

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**UN VE UNLU MAMULLERDE L-SİSTEİN TESPİTİNE YÖNELİK
KROMOTOGRAFİK VE SPEKTROSKOPİK METOTLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

AYŞEN DEVELİOĞLU ARSLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN SAĞDIÇ
EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. CANAN EKİNCİ DOĞAN**

İSTANBUL, 2016

Bu yüksek lisans tez çalışması, TÜBİTAK 115O065 numaralı “Helal Gıda Denetimde Jelatin, Glutamat ve L-sisteinin Kaynağına Yönelik Hızlı, Ekonomik ve Pratik Tespit Metotlarının Geliştirilmesi, Uygulanması ve Yaygınlaştırılması” isimli 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olup ı ışık tutan değerli hocam Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ' a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesine ve yüksek lisans eğitimime 1150065 numaralı proje ile destek sağlayan TÜBİTAK'a ve her türlü bilgi ve birikimlerini paylaşp tezimin şekillenmesi ve oluşmasında bana yön veren, farklı çalışma alanlarında bulunmamda imkân ve kolaylık sağlayıp emeklerini esirgemeyen TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü başuzman araştırmacılarından değerli hocam Doç. Dr. Canan EKİNCİ DOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

TÜBİTAK'taki çalışmalarım boyunca benimle tecrübelerini, birikimlerini ve bilgilerini paylaşan ve bana maddi manevi desteğini esirgemeyen TÜBİTAK MAM Çevre Enstitüsü araştırmacılarından değerli Elmas ÖKTEM OLGUN'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK'taki proje çalışmalarım süresince bana kendi bilgi ve tecrübelerini aktarıp her konuda yardımcı olan değerli TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü uzman araştırmacılarından Dr. Mediha Esra YAYLA'ya, Dr. Mustafa YAMAN'a ve Tarık ÖZTÜRK'e ve gerek laboratuvar çalışmalarında gerek çalışmam süresince bana yardımcı olan bilgilerini esirgemeyen Serkan SAVSAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen bana her konuda yardımcı olan ve bilgilerini aktaran proje vasıtasıyla beraber çalışma imkânı bulmaktan mutluluk duyduğum sevgili proje arkadaşım Nur ÇEBİ'ye teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana destek olan ve güvenen dünyadaki en büyük şansım olan sevgisi sonsuz kıymetli ailem, canım annem Nurhayat DEVELİOĞLU'na, en büyük dayandığım destekçim canım babam Mehmet DEVELİOĞLU'na, sevgili kardeşim Selim DEVELİOĞLU'na ve hayatımı paylaştığım sevgili eşim Hasan Semih ARSLAN'na kucak dolusu sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ve tabiki hayatımı anlamlı kılan, sevgilerini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim bana güzel anılar bırakan kıymetli dostlarım ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Aralık, 2016

Ayşen DEVELİOĞLU ARSLAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 L-sistein Tanımı ve Önemi.....	1
1.1.2 L-sisteinin Tarihi ve Üretimi	3
1.1.3 L-sistein Kullanım Alanları ve Fonksiyonları	4
1.1.4 Buğday Unu ve L-sistein	5
1.1.5 L-Sistein Mevzuat ve Helal Durumu.....	8
1.1.6 L-Sisteinin Tespitine Yönelik Literatür Çalışmaları	8
1.1.7 Kromotografik Metotlar	9
1.1.7.1 LC-MS/MS Tanımı ve Sistemi	9
1.1.8 Spektroskopik Metotlar	10
1.1.8.1 Raman Spektroskopisi Tanımı ve Sistemi	10
1.2 Tezin Amacı.....	11
1.3 Hipotez.....	11
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
2.1 Laboratuvar Ölçekli L-Sistein Üretimi Materyal ve Yöntem.....	13
2.1.1 Kullanılan Numuneler	13
2.1.2 Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	13
2.1.3 Kullanılan Kimyasallar.....	13
2.1.4 Laboratuvar Ölçekli L-Sistein Üretimi.....	14
2.2 LC-MS/MS Materyal ve Yöntem	15
2.2.1 L-Sistein Standartları.....	15
2.2.2 Un Numuneleri	15
2.2.3 Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	16
2.2.4 Kimyasal Maddeler	17

2.2.5	Standart L-sistein Çözeltilerinin Hazırlanması	18
2.2.6	Laboratuvar Ölçekli Üretilen L-sisteinlerin LC-MS/MS için Ön Hazırlığı.....	19
2.2.7	Buğday Unu ve Unlu Mamullerin Hazırlanması.....	20
2.2.8	Örnek MS Optimizasyonu	20
2.2.9	LC-MS/MS için Metot Validasyon Çalışmaları.....	21
2.2.10	LS-MS/MS Çalışma Şartları.....	23
2.2.10.1	HPLC Şartları.....	23
2.2.10.2	MS Şartları	24
2.3	Raman Spektroskopi Materyal ve Yöntem	25
2.3.1	Kullanılan Standart ve Numuneler	25
2.3.2	Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	25
2.3.3	Örnek Hazırlanması.....	26
2.3.4	Raman Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi	26
2.4	Kemometrik Yöntem	27
BÖLÜM 3		
BULGULAR VE TARTIŞMA		29
3.1	LC-MS/MS Bulgular	29
3.1.1	Numune Konsantrasyon Hesaplamaları	42
3.1.2	Raman Bulgular Sonuçlar.....	48
3.1.3	Kemometrik İnceleme	51
BÖLÜM 4		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		56
KAYNAKLAR		58
ÖZGEÇMİŞ		62

SİMGE LİSTESİ

$\bar{x}$	Aritmetik ortalama
c	Serinin aritmetik ortalaması
C	Analit konsantrasyonu
C _{pratik}	Standart örnek gerçek konsantrasyon
C _T	Kalibrasyon eğrisinden bulunan derişim
C _{teorik}	Standart örnek ölçülen konsantrasyon
F	Seyreltme faktörü
n	Deney sayısı
S _r	Tekraredilebilirlik limiti
w	İki çalışma arasındaki fark

KISALTMA LİSTESİ

%RSD	Yüzde bağıl standart sapma
%RSD _r	Tekrarüretilebilirlik yüzdesi
µL	Mikrolitre
CE	Collision energy- Çarpışma enerjisi
CH ₃ COOH	Asetikasit
cm ⁻¹	Dalga sayısı
CXP	Collision Exit Potantial-Çarpışma çıkış potansiyeli
dk	Dakika
DP	Declustering Potential- Kümelenme potansiyeli
EP	Entrance Potantial-Giriş Potansiyeli
g	Gram
g/mol	Gram/mol Moleküler ağırlık
HCA	Hiyerarşik kümeleme analizi
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IR-MS	İzotop Oran-Kütle Spektrometresi
kg	Kilogram
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi – Kütle/Kütle Spektrometresi
LOD	Minimum tespit sınırı
LOQ	Minimum tayin sınırı
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
PCA	Temel Bileşen Analizi
HCA	Hiyerarşik Kümeleme Analizi
ppm	Milyonda bir birim
sn	Saniye
V	Volt
TGK	Türk Gıda Kodeksi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 L-sistein yapısı.....	2
Şekil 1.2 Sistin yapısı.....	2
Şekil 2.1 L-sistein üretim akış şeması	15
Şekil 2.2 LC-MS/MS (ESI) AB Sciex 4000 Q Trap cihazı	17
Şekil 2.3 Renishaw Raman Mikroskop.....	26
Şekil 3.1 Sistin (A) ve L-sistein (B) LC-MS/MS kromotogramı	30
Şekil 3.2 Sistin LC-MS/MS kütle spektrumu	30
Şekil 3.3 L-sistein LC-MS/MS kütle spektrumu	31
Şekil 3.4 Sistin kalibrasyon eğrisi.....	33
Şekil 3.5 L-sistein kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 3.6 (A) L-sistein ve buğday ununa ait Raman spektrumu, (B) L-sistein, buğday unu ve tağşişli örneğe ait Raman spektrumları	50
Şekil 3.7 Raman mikroskop ile elde edilen canlı video görüntüleri ve spektrum noktaları (A) WF1, (B) WF2, (C) WF3, (D) WF4, (E) WF5	51
Şekil 3.8 (A) Katkısız ve L-sistein ilave edilmiş örneklere ait üç boyutlu temel bileşen analizi grafiği, (B) Katkısız ve L-sistein ilave edilmiş örneklere ait iki boyutlu temel bileşen analizi grafiği, (C) Birinci türev ve vektör normalizasyonu ön işlemi görmüş spektrumlar	53
Şekil 3.9 Katkısız ve L-sistein ilavesi yapılmış un numunelerine ilişkin hiyerarşik sınıflandırma analizi dendrogramı	54
Şekil 3.10 GADA metodu kullanılarak hesaplanan üç temel bileşene (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği	55

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 İnsan saçı ve diğer hayvan tüylerindeki sistin miktarı	4
Çizelge 1.2 Buğday unları ve gıda amaçlı buğday kepeğine ait kimyasal özellikler.	6
Çizelge 1.3 Buğday, un ve ekmeğin aminoasit kompozisyonu (100 g buğdayda).....	7
Çizelge 2.1 Standart türevlendirilmiş L-sistein ve sistin konsantrasyonları.....	19
Çizelge 2.2 Laboratuvar ortamında üretilen L-sisteinler	19
Çizelge 2.3 LC çalışma şartları.....	23
Çizelge 2.4 MS/MS çalışma şartları	24
Çizelge 2.5 MS/MS ayarları; ana iyon, parçalanma iyonları ve voltaj değerleri tablosu	24
Çizelge 3.1 Sistin konsantrasyon değerlerine karşılık gelen alanlar ve konsantrasyonlar	32
Çizelge 3.2 Standart sistinin ortalama konsantrasyon alanları	33
Çizelge 3.3 L-sistein konsantrasyon değerlerine karşılık gelen alanlar ve konsantrasyonlar	34
Çizelge 3.4 Standart L-sistien ortalama konsantrasyon alanları.....	35
Çizelge 3.5 Sistin LOD VE LOQ değerleri	37
Çizelge 3.6 L-sistein LOD VE LOQ değerleri	38
Çizelge 3.7 Sistin Tekraredilebilirlik ve Tekrarüretilebilirlik çalışmaları.....	40
Çizelge 3.8 L-sistein Tekraredilebilirlik ve Tekrarüretilebilirlik çalışmaları.....	41
Çizelge 3.9 Buğday unları sistin değerleri.....	44
Çizelge 3.10 Buğday unları L-sistein değerleri	45
Çizelge 3.11 Buğday unlarının L-sistein ve sistin değerlerinin toplamı.....	46
Çizelge 3.12 Laboratuvar ortamında üretilen L-sisteinlerin sistin değerleri	46
Çizelge 3.13 Laboratuvar ortamında üretilen L-sisteinlerin L-sistein değerleri.....	47
Çizelge 3.14 Ticari ürün L-sistein ve sistin yüzdeleri	47

