldiğini bildirmişlerdir.

2.1. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında; palm, soya ve ayçiçek yağlarında bulunan 2-MCPD, 3-MCPD ve GE tayinleri için yeni bir gaz kromatografisi yönteminin geliştirilmesi, valide edilmesi ve gerçek yağ numuneleri üzerinde kullanımının incelenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Standartlar ve Kimyasal Maddeler

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve standart maddeler Toronto Research Chemicals, Sigma Aldirich ve Merck firmalarından temin edilmiştir. Kullanılan kimyasallar kromatografik saflıkta olup, **Çizelge 3. 1**'de detaylı bir şekilde belirtilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kullanılan standartlar ve kimyasal maddeler

Kullanılan Stantartlar;
2-Chloro-1,3-propanediol,
2-Chloro-1,3-propanediol-d5,
3-Chloro-1,2-propanediol,
3-Chloro-1,2-propanediol-d5,
Glisidill Palmıtat,
Glisidil Palmıtate-d5,
Kullanılan Kimyasallar;
Metanol
Toluen
Aseton
Asetonitril
Pridin
Tersiyel butil metil eter
Isohekzan
Di etil eter
Etil asetat
İzo oktan
Sülfirik asit
NaCl
NaBr
NaOH
BSTFA : TMS (99:1)
Fenil boronik asit

3.2. Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm cihazlar **Çizelge 3. 2**'de verilmiştir

Çizelge 3. 2. Kullanılan cihazlar

Cihaz	**Marka**
Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Dedektörü (GC-FID)	Agilent-7890 Series
Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)	Agilent-7890N/5975C
Vorteks	IsoLab
Ultra Saf Su Cihazı	Tka-GenPure
Hassas Terazi	Gec-Avery
Ultrasonik Banyo	Kudos

3.3 Standartların Hazırlanması

Standartların (3-MCPD, 2-MCPD ve glisidil stearate) çözeltileri toluende hazırlanmış, iç standart (3-MCPD-d5, 2-MCPD-d5 ve glisidil palmitat-d5) çözeltileri ise metanolde hazırlanmıştır.

Stok 3-MCPD: 3-MCPD standardı 1000 mg/L olacak şekilde toluen içerisinde hazırlanmıştır (-18 °C'de 1 yıl süre ile saklanabilir).

Stok 2-MCPD: 2-MCPD standardı 250 mg/L olacak şekilde toluen içerisinde hazırlanmıştır (-18 °C'de 1 yıl süre ile saklanabilir).

Stok glisidil stearate: Glisidil stearate standardı 50 mg/L olacak şekilde toluen içerisinde hazırlanmıştır (-18 °C'de 1 yıl süre ile saklanabilir).

Stok 3-MCPD-d5: 3-MCPD-d5 iç standardı 500 mg/L olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır (-18 °C'de 6 ay süre ile saklanabilir).

Stok 2-MCPD-d5: 2-MCPD-d5 standardı 100 mg/L olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır (-18 °C'de 6 ay süre ile saklanabilir).

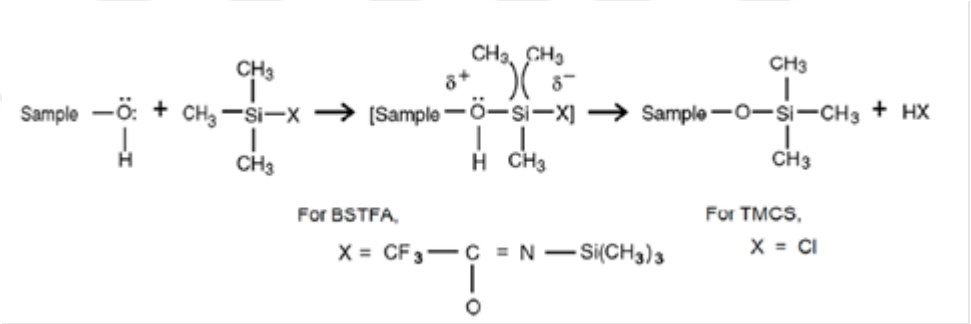
Stok glisidil palmitate-d5: Glisidil palmitate-d5 iç standardı 100 mg/L olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır (-18 °C'de 6 ay süre ile saklanabilir).

3.4. Türevlendirme İşleminin Optimizasyon Çalışmaları

3.4.1. Çözücü Seçimi

Optimizasyon çalışmalarının birinci basamağı olan çözücü seçimi için birbirlerinden tam olarak ayrılmayan 3-MCPD ve 3-MCPD-d5 bileşiklerine ait pikler dikkate alınmıştır. BSTFA:TMS reaktifi ile türevlendirme işlemi, belirlenen dört farklı çözücü ile yapılmıştır.

Konsantrasyonu 75 mg/L olan 3-MCPD ve 50 mg/L olan 3-MCPD-d5 dört farklı deney tüpüne alınmışlar ve çözücüleri N_2 gazı altında uçurulmuştur. Çözücüsü uzaklaştırılmış numunelerin her birinin üzerine pridin, aseton, asetonitril ve etil asetat çözücülerinden 200 µL eklenmiş ve numune tekrar çözülmüştür. Çözülen numunelere BSTFA:TMS reaktifinden 100 µL ilave edilerek türevlendirme yapılmıştır. Türevlenme işleminin gerçekleşmesi için 10 dk kadar 60 ºC'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Türevlendirme işlemine ait reaksiyon mekanizması **Şekil 3. 1**`de verilmiştir. Türevlendirme işleminin ardından numuneler viallenerek GC-FID cihazına enjekte edilmiştir.



Şekil 3. 1. BSTFA ile türevlendirme reaksiyonu mekanizması

Türevlendirilen numunelerinin kromatografik ayırmaları GC-FID cihazında taşıyıcı fazın He olduğu HP-5MS kolon üzerinde **Çizelge 3. 3**`de verilen şartlarda gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerden elde edilen ayırmalardaki piklerin kimlik kontrolleri için aynı kromatografik şartlarda GC-MS`de de analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 3. GC-FID / GC-MS analiz şartları (Racamonde ve ark., 2011)

GC-FID ve GC-MS			
Enjeksiyon	*Enjeksiyon Miktarı*		2 µL
	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklık		280 °C
	Mod		Splitless
Kolon Fırını	*Taşıyıcı gaz ve hızı*		He - 1.2 mL/dk
	Kolon		HP-5MS (%5-Fenil)-metilpolisiloksan
	Sıcaklık Programı		50 °C 2 dk 3 °C/dk 100 °C 0 dk 40 °C/dk 280 °C 10 dk
Dedektör	*FID*	*Sıcaklık*	300°C
	MS	*MOD*	Scan
		amu	45-550
		eV	70
		Source	230°C

3.4.2. BSTFA Miktar Çalışması

Optimizasyon çalışmalarının ikinci basmağı olan türevlendirme reaktifinin miktar çalışmaları için konsantrasyonları 1 mg/L olacak şekilde 2-MCPD, 2-MCPD-d5, 3-MCPD ve 3-MCPD-d5 (5 adet deney tüpünde de olacak şekilde) standartları ayrı deney tüplerine alınmış ve çözücüleri N_2 gazı altında uçurulmuştur. Çözücüsü uzaklaştırılmış olan numunelerin her birinin üzerine çözücü seçimi çalışmalarında çözücü olarak kullanımı uygun olduğuna karar verilen etil asetattan 200 µL eklenmiş ve numuneler tekrar çözülmüştür. Çözülen numunelere karşımın oranı 99:1 olan BSTFA:TMS reaktifinden her tüpe ayrı ayrı 20 µL, 30 µL, 50 µL, 70 µL ve 100 µL hacimlerde ilave edilerek türevlendirme yapılmıştır. Türevlenme işleminin gerçekleşmesi için 10 dk kadar 60 ºC'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Türevlendirme işleminin ardından numuneler viallenerek GC-FID cihazına enjekte edilmiştir. Türevlendirilen numunelerin kromatografik ayırmaları **Çizelge 3. 3**`de verilen şartlarda gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kromatografik Şartların Optimizasyon Çalışmaları

Silillenen 2-MCPD, 3-MCPD, GE ve d-5 izotoplarının analizleri, Agilent 7890N-5975C GC-MS ve 7890 GC-FID cihazları kullanılarak, HP-5MS kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kromatografik çalışmalarda, birbirlerinden tam olarak ayrılmayan 3-MCPD ve 3-MCPD-d5 bileşiklerine ait pikler dikkate alınmıştır.

MCPD ve GE analizlerinde 1 adet literatürden ve tarafımızdan değiştirilen (modifiye edilen) veya geliştirilen 13 adet metot olmak üzere 14 adet metot kullanılarak kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmaları için kullanılan metotlara ait parametre değerleri **Çizelge 3. 4**'de verilmiştir.

Çizelge 3. 4. GC-FID metot parametreleri

Metot	Enjektör	Dedektör	Akış Hızı	Kolon Fırını		
	°C	°C	mL/dk	°C/dk	°C	dk
Metot L. (Racamonde ve ark., 2011)	280	300	1.2		50	2
				3	100	0
				40	280	10
Metot 1	280	300	1.2		50	5
				3	100	2
				5	280	10
Metot 2	280	300	1.2		50	5
				2	120	2
				30	280	10
Metot 3	280	300	1.2		50	5
				2	90	5
				3	150	0
				30	280	10
Metot 4	280	300	1.6		50	5
				2	80	3
				2	140	0
				30	280	10
Metot 5	280	300	1.2		50	5
				3	90	3
				5	150	5
				20	280	10
Metot 6	280	300	1		50	5
				2	120	5
				5	180	5
				10	280	10
Metot 7	280	300	1.1		50	4
				1	80	1
				1	90	1
				1	100	1
				50	280	7
Metot 8	280	300	0.8		50	5
				2	90	5
				2	160	0
				30	280	10
Metot 9	280	300	1.2		50	5
				1	70	0.5
				1	80	0.5
				1	90	0.5
				1	100	0.5
				1	120	1
				50	280	10
Metot 10	280	300	1.2		50	1
				1	60	1
				1	70	5
				0.5	90	0.5
				1	110	0.5
				0.5	120	5
				50	280	10

Metot 11	280	300	1.2		70	5
				0.5	85	5
				1	90	0.3
				0.5	110	1.2
				1	130	0.5
				0.5	150	5
				50	280	10
Metot 12	280	300	0.8		50	5
				3	90	3
				5	150	5
				20	280	10
Metot 13	280	300	1.2		50	3.5
				1	80	5
				0.5	100	7
				1	109	1
				1.1	120	7
				40	280	10

3.6. Kalibrasyonu Çözeltileri

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen çözücü, miktar ve kromatografi metodu sonuçlarına göre kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır.

2-MCPD ve 3-MCPD miktarının tayini için 0.04- 0.7 mg/L konsantrasyonları aralığında 2-MCPD ve 3-MCPD içeren standart çözeltiler hazırlanmış ve her bir çözeltiye son konsantrasyonları 1 mg/L olacak şekilde iç standart 2-MCPD-d5 ve 3-MCPD-d5 çözeltileri ilave edilmiştir (**Çizelge 3. 5**). Hazırlanan standart çözeltilerin çözücüleri N_2 gazı altında uçurulmuştur. Çözücüsü uzaklaştırılmış olan numunelerin her birinin üzerine etil asetattan 200 µL eklenmiş ve numuneler tekrar çözülmüştür. Çözülen numunelere BSTFA:TMS reaktifinden 70 µL ilave edilerek türevlendirme yapılmıştır. Türevlenme işleminin gerçekleşmesi için 10 dk kadar 60 ºC'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Türevlendirme işleminin ardından numuneler viallenerek GC-FID cihazına enjekte edilmiştir.

Çizelge 3. 5. Kalibrasyon çözeltileri için standart miktarları ppm (mg/L)

3-MCPD(ppm)	3-MCPD d5(ppm)	2-MCPD(ppm)	2-MCPD d5(ppm)
0.04	1	0.04	1
0.08	1	0.08	1
0.17	1	0.17	1
0.35	1	0.35	1
0.7	1	0.7	1

3.7. Yağlardaki MCPD ve GE analizleri

3.7.1. Toplam 3-MCPD (Serbest 3-MCPD, Bağlı 3-MCPD ve GE) ve Toplam 2-MCPD (Serbest 2-MCPD, Bağlı 2-MCPD ve GE) analizleri

Rafine yağlarda bulunan MCPD ve GE türlerinin analizinde, yağlarda bulunan bu türlerin ester formaları bazik transesterifikasyon reaksiyonuyla serbest 3-MCPD ve 2-MCPD formlarına dönüştürülerek BSTFA ile türevlendirilmiş, hem GC-MS hem de GC-FID ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Transesterifikasyon işlemlerinde AOCS Cd 29c-13 resmi metodu kullanılırken türevlendirme işleminde optimizasyonu yapılmış yöntem kullanılmıştır. Yapılan işlemler aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir (Örnek 1).

Prosedür;

0.25 gram yağ numunesi deney tüpüne alınarak, üzerine 100 µL 2-MCPD-d5 ve 3-MCPD-d5 iç standartları ilave edilmiştir. Numune üzerine 100 µL Tersiyel butil metil eter eklenerek örnekler çözülmüştür. Yağ numunesine 200 µL metanollu sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek tüm ester bağları hidroliz edilerek 2-MCPD ve 3-MCPD'lerin serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Ester hidrolizini durdurmak için 600 µL asitlendirilmiş NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan organik fazlar 600 µL izohekzan ile 3 kez ekstrakte edilerek atılmıştır. Sulu faz üzerine 600 µL dietil eter:etil asetat (3:2) karışımı ilave edilmiş ve yıkanmıştır. Yıkanmış serbest 2-MCPD ve 3-MCPD organik fazdan ayrılarak yeni deney tüplerinde toplanmıştır. Çözelti ortamına 1 g Na_2SO_4 ilave edilerek numunenin kurutulması sağlanmıştır. Kurutulan numuneler santrifüj edilerek ayrı bir tüpe alınmışlar ve çözücüleri N_2 gazı ile uçurulmuştur. Çözücüsü uçurulmuş numuneler etil asetat ile tekrar çözüldükten sonra türevlendirme reaktifinden (BSTFA) 70 µL ilave edilmiştir. Türevlenme işleminin gerçekleşmesi için 20 dk kadar 60 ºC'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Türevlendirme işleminin ardından numunelerin GC-FID ve GC-MS cihazlarına enjeksiyonu yapılmıştır.

Geliştirilen yeni metodun doğrulamasının gerçekleştirilmesi için numuneler AOCS Cd 29c-13 metoduyla da tekrar hazırlanmış ve GC-MS analizleri yapılmıştır. Numunelerin transesterifikasyon ve türevlendirme işlemlerinde AOCS Cd 29c-13 metodunun prosedürü tamamen uygulanmıştır. Numune hazırlama işleminin ardından uygulanan GC-MS analizine ait metot parametreleri **Çizelge 3. 6**`de verilmiştir. GC-MS çalışma modu olarak Seçilmiş İyon Görüntüleme (SIM) kullanılmıştır. Transesterifikasyondan sonra türevlendirme işlemi için aşağıdaki şekilde prosedür devam devam ettirilmiştir; (Örnek 1)

Prosedür;

Serbest forma dönüştürülen 2-MCPD ve 3-MCPD 600 µL dietil eter:etil asetat (600 µL:400 µL) karışımı ile ekstrakte edilerek, yeni deney tüplerine alınmış ve bu işlem ile 3 kez tekrar edilmiştir. Örneklerde kalan nemin uzaklaştırılması için susuz sodyum sülfat ilave edilmiştir. Her iki organik ekstrakta da türevlendirme reaktifi olan fenil boranik asitten (PBA) 50 µL ilave edilmiş ve azot gazı altında çözücüleri uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan numuneler 500 µL izo-oktan ile tekrar çözülerek GC-MS'de analizi gerçekleştirilmiştir.

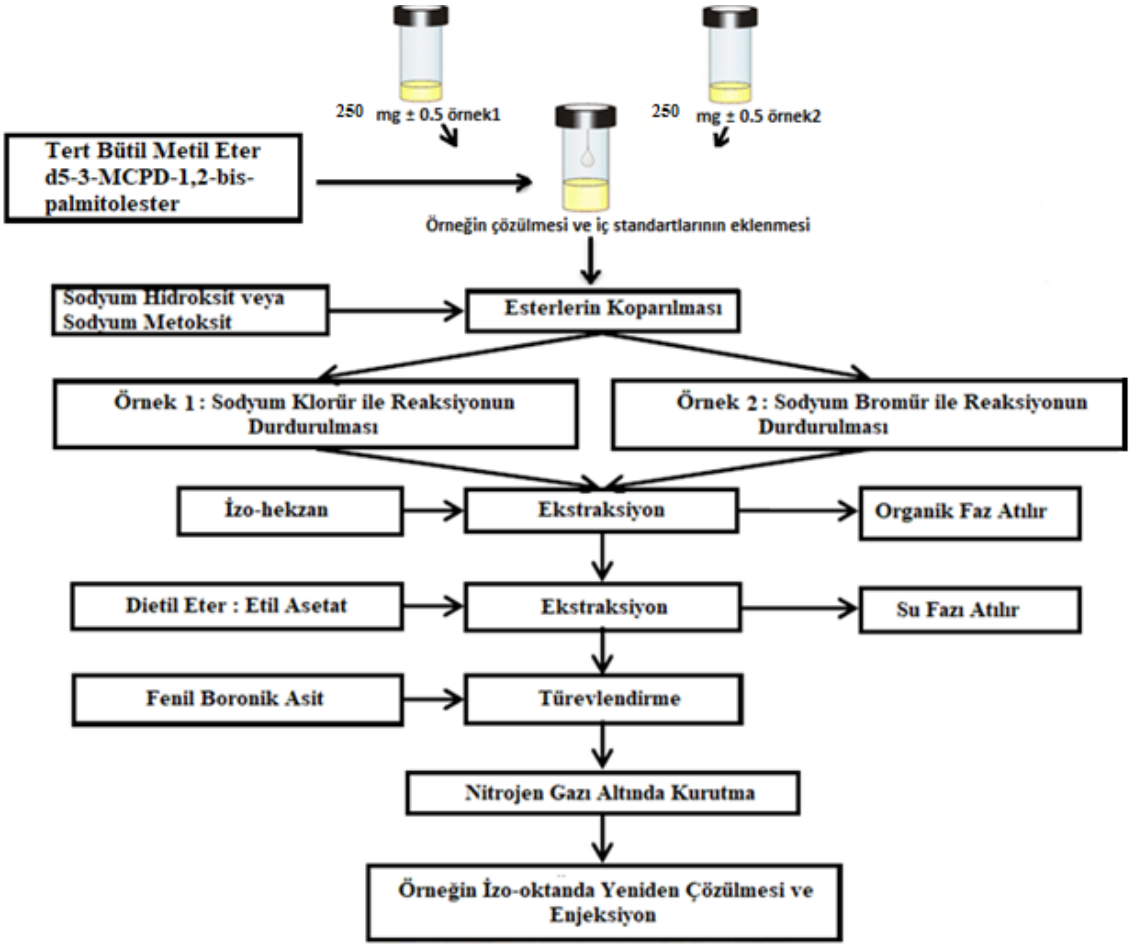
Çizelge 3. 6. GC-MS analiz şartları

GC-MS METOT (AOCS, 2013)		
Enjeksiyon	*Enjeksiyon Miktarı*	3 µL
	Enjeksiyon Bloğu Sıcaklık	280 °C
	Mod	Pulsed Splitless
Kolon Fırını	*Taşıyıcı gaz ve hızı*	He - 1 mL/dk
	Kolon	HP-5MS (%5-Fenil)-metilpolisiloksan
	Sıcaklık Programı	85 °C 0.5 dk 6 °C/dk 150 °C 0 dk 12 °C/dk 180 °C 0 dk 25 °C/dk 280 °C 7 dk
Dedektör		Elektron İyonizasyonu (EI)
	Tarama	Seçilmiş İyon Görüntüleme (SIM)

Seçilmiş iyon taraması için qualifier ve quantifier değerleri;

- 3-MCPD-PBA (m/z) 147 (quantifier); 196(qualifier);
- 2-MCPD-PBA (m/z) 196 (quantifier); 198 (qualifier);
- 3-MCPD-d5-PBA (m/z) 150 (quantifier); 201 (qualifier);
- 2-MCPD-d5-PBA (m/z) 201 (quantifier); 203 (qualifier);
- 3-MBPD-PBA (m/z) 147 (quantifier); 240 (qualifier);
- 3-MBPD-d5-PBA (m/z) 150 (quantifier); 245 (qualifier);

Uygulanan her iki analiz yöntemi için akış şeması **Şekil 3.2**`de verilmiştir.



Şekil 3. 2. 3-MCPD esterleri ve GE analizi akış şeması

3.7.2. Serbest ve Bağlı 3-MCPD analizi

Rafine yağlarda bulunan serbest ve bağlı 3-MCPD türlerinin analizinde, bu türlerin ester formaları bazik transesterifikasyon reaksiyonuyla serbest 3-MCPD formlarına dönüştürülerek BSTFA ile türevlendirilmiş, hem GC-MS hem de GC-FID ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Transesterifikasyon işlemlerinde AOCS Cd 29c-13 resmi metodu kullanılırken türevlendirme işleminde optimizasyonu yapılmış yöntem kullanılmıştır. Yapılan işlemler aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir (Örnek 2).

Prosedür;

0.25 gram yağ numunesi deney tüpüne alınarak, üzerine 100 µL 2-MCPD-d5 ve 3-MCPD-d5 iç standartları ilave edilmiştir. Numune üzerine 100 µL Tersiyel butil metil eter eklenerek örnekler çözülmüştür. Yağ numunesine 200 µL metanollu sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek tüm ester bağları hidroliz edilerek 2-MCPD ve 3-MCPD'lerin serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Ester hidrolizini durdurmak için 600 µL asitlendirilmiş NaBr çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan organik fazlar 600 µL izohekzan

ile 3 kez ekstrakte edilerek atılmıştır. Sulu faz üzerine 600 µL dietil eter:etil asetat (3:2) karışımı ilave edilmiş ve yıkanmıştır. Yıkanmış serbest 2-MCPD ve 3-MCPD organik fazdan ayrılarak yeni deney tüplerinde toplanmıştır. Çözelti ortamına 1 g Na_2SO_4 ilave edilerek numunenin kurutulması sağlanmıştır. Kurutulan numuneler santrifüj edilerek ayrı bir tüpe alınmışlar ve çözücüleri N_2 gazı ile uçurulmuştur. Çözücüsü uçurulmuş numuneler etil asetat ile tekrar çözüldükten sonra türevlendirme reaktifinden (BSTFA) 70 µL ilave edilmiştir. Türevlenme işleminin gerçekleşmesi için 20 dk kadar 60 ºC'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Türevlendirme işleminin ardından numunelerin GC-FID ve GC-MS cihazlarına enjeksiyonu yapılmıştır.

Geliştirilen yeni metodun doğrulamasının gerçekleştirilmesi için numuneler AOCS Cd 29c-13 metoduyla da tekrar hazırlanmış ve GC-MS analizleri yapılmıştır. Numunelerin transesterifikasyon ve türevlendirme işlemlerinde AOCS Cd 29c-13 metodunun prosedürü tamamen uygulanmıştır. Numune hazırlama işleminin ardından uygulanan GC-MS analizine ait metot parametreleri **Çizelge 3. 6**`de verilmiştir. GC-MS çalışma modu olarak Seçilmiş İyon Görüntüleme (SIM) kullanılmıştır. Transesterifikasyondan sonra türevlendirme işlemi için aşağıdaki şekilde prosedür devam devam ettirilmiştir; (Örnek 2)

Prosedür;

Serbest forma dönüştürülen 3-MCPD 600 µL dietil eter:etil asetat (600 µL:400 µL) karışımı ile ekstrakte edilerek, yeni deney tüplerine alınmış ve bu işlem ile 3 kez tekrar edilmiştir. Örneklerde kalan nemin uzaklaştırılması için susuz sodyum sülfat ilave edilmiştir. Her iki organik ekstrakta da türevlendirme reaktifi olan fenil boranik asitten (PBA) 50 µL ilave edilmiş ve azot gazı altında çözücüleri uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan numuneler 500 µL izo-oktan ile tekrar çözülerek GC-MS'de analizi gerçekleştirilmiştir.

Uygulanan her iki analiz yöntemi için akış şeması **Şekil 3. 2**`de verilmiştir.

3.8. Geliştirilen Metoda Göre Sonuçların Hesaplanması

3.8.1. Toplam 2-MCPD (Serbest 2-MCPD, Bağlı 2-MCPD ve GE)

2-MCPD esterleri asitli bir tuz çözeltisi (Cl^- iyonları ihtiva eden) ile bazik ortamda metanollü NaOH varlığında parçalanarak serbest forma dönüştürülmüştür. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken 2-MCPD pik alanının, iç standart 2-MCPD-d5 pik alanı

oranı (Q) ile 2-MCPD konsantrasyonu dikkate alınmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla yağ numunelerindeki 2-MCPD miktarları hesap edilmiştir.

$$Q = \frac{A(2-MCPD)}{A(2-MCPD-d5)}$$

Q: Pik alanları oranı,

A: Pik alanı

Kalibrasyon eğrisi formülü;

$$\boldsymbol{Q = m * x(2-MCPD) + n}$$

Q: Pik alanları oranı,

m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

x: 2-MCPD miktarı mg/kg

n: Kalibrasyon grafiğinin y eksenin kesim noktası

Numunelerdeki 2-MCPD miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır;

$$W_{(2-MCPD)} = \frac{Q(yağ) - n}{m * x}$$

$W_{(2\text{-MCPD})}$: Toplam 2-MCPD miktarı mg/kg

3.8.2. Toplam 3-MCPD (Serbest 3-MCPD, Bağlı 3-MCPD ve GE)

Yağ numunesi içerisinde bulunan serbest 3-MCPD, bağlı 3-MCPD ve GE esterleri, asitli bir tuz çözeltisi (Cl^- iyonları ihtiva eden) ile bazik ortamda metanollü NaOH varlığında parçalanarak serbest 3-MCPD forma dönüştürülmüş ve GE'den gelen serbest 3-MCPD ile birlikte toplam 3-MCPD miktarı hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken 3-MCPD pik alanının, iç standart 3-MCPD-d5 pik alanı oranı (Q) ile 3-MCPD konsantrasyonu dikkate alınmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla yağ numunelerindeki toplam 3-MCPD miktarları hesap edilmiştir (Örnek 1).

$$Q = \frac{A(3-MCPD)}{A(3-MCPD-d5)}$$

Q: Pik alanları oranı,

A: Pik alanı

Kalibrasyon eğrisi formülü;

$$\boldsymbol{Q = m * x(3-MCPD) + n}$$

Q: Pik alanları oranı,

m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

x: 3-MCPD miktarı mg/kg

n: Kalibrasyon grafiğinin y eksenin kesim noktası

Numunelerdeki 3-MCPD ve GE miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır;

$$W_{(3-MCPD)} = \frac{Q(yağ) - n}{m * x}$$

$W_{(3\text{-MCPD})}$: Toplam 3-MCPD miktarı mg/kg

3.8.3. Serbest ve Bağlı 3-MCPD

Yağ numunesi içerisinde bulunan 3-MCPD esterleri asitli Br^- tuz çözeltisi ile reaksiyona girerek 3-MBPD'ye dönüşmüş serbest ve bağlı 3-MCPD miktarı hesaplanmıştır (Örnek 2). Kalibrasyon eğrisi; 3-MCPD pik alanının, iç standart 3-MCPD-d5 pik alanı oranına karşılık gelen ilgili kalibrasyon çözeltisi konsantrasyonu ile oluşturulmuştur. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla yağ numunelerindeki toplam 3-MCPD miktarları hesap edilmiştir (Örnek 2).

$$Q = \frac{A(3-MBPD)}{A(3-MBPD-d5}$$

Q: Pik alanları oranı,

A: Pik alanı

Kalibrasyon eğrisi formülü;

$$Q = m * x(3-MBPD) + n$$

Q: Pik alanları oranı,

m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

x: 3-MBPD miktarı mg/kg

n: Kalibrasyon grafiğinin y eksenin kesim noktası

Numunelerdeki 3-MCPD miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır;

$$W_{(3-MCPD)} = \frac{Q(yağ) - n}{m * x}$$

$W_{(3\text{-MCPD})}$: Serbest ve bağlı 3-MCPD miktarı mg/kg

3.8.4. Glisidil Ester

GE miktarı, toplam 3-MCPD (Örnek 1) ve serbest ve bağlı 3-MCPD (Örnek 2) miktarlarının farkının bir dönüştürme faktörü ile çarpılmasından bulunmaktadır. Dönüştürme faktörü, MCPD türü içermeyen yağ örneğine GE standartlarının eklendiği standart ekleme yöntemi ile bulunmaktadır. Standart ekleme yönteminden elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğiminden yararlanılarak dönüşüm faktörü hesap edilmiştir.

$$t=1/m$$

m= standart eklem yönteminden elde edilen eğrinin eğimi

$$W_{glisidil} = t * (W_{3\text{-}MCPD(t)} - W_{3\text{-}MCPD(s,b)})$$

$W_{3\text{-}MCPD(t)}$: Toplam 3-MCPD miktarı mg/kg

$W_{3\text{-}MCPD(s,b)}$: Serbest ve bağlı 3-MCPD miktarı

3.9. AOCS Resmi Metoduna Göre Sonuçların Hesaplanması

3.9.1. Toplam 2-MCPD (Serbest 2-MCPD, Bağlı 2-MCPD ve GE)

2-MCPD esterleri asitli bir tuz çözeltisi (Cl^- iyonları ihtiva eden) ile bazik ortamda metanollü NaOH varlığında parçalanarak serbest forma dönüştürülmüştür. Örnek 1'd1 toplam 2-MCPD bulmak için; standartın ve iç standardın sinyal alanına karşılık gelen iyonlarına dayalı oranı, iç standardın konsatrasyonu ile çarpılarak bulunmuştur.

$$W\,2-MCPD(A) = \frac{\text{SFa x Wd5} - \text{2-MCPD(A)}}{\text{SFiA}}$$

$W_{2\text{-}MCPD(A)}$: Örnek 1'daki 2-MCPD'nin mg/kg cinsinden kütlesi.

$W_{d5\text{-}2\text{-}MCPD(A)}$: Örnek 1'daki 2-MCPD-d5'nin mg/kg cinsinden kütlesi.

SF_A Örnek 1'daki 2-MCPD'nin alanı.

$SF_{İA}$ Örnek 1'daki 2-MCPD-d5'nin alanı.

3.9.2. Toplam 3-MCPD (Serbest 3-MCPD, Bağlı 3-MCPD ve GE)

Yağ numunesi içerisinde bulunan serbest 3-MCPD, bağlı 3-MCPD ve GE esterleri asitli bir tuz çözeltisi (Cl^- iyonları ihtiva eden) ile bazik ortamda metanollü NaOH varlığında parçalanarak serbest 3-MCPD forma dönüştürülmüş ve GE'den gelen serbest 3-MCPD ile birlikte toplam 3-MCPD miktarı hesaplanmıştır. Örnek 1'de toplam

3-MCPD bulmak için; analitin ve iç standardın sinyal alanına karşılık gelen iyonlarına dayalı oranı, iç standardın konsatrasyonu ile çarpılarak bulunmuştur.

$$W_{3\text{-MCPD(A)}} = \frac{SFa \times Wd5 - 3MCPD(A)}{SFiA}$$

$W_{3\text{-MCPD(A)}}$: Örnek 1'daki 3-MCPD'nin mg/kg cinsinden kütlesi.

$W_{d5\text{-}3\text{-MCPD(A)}}$: Örnek 1'daki 3-MCPD-d5'nin mg/kg cinsinden kütlesi.

SF_A Örnek 1'daki 3-MCPD'nin alanı.

$SF_{İA}$ Örnek 1'daki 3-MCPD-d5'nin alanı.

3.9.3. Serbest ve Bağlı 3-MCPD

Örnek 2'de ise yağ numunesi içerisinde bulunan serbest ve bağlı 3-MCPD esterleri (Cl^- iyonları ihtiva etmeyen) asitli Br^- tuz çözeltisi ile reaksiyona girerek 3-MBPD'ye dönüşmüş ve bağlı ve serbest 3-MCPD miktarı hesaplanmıştır.

Örnek 2'de 3-MCPD esterleri için analitin ve iç standardın sinyal alanına karşılık gelen iyonlarına dayalı oranı, iç standardın konsatrasyonu ile çarpılarak bulunmuştur.

$$W3 - MCPD(B) = \frac{SFB \times Wd5 - 3 - MCPD(B)}{SFiB}$$

$W_{3\text{-MCPD(B)}}$: Örnek 2'deki 3-MCPD'nin mg/kg cinsinden kütlesi.

$W_{d5\text{-}3\text{-MCPD(B)}}$: Örnek 2'deki 3-MCPD-d5'nin mg/kg cinsinden kütlesi.

SF_B Örnek 2'deki 3-MCPD'nin alanı.

$SF_{İB}$ Örnek 2'deki 3-MCPD-d5'nin alanı.

3.9.4. Glisidil Ester

AOCS`nin resmi Cd 29c-13 metoduna göre GE miktarı, toplam 3-MCPD (Örnek 1) ve serbest ve bağlı 3-MCPD (Örnek 2) miktarlarının farkının bir dönüştürme faktörü ile çarpılmasından bulunmaktadır. Dönüştürme faktörü, MCPD türü içermeyen yağ örneğine GE standartlarının eklendiği standart ekleme yöntemi ile bulunmaktadır. Standart ekleme yönteminden elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğiminden yararlanılarak dönüşüm faktörü hesap edilmiştir.

$$Wglisidil = t * (W_{3\text{-MCPD(1)}} - W_{3\text{-MCPD(2)}})$$

$t=1/m$ (m=kalibrasyon eğrisinin eğimi)

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Yağlarda bulunan 2-MCPD, 3-MCPD ve GE insan sağlığını tehdit eden önemli kirleticiler arasında yer almaktadır. Bu kirleticilerin yetişkinlerde ve çocuklarda belirli miktarlarda alınması sonucunda ileri seviyede sağlık problemlerine yol açabilecekleri yapılan birçok çalışmada belirtilmiştir. Ayrıca bu türlerin; böbrek, kalp ve üreme organlarına doğrudan genotoksik ve toksik etki bıraktıkları da gösterilmiştir (Barocelli ve ark., 2011; Knutsen ve ark., 2018).