ÖZET

UN VE UNLU MAMULLERDE L-SİSTEİN TESPİTİNE YÖNELİK KROMOTOGRAFİK VE SPEKTROSKOPİK METOTLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Ayşen Develioğlu Arslan

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş Danışman: Doç. Dr. Canan EKİNCİ DOĞAN

L-sistein doğadaki yirmi aminoasitten biri olan esansiyel olmayan ve son yıllarda popüler bir aminoasittir. L-sistein gıda, ilaç ve kozmetik alanları olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Gıda sanayindeki uygulamalardan biri aromadaki kullanımıdır. Özellikle bitkisel gıdalarda ete lezzet vermek için kullanılmaktadır L-sistein, aynı zamanda, bir hamur geliştirici un katkı maddesidir. Fırıncılık işlemlerinde işlem yardımcısı olarak kullanılır. Türk Gıda Kodeksinde (TGK) ekmeklik unlarda kullanımı yasak olan L-sistein'in bazı unlara taşıyıcı olarak katıldığı düşünülmektedir. Ayrıca L-sistein ile ilgili en önemli sorun üretimi sırasında kullanılan hammaddenin kökenidir. L-sistein özellikle uzak doğuda insanların ve hayvanların saç, kıl, tüy ve toynaklarından hidroliz ile elde edilgi bilinmektedir. L-sistein ekmeklik unlara taşıyıcı olarak katılmaktadır.

Bu çalışma L-sisteinin laboratuvar ölçekte üretimi ve Raman Spektroskopisi ve LC-MS/MS ile tespitine yönelik çalışmalarla ilgilidir. Çalışmada domuz kılı ve insan saç kullanılarak laboratuvar ölçekli L-sistein üretimi yapılmıştır. L-sistein ve dimer yapısı olan sistin için LC-MS/MS cihazı kullanılarak yeni metot geliştirilmiştir. Bu doğrultuda, sistem ve örnek optimizasyonları ve yöntem validasyonu yapılmıştır. Yirmibeş farklı buğday unundaki L-sistein ve sistin miktarları tespit edilmiş bununla

beraber sa ve domuz kılı kullanılarak laboratuvar ölçekli üretimi gerçekleştirilen L-sisteinlerin de sistin ve L-sistein yzdelereine bakılmıştır. Ayrıca piyasadan temin edilen iki farklı markaya ait pizza hamuru, lavaş ekmeği ve hamburger ekmeğinin L-sistein ve sistin miktarına LC-MS/MS ile bakılmıştır. Raman spektroskopisi ile buğday unlarına belirli miktarda (%0.5, 1, 2, 4) L-sistein katılıp Raman mikroskobunda görsel olarak tağşış tespiti sağlanmış ayrıca kemometrik olarak verilerin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak L-sistein ve sistinin kantitatif tespiti için LC-MS/MS cihazıyla metot geliştirilmiş, validasyonu gerçekleştirilip, gerçek numunelerde tespiti yapılmıştır. Raman spektroskopisi yöntemi ile buğday ununa dışarıdan tağşış amaçlı eklenen L-sisteinlerin tespiti hızlı, pratik ve %100 doğrulukta gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Raman verilerine uygulanan Kemometri alışmaları ile L-sisteinin farklı kökenden üretilmesi durumunda ayırt edilebilmesi konusunda da ilerleme sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: L-sistein, sistin, sa, domuz kılı, buğday unu, LC-MS/MS, Raman spektroskopisi, Kemometri, taklit/tağşış, hile.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SPECTROSCOPIC AND CHROMOTOGRAPHIC METHODS ON DETERMINATION OF L- CYSTEINE IN THE WHEAT FLOUR AND BAKERY PRODUCTS

Ayşen Develioğlu Arslan

Department of Food Engineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Co-Adviser: Assoc. Dr. Canan EKİNCİ DOĞAN

L-cysteine is a popular aminoacid which is non-essential and one of the twenty aminoacids in the nature. L-cysteine is used in many areas including food, pharmaceutical and personal care industries. Especially in food industries, one of its applications is the production of flavours such as the meat flavour in vegetarian food. L-cysteine is also used as a flour treatment agent and processing aids. According to Turkish Food Codex Regulation (TGK), addition of L-cysteine to the wheat flour is certainly forbidden by legal regulations; but, it is thought to be used in bread flour as fraud. Also, one of the main issue about L-cysteine is its origine of source. It's known that L-cysteine is known to be produced from human hair and animals' feathers, bristles and hooves with hydrolysis method especially in far east. L-cystein is added in flour as adulteration.

This study is about production of L-cystein in laboratory and the detection of it with Raman spectroscopy and LC-MS/MS chromatography methods. In this study, L-cysteine is produced in lab-scale by using human hair and pig bristle. A new method is developed for L-cysteine and its dimer structure in LC-MS/MS equipment. Accordingly, system and sample optimizations and method validations are performed

and also quantitative detection of L-cysteine and cystine are done. On the other hand, L-cysteine which is obtained from pig bristle and human hair in laboratory is analyzed. Additionally, pizza dough, pita bread and hamburger bread from two different brands are evaluated with respect to their L-cysteine and cystine amounts in LC-MS/MS. Certain amounts of L-cysteine (%0.5, 1, 2, 4) is added to wheat flour and the adulteration is analysed with Raman spectroscopy and visually through the Raman microscope; besides, Raman data is evaluated by using chemometrics methods.

In conclusion, a new method is developed and validated with LC-MS/MS for the quantitative detection of L-cysteine and cystine; and, in commercial product, L-cysteine and cystine are detected and quantitated. On the other hand, adulterated flour samples were perfectly discriminated with respect to their L-cysteine contents using Raman microscopy; therefore, rapid, effective, 100% accurate method is developed for the detection of L-cysteine in wheat flour using Raman spektroskopy. Besides, Raman spectroscopy technique combined with Chemometrics for L-cysteine detection in wheat flour is further improved for detecting L-cysteine produced from different sources of origin.

Key Words: L-cysteine, cystine, hair, pig bristle, wheat flour, LC-MS/MS, Raman spectroscopy, Chemometrics, adulteration.

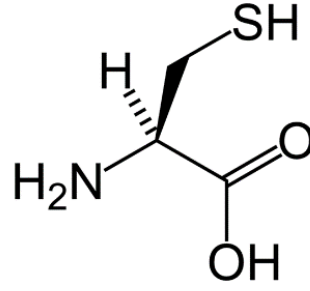
1.1 Literatür Özeti

L-sistein son yıllarda dikkatleri üzerine çeken bir gıda katkı maddesidir. L-sisteinin çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunduğu ayrıca dışarıdan bazı işlenmiş ürünlere katkı olarak eklendiği bilinmektedir. L-sisteinin tespitine yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur.

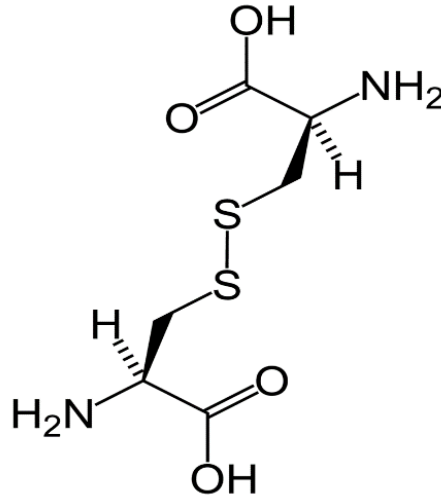
1.1.1 L-sistein Tanımı ve Önemi

L-sistein doğadaki mevcut proteinlerde bulunan ve proteinlerin temel yapıtaşı olan yirmi aminoasitten biridir [1]. L-sistein formu doğada bulunan ve bilinen halidir [1]. Temel olmayan (yarı gerekli) bir aminoasit olarak sınıflandırılıp, insan vücudu tarafından sentezlenebilir [1], [2]. L-sistein polar (hidrofilik), yüksüz ve içeriğinde tiyol (sülfidil) grubu içeren bir aminoasit olup, molekül formülü $C_3H_7O_2NS$ 'dir [1], [2], [3]. Tiyol grupları oksitlenme ya da indirgeme reaksiyonları yani redoks reaksiyonu vermektedir [1]. Oksitlendiğinde, L-sistein, bir disülfid bağı ile birleştirilmiş iki L-sistein birleşmesiyle sistini oluşturabilmektedir. Bu geri dönüşümlü reaksiyonla disülfid bağının indirgeme reaksiyonu iki L-sistein molekülünü yeniden yapılandırır [1].

L-sisteinin disülfid bağları pek çok protein yapısının tanımlanmasında önemli rol oynamaktadır [1], [2]. L-sistein amonyak ve asetik asitte çözünebilen, eter, aseton, benzen, karbon disülfür ve karbon tetraklorürde çözünemeyen renksiz kristal yapıda bulunan bir aminoasittir [1], [4].



Şekil 1.1 L-sistein yapısı [4]



Şekil 1.2 Sistin yapısı [7]

L-sistein, sert kabuklu yemişlerin, hububat, et, meyve ve sebzeler gibi birçok gıdanın doğal yapısında bulunmakta ve vücuda bu gıdalarla eksikliğinde alınabilmektedir [2]. L-sistein, besin kaynaklarından kümes hayvanları, buğday, brokoli, yumurta, kuşkonmaz, yanı sıra sarımsak, soğan, keçiyoynuzu ve kırmızı biber gibi çeşitli gıdalarda bulunmaktadır [1], [4]. Ayrıca birçok bitkisel ve hayvansal proteinlerin bileşeni olan, kıl, tüy, toynak ve yünde oldukça fazla miktarlarda bulunur [4].

L-sistein vücut metabolizmasında önemli yere sahiptir. L-sistein sülfür içeren bileşiklerin üretiminde rol almakla beraber, redoks potansiyeli sayesinde ağır metalleri bağlayarak detoks görevi yapmakta, vücudun protein bağlarındaki kararlılığı sağlamakta ve metabolizmada ikincil metabolit olarak görev yapmaktadır [2]. Özellikle metionin, tiamin, biotin, koenzim A, ve Fe/S (Demir/Kükürt) arasındaki dengenin kurulmasında vücut metabolizması için önemli yere sahiptir [2].