Yağların kullanılabilir forma getirilmesi için içerisinde bulunan yabancı maddelerin rafinasyon işlemiyle uzaklaştırılması gereklidir. Ancak 2-MCPD, 3-MCPD ve GE'ler yağ rafinasyon prosesinin son basamağı olan, düşük basınç ve yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen deoderizasyon kademesinde oluştuğu yapılan birçok çalışmada belirtilmiştir (Topkafa, 2013).Rafinasyon prosesi sırasında, üretim sonunda ve yağ içeren gıdalarda bu türlerin oluşumunun izlenmesi ve etkilerini azaltmak ve kalite kontrol stratejilerinin uygulanması için hem yağlardaki hem de yağ kaynaklı gıda ürünlerindeki miktarlarının belirlenmesi için güvenilir prosedürlerin geliştirilmesi önemlidir. Son yıllarda bu kirleticilerin tespit edilmesini amaçlayan pek çok yeni metot geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir.

Bu tez çalışmasında; bu kirleticileri hem rafine yağlarda hem de gıda ürünlerinde tespit etmek ve miktarlarının analizlerini gerçekleştirmek için yeni bir gaz kromatografisi tekniği geliştirilmiştir. Yeni geliştirilen metoda ait elde edilen deney sonuçları ve değerlendirmeler aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

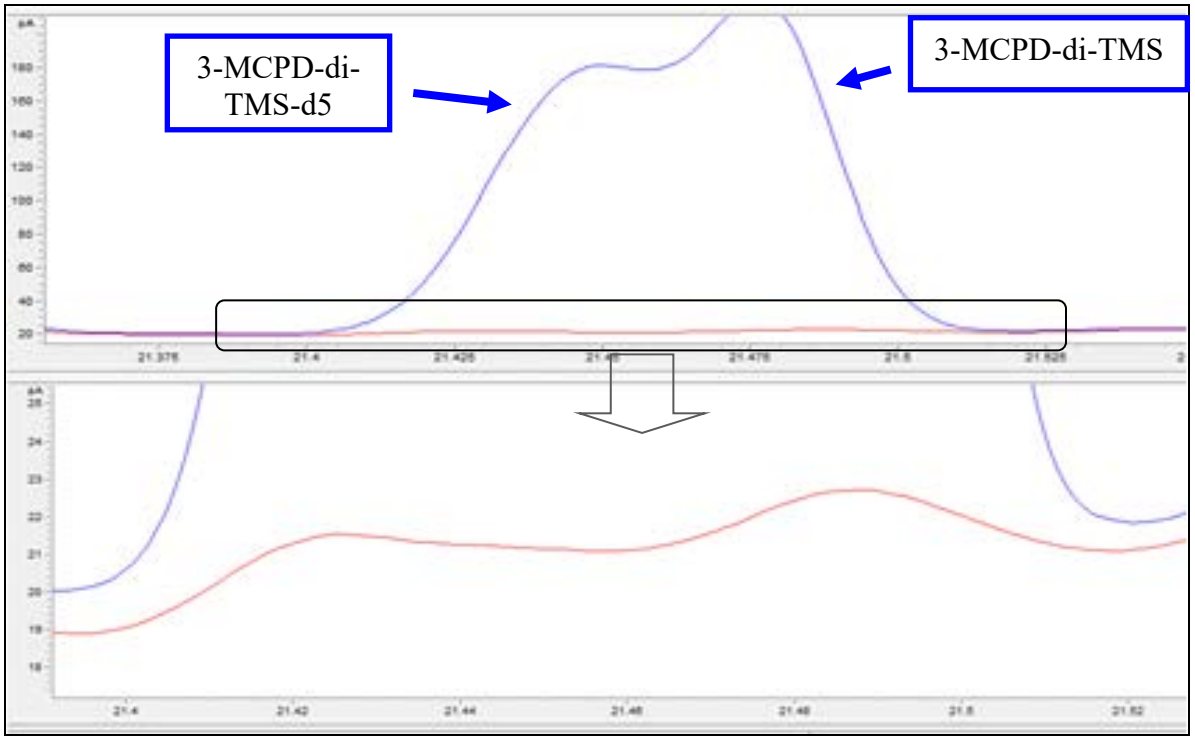
4.1. Türevlendirme İşleminin Optimizasyon Çalışmaları

2-MCPD, 3-MCPD ve GE türlerinin tespiti için hem resmi hem de litertürde farklı yöntemler tanımlanmıştır. Bu yöntemlerde serbest forma dönüştürülmüş bu türlerin uygun bir türevlendirme reaktifi ile türevlendirildikten sonra uçucu hale getirilmeleri esas alınmıştır. Resmi metotlarda genellikle fenil boronik asitle türevlendirme yapılırken birçok literatürde fenil boronik asit haricinde BSTFA, HFBI ve TsOH ile türevlendirmeler de kullanılmıştır. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında; hem türevlendirme hızının yüksek olması hem de hidroksil grubu bulunduran organik türler için kararlı bir türevlendirme reaktifi olan BSTFA kullanılmıştır.

4.1.1. Çözücü Seçimi

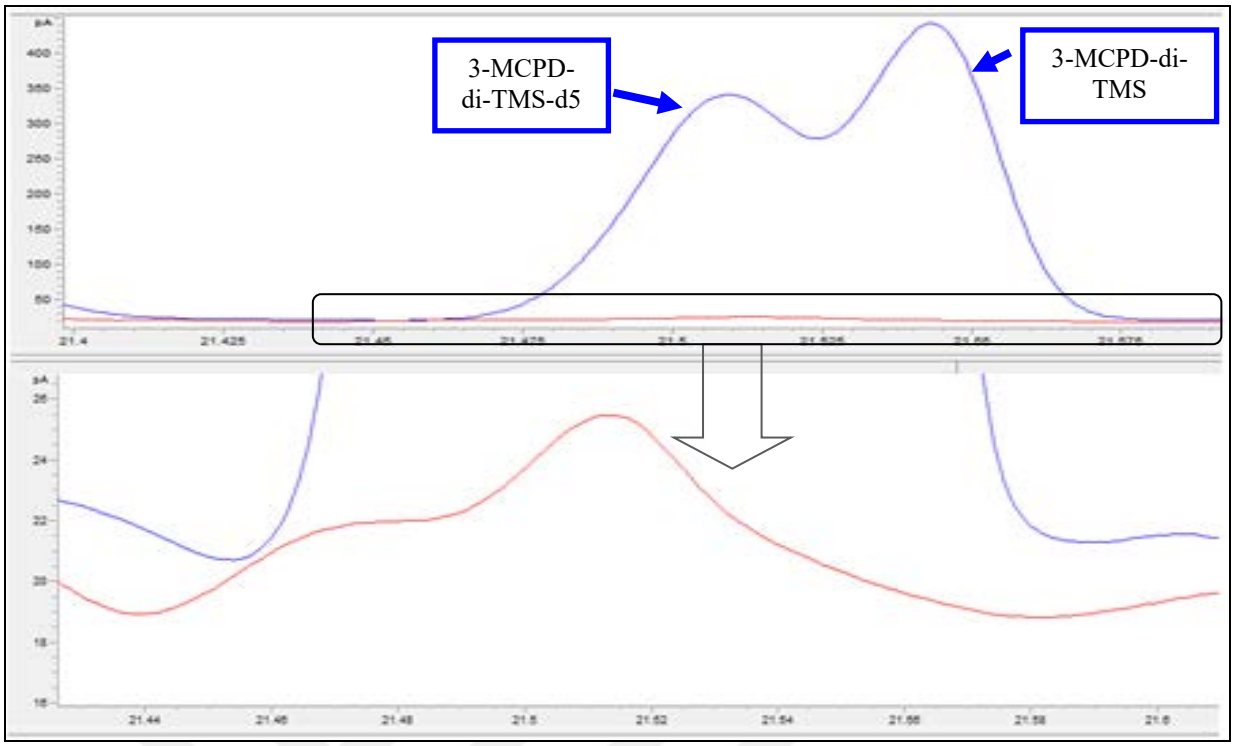
BSTFA ile türevlendirme işlemi için türevlendirmede kullanılan çözücü oldukça önemli ve seçicidir. Çalışmada piridin, aseton, asetonitril ve etil asetat çözücüleri seçilmiştir. 2-MCPD ve 3-MCPD türlerinin kromatorafik sistemde analizinde çözücü piki ile analit pikinin üst üste gelmemesi esas alınmıştır.

Pridin çözücüsü ile yapılan türevlendirme işleminden elde edilen 3-MCPD türlerine ve çözücüye ait kromatogram **Şekil 4. 1**'de verilmiştir.



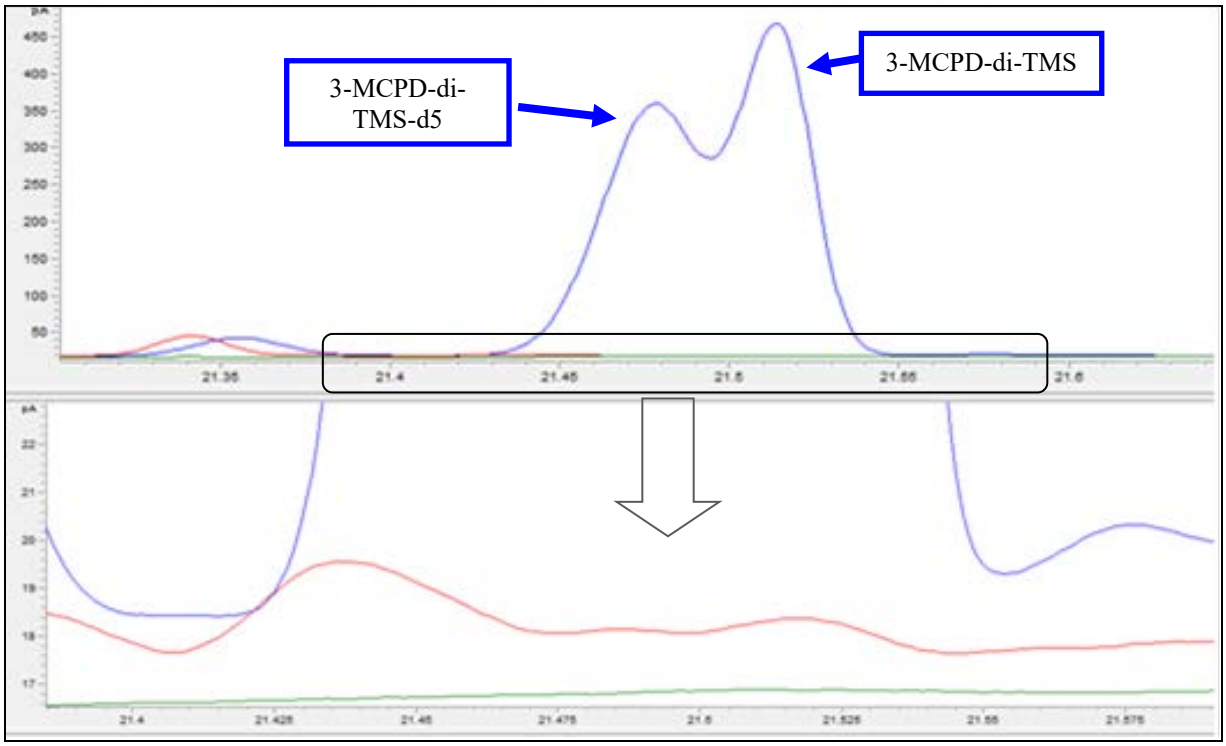
Şekil 4. 1. Pridin çözücüsüne ve 3-MCPD`ye ait GC-FID kromatogramı

Aseton çözücüsü ile yapılan türevlendirme işleminden elde edilen 3-MCPD türlerine ve çözücüye ait kromatogram **Şekil 4. 2**'de verilmiştir.



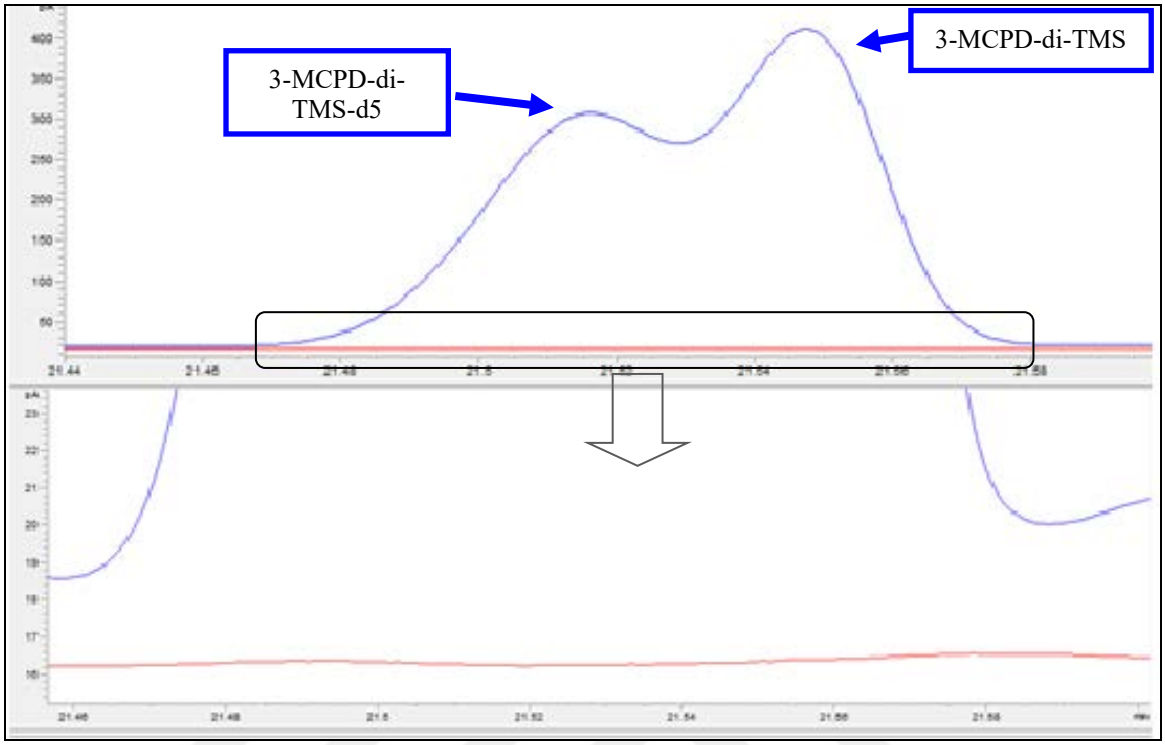
Şekil 4. 2. Aseton çözücüsüne ve 3-MCPD`ye ait GC-FID kromatogramı

Asetonitril çözücüsü ile yapılan türevlendirme işleminden elde edilen 3-MCPD türlerine ve çözücüye ait kromatogram **Şekil 4. 3**'de verilmiştir.



Şekil 4. 3. Asetonitril çözücüsüne ve 3-MCPD`ye ait GC-FID kromatogramı

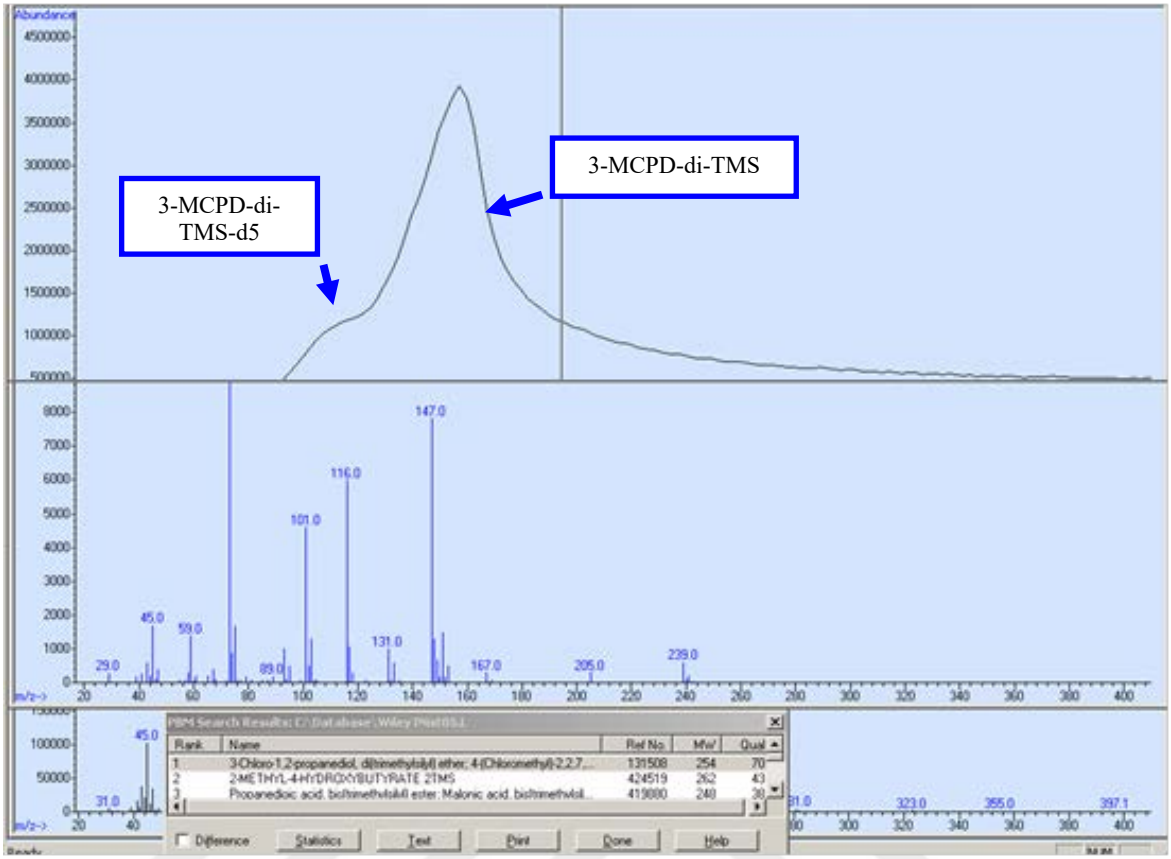
Etilasetat çözücüsü ile yapılan türevlendirme işleminden elde edilen 3-MCPD türlerine ve çözücüye ait kromatogram **Şekil 4. 4**'de verilmiştir.