1.1.2 L-sisteinin Tarihi ve Üretimi

L-sistein 1810 yılında Wollaston tarafından böbrek taşından izole edildi [1]. Daha sonra çeşitli oranlarda bitkisel ve hayvansal proteinlerde bulundu. Ardından 1899'da hayvan boynuzundan izole edilmeye başlandı. İskelet, bağ doku ve sindirim enzimlerinde de bol miktarda keşfedildi [1], [2]. L-sisteinin hayvanların kıl, toynak, tüy ve pençelerinde oldukça fazla olduğu bulunmuştur [2].

L-sisteinin tahmini küresel pazardaki hacmi yılda 5000 tondur [1]. Değişik endüstrilerde kullanılan dünyada üretilen L-sisteinin yaklaşık %30'u onun türev formu olan N-asetilsistein ve S-karboksimetilsisteindir [1].

L-sisteinin endüstriyel üretiminde, keratin hidrolizi, enzimatik biyolojik dönüşüm, biyosentez ve fermentasyon yöntemleri kullanılmaktadır [1], [2].

Geleneksel yöntemle L-sistein, keratinden üretilmektedir. Keratince zengin, tavuk tüyleri, domuz kılları, hayvan toynakları veya pençeleri ve insan saçı gibi benzeri kaynaklardan elde edilmektedir [1], [2], [6]. İnsan saçının keratin açısından zengin, ucuz ve kolay bulunabilir olması L-sistein üretiminde tercih edilmesini sağlamaktadır [1]. İnsan saçında L-sistein oranı yaklaşık %6.6-14.5 arasında değişmektedir [7]. Saç veya tüyden asit çözeltileri ile ($\text{HCl} > \%20$) 100°C 'de 6 saat hidrolizle elde edilmektedir [8]. Yaklaşık 1 ton saçtan yaklaşık 100 kg sistein elde edilebilmektedir [8].

Asya'da özellikle Çin, insan saçından ve domuz kılından hidroliz yoluyla sistein üreten büyük bir pazara sahiptir [1]. Üretilen bu metot, kolay olmasına karşın üretim prosesinin bazı aşamalarında kötü koku gibi problemler ortaya çıkarmaktadır [1], [6]. Japonya ve Almanya sistein için diğer iki büyük üretici ülke olarak bilinmektedir. Bu ülkeler insan ve hayvan kökenli olmayan hammadde kullanarak üreten ülkelerdir [1], [4].

Çizelge 1.1 İnsan saçı ve diğer hayvan tüylerindeki sistin miktarı [7]

Kaynak	Sistin Miktarı (%)
İnsan saçı	6,5-14,53
Sığır	6,9-12,5
Kedi	13,1
Köpek	19,0
Tavşan	13,0

Diğer bir üretim yöntemi enzimatik biyodönüşümdür. Biyosentez teknolojisi kullanılarak DL-2-amino- Δ^2 -tiazolin-4-karboksilik asit asimetrik hidrolizi ile L-sistein elde edilmektedir. Bu enzim *Pseudomonas* cinsi bakteri kullanımı ile üretilmektedir [6].

Endüstriyel uygulaması ise mutant *Escherichia coli*'nin triptofan sentezi ile elde edilmesiyle yapılmaktadır. *Escherichia coli*'nin rol aldığı direk fermentasyon sayesinde L-serin o-asetiltransferaz (SAT) elde edilmektedir. Bu işlem için gen kodlanması gerekmektedir [2].

1.1.3 L-sistein Kullanım Alanları ve Fonksiyonları

L-sistein özellikle gıda, ilaç ve kişisel bakım (kozmetik) endüstrisinde kullanılmaktadır [1].

Gıda sanayinde, gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kodeks Alimentarius gıda etiketleme yönetmeliğindeki E kodları E910 L-sistein, E920 L-sistein hidroklorür ve E921 L-sistein hidroklorür monohidrattır [1]. Gıdalardaki başlıca uygulamalardan biri aromalardadır. Özellikle bitkisel gıdalarda ete lezzet vermek için kullanılmaktadır [1]. L-sisteinin gıdalardaki diğer bir fonksiyonu katkı maddesi olarak kullanımıdır. Unlu mamüllerde işlem yardımcı un katkısı olarak kullanılır [2], [4]. Hamuru yumuşatmak ve böylece daha esnek, elastik ve genişletilebilir hamur oluşturmasını sağlamaktadır. Bu da hamurun işleme süresini azaltmaya yardımcı olmaktadır [2], [4], [9]. L-sistein indirgen özelliği sayesinde hamurda bulunan kovalent disülfid bağlarını açarak, hamur sisteminin zayıflamasına, hamurun çabuk olgunlaşmasına ve kolay açılıp, şekil verilmesine

yardımcı olur [1], [9]. Hamurun olgunlaşmasını hızlandırırken, fermantasyon toleransını kısaltır. Ekmek ve unlu mamullerin üretiminde süreden kazanmak ve işlemeyi kolaylaştırmak için tercih edilmektedir. L-sistein hamurun reolojik özelliklerine etki etmekte ve böylece hamurun yapısında iyileştirme sağlayarak kısa sürede işlenmesine olanak vermektedir [2], [9].

L-sistein ayrıca ilaç endüstrisinde panzehir olarakta kullanılmaktadır. En popüler olanı parasetamol zehirlenmesine karşı kullanılan panzehirdir. Ayrıca glutahiane eksikliği tedavisinde başarılı olduğu görülmüştür. Ağız yolu enfeksiyonları glossite ve jinjivit tedavisinde kullanılır [2]. L-sistein, prematüre bebeklerde, yaşlılarda ve emilim sendromu gibi bazı metabolik hastalığı olan insanlar için gerekli olabilmektedir [1].

L-sistein aynı zamanda kişisel bakım ve kozmetik alanlarında da kullanılır [1], [2]. L-sistein ultraviyole ışınların etkilerine karşı güneşten cildi koruma, antioksidan özelliklere sahip olma ve deri üzerinde anti yaşlanma etkisi olduğu bilinmektedir. L-sistein kalıcı saç dalgası (perma) yapımında thioglycolic asit substratı olarak kullanılır. L-sisteinin, deri kolajen üretimi için önemli olduğu, cildin esnekliğini koruduğu bilinmektedir. L-sistein sağlıklı cilt, saç ve tırnak dokusunu ve esnekliğini desteklemek için kullanılmaktadır. Bu özellikleri sebebiyle cilt bakımı ürün yelpazesinde oldukça fazla tercih edilmektedir [1], [2].

1.1.4 Buğday Unu ve L-sistein

Tahıllar arasında yer alan ekmeklik buğday *Triticum aestivum* dünyanın en önemli bitkisi olarak kabul edilir. Dünya nüfusunun üçte birinin tükettiği besin olan buğday, insan beslenmesinde harcanan kaloringin yarısını ve mevcut proteinin de yarısını karşılamaktadır [10].

Genel olarak buğday tanesi üç kısımdan oluşmaktadır. % 83-84'ü endosperm, % 13-14'ü kepek ve %3'ü de embriyodan oluşmaktadır. Endosperm unun elde edildiği bölümdür. Endosperm hücreleri, protein yapısı içinde saklı nişasta granülleriyle doludur. Kepek, buğday tanesinin dış kısmıdır. Embriyo birim miktardaki protein ve yağ bakımından ilk sırada yer alan bölümdür [10], [11].

Türk Gıda Kodeksi “Buğday Unu Tebliğ’ine” göre; buğday unu, yabancı maddelerden temizlenmiş ve tavllanmış buğdayların tekniğine uygun olarak öğütülmesiyle elde edilen unlardır [12].

Dünyada bulunan buğdayların protein miktarı ortalama %12-13'tür. Karbonhidrat miktarı ise %65-85 civarındadır [13]. Başka bir kaynağa göre çevre şartlarına göre buğdaydaki protein miktarı %6-22 arasında değişmektedir. Buğdaydaki toplam azot miktarı ile proteinler arasında sabit bir ilişki mevcuttur, bu ilişki $N \times 5.7$ olarak ifade edilmektedir [38].

Buğday ununda toplam 18 farklı aminoasit bulunur, bu aminoasitlerin 2/3'ünü glutamin, prolin, L-sistein ve sistin oluşturmaktadır. Buğdayın yapısında bulunan bütün aminoasitler işlevsel özelliklerinden dolayı ayrı bir önem taşımaktadır [11]. Sistin aminoasidi reaktif sülfidril (SH) grubu içeren iki sistein molekülünün bir disülfid (S-S) bağıyla birleşmesi sonucu oluşur ve glutendeki aminoasitlerin yaklaşık %2.1'ini oluşturur ekmek hamurunun yapısında ve oluşumunda önemli yere sahiptir [11]. Sistin hamur oluşumu sırasında molekül içi disülfid bağ oluşumu ve moleküller arası disülfid bağları arasında etkileşimi sağlayarak gluten oluşumuna yardımcı olur [11].