Şekil 4. 4. Etil asetat çözücüsüne ve 3-MCPD`ye ait GC-FID kromatogramı

Kromatografik analizlerden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda analit piklerinin çıkış zamanlarında etil asetat çözücüsüne ait bir pikin olmadığı, piridin, aseton ve asetonitril çözücülerinin pik verdiği gözlenmiştir. Bu aşamadan sonraki çalışmalarda türevlendirme çözücüsü olarak etil asetat çözücüsü kullanılmıştır.

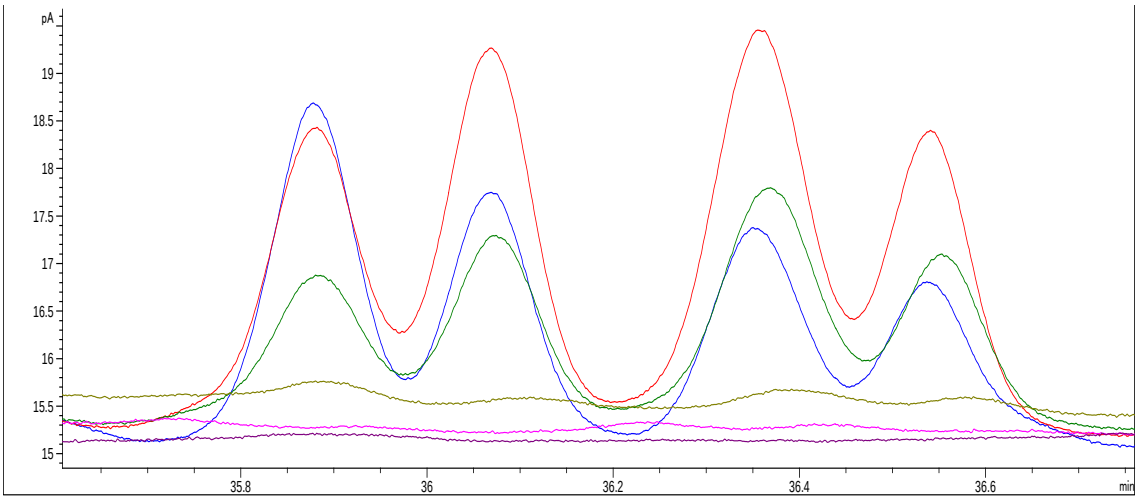
Çözücü optimizasyonundan elde edilen sonuçları doğrulamak ve 3-MCPD ve 3-MCPD-d5 piklerinin yerlerini tam olarak belirlenmek için etil asetat çözücüsünde hazırlanan standartlar GC-MS cihazında scan modda tarama yaparak analizlerin doğruluğu test edilmiştir. GC-FID sisteminde kullanılan metot GC-MS sisteminde kullanılmış ve **Şekil 4. 5**'de görülen kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 4. 5. Etil asetat çözücüsüne ve 3-MCPD`ye ait GC-MS kromatogramı ve spektrumu

4.1.2. BSTFA Miktar Çalışması

Çözücü seçimi analizlerinin ardından; yağlarda bulunan MCPD türlerinin türevlendirilmesi için gerekli olan eşdeğer miktarda BSTFA reaktifi konsantrasyonu belirleme çalışmalarına geçilmiştir. Bu çalışma için; 20 µL, 30 µL, 50 µL, 70 µL ve 100 µL hacimlerde BSTFA reaktifi 1mg/L konsantrasyona sahip 2-MCPD, 2-MCPD-d5, 3-MCPD ve 3-MCPD-d5 standartlarına ilave edişmiş ve türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme sonunda elde edilen standartlara ait bazı kronatogramlar **Şekil 4. 6**'de verilmiştir.



Şekil 4. 6. Farklı hacimde BSTFA ilavesine ait bazı kromatogramları 35.8 dk.(3-MCPD-d5-di-TMS), 36 dk. (3-MCPD-di-TMS), 36.3 dk. (2-MCPD-d5-di-TMS), 36.5dk. (2-MCPD-di-TMS)

Kromatografik analizlerden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda 70 µL BSTFA ilavesini uygun olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4. 7**). Bu aşamadan sonraki çalışmalarda türevlendirme reaktifi ilavesi bu hacimde yapılmıştır.



Şekil 4. 7. Türevlendirme reaktifi ilavesi

4.2. Kromatografik Şartların Belirlenmesi

GC-FID`de yürütülen 2-MCPD, 3-MCPD ve GE analizlerinde; 1 adet literatürden ve tarafımızdan değiştirilen (modifiye edilen) veya geliştirilen 13 adet metot olmak üzere 14 adet metot kullanılarak kromatografik ayrımlar için en uygun metot tespit edilmeye çalışılmıştır. Kromatografik ayrımlarda 3-MCPD ve 3-MCPD-d5 ayrımı özellikle dikkate alınmıştır. Kullanılan metotların kromatografik ayırma verim hesaplamalarına dair sonuçlar **Çizelge 4. 1**`de yer almaktadır.

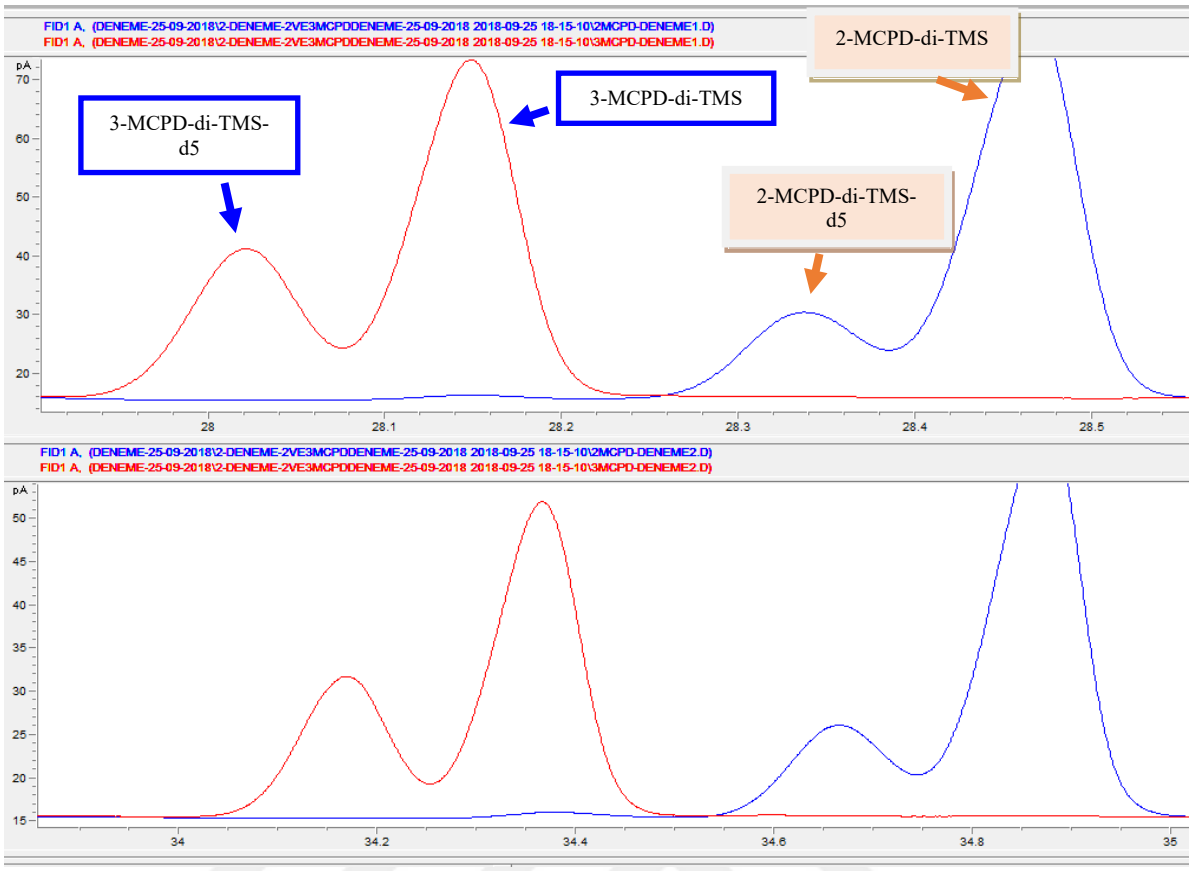
Çizelge 4. 1. GC-FID analiz şartları

Metot	Enjektör	FID	Akış Hızı	Kolon Fırını			Kromatografik Verim				Analiz Süreleri
	°C	°C	mL/dk	°C/dk	°C	dk	k'	α	N	Rs	dk
Metot L. (Racamonde ve ark., 2011)	280	300	1.2	 3 40	50 100 280	2 0 10	4.295	1.015	1076598	1.026	33.2
Metot 1	280	300	1.2	 3 5	50 100 280	5 2 10	3.613	1.006	925262	1.102	69.6
Metot 2	280	300	1.2	 2 30	50 120 280	5 2 10	4.715	1.006	671117	1.174	57.3
Metot 3	280	300	1.2	 2 3 30	50 90 150 280	5 5 0 10	4.915	1.007	689999	1.233	64.3
Metot 4	280	300	1.6	 2 2 30	50 80 140 280	5 3 0 10	5.031	1.007	641872	1.221	67.6
Metot 5	280	300	1.2	 3 5 20	50 90 150 280	5 3 5 10	3.702	1.005	1076674	1.069	54.8
Metot 6	280	300	1	 2 5 10	50 120 180 280	5 5 5 10	4.294	1.007	623385	1.089	82
Metot 7	280	300	1.1	 1 1 1 50	50 80 90 100 280	4 1 1 1 7	4.912	1.006	662036	1.112	67.6
Metot 8	280	300	0.8	 2 2 30	50 90 160 280	5 5 0 10	4.431	1.005	654430	0.880	79
Metot 9	280	300	1.2	 1 1 1 1 1 50	50 70 80 90 100 120 280	5 0.5 0.5 0.5 0.5 1 10	8.405	1.008	453072	1.209	71.2
Metot 10	280	300	1.2	 1 1 0.5 1 0.5 50	50 60 70 90 110 120 280	1 1 5 0.5 0.5 5 10	9.544	1.011	227407	1.224	125.2

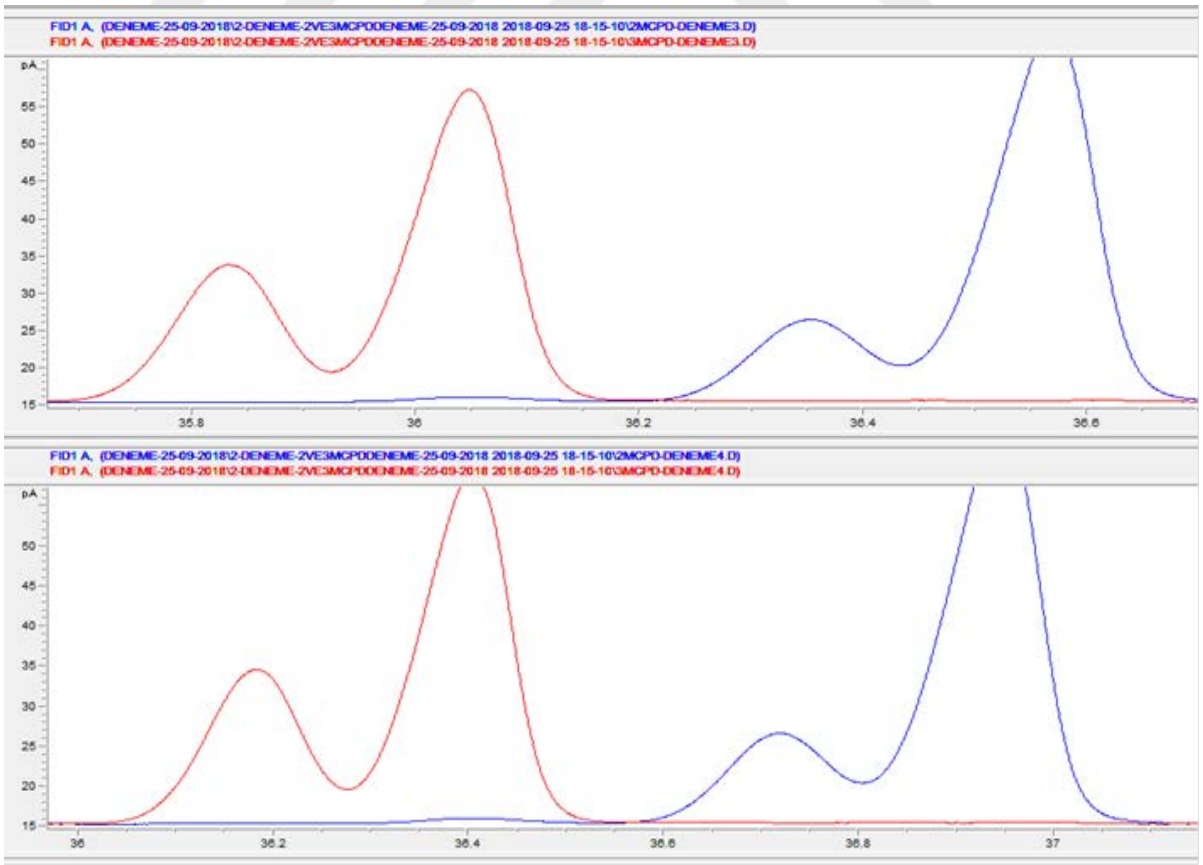
Metot 11	280	300	1.2	0.5 1 0.5 1 0.5 50	70 85 90 110 130 150 280	5 5 0.3 1.2 0.5 5 10	4.532	1.005	666440	0.898	164.6
Metot 12	280	300	0.8	3 5 20	50 90 150 280	5 3 5 10	7.891	1.009	247344	1.062	54.8
Metot 13	280	300	1.2	1 0.5 1 1.1 40	50 80 100 109 120 280	3.5 5 7 1 7 10	8.242	1.009	221328	1.027	126.5

Analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan k`, α, N, Rs değerleri kromatografik analizlerin değerlendirilmesinde kullanılmış ve k` değerinin 2-10 arasında, Rs değeri 1,5`a en yakın ve tabaka sayısı değeri en fazla olan kromatografik metodun en uygun metot olduğu kabul edilmiştir.