Çizelge 1.2 Buğday unları ve gıda amaçlı buğday kepeğine ait kimyasal özellikler [12]

Ürün	Nem % (m/m) En çok	Kül % Km'de (m/m)	Sedimentasyon (mL)	Beklemeli Sedimentasyon (mL)	Protein % Miktarı Km'de (en az)	Asitlik % Km'de (sülfürik asit cinsinden) en çok	Düşme Sayısı (Sn) En az
Özel Amaçlı Buğday Unu	14,5	Aranmaz	Aranmaz	Aranmaz	7	0,07	Aranmaz
Ekmeklik Buğday Unu	14,5	$0,7 < \%Kül \leq 0,8$	En az 30	En az 30	10,5	0,07	250
Tam Buğday Unu	14,5	En az 1,2	Aranmaz	Aranmaz	11	0,09	Aranmaz
Gıda Amaçlı Buğday Kepeği	12	Aranmaz	Aranmaz	Aranmaz	Aranmaz	Aranmaz	Aranmaz

Çizelge 1.3 Buğday, un ve ekmeğin aminoasit kompozisyonu (100 g buğdayda) [13]

Aminoasit	Buğday	Un	Ekmek
Alanin	0,428	0,366	0,386
Arginin	0,617	0,500	0,468
Aspartik asit	0,670	0,545	0,605
Sistin	0,259	0,278	0,247
Glutamik asit	3,750	4,539	4,171
Glisin	0,511	0,424	0,422
Histidin	0,253	0,247	0,249
İzolösin	0,513	0,561	0,568
Lösin	0,853	0,918	0,936
Lisin	0,361	0,274	0,326
Metionin	0,232	0,228	0,250
Fenilalanin	0,582	0,647	0,632
Pirolin	1,296	1,539	1,461
Serin	0,666	0,716	0,717
Treonin	0,397	0,371	0,396
Triptofan	0,143	0,134	0,128
Trosin	0,408	0,428	0,437
Valin	0,592	0,597	0,616

1.1.5 L-Sistein Mevzuat ve Helal Durumu

L-sisteinin gıda sanayindeki en geniş çaplı uygulaması aroma üretimindedir [1]. Türk Gıda Kodeksi'ne göre, L-sistein, L-sistein hidroklorür ve L-sistein hidroklorür monohidrat olarak bulunabilen katkı maddesidir. Gıda paketlenme etiketine göre belirtildiğinde, E kodları E910 L-sistein, E920 L-sistein hidroklorür ve E921 L-sistein hidroklorür monohidrat olarak bilinmektedir [1]. Numaralandırma düzeni Kodeks Alimentarius Komitesi tarafından belirlenen uluslararası numaralandırma sistemine göre düzenlenmiştir [1], [2], [14].

Ülkemizde üretilen ekmeklik unlarında L-sistein'nin katkı olarak kullanılması Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ne göre yasaklanmıştır [15].

L-sistein ile en büyük problem üretiminde kullanılan hammaddenin kökeni ile ilgilidir [1], [14]. Helal gıda kapsamında, “İslamiyette, insan vücudunun herhangi bir kısmının gıda olarak kullanılmasına” izin verilmediğinden, insan saçından yapılmış L-sistein helal olmamaktadır [14].

1.1.6 L-Sisteinin Tespitine Yönelik Literatür Çalışmaları

L-sisteinin tespitinde literatürde farklı çalışmalar mevcuttur.

Athilakshmi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sistin ve sistein aminoasitlerinin gümüş nanopartikülleri kullanarak tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada, UV spektroskopisiyle sistein ve sistinle kümelenmiş nanopartiküller ve renk değişimleri kolorimetrik olarak gösterilmiştir [16].

Kwanyuen ve Burton'un yaptığı çalışmada sistin ve sistein tespitinde Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) kromatografi yöntemi kullanılmıştır. Soyada kolon öncesi türevlendirmeye dayanan bir yöntem kullanarak sistein, sisteinik asite dönüştürülerek tespit edilmiştir [17].

Jenkins ve arkadaşları görünür ışık Raman spektroskopisi kullanarak sistein, metionin, tirozin ve prolin gibi birbirine yakın moleküler yapıya sahip aminoasitlerin ayrımını incelemişlerdir. Değişik form ve yapılarda bulunan karışımlarda her bir aminoasit için parmak izi şeklinde belirgin saçılımlar gözlemlenmiş, ayrımları ve tanımlaması yapılmıştır [18].

Akhtar ve arkadaşları Fourier Transform Raman Mikroskobu ile normal, işlem görmüş ve beyaz saç örneklerini incelemişlerdir. Saç örnekleri toz haline getirerek raman saçılımına bakılmıştır. Sistein içeriğinde değişimler gözlemlemişlerdir [19].

Demirkol ve arkadaşları bazı meyve ve sebzelerin biyolojik tiyollerini tespit etmeye yönelik çalışma yapmışlardır. HPLC tekniği kullanarak biyolojik tiyol ölçümü yapmışlardır [5].

Adar yaptığı bir çalışmada sisteinin gözle görülür raman dalgaları oluşturduğunu gözlemlemiştir. Kompleks moleküller arasından disülfid (S-S) bağının raman spektroskopisinde keskin bantları verdiğini gözlemlemiştir. 500 cm⁻¹ dalga sayısında L-sisteinin sahip olduğu disülfid (S-S) bağında vibrasyonel bantların olduğunu gözlemlemiştir [20].

Tcherkas ve Densenko yaptıkları bir çalışmada insan plazmasındaki homosisteinin ve glutamik asit, aspartik asit, serin ve glutamin konsantrasyonunu türevlendirme işlemine tabi tutarak HPLC ile tespit etmişlerdir [21].

Podstawka ve arkadaşları kollodial gümüş ile yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması spektrumlarını (SERS) kullanarak, L-metionin, L-sistein, L-Lösin, L-fenilalanin ve L-prolin gibi çeşitli aminoasitlerin ve bu aminoasitlerin homopeptitlerini incelemişlerdir. Bu analiz ile aminoasitlerin ve dipeptitlerinin özellikle yüzey geometrisi özellikleri incelenmiş ve C-C bantlarında ayrımlar gözlemlenmiştir [22].

Zhu ve arkadaşları çeşitli sarımsakların organosülfür bileşiklerini S-alil-L-sistein, γ -glutamyl-S-alil-L-sistein, ve alisini hızlı, eş zamanlı ölçümü için LC-MS/MS cihazı kullanarak kantitatif olarak tespit etmişlerdir. Metot optimizasyonu ve validasyonunu gerçekleştirmişlerdir [39].

1.1.7 Kromatografik Metotlar

Karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılarak tanımlanması ve tayini için kullanılan analitik metotlara verilen isimdir [23].

1.1.7.1 LC-MS/MS Tanımı ve Sistemi

Sıvı kromatografisi (LC) bir kolondan çözünerek ayrılan bileşenlerin sıvıda akış halindeki durgun ve hareketli fazın bulunduğu bir sistemde hareketli faz durgun fazın

üzerinden geçmesiyle ayırım gerçekleşir. Ayrılan bileşikler kolon çıkışına bağlanan dedektörle tespit edilerek miktarlarıyla orantılı olarak ölçülür. Yüksek hızda ayırmaların yapıldığı ve genellikle vakum ve basıncın kullanıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, HPLC denilir [24], [26].

Kütle spektrometresi (MS) manyetik ve elektriksel alanda hareket eden yüklü partiküllerin kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılması prensiyle çalışan sistemdir [25], [26].

LC-MS/MS sistemi, HPLC ve MS bölümlerinin beraber çalışarak molekülü tanımlama ve miktar tayinini sağlayan cihazlardır [27].

LC-MS/MS çalışma prensibi; ardışık MS/MS'de karışık moleküller birinci MS iyon kaynağında moleküllerin kendine ait iyonları oluşmaktadır. Böylelikle içeriği bilinmeyen örneğin karakteristik ana iyonu diğer bileşenlerden ayrılmayısıyla seçilerek tanımlanır. Birinci MS'de ayrılmış olan ana iyon ikinci MS analizörüne gönderilir. Burada ikincil iyon fragmentlerine ayrılır. Ana iyon ve ikincil iyonun beraber tanımlanması birleşimin yüksek seçicilikte tanımlanmasını ve bileşenlerin tamamen ayrılmasını sağlar [25], [26].

LC-MS/MS cihazı yüksek hassaslık, az miktarda reaktif gerekliliği, geniş analitik ölçüm aralığı, aynı anda yüzlerce analitin ölçülebilmesi gibi avantajlara sahiptir. LC-MS/MS'in LC-MS'den farkı bir enjeksiyonda yüzlerce toksik madde taraması yapılan bir metotta aynı moleküler ağırlığa sahip birçok bileşik arasından analiz yapılabilmesidir. Buradaki ayırım LC-MS ile yapılamamaktadır [28].

1.1.8 Spektroskopik Metotlar

Spektroskopi, ışın ile madde arasındaki etkileşimleri inceleyen bilim dalıdır. Örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve değerlendirilmesi ayrıca yüklü ve yüksüz taneciklerle maddenin etkileşmesi sonucu meydana gelen olayları inceleyen metotlara spektroskopik metotlar denilmektedir [22], [29].

1.1.8.1 Raman Spektroskopisi Tanımı ve Sistemi

Moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi ve bu sebeple gerçekleşen ışık saçılması sonucuyla çalışan bir sistemdir [29].

Molekül ile etkileşime giren ışığın kaynağı olarak özellikle son yıllarda genellikle lazer türü kaynaklar olan Lazer Raman Spektroskopisi kullanılır. Bu sistem örneklerin kuvvetli bir lazer kaynağıyla ışınlanmasıyla saçılan ışının belirli bir açıdan ölçümü prensibiyle çalışan sistemdir [29], [30].

Raman spektroskopisi örnek haznesi, ışık kaynağı, dalga boyu seçici ve detektörden oluşmaktadır. Bu sistemde ışın miktarı ve örnek yapısına göre yüksek ışık gürültüleri oluşabilmektedir [29], [30].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada hammadde olarak domuz kılı ve insan saçı kullanılarak L-sisteinin laboratuvar ölçekli üretimi, farklı buğday unları, buğday ve unlu mamullerde bulunan L-sisteinin yeni kromatografik ve spektroskopik yöntemler geliştirilerek tespit edilmesi ve dışarıdan unlara taşıyıcı amaçlı olarak eklenen L-sisteini tespit etmeye yönelik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu hedefi gerçekleştirmek için çalışmada şu aşamalar planlanmıştır:

- 1- L-sisteinin domuz kılı ve insan saçı kullanılarak laboratuvar koşullarında üretimi gerçekleştirilmiştir.
- 2- Farklı unlarda ve unlu mamullerde L-sistein tespitine yönelik LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir.
- 3- Farklı buğday unlarına dışarıdan eklenen L-sisteinin tespitine yönelik Raman spektroskopisi ile metod geliştirilmiştir. Ayrıca Raman verileri kemometri yöntemi olarak Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA), Temel Bileşen Analizi (PCA) ve Genetik Algoritma Tabanlı Ayırma Analiz (GADA) kullanılarak incelenmiştir.