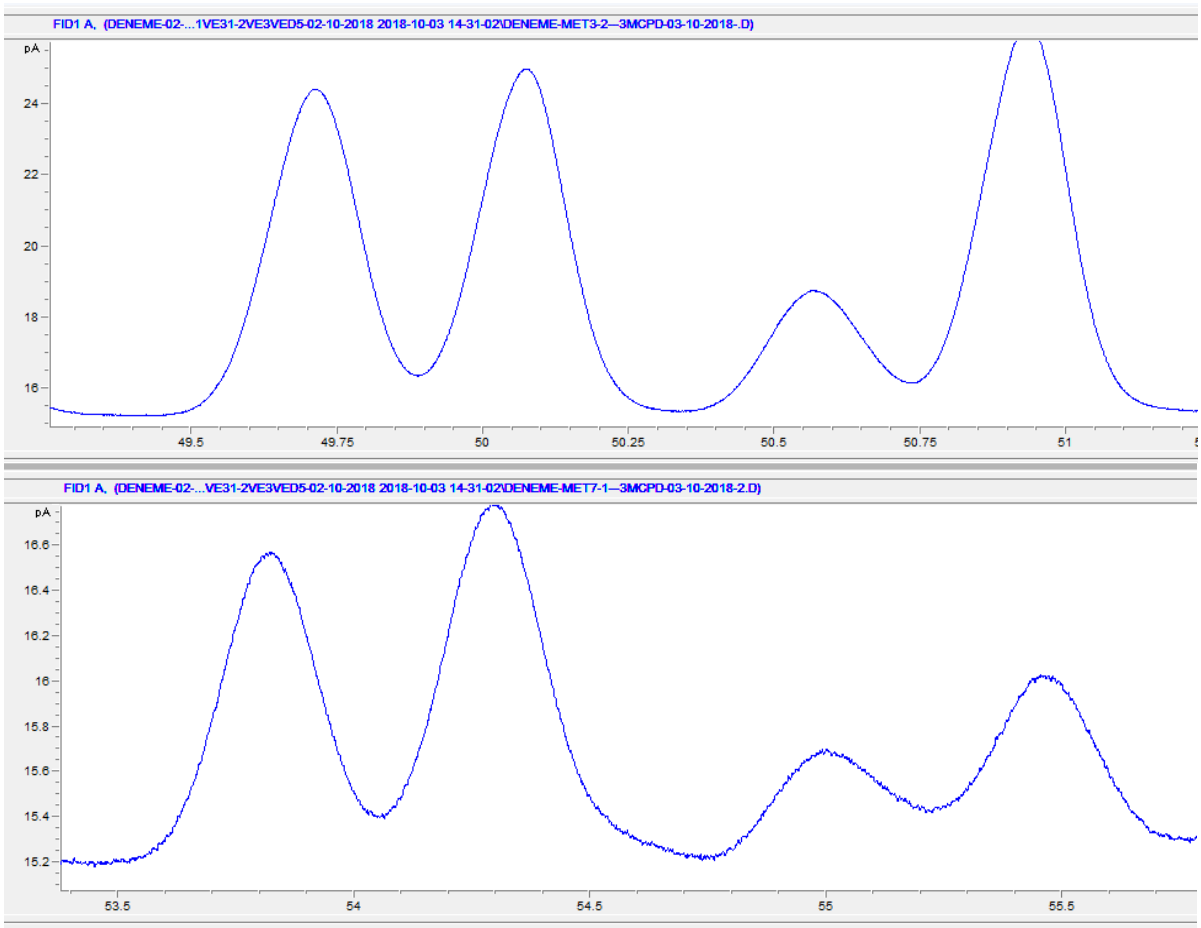
Toplam 14 analiz metoduyla yapılan analizler sonucunda 3-MCPD ve 3-MCPD-d5 türlerinin tam olarak ayrılması Metot-3 ile gerçekleştirilmiş ve yapılan çalışmalarda bu metot kullanılmıştır. Çalışılan metotlara ait bazı kromatogram sonuçları **Şekil 4. 8-10**`da verilmiştir.



Şekil 4. 8. Metot 1 ve Metot 2 için GC-FID kromatogramı



Şekil 4. 9. Metot 3 ve Metot 4 için GC-FID kromatogramı



Şekil 4. 10. Metot 9 ve Metot 13 için GC-FID kromatogramı

4.2.1. Metod Validasyonu

Bir analitik yöntemin doğrulanması, metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasına metot validasyonu denir (González ve Herrador, 2007). Bu tanım doğrultusunda; gerçekleştirilen bu tez çalışmasında geliştirilen gaz kromatografisi yönteminin validasyon çalışmaları yapılmıştır. MCPD ve GE türlerinin kantitatif olarak tayini için geliştirilen metodun valide edilmesinde aşağıda alt başlıklar halinde verilen parametreler kullanılmıştır. Türevlendirilen MCPD numuneleri 3 tekrarlı olarak optimize edilen metot-3 metoduna göre GC-FID sistemine enjeksiyonu yapılmıştır.

4.2.1.1. Doğruluk

Ölçülen değerin doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösteren doğruluk, mutlak hata ya da bağıl hata olarak ifade edilmektedir. Ayrıca bir yöntem için doğruluk, analitin geri kazanım çalışmaları ile de belirlenebilmektedir (Ayyıldız, 2010).

Validasyonu yapılan metoda ait doğruluk sonuçları **Çizelge 4. 2** ve **Çizelge 4. 3**'de % geri kazanım olarak verilmiştir. Hesaplamalarda 3-MCPD-di-TMS, 2-MCPD-di-TMS için 3 tekrarlı ve 5 değişkenli sonuçlar kullanılmıştır.

Çizelge 4. 2. 3-MCPD-di-TMS için % Geri Kazanım

3-MCPD (ppm)	Pik Alan Oranları	Bulunan Konsantrasyon (ppm)	% Geri Kazanım (%)
0.04	0.0711	0.0380	95.0997
0.08	0.1040	0.0691	86.4011
0.17	0.2186	0.1764	103.803
0.35	0.3985	0.3452	98.6458
0.7	0.7776	0.7008	100.121

3-MCPD için; **Doğruluk ±SD = 96.81 ±10.92**

Çizelge 4. 3. 2-MCPD-di-TMS için % geri kazanım

2-MCPD (ppm)	Pik Alan Oranları	Bulunan Konsantrasyon (ppm)	% Geri Kazanım (%)
0.04	0.0319	0.0370	92.673
0.08	0.0594	0.0820	102.520
0.17	0.1169	0.1759	103.525
0.35	0.2194	0.3432	98.0788
0.7	0.4390	0.7019	100.279

2-MCPD için; **Doğruluk ±SD = 99.42 ±10.70**

Hesaplanan değerlerden %95 güven seviyesinde optimizasyonu yapılan yöntemin doğruluğunun yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.2.1.2. Kesinlik

Kesinlik; ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığını (tekrarlanabilirliği) gösteren ve standart sapma, bağıl standart sapma, varyans veya varyasyon katsayısı ile verilen bir validasyon parametresidir (Ayyıldız, 2010). 2-MCPD-di-TMS ve 3-MCPD-di-TMS için kesinlikler;

a) Tekrarlanabilirlik (Gün içi tekrarlanabilirlik),

b) Orta-Kesinlik (Günler arası tekrarlanabilirlik)

olmak üzere iki şekilde hesaplanmış ve % RSD olarak **Çizelge 4. 4 ve 4. 5**'de değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. 4. 3-MCPD-di-TMS için Kesinlik

	Gün İçi (n=5)		Günler Arası (n=5)	
Bilinen konsantrasyon ppm	**Bulunan Konsantrasyon ppm**	**%RSD**	**Bulunan Konsantrasyon ppm**	**%RSD**
0.04	0.047	1.881	0.040	2.203
0.08	0.082	3.670	0.084	4.158
0.175	0.163	2.971	0.171	3.310
0.35	0.339	1.925	0.352	2.870
0.7	0.757	4.605	0.726	3.221

Çizelge 4. 5. 2-MCPD-di-TMS için Kesinlik

	Gün İçi (n=5)		Günler Arası (n=5)	
Bilinen konsantrasyon ppm	**Bulunan Konsantrasyon ppm**	**%RSD**	**Bulunan Konsantrasyon ppm**	**%RSD**
0.04	0.045	0.616	0.047	3.076
0.08	0.078	1.580	0.076	4.772
0.175	0.184	1.352	0.171	1.898
0.35	0.307	1.245	0.329	2.341
0.7	0.659	1.196	0.668	3.231

Kabul edilen kesinlik, analiz tipine göre farklılık gösterebilmektedir ve % 2 ve %20 arasında olması beklenir. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası en yüksek %RSD değerleri sırası ile 4.605±0.04 ve 4.772±0.05 bulunmuştur. Bu sonuçların yöntemin kesinliğinin MCPD türlerin tespiti için kabul edilebilir sınırlar içinde olduğunu göstermektedir.

4.2.1.3. Gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of Detection)

Gözlenebilme sınırı, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine bağlı olarak analitin bir işlemle gözlenebilecek en düşük derişimidir. LOD, bezlayn gürültüsünden farklı olarak tespit edilen, fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit olarak da tanımlanmaktadır (Ayyıldız, 2010). Gözlenebilme sınırının hesaplanmasında aşağıda verilen denklem ile hesap edilebilmektedir.

$$\mathbf{LOD = 3 \times S/N}$$

S= En düşük konsantrasyona sahip analit sinyali

N=Bezlayn Gürültüsü

Yukarıda verilen denklem yardımıyla 2-MCPD-di-TMS ve 3-MCPD-di-TMS için gözlenebilme sınırları hesap edilmiş ve **Çizelge 4. 6** ’da verilmiştir.

Çizelge 4. 6. 2-MCPD ve 3-MCPD için LOD değerleri

	LOD (mg/L)
2-MCPD	0.00131±0.00020
3-MCPD	0.00040±0.00001

4.2.1.4. Tayin sınırı (LOQ; Limit of Quantification)

Tayin sınırı, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine bağlı olarak analitin bir işlemle tayin edilebilecek en düşük derişimidir. LOQ, bezlayn gürültüsünden farklı olarak tespit edilen ve miktarı belirlenebilen en küçük analit konsantrasyonu olarak da tanımlanmaktadır (Ayyıldız, 2010). Tayin sınırının hesaplanmasında aşağıda verilen denklem ile hesap edilebilmektedir.

LOQ= 10 x S/N

S= En düşük konsantrasyona sahip analit sinyali

N=Bezlayn Gürültüsü

Yukarıda verilen denklem yardımıyla 2-MCPD-di-TMS ve 3-MCPD-di-TMS için tayin sınırları hesap edilmiş ve **Çizelge 4. 7**'de verilmiştir.

Çizelge 4. 7. 2-MCPD ve 3-MCPD için LOQ değerleri

	LOQ (mg/L)
2-MCPD	0.0012±0.0007
3-MCPD	0.0391±0.0080

Rafine yağlar ve gıda ürünlerinde bulunan MCPD türlerinin konsantrasyonları göz önünde bulundurulduğunda geliştirilen yöntemin hem gözlenebilme hem de tayin sınırlarının oldukça düşük olduğu ve gerçek numunelerin analizinde kullanılabileceği görülmüştür.

4.2.1.5. Doğrusallık

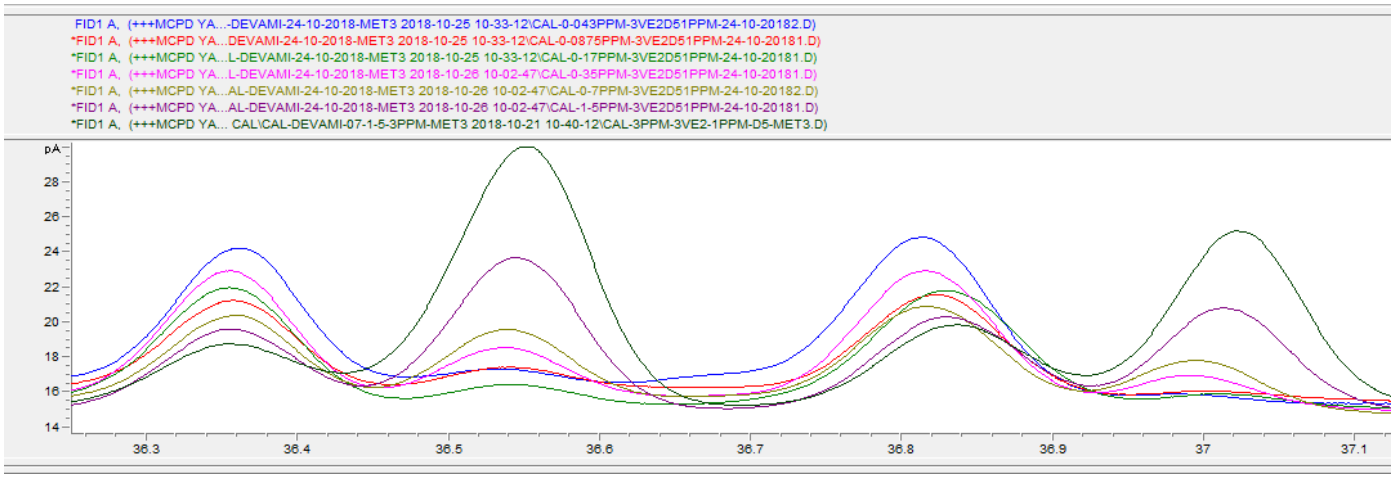
Doğrusallık, analitin derişimine karşı dedektör cevabının doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların doğru üzerinde veya doğruya yakın yerlerde bulunmasıdır. Eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı (R^2) doğrusallığı veren parametrelerdir. R^2 = 0.999 ve üzerinde olmalı ve değerler çizilen doğrunun üzerinde yer almalıdır. (González ve Herrador, 2007; Sagırlı, 2016)

Validasyonu yapılan metodun doğrusallığını hesap etmek için kullanılan 3-MCPD ve 2-MCPD'nin kalibrasyon standartları konsantrasyonları ve pik alanı-iç standart pik alanı oranı **Çizelge 4. 8**'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için analiz edilen

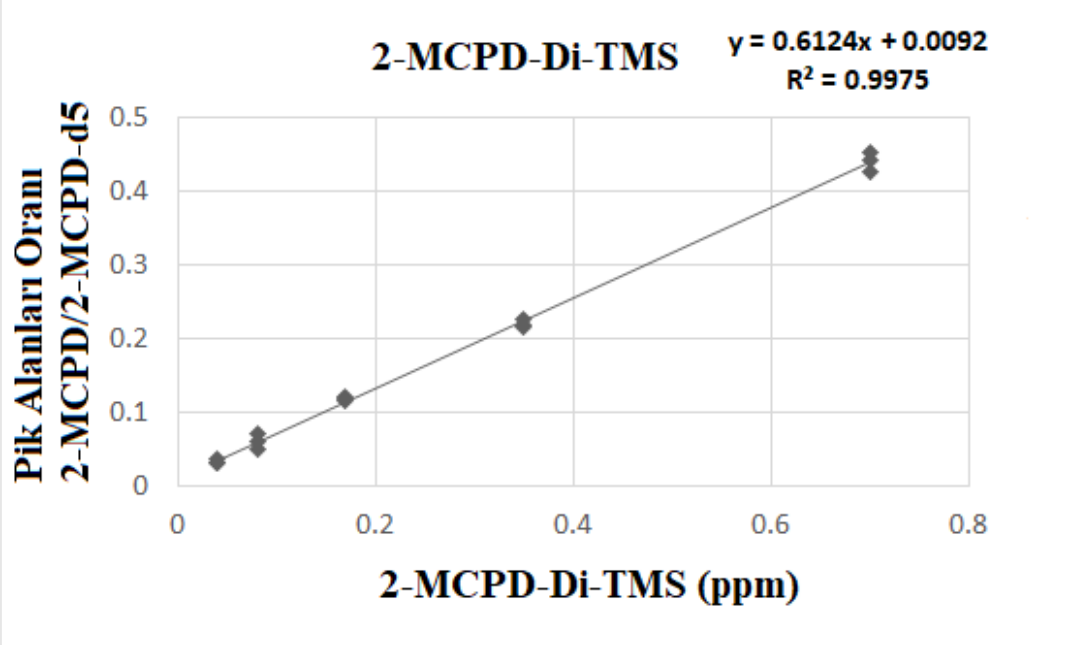
MCPD türlerinin kromatogramları **Şekil 4. 11.**`de, 2-MCPD için kalibrasyon eğrisi **Şekil 4. 12.**`de ve 3-MCPD için kalibrasyon eğrisi **Şekil 4. 13.**`de verilmiştir.

Çizelge 4. 8. Kalibrasyon Standart miktarları ppm (mg/L)

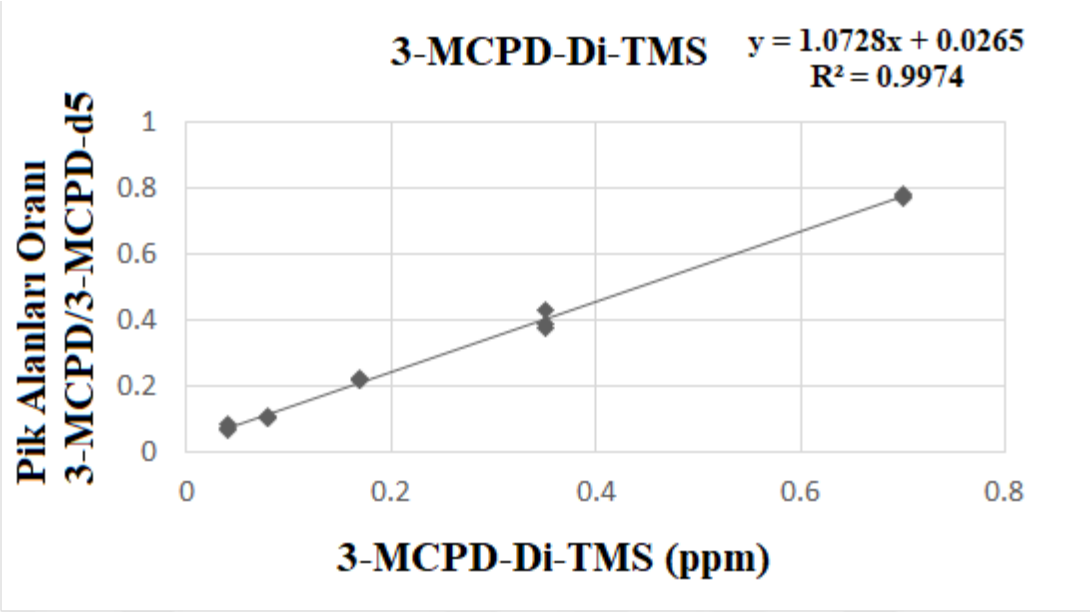
3-MCPD (mg/L)	3-MCPD-d5 (mg/L)	Pik Alan Oranları	2-MCPD (mg/L)	2-MCPD-d5 (mg/L)	Pik Alan Oranları
0.04	1	0.071	0.04	1	0.031
0.08	1	0.104	0.08	1	0.070
0.17	1	0.219	0.17	1	0.116
0.35	1	0.399	0.35	1	0.219
0.7	1	0.778	0.7	1	0.439



Şekil 4. 11. Kalibrasyon grafiğine ait kromatogram



Şekil 4. 12. 2-MCPD-Di-TMS kalibrasyon eğrisi



Şekil 4. 13. 3-MCPD-Di-TMS kalibrasyon eğrisi

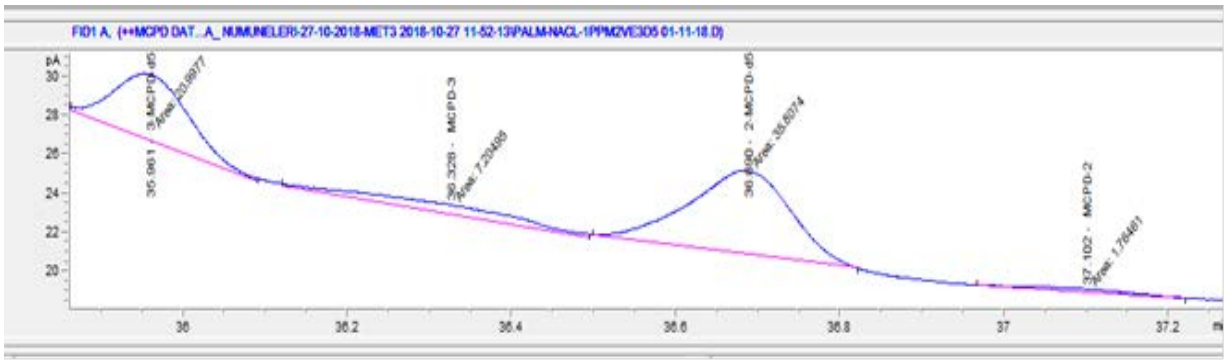
Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin R^2 değerleri dikkate alındığında; geliştirilen yöntemin 2- MCPD (0.9975) ve 3-MCPD (0.9974) türleri için doğrusallığının oldukça iyi olduğu görülmüştür.

4.3. Gerçek Yağ Numunelerinde 2-MCPD, 3-MCPD ve GE Miktar Tayinleri

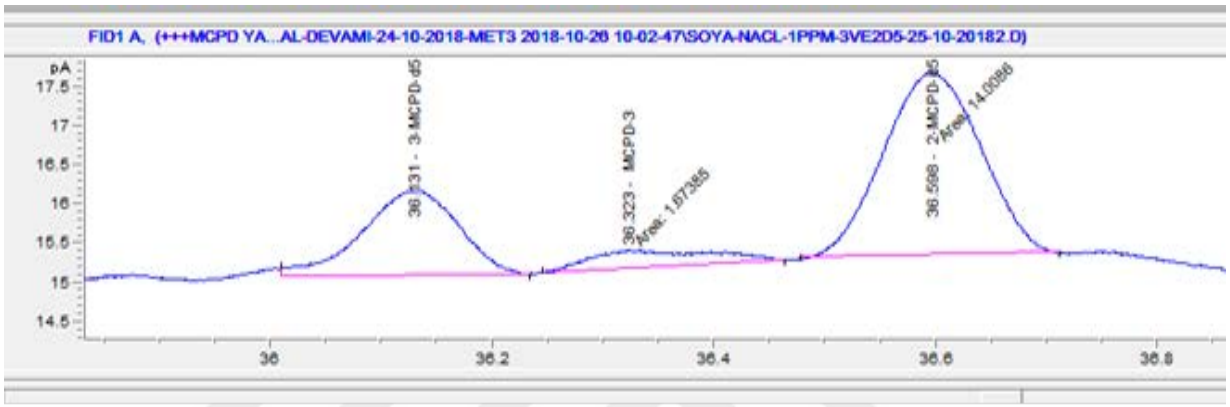
Yapılan bu tez çalışmasının son basamağında; türevlendirme işleminin optimizasyonu, kromatografik yöntemin geliştirilmesi ve yöntemin validasyou çalışmalarının ardından yöntemin gerçek numunelerdeki uygulaması ve standart metotlarla karşılaştırma çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda palm, ayçiçek ve soya yağları kullanılmış ve bu yağların hem geliştirilen yöntemle hem de standart metotla analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.3.2. Geliştirilen Metoda Göre 2-MCPD, 3-MCPD ve GE Miktar Tayinleri

Palm, ayçiçek ve soya yağları optimizasyonu yapılmış türevlendirme ve kromatografik yöntemle analiz edilmiştir. Palm ve soya yağında bulunan toplam 3-MCPD ve 2-MCPD türlerine ait kromatogramlar sırasıyla **Şekil 4. 14**`de ve **Şekil 4. 15**`de verilmiştir. Ancak yapılan analizler sonunda ayçiçek yağında bu türlerin mevcut olmadığı görülmüştür.

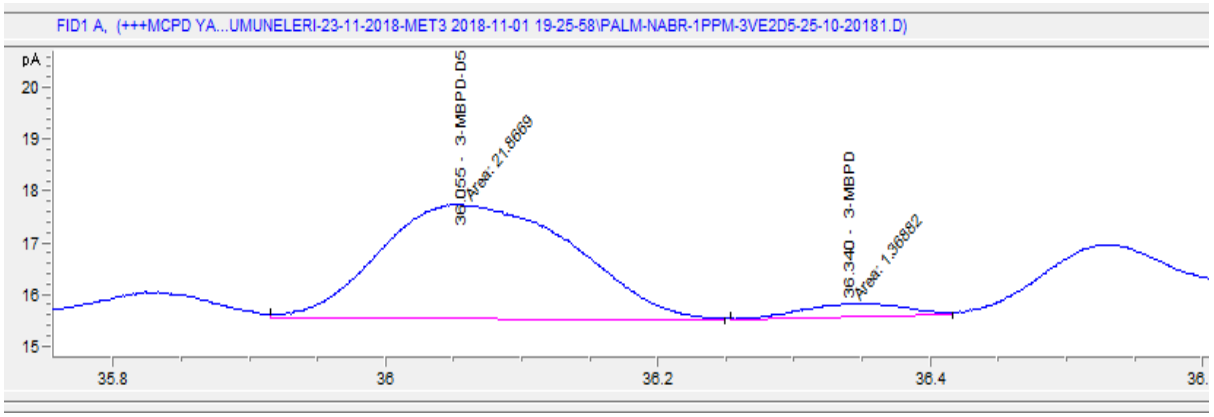


Şekil 4. 14. Palm yağı için GC-FID 3-MCPD-di-TMS ve 2-MCPD-di-TMS kromatogramı

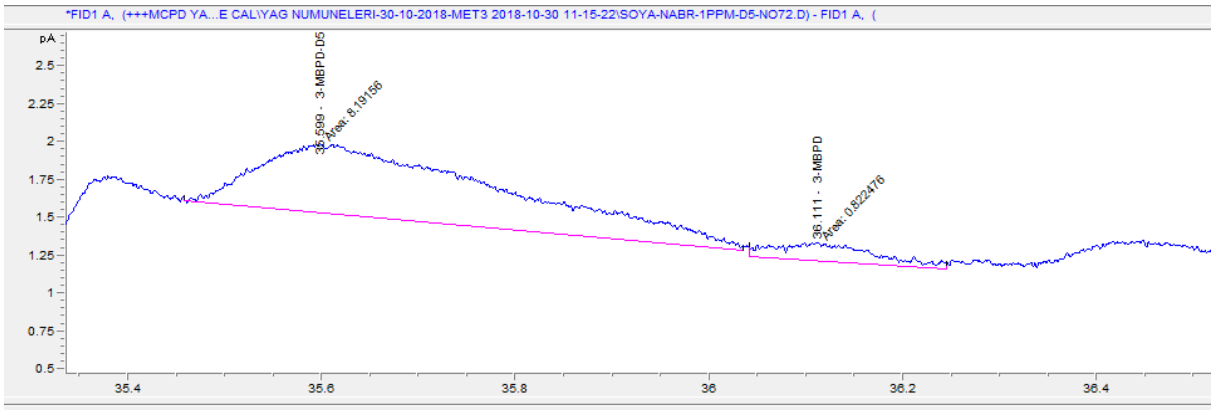


Şekil 4. 15. Soya yağı için GC-FID 3-MCPD-di-TMS ve 2-MCPD-di-TMS kromatogramı

Palm ve soya yağında bulunan bağlı ve serbest 3-MCPD ve 2-MCPD türlerine ait kromatogramlar sırasıyla **Şekil 4. 16**`de ve **Şekil 4. 17**`de verilmiştir. Ancak yapılan analizler sonunda ayçiçek yağında bu türlerin mevcut olmadığı görülmüştür.



Şekil 4. 16. Palm yağı için GC-FID 3-MBPD-Di-TMS kromatogramı



Şekil 4. 17. Soya yağı için GC-FID 3-MBPD-Di-TMS kromatogramı

Validasyonu yapılan metot ile gerçekleştirilen analizlerde yağlarda bulunan GE miktarları, materyal metotta (başlık 3.9.4) verilen hesaplama yöntemine göre bulunmuştur. Toplam GE tayininde kullanılan standart ekleme metodunda standart ekleme aralığı 0.06 ile 0.75 mg/kg olarak belirlenmiştir. Hazırlanan numuneler Örnek 1 uygulamasına göre hidroliz edilmiş ve türevlendirilerek GC-FID cihazına verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinde iç standart olarak konsantrasyonu 1 mg/L olan GE-Palmitat-d5 kullanılmıştır.

Toplam 3-MCPD ve 2-MCPD, bağlı ve serbest 3-MCPD, toplam GE ester miktarları **Çizelge 4. 9.**`da verilmiştir. 3-MCPD ve GE palm ve soya yağında tespit edilmesine rağmen 2-MCPD sadece palm yağında tespit edilmiştir. Ayçiçek yağında MCPD ve GE ester türlerinin hiçbiri tespit edilememiştir.

Çizelge 4. 9. Geliştirilen metoda göre 2-MCPD, 3-MCPD ve GE sonuçları

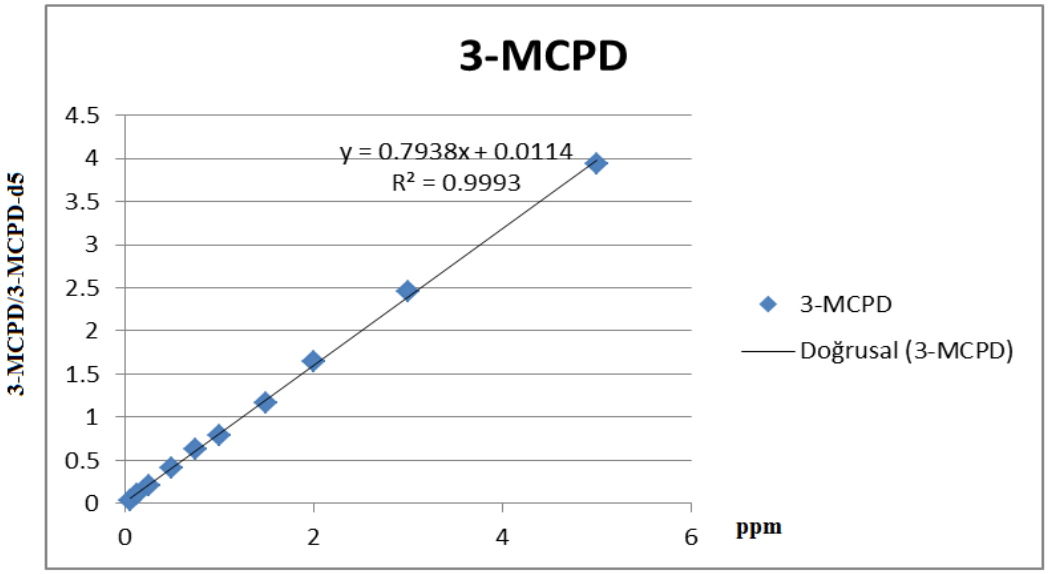
	Toplam 3-MCPD mg/kg	**Bağlı ve serbest 3-MCPD mg/kg**	**Toplam 2-MCPD mg/kg**	**Glisidil mg/kg**
Palm	0.193±0.032	0.098±0.025	0.071±0.036	0.314±0.072
Ayçicek	TED	TED	TED	TED
Soya	0.032±0.012	0.026±0.011	TED	0.037±0.023

*TED: Tespit edilemeyen değer

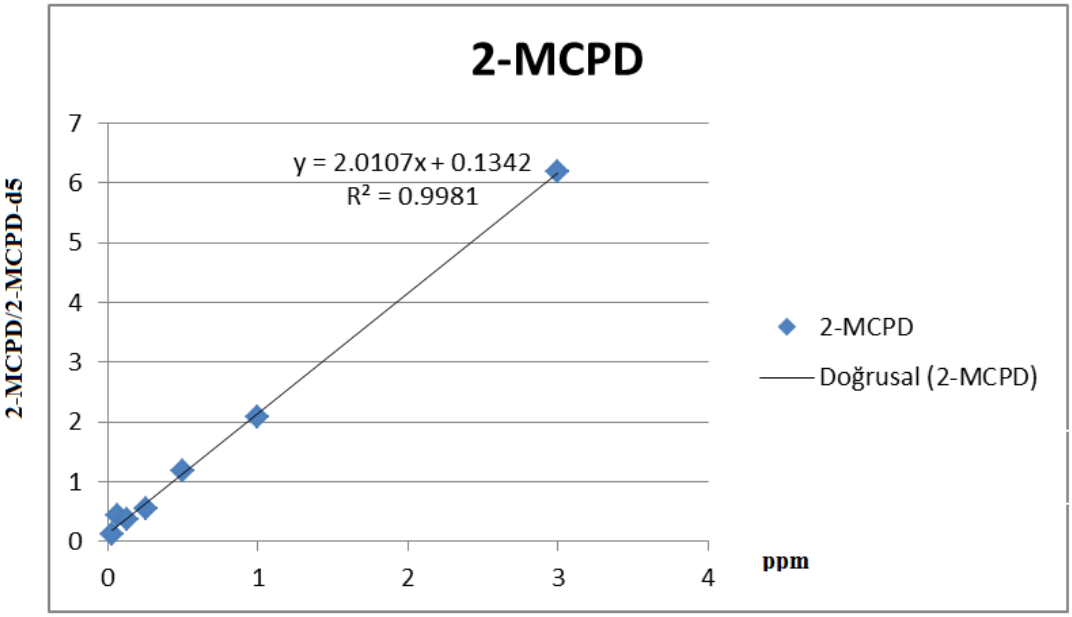
4.3.3. AOCS Resmi Cd 29c-13 Metoduna Göre 2-MCPD, 3-MCPD ve GE Miktar Tayinleri

MCPD ve GE türlerinin palm, soya ve ayçiçek yağındaki miktarlarının tespiti, 3-MCPD ve 2-MCPD için hazırlanan kalibrasyon eğrileri ile yapılmıştır. Kalibrasyon

eğrileri 3-MCPD için 0.06 ile 5 mg/L aralığındaki ve 2-MCPD için 0.03 ile 3 mg/L aralığındaki standartlar ile AOCS resmi metodu kullanılarak elde edilmiştir. Standart ve yağ numunelerindeki MCPD türlerinin tayininde konsantrasyonu 1mg/L olan serbest formdaki 3-MCPD-d5 ve 2-MCPD-d5 iç standardları kullanılmıştır. 3-MCPD için elde edilen kalibrasyon eğrisi **Şekil 4. 18**`de ve 2-MCPD için elde edilen kalibrasyon eğrisi **Şekil 4. 19**`de verilmiştir.