1.3 Hipotez

Ülkemizde ve İslam dünyasında son yıllarda tartışma konusu olan L-sistein aminoasidinin unlu mamullerde özellikle ekmeklik unlarda kullanılmasının TGK'ne göre yasaklanmıştır. Ayrıca L-sistein üretiminde kullanılan hammaddenin kökenine yönelik de tespitinde problemler yaşanmaktadır. Literatürde konuyla ilgili mevcut çalışma olmaması sebebiyle TÜBİTAK ARDEB 1003 kapsamında desteklenen proje ile çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışma ile laboratuvar ortamında domuz kılı ve insan saçı

gibi helal olmayan kaynaklardan L-sisteinin laboratuvar ölçekli üretilmesi L-sistein içeren numunelerde L-sistein içeriğinin tespitinde ilk defa LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. Raman spektroskopisi ve Kemometrik metotla birlikte L-sistein içeren unlarda tağşişin belirlenmesi için metot geliştirilmesi yapılmıştır.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Laboratuvar Ölçekli L-Sistein Üretimi Materyal ve Yöntem

2.1.1 Kullanılan Numuneler

Çalışmada kullanılan numuneler TÜBİTAK MAM 1001 proje kapsamında domuz kılı Tropikana domuz çiftliğinden (Antalya), insan saçı kadın berberlerinden temin edilmiştir.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar aşağıda belirtilmiştir.

Otoklav

Saf su cihazı (Milipore Elix 5 UV, Fransa)

Çekerocak

Hassas terazi (0.0001 g) hassasiyette

Adi süzgeç kağıdı

pH kağıtları

Su banyosu

2.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal aşağıda belirtilmiştir.

Aktif karbon; Merck (Almanya)

Hidroklorik asit; Carlo Erba Group %37 (İtalya)

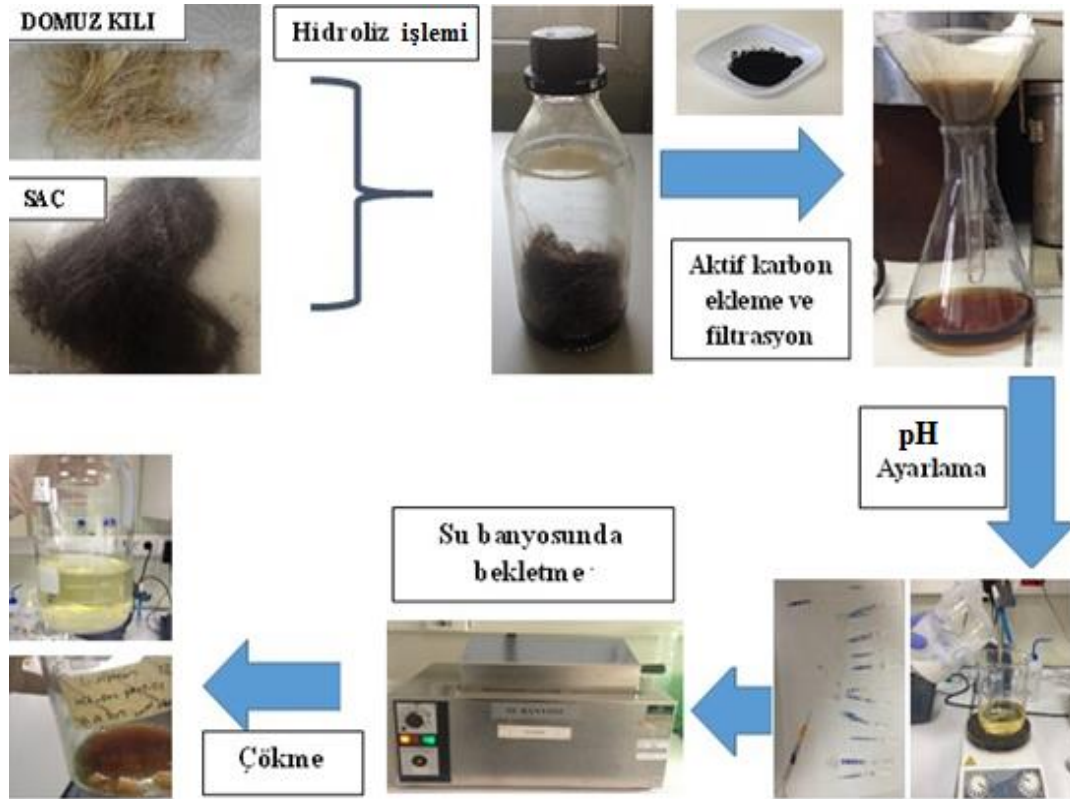
Asetik asit; Sigma-Aldrich (Almanya)

Kalsiyum hidroksit; Emsure (Almanya)

2.1.4 Laboratuvar Ölçekli L-Sistein Üretimi

L-sisteinin literatür araştırmalarına [4], [8] dayanarak, laboratuvar koşullarında üretimi gerçekleştirilmiştir. İlk başta zayıf asit (6N CH_3COOH) ve kuvvetli asit (6N HCl) çözeltileri kullanılarak saç ve domuz kılı örnekleri hidroliz edilmiştir. Asetik asit ile hidroliz yapılan örneklerde yeterli parçalanma olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple çalışmaya 6N HCl ile devam edilmiştir.

L-sistein laboratuvar ortamında üretimi için öncelikle 9'ar g domuz kılı ve insan saçları tartılmıştır. Örnekler otoklav için uygun cam şişelere aktarılarak üzerleri 6N HCl çözeltisi ile muamele edilmiştir [2]. Daha sonra hammaddelerin iyi bir şekilde parçalanması için 12 saat boyunca 120°C sabit basınç altında hammadde ile asit otoklavda bekletilmiştir. Otoklavdan çıkarılan parçalanmış domuz kılı ve saç çözeltisi, içerisinde bulunan çözünmeyen parçaları uzaklaştırmak amaçlı adi süzgeç kağıdı ile süzülmüştür. Ardından çözelti aktif karbon ile muamele edilerek tekrar karıştırılmış ve süzme işlemi gerçekleştirilerek berrak bir çözelti elde edilmiştir. Berrak çözeltiyi ikiye ayrılarak birinci kısımda çözeltinin pH'ı ayarlamadan diğerinde de pH ayarı yapılarak devam edilmiştir. pH ayarlaması yapılmasındaki amaç L-sisteinin literatürdeki izoelektrik noktasına (5.02) [31] bakılarak L-sisteinleri çözeltinin içerisinden çöktürmektir. Bu amaç doğrultusunda çözelti kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ile pH 5-5.5 arasına ayarlanmıştır. Ardından çözelti ağzı açık bir şişede 50°C 'lik su banyosunda çözeltisi uzaklaşana kadar bekletilmiştir. Şekil 2.1'de L-sistein üretim akışı gösterilmektedir.



Şekil 2.1 L-sistein üretim akış şeması

2.2 LC-MS/MS Materyal ve Yöntem

2.2.1 L-Sistein Standartları

Çalışmada L-sistein standardı olarak L-sistein Sigma Aldrich ve Sistein nonanimal Sigma, sistin Sigma Aldrich numuneleri TÜBİTAK MAM 1003 projesi kapsamında temin edilmiştir. Ayrıca proje kapsamında satın alınan insan saçı ve domuz kılından, laboratuvar ortamında üretilen L-sisteinler kullanılmıştır.

2.2.2 Un Numuneleri

Çalışmada Türkiye’den farklı marka, randıman ve çeşitlerde 25 adet un örneği kullanılmıştır. Numuneler TÜBİTAK’ta bulunan mevcut örnek ve proje kapsamında alınan un numunelerinden oluşmaktadır. Un numuneleri, U1, U2,U3,U4,U5,U6,U7,U8, U9,U10,U11,U12,U13,U14,U15,U16,U17,U18,U19,U20,U21,U22,U23,U24,U25 şeklinde isimlendirilmiştir.

Bununla beraber marketten iki farklı markada hamburger ekmeği, lavaş ekmeği ve pizza hamuru örnekleri de içeriğindeki sistin ve L-sistein miktarlarını belirlemek için satın alınmıştır.

2.2.3 Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar aşağıda belirtilmiştir.

LC-MS/MS (ESI) AB Sciex 4000 Q Trap cihazı

Derin Dondurucu

Otoklav

Etüv

Saf su cihazı (Milipore Elix 5 UV, Fransa)

Ultrasound cihazı (Hielscher Ultrasonics GmbH, Almanya)

Çekerocak

Hassas terazi (0.0001 g) hassasiyette

Turbo Vap Azot uğurma sistemi

Otomatik pipet 10-100 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL

Süzgeç kağıdı

Santrifüj

Vorteks

Vialler



Şekil 2.2 LC-MS/MS (ESI) AB Sciex 4000 Q Trap cihazı

2.2.4 Kimyasal Maddeler

L-sistein; Sigma-Aldrich (C7352), hayvansal olmayan kaynak $\geq$ %98 saflıkta (Japonya)

L-sistein; Sigma-Aldrich (W326305), $\geq$ %97, FG (Çin)

Sistin; Sigma-Aldrich (Almanya)

Hidroklorik asit; Carlo Erba Group %37 (İtalya)

HPLC kalitede su yüksek saflıkta 0.20 μ 'dan süzölmüş

Metanol; Chromasolv®; Sigma- Aldrich (for HPLC, $\geq$ 99.9%, İsrail)

Formik asit; saf %98-100'lük, Sigma-Aldrich (Almanya)

Reaktif 1: 0.1 N HCl çözeltisi

Reaktif 2: %80 n-Propanol-%20 Piridin

Reaktif 3: %83 İzooktan-%17 Propil kloroformat

Reaktif 4: %60 Kloroform-%38 İzooktan-%2 Propil kloroformat

Reaktif 5: %80 Metanol-%20 Su çözeltisi

Mobil Faz A: 1 mM Formik Asit \ 1 litre Su

Mobil Faz B: 1 mM Formik Asit \ 1 litre Metanol

2.2.5 Standart L-sistein Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmada standart çözelti hazırlama aşamasında, L-sistein non-animal Sigma Alrich (C7352) ve L-sistein Sigma Aldrich (W326305) standartları olmak üzere iki farklı standart için denemeler yapılmıştır. L-sistein Sigma Aldrich (W326305) standart ve sistin Sigma Aldrich olarak seçilip çalışmaya devam edilmiştir.

Türevlendirme çözeltilerinin hazırlığında literatür çalışmalarında yer aldığı gibi biyolojik sıvıların türevlendirme çalışmalarındaki gibi türevlendirme çözeltileri hazırlanmıştır [40], [41].

Reaktif 1 için 0.1 N HCl çözeltisi hazırlanmıştır. Reaktif 2 için %80 n-propanol ve %20 piridinden oluşan çözelti hazırlanmıştır. Reaktif 3 için %83 izooktan ve %17 propil kloroformattan oluşan çözelti hazırlanmıştır. Reaktif 4 için %60 kloroform ve %38 izooktan- %2 propil kloroformattan oluşan çözelti hazırlanmıştır. Reaktif 5 için %80 metanol ve %20 saf sudan oluşan çözelti hazırlanmıştır.

Standart hazırlığında 100 mg standarttan 100 mL balon jojeye tartılmıştır. Standart 0.1 N HCl ile çözülüp hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak 1000 mg/L ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stoktan 0.1'er mL alınarak ve 10 mL'lik balon jodede 0.1 N HCl ile seyreltilmiştir. Elde edilen 100 mg/L standart çözeltisinden 0.1 alınarak cam santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Ardından türevlendirme işlemine geçilmiştir. Türevlendirme işlemi için; standart çözeltisinin üzerine 0.1 mL 0,1 N HCl çözeltisi ilave edilmiş ve 10 sn boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. 0.2 mL 'Reaktif 2' eklenip ardından 10 sn boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. 0.2 mL 'Reaktif 3' eklenip ardından 10 sn boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. 3 dakika süresince çözelti bekletilip tekrar 10 sn vorteks ile karıştırılmıştır. 0.2 mL 'Reaktif 4' eklenip ardından 10 sn kadar vorteks ile karıştırılmıştır. Çözelti oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir. Örnek karışım eppendorf tüpüne aktarılmıştır. 5000 rpm' de 5 dk santrifüj ile çöktürülmüştür 0.2 mL üst faz temiz bir cam santrifüj tüpüne aktarılıp azot altında kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Tüpe 500 µL 'Reaktif 5' eklenmiştir. Elde edilen çözelti 10 sn vorteks ile karıştırılarak 2 mg/L konsantrasyonunda türevlendirilmiş standart karışım elde edilmiştir. Elde edilen standart türevlenmiş karışım ultrasonik su banyosunda 1 dk bekletildikten sonra numune LC-MS/MS viallerine aktarılmıştır. 2 mg/L türevli standart karışım 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 1 mg/L konsantrasyonda seyreltilerek cihaza verilmiştir.

Çizelge 2.1 Standart türevlendirilmiş L-sistein ve sistin konsantrasyonları

Standartlar mg/L
0.005
0.01
0.05
0.1
1

2.2.6 Laboratuvar Ölçekli Üretilen L-sisteinlerin LC-MS/MS için Ön Hazırlığı

Çalışmada laboratuvar ortamında insan saçı ve domuz kılından elde edilen L-sisteinler Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Laboratuvar ortamında üretilen L-sisteinler

ÖRNEKLER
Domuz kılından elde edilmiş L-sistein (pH ayarı yapılmamış)
İnsan saçından elde edilmiş L-sistein (pH ayarı yapılmamış)
İnsan saçından elde edilmiş L-sistein (pH 5-5,5)
Domuz kılından elde edilmiş L-sistein (pH 5-5,5)

Çalışmada bu doğrultuda üretilen L-sistein örneklerinden 0.2 mL’si cam deney tüpüne alınıp çözelti azot altında kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Tüp içerisine 0.2 mL 0.1 N HCl eklenerek elde edilen çözelti vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından türevlendirme işlemi yapılmıştır. Bunun için karışıma 0.2 mL ‘Reaktif 2’ ilave edilerek 10 sn vorteks ile karıştırılmıştır. Sonrasında 0.2 mL ‘Reaktif 3’ ilave edilmiş ve 10 sn boyunca vorteks ile karıştırılıp karışım 3 dakika bekletilmiştir. Ardından 10 sn vorteks ile tekrar karıştırılmıştır. Deney tüpüne 0.2 mL ‘Reaktif 4’ ilave edilmiş, 10 sn vorteks ile karıştırılıp 1 dk kadar bekletilmiştir. Örnekler cam deney tüpünden eppendorf tüpe aktarılmıştır. 5000 rpm 5 dk santrifüj ile çöktürme işlemi yapılarak faz ayrımı gözlenmiştir. Üst fazın 0.2 mL’si başka bir tüpe aktarılmıştır. Azotlu altında buharlaştırılan örneklerin üzerine 1 mL ‘Reaktif 5’ eklenerek ultrasonik su banyosunda çözülüp ardından LC-MS/MS viallerine aktarılmıştır. Vialler LS-MS/MS cihazında örnek ünitesine yerleştirilmiştir.

2.2.7 Buğday Unu ve Unlu Mamullerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan un örnekleri ve ticari ürünler türevlendirme işlemi öncesi hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem ile örneklerin karmaşık yapısının hidroliz işlemi ile yapı taşlarına parçalanması sağlanmıştır. Böylece örneklerdeki L-sistein ve sistinlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma için 25 buğday unu örneğinden yaklaşık 50 mg tartılmıştır. 20 mL 6N HCl ile 110°C'lik etüvde 24 saat bekletilerek hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler filtreden geçirilmiş ardından 0.2 mL'si santrifüj tüpüne alınmıştır. 52°C sıcaklıkta çözelti azot altında buharlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. 0.2 mL 0.1 M HCl örneğin üzerine ilave edilmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 0.2 mL 'Reaktif 2' ilave edilip 10 sn vorteks ile karıştırılma 0.2 mL 'Reaktif 3' ilave edilip 10 sn boyunca vorteks ile karıştırılma 3 dk süre bekletilmiştir. Ardından tekrar 10 sn boyunca vorteks ile karıştırılıp 0.2 mL 'Reaktif 4' ilave edilmiş ve sonrasında 10 sn vorteks ile karıştırılıp 1dk kadar beklenilmiştir. Örnekler cam deney tüpünden eppendorf tüpüne aktarılmıştır. 5000 rpm'de 5 dk santrifüj ile çöktürme işlemi yapılarak faz ayrımı gözlenmiştir. 0.2 mL üst fazdan başka bir tüpe alınmıştır. Daha sonra çözeltinin azot altında buharlaştırma işlemi yapılmıştır. Buharlaştırılan örneklerle 0.5 mL 'Reaktif 5' eklenerek çözelti ultrasonik su banyosunda çözündürülüp LC-MS/MS viallerine aktararak LS-MS/MS cihazında örnek ünitesine yerleştirilmiştir.

2.2.8 Örnek MS Optimizasyonu

LC-MS/MS (ESI) çalışmaları AB Sciex 4000 Q Trap cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Cihazın kütle dedektörü (MS) bölümünde L-sistein ve sistin aminoasit standartları ile literatür bilgileri göz önüne alınarak seçilmiştir. Bu bilgiler ışığında sistin için tespit edilecek moleküler ağırlığı 240.3 g/mol, L-sistein için 121.16 g/mol belirlenerek çalışmalar optimize edilmiştir. L-sisteinin unlara sonradan ilave edilme ihtimali ve buğday ununun doğal olarak içeriğindeki bulunan L-sistein miktarı düşünülerek; cihaza verilecek standart konsantrasyonlarının çalışma aralığı belirlenmiştir. Ayrıca haftalık ve aylık 0.1 mg/L konsantrasyonuna sahip standart örnekler belirli aralıklarla (günlük, haftalık ve aylık kontrol) cihaza enjekte edilerek cihaz performansı kontrol edilmiştir.

2.2.9 LC-MS/MS için Metot Validasyon Çalışmaları

Bir laboratuvarındaki bir metodun geçerli kılınmasındaki amaç bir ölçümde takip edilen prosedürün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilmesini sağlamaktır. Bir metodun performansının belirlenen analiz ihtiyacına uygun olduğunu belirlemek ve göstermek için metot validasyonu yapılmalı veya metot geçerli kılınmalıdır. Ancak kullanılan metot geçerli kılındıktan sonra rutin olarak çalışılmaya devam edilmektedir [33], [34], [42].

Tez kapsamında geliştirilen metodun valide veya geçerli kılınması için:

- Lineer ölçüm aralığı (lineerite)
- Tayin sınırı (LOD), Ölçüm sınırı (LOQ)
- Kesinlik
 - Tekraredilebilirlik
 - Tekrarüretilebilirlik
- Doğruluk
 - Gerçeklik
 - Geri kazanım

Çalışmaları yapılmalıdır [33].

Çalışmada en düşük konsantrasyon değeri 0.005 mg/L'den başlamak üzere 0.01, 0.05, 0.10, 1 mg/L konsantrasyonları çalışma aralığı olarak kabul edilmiş ve validasyon bu konsantrasyonlarda yapılmıştır. Literatürden buğday ve unda bulunan, ayrıca un ve unlu mamullere katılması muhtemel L-sistein miktarı belirlenerek ölçüm aralığına karar verilmiştir [1], [36]. [37]. Sonraki aşamada en düşük konsantrasyon hesabı ve L-sisteinin örnekteki bulunma sınırı göz önüne alınarak lineerite (doğrusallık) çalışması yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerin, konsantrasyonlarına karşı cihazdan alınan intensity değişimleri (alan) arasında doğrusal ve orantılı artışın olup olmadığı kontrol edilmiştir. Lineer ölçüm aralığını belirlemek için standartların konsantrasyonları 0.005-0.010-0.050-0.100-1 mg/L (ppm) olacak şekilde beş farklı konsantrasyonda 3'er paralel olmak üzere cihaza enjekte edilmiştir.

Tayin sınırı (LOD), bir analitin (analizi yapılacak molekül) laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit ettiği en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Ölçüm sınırı (LOQ) ise örnekteki tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır [34]. Tayin sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) çalışmaları ve hesabı için kalibrasyon eğrisinin en düşük konsantrasyon noktası olan 0.005 mg/L için 6 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın konsantrasyon değerlerinin aritmetik ortalaması ve standart sapmaları hesaplanmış değerlerin uygunluğu kontrol edilmiştir.

TS 6822-1 (ISO 6726-1) ‘Ölçme Metotlarının ve Sonuçlarının Doğruluğu (Gerçeklik ve Kesinlik)-Bölüm 1 Genel Prensipler ve Tarifler’ standardı, 2002/657/EC SANCO ve EUROCHEM kaynaklarına göre doğruluk; gerçeklik ve kesinlik parametrelerini kapsayan bir parametredir.

Gerçeklik toplam sistematik hatadan, kesinlik ise standart sapma üzerinden ifade edilmektedir. Gerçeklik kontrolü, referans malzeme kullanılarak ya da alternatif bir metot kullanılarak yapılmaktadır [33], [34].

Kesinlik, ölçüm sonuçlarının birinin diğerine olan yakınlığı olarak bilinmekte ve çoğunlukla standart sapma olarak ifade edilmektedir. Kesinlik tekraredilebilirlik ve tekrarüretilebilirlik üzerinden hesaplanmaktadır [42].