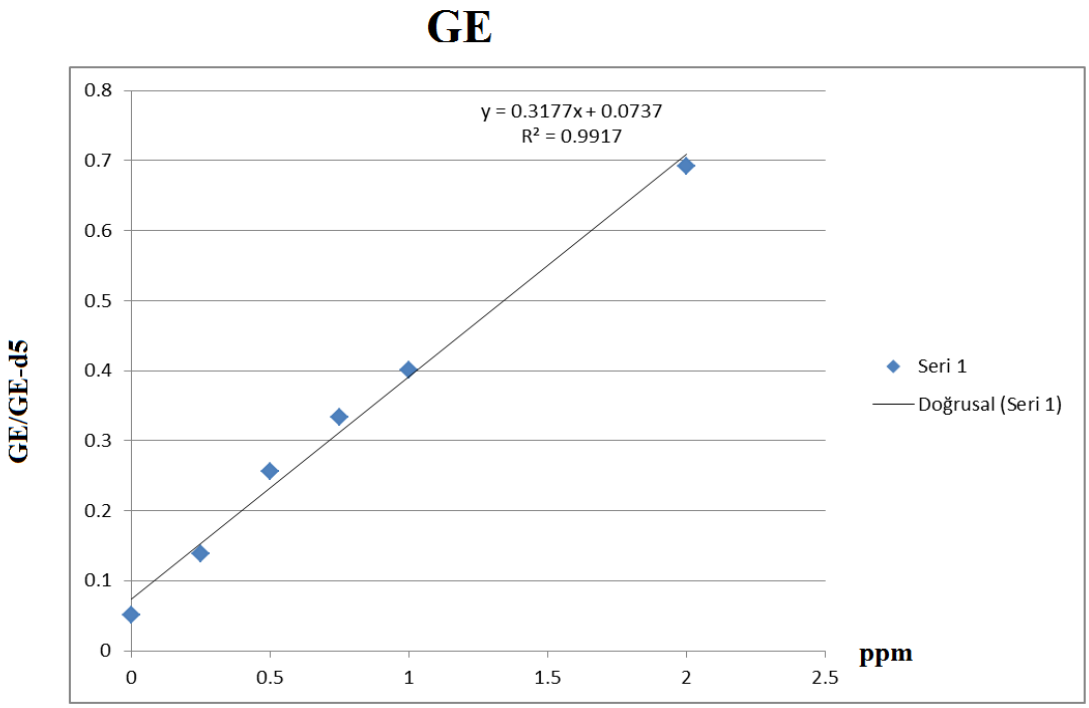


Şekil 4. 18 3-MCPD standartlarının kalibrasyon eğrisi



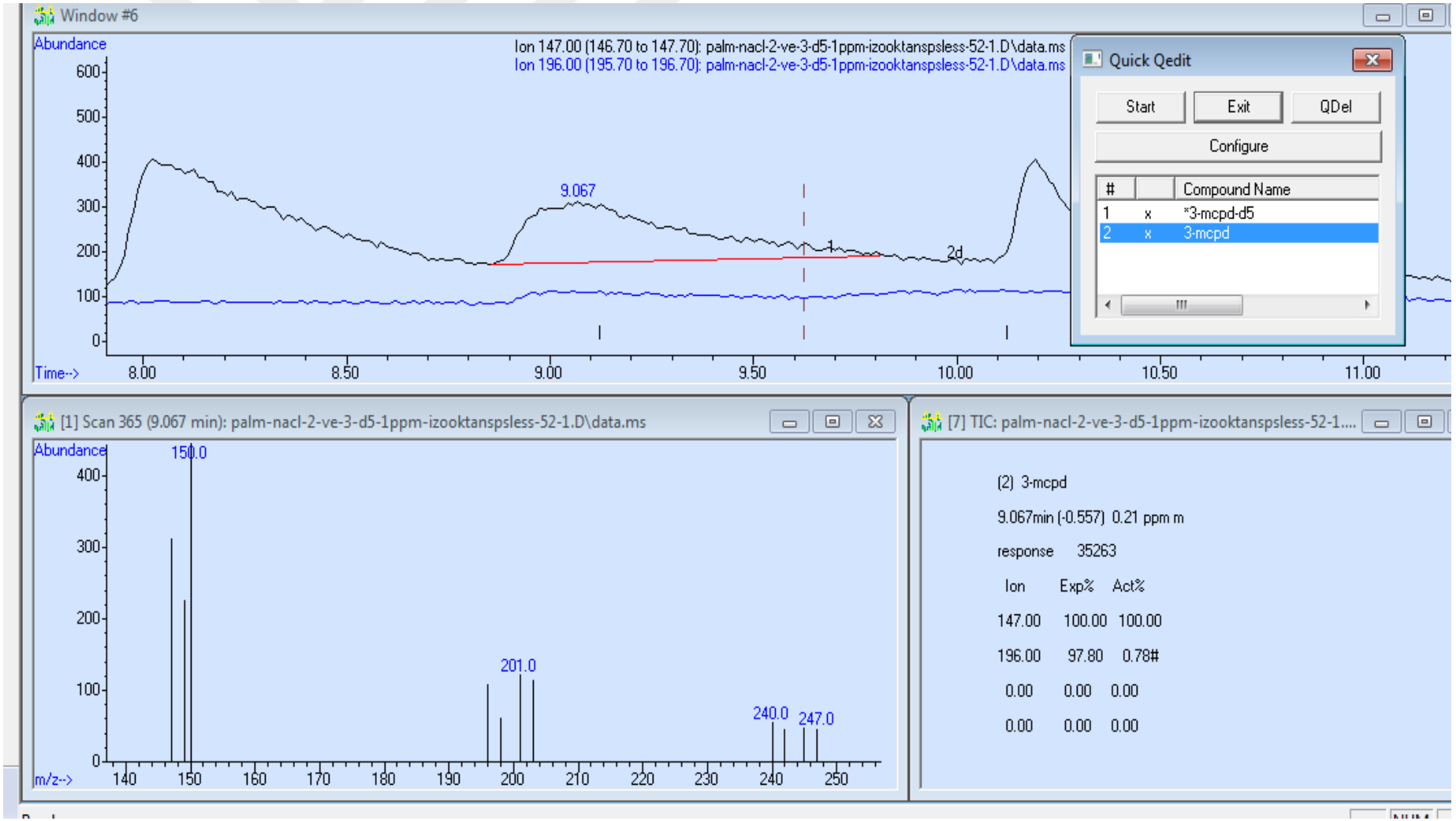
Şekil 4. 19. 2-MCPD standartlarının kalibrasyon eğrisi

AOCS`nin Cd 29c-13 resmi metodu kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde yağlarda bulunan GE miktarları, materyal metotta (başlık 3.10.4) verilen hesaplama yöntemine göre bulunmuştur. Toplam GE tayininde kullanılan standart ekleme metodunda standart ekleme aralığı 0.06 ile 0.75 mg/kg olarak belirlenmiştir. Hazırlanan numuneler Örnek 1 uygulamasına göre hidroliz edilmiş ve türevlendirilerek GC/MS cihazına verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinde iç standart olarak konsantrasyonu 1mg/L olan GE-Palmitat-d5 kullanılmıştır. Standart ekleme yöntemine ait kalibrasyon eğrisi **Şekil 4. 20**`de verilmiştir.

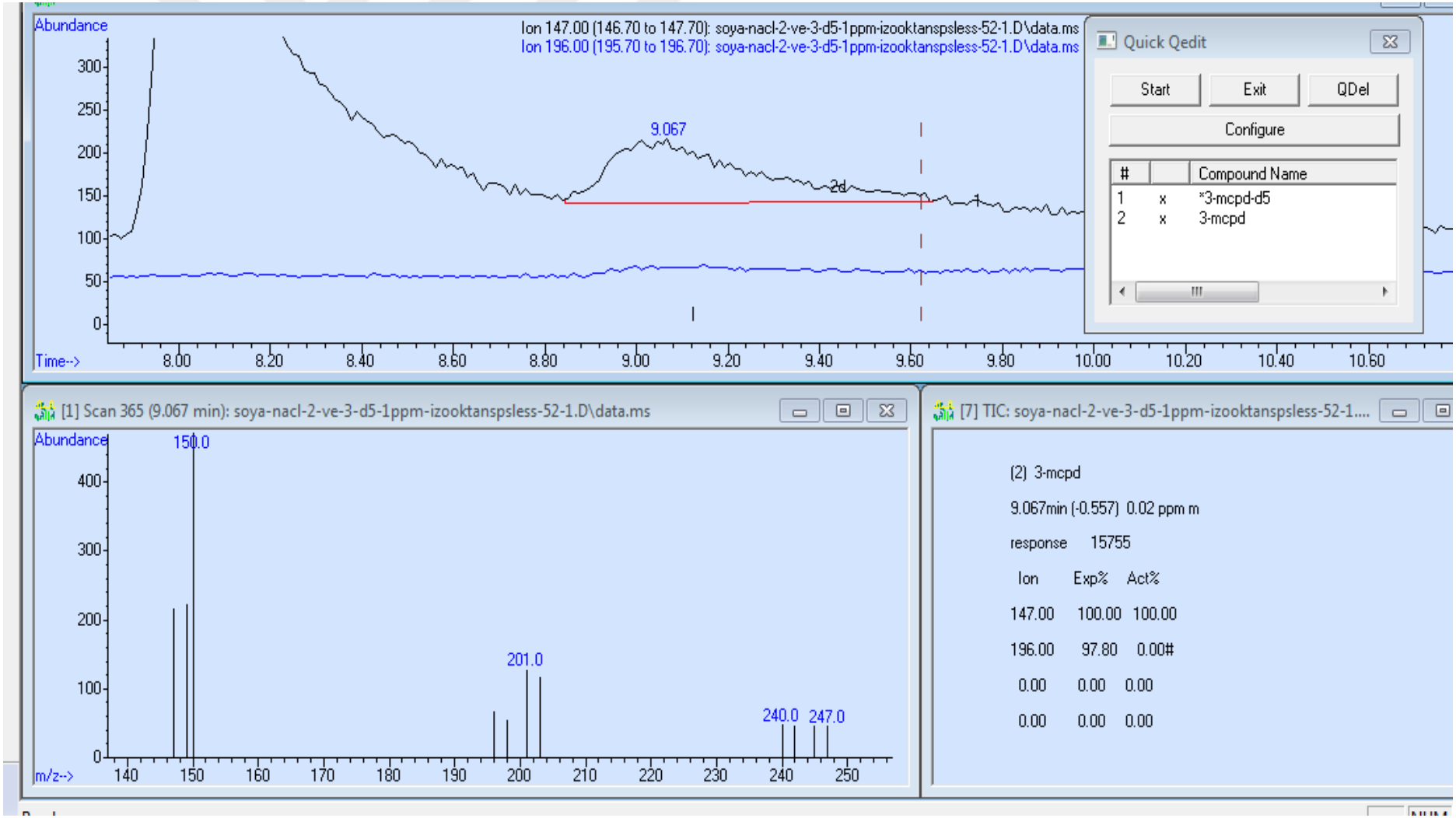


Şekil 4. 20 GE' in 3-MCPD'e dönüşüm faktörünü gösteren kalibrasyon eğrisi

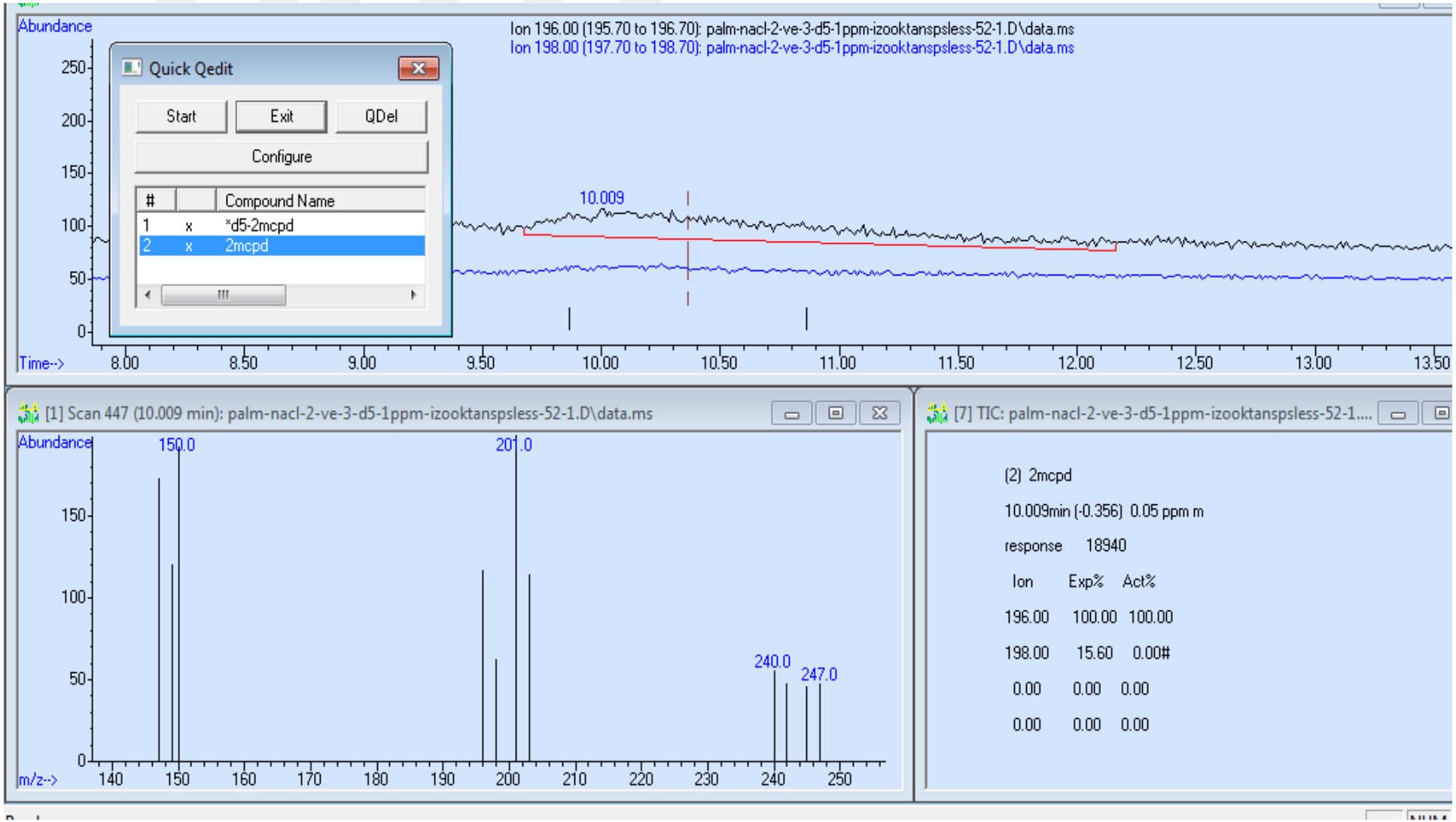
Palm ve soya yağında bulunan toplam 3-MCPD türüne ait kromatogramlar sırasıyla **Şekil 4. 21**`de ve **Şekil 4. 22**`da verilmiştir. Ayrıca palm yağında bulunan 2-MCPD türüne ait kromatogram **Şekil 4. 23**`de verilmiştir. Ayçiçek yağında MCPD ve GE ester türlerinin hiçbiri ve soya yağında 2-MCPD tespit edilememiştir.



Şekil 4. 21. Palm yağı için GC-MS 3-MCPD-PBA kromatogramı



Şekil 4. 22. Soya yağı için GC-MS 3-MCPD-PBA kromatogramı



Şekil 4. 23. Palm yağı için GC-MS 2-MCPD-PBA kromatogramı

AOCS Cd 29c-13 metoduna göre palm, soya ve ayçiçek yağında bulunan toplam 3-MCPD ve 2-MCPD, bağlı ve serbest 3-MCPD, toplam GE ester miktarları **Çizelge 4. 10**`da verilmiştir. MCPD ve GE türlerinin hepsi sadece palm yağında tespit edilmesine rağmen ayçiçek ve soya yağlarında sadece 3-MCPD tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 10. AOCS metoduna göre 2-MCPD, 3-MCPD ve GE sonuçları

	Toplam 3-MCPD mg/kg	**Bağlı ve Serbest 3-MCPD mg/kg**	**Toplam 2-MCPD mg/kg**	**Glisidil mg/kg**
Palm	0.219±0.022	-	0.057±0.014	-
Ayçicek	0.017±0.008	0.005±0.002	TED	0.036±0.023
Soya	0.026±0.012	-	TED	-

*TED: Tespit edilemeyen değer

Optimizasyonu yapılan bir metodun kullanılabilirlik kazanabilmesi için, metodun performansını ve üstünlüğünü gösteren validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesinin yanı sıra yeni metodun, standart bir metotla da istatistiksel olarak karşılaştırılması gerekmektedir (Ayyıldız, 2010). Bu sebeple geliştirilen Metot-3 metodu ile kullanılmakta olan standart AOCS metodu istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Metot-3 ve standart metot karşılaştırması yapılırken, t testi dikkate alınmış ve aşağıdaki formüller yardımıyla t değeri hesaplanmıştır. t değerinin hesaplanmasından sonra ise; serbestlik derecesine göre oluşturulmuş tablolardan kritik t değeri bulunmuş ve hesaplanan değerlerle karşılaştırılarak, hipotezlerden metodun uygunluğuna karar verilmiştir.

$$t = \frac{\bar{X}d - \mu_0}{Sd/\sqrt{N}}$$

t: t testi

$\bar{X}d$: Farkların Ortalaması

Sd: Farkların Standart Sapması

N: Farkları Sayısı

Metot 3 ve standart metot kullanılarak gerçekleştirilen palm, soya ve ayçiçeği yağlarında bulunan 2-MCPD, 3-MCPD ve GE tayinlerinden elde edilen verilerin karşılaştırılmasında aşağıdaki null alternatif hipotezleri kullanılmıştır.