- Tekraredilebilirlik aynı kişinin, aynı ekipmanı kullanarak, aynı laboratuvar, kısa zaman aralığında yapmış olduğu analizleri kapsamaktadır. Tekraredilebilirlik çalışması için en az 6 tekrar analiz yapılmalıdır [42].
- Tekrarüretilebilirlik çalışmasında ise farklı kişi, farklı ekipman, aynı laboratuvar ve uzun zaman aralığında en az 6 tekrar çalışması yapılmalıdır [42].

Bu doğrultuda, kesinlik çalışması kapsamında içeriği belirli %100 gerçek örnekten 5'er paralel 2 enjeksiyon şeklinde birbirinden bağımsız 10 adet aynı gün içinde çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu değerlerin %RSD ve %Geri kazanımları hesaplanmıştır. Daha sonra farklı bir günde içeriği belli ticari örneklerle tekrarüretilebilirlik çalışması amacıyla işlem tekrarlanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ilk gün yapılan çalışmalarla karşılaştırılarak %RSDr değerleri hesaplanmıştır.

2.2.10 LS-MS/MS Çalışma Şartları

2.2.10.1 HPLC Şartları

LC-MS/MS’te L-sistein ve sistinin tespitine yönelik yöntem geliştirme aşamasında, LC-MS/MS cihazının HPLC bölümündeki kromatografik ayırım için çeşitli mobil faz denemeleri yapılmıştır. Mobil faz seçimi için yürütülen çalışmalara öncelikle, metanol, asetonitril, formik asit ve su gibi genel kullanıma ait faz çözücülerinden oluşan farklı bileşimlerde çeşitli hareketli faz denemeleri gerçekleştirilmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir. Literatür çalışmaları [32] ve denemeler göz önüne alınarak en uygun mobil fazların, mobil faz A için 1 mM formik asit \ 1 litre su, mobil faz B için 1 mM formik asit \ 1 litre metanol olduğuna karar verilmiş ve çalışmaya bu mobil fazlarla devam edilmiştir.

HPLC mobil fazlarının hazırlanması;

Mobil Faz A için cam şişeye 1 mL formik asit ilave edilip su ile 1 litreye tamamlanarak oluşturulmuştur.

Mobil Faz B için ise cam şişeye 1 mL formik asit ilave edilip metanol ile 1 litreye tamamlanmıştır.

HPLC bölümünün çalışma şartları akış (gradient) programı Çizelge 2.3’te belirtilmiştir.

Çizelge 2.3 LC çalışma şartları

Akış Program	Mobil Faz B
Zaman (dk)	% B
0,1	38
12	65
12,1	95
14	95
14,1	38
20	38

2.2.10.2 MS Şartları

LC-MS/MS çalışmalarının iyon ayrımının gerçekleştiği MS bölümünün çalışma şartları Çizelge 2.4'te gösterilmektedir. LC-MS/MS bölümünün MS/MS ayarları Çizelge 2.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.4 MS/MS çalışma şartları

Sistem	LC-MS/MS çalışma koşulları
Dedektör	(ESI) AB Sciex 4000 Q Trap
Kolon	EZ: FFAST AAA-MS 250x2 mm 4 mikron
Kolon fırını (°C)	40
Pompa	240-250 bar
Akış hızı (mL dk)	0,25
Mobile faz A	1 mM Formik Asit \ 1 litre Su
Mobile faz B	1 mM Formik Asit \ 1 litre Metanol
Toplam çalışma süresi	20 dk
Enjeksiyon Hacmi (µL)	10

Çizelge 2.5 MS/MS ayarları; ana iyon, parçalanma iyonları ve voltaj değerleri tablosu

Q ₁ Ana iyon	Q ₃ Fragment	Zaman (s)	Analit	DP (V)	EP (V)	CE (V)
497,134	248,1	10	Sistin	86	10	23
497,134	206,1	10	Sistin	86	10	35
336,293	190,1	10	L-sistein	31	10	17
336,293	248,1	10	L-sistein	31	10	17

2.3 Raman Spektroskopi Materyal ve Yöntem

2.3.1 Kullanılan Standart ve Numuneler

Çalışmada standart kimyasal olarak L-sistein Sigma Aldrich (W326305) kullanılmıştır. Beş farklı firmadan TÜBİTAK MAM proje kapsamında temin edilen buğday unları kullanılmıştır. Bu unlar WF1, WF2, WF3, WF4 ve WF5 olarak isimlendirilmiştir.

Çalışmada ayrıca on farklı un, buğday, ticari L-sistein, toz domuz kılı, toz insan saçı ve laboratuvar ölçekli üretimi gerçekleştirilen L-sisteinler kullanılmıştır.

2.3.2 Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Çalışma kapsamında kullanılan alet ve ekipmanlar aşağıda belirtilmiştir.

Renishaw Raman Mikroskop

Bilyeli karıştırıcı (Retsch MM 400, Germany)

Pelet baskı makinası (Perkin Elmer, USA)

Spatüller

Lamel

Platin tabaka

Kemometrik inceleme için OPUS yazılım programı OPUS Version 7.2 (Bruker, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 2.3 Renishaw Raman Mikroskop

2.3.3 Örnek Hazırlanması

Çalışma kapsamında buğday unlarına farklı konsantrasyonlarda % 0.5, 1, 2, 4 olmak üzere standart L-sistein Sigma Aldrich ilave edilerek, buğday unları katkılı hale getirilmiştir. Tağşiş edilen unlar 10 dk boyunca bilyeli karıştırıcıda tamamen homojen karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra L-sistein katkılı unlar pelet baskı makinasında 10 MPa basınç uygulaması ile 2 dk sürecince bekletilerek pelet haline getirilmiştir. Bu işlem sonucunda Raman analizi öncesi, tamamen pürüzsüz ve düzgün numune yüzeyi elde edilmesi sağlanmıştır.

Çalışmada on farklı un örneği spatül ile lamel üzerine yerleştirilmiş platin tabaka üzerine konularak Raman spektroskopi cihazıyla çekimleri gerçekleştirilmiştir. Ham buğday robottan geçirilerek toz haline getirilerek Raman çekimi gerçekleştirilmiştir. Toz insan saçı, toz domuz kılı ve laboratuvar ölçekli üretilen örnekler toz hale getirilip spatül ile lamelin üzerine yerleştirilmiş platin tabakaya konularak Raman spektroskopi cihazı ile çekimleri gerçekleştirilmiştir.

2.3.4 Raman Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi

Çalışmada tüm örneklerin Raman spektrumları için Renishaw Raman Mikroskop kullanılmıştır. Raman ölçümlerinin gerçekleştirilmesi aşamasında öncelikle pelet haline

getirilmiştir. L-sistein ilave edilmemiş unların ve standart L-sisteinin Raman spektroskopunda farklı objektiflerde ve güçlerde spektrumları elde edilmiştir. Net, belirgin spektral, pik ve bant oluşumu için cihaz ayarları ile optimizasyon yapılmıştır. Ölçümler 532 nm dalga boyunda diod lazer ışın kaynağı kullanılmış, %5 lazer gücüyle 1 sn maruz kalma süresiyle cihaz şartları oluşturulmuştur. Bütün çekimlerde statik çekim modunda gerçekleştirilerek pelet halindeki örnekler, lamelin üzerine yerleştirilmiş platin tabaka üzerine yerleştirilerek Raman Spektroskopi çekimleri gerçekleştirilmiştir. Çekimlerdeki en net verilerin x20 objektif lens, %5 lazer güç, 1 sn maruz kalma süresi ve 40 akümülayon (scans) cihaz ayarlarında olduğu gözlemlenmiştir. Net verilere ulaşıncı standart L-sistein katkılı buğday unlarına da aynı çekimler gerçekleştirilmiş, mikroskop görüntüleri incelenmiştir. Literatürde [20] S-S bağları için belirgin raman bantlarının 495 cm^{-1} 'de (raman kayma değerinde) ve ayrıca spektrumlarda L-sistein için literatürde [43], [44] belirgin vibrasyonel bantların 443, 536, 640, 693, 774, 823, 942, 1008, 1200, 1344, 1399, 1426 cm^{-1} raman kayma değerinde olduğu verilerine dayanarak örneklerin parmak izi bölgesi $400\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ aralığında Raman mikroskop statik çekimleri gerçekleştirilmiştir. Sinyal gürültü oranını arttırmak amacı ile 40 akümülayon (scans) ile spektrumlar toplanmıştır. Elde edilen sonuçların açıklanabilmesi amacı ile canlı video görüntülerinden yararlanılmıştır.

Çalışmada toz haline getirilmiş buğday, insan saçı, domuz kılı ve laboratuvar ölçekli üretilen L-sisteinler ve on farklı un örneğinin Raman çekimlerinde $400\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (raman kayma değerinde) aralığında statik ve extended çekimleri yapılmıştır.

2.4 Kemometrik Yöntem

Kemometri istatistik ve matematiğin bilgisayar kullanılarak kimyasal verilerin işlenmesini sağlayan bir kimya disiplini olarak tanımlanmaktadır. Kemometride istatistik ve matematik yöntemleri kullanılarak düzensiz verilerin sırasıyla tanımlayıcı yöntemlerle test edilip, sinyallerin türev ve integrasyonları kullanılarak düzeltilmesi, filtrelmesi sağlanmaktadır [35].

Çalışmada Raman mikroskobu ile çekimleri gerçekleştirilen örneklerin verilerinin kemometrik incelenmesi gerçekleştirilmiştir

Bu doğrultuda L- sistein katkılanmış unların Raman Spektroskopisi cihaz verileri OPUS yazılım programı kullanılarak spektrumlara birinci türev ve vektör

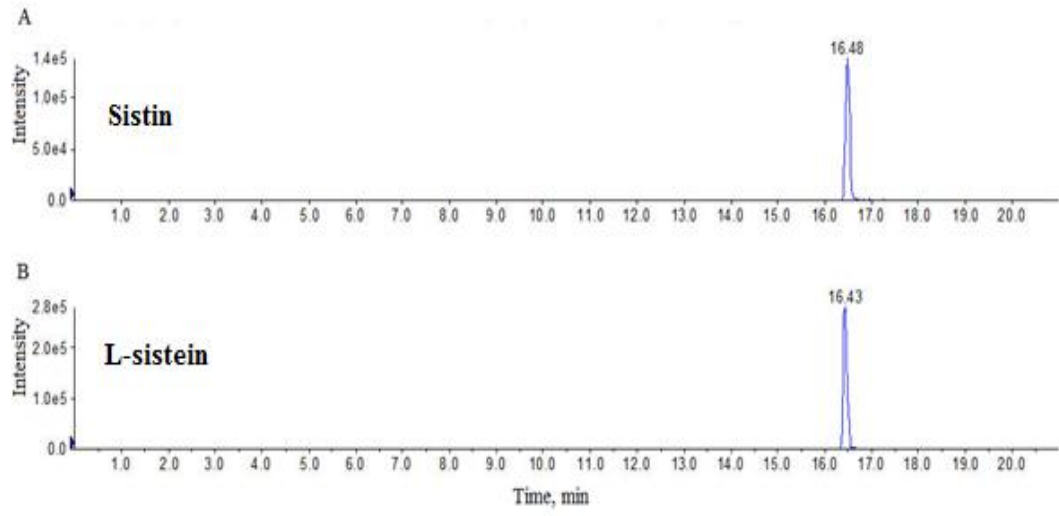
normalizasyonu ön işlemleri uygulanarak Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) ve Temel Bileşen Analizi (PCA) gerçekleştirilmiştir.

Raman Spektroskop cihazı ile buğday, farklı buğday unları, ticari L-sistein, toz domuz kılı ve toz insan saçının Raman analizi gerçekleştirilen örneklerin spektral verileri değerlendirilmesi amacıyla İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü'ne gönderilmiştir. Burada Kemometrik olarak Genetik Algoritma Tabanlı Ayırma Analiz (GADA) metoduyla veriler değerlendirilmiştir.

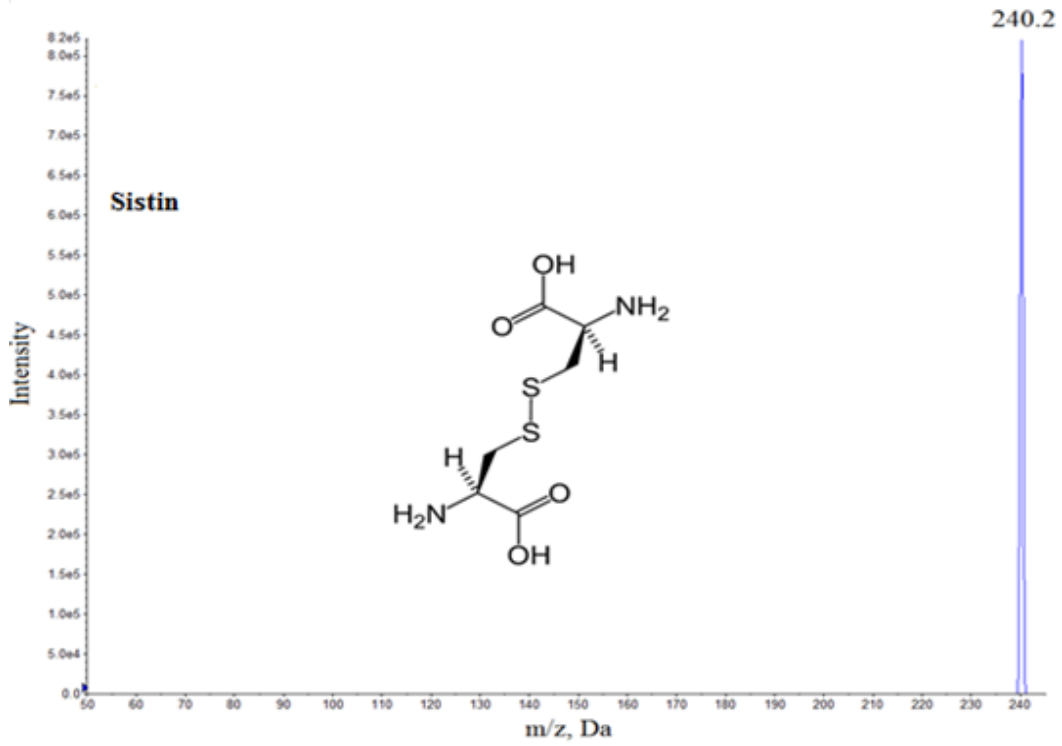
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 LC-MS/MS Bulgular

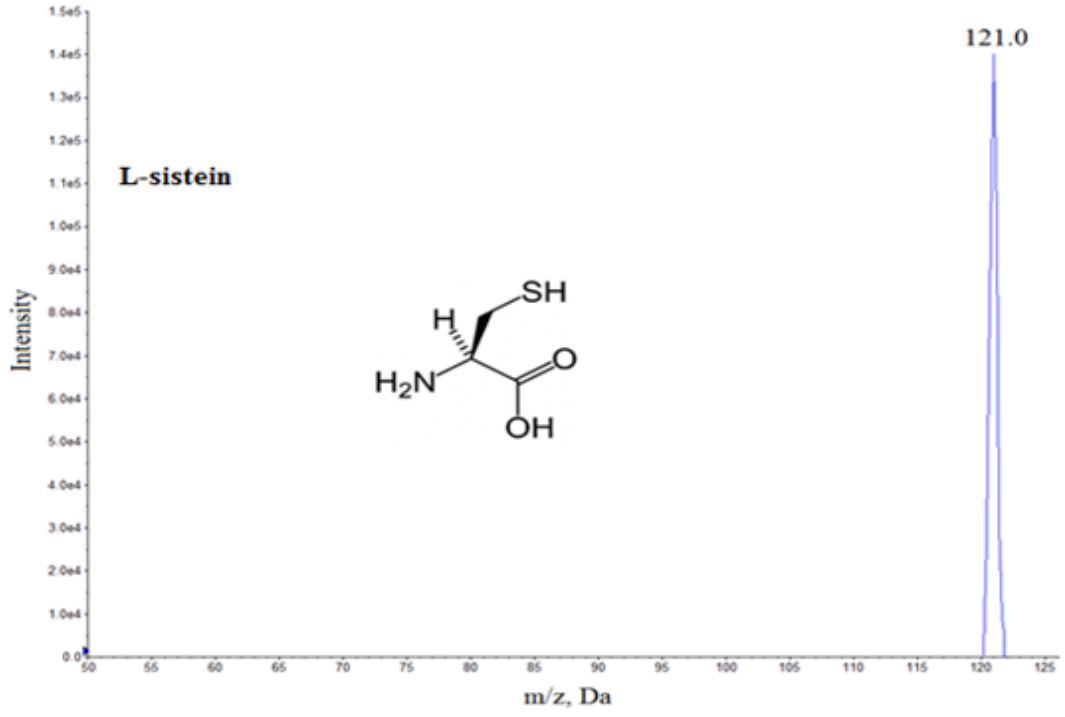
LS-MS/MS’te yapılan çalışmalar sonucunda, L-sistein ve sistinin LC-MS/MS’te tespiti için yöntem geliştirilmiştir. Bu doğrultuda L-sistein ve dimer yapısında bulunma ihtimali olan sistin formunun standartlarının moleküler ağırlıkları göz önüne alınarak LC-MS/MS cihazının MS bölümünde optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından hareketli faz denemeleri ve örnek optimizasyonu cihaz performansı gibi parametreler kontrol edilerek validasyon işlemi sırasıyla gerçekleştirilmiştir. Yöntem validasyonu kapsamında, öncelikle standart olarak kullanılan örnekler belirlenmiş ve çalışma aralığına karar verilmiştir. Doğrusallık çalışması amacıyla en düşük konsantrasyon 0.005 mg/L başlamak üzere 5 farklı konsantrasyonda standart hazırlanarak cihazda en az 3’er paralel analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile konsantrasyona karşı cihazdan elde edilen intensity alanların grafiği çizilmiştir. Kromotogramlardan her bir standart konsantrasyonuna karşılık gelen pik alanları belirlenip çalışma eğrisi (Lineerite-doğrusallık) oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrisindeki, standart çözeltilerin lineer doğruya uzaklıklarının karelerinin toplamının minimum olması gerekliliğinden dolayı grafiğin regresyon katsayısının >0.99 olması beklenmektedir. Çalışmanın 0.005-0.01-0.05-0.1-1 mg/L konsantrasyonlardaki sistin ve L-sistein analitleri için en az 3 tekrarlı çalışma sonuçlarının alan ve kalibrasyon eğrisine karşılık konsantrasyon değerleri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.3’te gösterilmektedir. Şekil 3.1’de sistin ve L-sistein LC-MS/MS kromotogramları gösterilmiştir. Şekil 3.2’de sistin Şekil 3.3’te L-sisteine ait LC-MS/MS kütle spektrumları gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Sistın (A) ve L-sistein (B) LC-MS/MS kromotogramı



Şekil 3.2 Sistın LC-MS/MS kütle spektrumu



Şekil 3.3 L-sistein LC-MS/MS kütle spektrumu

Çizelge 3.1 Sistin konsantrasyon değerlerine karşılık gelen alanlar ve konsantrasyonlar

Standart Konsantrasyonu (mg/kg)	Alan	Konsantrasyon (mg/kg)
0,005	32400,00	0,0054
0,005	41900,00	0,0070
0,005	38900,00	0,0065
0,005	31000,00	0,0052
0,005	39000,00	0,0065
0,005	370000	0,0050
0,010	92600,00	0,0154
0,010	87500,00	0,0146
0,010	92300,00	0,0154
0,05	461000,00	0,0768
0,05	402000,00	0,0670
0,05	432000,00	0,0720
0,10	857000,00	0,1428
0,10	741000,00	0,1235
0,10	835000,00	0,1392
1,00	6560000,00	1,0933
1,00	6440000,00	1,0733
1,00	6370000,00	1,0617

Her çalışmadan en az 3 paralel okuma gerçekleştirilmiş ve bu çalışmaların aritmetik ortalamaları (3.1) eşitliği vasıtasıyla hesaplanmış ve sistin için kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Sistinin konsantrasyonlarına karşılık gelen ortalama alanlar Çizelge 3.2’de gösterilmektedir. Şekil 3.4’te sistinin konsantrasyonlarına karşılık gelen kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3.1)$$

$\bar{x}$: Aritmetik ortalama

i: 1,2,..n

n: Ölçüm sayısı

Çizelge 3.2 Standart sistinin ortalama konsantrasyon alanları

Standart (mg/kg)	Alan
0,005	39000,00
0,010	92300,00
0,05	461000,00
0,10	741000,00
1,00	6370000,00



Şekil 3.4 Sistin kalibrasyon eğrisi