H0: μ0 = 0
HA: μ0 ≠ 0

Oluşturulan hipotezlere göre; H0, Metot 3 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı olarak (%95 güven seviyesinde) bir fark olmadığını ileri sürerken, HA, Metot 3 ile standart metot verilerine ait ortalamalar arasında anlamlı bir fark olduğunu savunmaktadır.

İki metottan elde edilen deneysel verilerin kullanılmasıyla, hesaplanan t değeri: 0.13 olarak, kritik t değeri (tablodan) ise 3.18 olarak belirlenmiştir.

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, %95 güven seviyesinde H0 hipotezinin reddedilemeyeceği açıkça görülmektedir. Şöyle ki;

t hesaplanan: 0.13 < t kritik: 3.18 olduğundan hesaplanan t değeri, dağılım grafiğinde kabul bölgesine düşmektedir. Bu sebeple; H0: μ0 =0 olduğunu ileri süren H0 hipotezi reddedilemez, yani; Metot 3 ve standart metotlardan elde edilen veri gruplarının ortalaması birbirinden anlamlı olarak farklı değildir.

Çizelge 4. 11. 2-MCPD, 3-MCPD ve GE için GC-FID ve GC-MS sonuçları

Yağ Örneği	Geliştirilen Metot				AOCS Cd 29c-13			
	Toplam 3-MCPD mg/kg	Bağlı ve Serbest 3-MCPD mg/kg	Toplam 2-MCPD mg/kg	Glisidil mg/kg	Toplam 3-MCPD mg/kg	Bağlı ve Serbest 3-MCPD mg/kg	Toplam 2-MCPD mg/kg	Glisidil mg/kg
Palm	0.193±0.032	0.098±0.025	0.071±0.036	0.314±0.072	0.219±0.022	-	0.057±0.014	-
Ayçicek	TED	TED	TED	TED	0.017±0.008	0.005±0.002	TED	0.036±0.023
Soya	0.032±0.012	0.026±0.011	TED	0.037±0.023	0.026±0.012	-	TED	-

*TED: Tespit edilemeyen değer

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında, son yıllarda pek çok tartışmaya sebep olmuş ve insan sağlığını tehdit eden; 2-MCPD, 3-MCPD ve GE'lerin rafine yağlardaki miktarlarını tespit etmek amacıyla yeni bir gaz kromatografisi metodu geliştirilmiştir. Literatürde ve standart metotlarda yer alan yöntemlerde 2-MCPD, 3-MCPD ve GE türlerinin tespiti için bu türlerin serbest forma dönüştürülmesi ve uygun bir türevlendirme reaktifi ile türevlendirildikten sonra uçucu hale getirilmeleri esas alınmaktadır. Standart metotlarda türevlendirme reaktifi olarak sıklıkla fenil boronik asit kullanılırken BSTFA, HFBI ve TsOH gibi reaktiflerde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ise; rafine yağlarda bulunan 2-MCPD, 3-MCPD ve GE türlerinin analizlerinde türevlendirme reaktifi olarak BSTFA kullanılmış ve türevlendirme işlemi için çözücü ve reaktif konsantrasyonu optimize edilerek yeni bir gaz kromatografi metodu geliştirilmiştir.

BSTFA ile yapılan türevlendirme işlemlerinde piridin, aseton, asetonitril ve etil asetat çözücüleri kullanılmış ve GC-FID`de kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatografik sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda analit piki çıkış zamanında sadece etil asetat çözücüsünün pik vermediği piridin, aseton ve asetonitril çözücülerinin pik verdiği gözlenmiştir. Çözücü optimizasyonundan elde edilen sonuçları doğrulamak için GC-FID sisteminde kullanılan metot, GC-MS sisteminde kullanılmış ve scan modda tarama yapılmıştır. GC-MS'de de analit çıkış zamanında etil asetata ait herhangi bir pik gözlenmemiştir.

Yağlarda bulunan MCPD türlerinin türevlendirilmesinde gerekli olan eşdeğer miktarda BSTFA reaktifi ilavesi için; 20-100 µL aralığındaki farklı hacimlerde BSTFA reaktifi MCPD standartları üzerine ilave edişmiş ve türevlendirme işlemi için 70 µL`nin uygun olduğu gözlenmiştir.

Hızlı, basit, kararlı, güvenilir ve maliyeti düşük sistemler kullanılarak bir türün analiz edilmesi kromatografik yöntemler açısından çok önemlidir. Literatürde ve standart metotlarda genel olarak kurulum maliyeti yüksek olan kütle spektrometresi yöntemleri kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen bu çalışmada; kurulum maliyeti düşük olan GC-FID sistemi kullanılarak 2-MCPD, 3-MCPD ve GE türleri analiz edilmiştir. Analizlerde 14 adet metot kullanılmış ve en uygun k`, α, N, Rs değerlerine sahip Metot-3, çalışmalarda kullanılmıştır. Ayrıca geliştirilen yeni metot için validasyon çalışmaları

yapılmış ve kesinlik, doğruluk, seçicilik, doğrusallık, LOD ve LOQ değerlerinin yanı sıra literatürde yer alan standart bir metot ile karşılaştırma yapılarak t testi incelenmiştir.

Seçilen yağ numunelerinde bulunan 2-MCPD, 3-MCPD ve GE türleri için hem geliştirilen ve validasyonu yapılan yöntem hem de standart metot ile analizler yapılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; BSTFA ile türevlendirme işleminin ve geliştirilen kromatografik yöntemin standart metotların yerine kullanılabileceği gözlenmiştir.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında, 2-MCPD, 3-MCPD ve GE türlerinin analizi için hızlı, basit, kararlı, güvenilir, maliyeti düşük ve şimdiye kadar etkin bir biçimde kullanılmamış GC-FID yöntemi geliştirilmiş; elde edilen veriler, bu yöntemin rafine yağlar ve birçok gıda ürününde uygulanabileceğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

Abraham, K., Appel, K. E., Berger-Preiss, E., Apel, E., Gerling, S., Mielke, H., Creutzenberg, O. ve Lampen, A., 2013, Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats, *Archives of toxicology*, 87 (4), 649-659.

AOCS, J., 2013, JOCS Official Method Cd 29c-13: Fatty-acidbound 3-chloropropane-1, 2, diol (3-MCPD) and 2, 3-epoxi-propane-1-ol (glycidol), Determination in Oils and Fats by GC/MS (Differential Measurement), *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 3rd printing*, 2014.

Authority, E. F. S., 2013, Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment, *EFSA Journal*, 11 (9), 3381.

Ayyıldız, H. F., 2010, Improvement of oil analysis methods by automated flow injection systems, *selcuk university*, konya, 442.

Bakhiya, N., Abraham, K., Gürtler, R., Appel, K. E. ve Lampen, A., 2011, Toxicological assessment of 3-chloropropane-1, 2-diol and glycidol fatty acid esters in food, *Molecular nutrition & food research*, 55 (4), 509-521.

Barocelli, E., Corradi, A., Mutti, A. ve Petronini, P., 2011, Scientific report submitted to EFSA:"Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters in a 90-day toxicological study", *European Food Safety Authority. http://www. efsa. europa. eu/de/supporting/pub/187e. htm*.

Başoğlu, F., 2006, Yemeklik Yağ Teknolojileri. Nobel Yayın No: 956 Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi: 33, *Basım. Ankara*, 349.

Calta, P., Velíšek, J., Doležal, M., Hasnip, S., Crews, C. ve Réblová, Z., 2004, Formation of 3-chloropropane-1, 2-diol in systems simulating processed foods, *European Food Research and Technology*, 218 (6), 501-506.

Chung, W.-c., Hui, K.-y. ve Cheng, S.-c., 2002, Sensitive method for the determination of 1, 3-dichloropropan-2-ol and 3-chloropropane-1, 2-diol in soy sauce by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 952 (1-2), 185-192.

Crews, C., Chiodini, A., Granvogl, M., Hamlet, C., Hrnčiřík, K., Kuhlmann, J., Lampen, A., Scholz, G., Weisshaar, R. ve Wenzl, T., 2013, Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (1), 11-45.

De Greyt, W., 2013, Edible oil refining: Current and future technologies, *Edible Oil Processing*, 127-151.

Dubois, M., Tarres, A., Goldmann, T., Empl, A. M., Donaubauer, A. ve Seefelder, W., 2012, Comparison of indirect and direct quantification of esters of monochloropropanediol in vegetable oil, *Journal of Chromatography A*, 1236, 189-201.

EFSA, 2016, Risks for human health related to the presence of 3-and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food, *EFSA Journal*, 14 (5), e04426.

El-Mallah, M. H., El-Shami, S. M., Hassanien, M. M. M. ve Abdel-Razek, A. G., 2011, Effect of chemical refining steps on the minor and major components of cottonseed oil, *Agric. Biol. JN Am*, 2, 341-349.

Ermacora, A. ve Hrncirik, K., 2013, A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90 (1), 1-8.

Ermacora, A. ve Hrncirik, K., 2014, Influence of oil composition on the formation of fatty acid esters of 2-chloropropane-1, 3-diol (2-MCPD) and 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) under conditions simulating oil refining, *Food chemistry*, 161, 383-389.

Ermacora, A. ve Hrnčiřík, K., 2014, Development of an analytical method for the simultaneous analysis of MCPD esters and glycidyl esters in oil-based foodstuffs, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31 (6), 985-994.

Franke, K., Strijowski, U., Fleck, G. ve Pudel, F., 2009, Influence of chemical refining process and oil type on bound 3-chloro-1, 2-propanediol contents in palm oil and rapeseed oil, *LWT-Food Science and Technology*, 42 (10), 1751-1754.

Fry, H., Schödel, C., These, A. ve Preiß-Weigert, A., 2013, Collaborative study for the determination of 3-MCPD-and 2-MCPD-fatty acid esters in fat containing foods, *Federal Institute for Risk Assessment (BfR): Berlin, Germany*.

Garballo-Rubio, A., Soto-Chinchilla, J., Moreno, A. ve Zafra-Gómez, A., 2017, A novel method for the determination of glycidyl and 3-monochloropropanediol esters in fish oil by gas chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta*, 165, 267-273.

González, A. G. ve Herrador, M. Á., 2007, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (3), 227-238.

Hamlet, C. G., 1998, Analytical methods for the determination of 3-chloro-1, 2-propandiol and 2-chloro-1, 3-propandiol in hydrolysed vegetable protein, seasonings and food products using gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry, *Food Additives & Contaminants*, 15 (4), 451-465.

Hamlet, C. G. ve Sadd, P. A., 2009, Chloropropanols and chloroesters, Hoboken, NJ: Wiley, p.

Hamlet, C. G., Asuncion, L., Velíšek, J., Doležal, M., Zelinková, Z. ve Crews, C., 2011, Formation and occurrence of esters of 3-chloropropane-1, 2-diol (3-CPD) in foods: What we know and what we assume, *European journal of lipid science and technology*, 113 (3), 279-303.

Hori, K., Koriyama, N., Omori, H., Kuriyama, M., Arishima, T. ve Tsumura, K., 2012, Simultaneous determination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *LWT-Food Science and Technology*, 48 (2), 204-208.

Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L. ve Grasl-Kraupp, B., 2018, Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters, *EFSA Journal*, 16 (1).

Küsters, M., Bimber, U., Ossenbrüggen, A., Reeser, S., Gallitzendörfer, R. ve Gerhartz, M., 2010, Rapid and simple micromethod for the simultaneous determination of 3-MCPD and 3-MCPD esters in different foodstuffs, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (11), 6570-6577.

Li, C., Zhou, Y., Zhu, J., Wang, S., Nie, S. ve Xie, M., 2016, Formation of 3-chloropropane-1, 2-diol esters in model systems simulating thermal processing of edible oil, *LWT-Food Science and Technology*, 69, 586-592.

Li, H., Chen, D., Miao, H., Zhao, Y., Shen, J. ve Wu, Y., 2015, Direct determination of fatty acid esters of 3-chloro-1, 2-propanediol in edible vegetable oils by isotope dilution-ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1410, 99-109.

Liu, W.-y., 2012, Development and validation of an improved method for determination of chloropropanols in paperboard food packaging by GC-MS, *Rutgers University-Graduate School-New Brunswick*.

Lynch, B. S., Bryant, D. W., Hook, G. J., Nestmann, E. R. ve Munro, I. C., 1998, Carcinogenicity of monochloro-1, 2-propanediol (α-chlorohydrin, 3-MCPD), *International Journal of Toxicology*, 17 (1), 47-76.

Macit, S. ve Şanlıer, N., 2014, Palm Yağı ve Sağlık (Palm Oil and Health), *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 13, 20.

Matthäus, B. ve Pudel, F., 2013, Mitigation of 3-MCPD and glycidyl esters within the production chain of vegetable oils especially palm oil, *Lipid Technology*, 25 (7), 151-155.

Meierhans, D., Bruehlmann, S., Meili, J. ve Taeschler, C., 1998, Sensitive method for the determination of 3-chloropropane-1, 2-diol and 2-chloropropane-1, 3-diol by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 802 (2), 325-333.

Nas, S. ve Gökalp, H. Y., 2001, Bitkisel yağ teknolojisi, Atatürk Üniversitesi Yayınları, p.

Nyman, P., Diachenko, G. ve Perfetti, G., 2003, Survey of chloropropanols in soy sauces and related products, *Food additives and contaminants*, 20 (10), 909-915.

Önal, B., Özdikicierler, O. ve Yemişçioğlu, F., 2016, Türkiye Piyasasında Satışa Sunulan Patates Cipslerinde 3-MCPD Esterleri ve Glisidil Esterleri Miktarları.

Racamonde, I., González, P., Lorenzo, R. ve Carro, A., 2011, Determination of chloropropanols in foods by one-step extraction and derivatization using pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218 (39), 6878-6883.

Rétho, C. ve Blanchard, F., 2005, Determination of 3-chloropropane-1, 2-diol as its 1, 3-dioxolane derivative at the μg kg− 1 level: application to a wide range of foods, *Food additives and contaminants*, 22 (12), 1189-1197.

Sagırlı, O., 2016, Validasyon. Istanbul.

Samaras, V. G., Giri, A., Zelinkova, Z., Karasek, L., Buttinger, G. ve Wenzl, T., 2016, Analytical method for the trace determination of esterified 3-and 2-monochloropropanediol and glycidyl fatty acid esters in various food matrices, *Journal of Chromatography A*, 1466, 136-147.

Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G., Scanlan, F. ve Stadler, R., 2008, Esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD, *Food Additives and Contaminants*, 25 (4), 391-400.

Stadler, R. H., 2015, Monochloropropane-1, 2-diol esters (MCPDEs) and glycidyl esters (GEs): an update, *Current Opinion in Food Science*, 6, 12-18.

Steenbergen, H., Hrnčiřík, K., Ermacora, A., de Koning, S. ve Janssen, H.-G., 2013, Direct analysis of intact glycidyl fatty acid esters in edible oils using gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1313, 202-211.

Taşan, M. ve Geçgel, Ü., 2007, Bitkisel Karışım Sıvı Yağların Yağ Asiti Bileşimlerinin İncelenmesi.

Topkafa, M., 2013, Investigation Of Refining Properties For Edible Pomegranate Seed Oil, *Selcuk University*, KONYA, 184.

Van Bergen, C., Collier, P., Cromie, D., Lucas, R., Preston, H. ve Sissons, D., 1992, Determination of chloropropanols in protein hydrolysates, *Journal of Chromatography A*, 589 (1-2), 109-119.

Velíšek, J., Davidek, J., Hajšlová, J., Kubelka, V., Janíček, G. ve Mánková, B., 1978, Chlorohydrins in protein hydrolysates, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 167 (4), 241-244.

Xu, X., Ren, Y., Wu, P., Han, J. ve Shen, X., 2006, The simultaneous separation and determination of chloropropanols in soy sauce and other flavoring with gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical and electron impact ionization modes, *Food additives and contaminants*, 23 (2), 110-119.

Yamazaki, K., Ogiso, M., Isagawa, S., Urushiyama, T., Ukena, T. ve Kibune, N., 2013, A new, direct analytical method using LC-MS/MS for fatty acid esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD esters) in edible oils, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (1), 52-68.

Zelinková, Z., Svejkovská, B., Velíšek, J. ve Doležal, M., 2006, Fatty acid esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in edible oils, *Food Additives and Contaminants*, 23 (12), 1290-1298.

Zulkurnain, M., Lai, O. M., Tan, S. C., Abdul Latip, R. ve Tan, C. P., 2013, Optimization of palm oil physical refining process for reduction of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) ester formation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (13), 3341-3349.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :	Muhammed Raşit BAKIR
Uyruğu :	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi :	Çubuk/ANKARA-1993
Telefon :	5344072136
Faks :	
e-mail :	rasitbkr@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise :	Çubuk Anadolu End. Mes. Lisesi Çubuk ANKARA	2011
Üniversite :	Selçuk Üniversitesi Selçuklu KONYA	2015
Yüksek Lisans :		
Doktora :		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR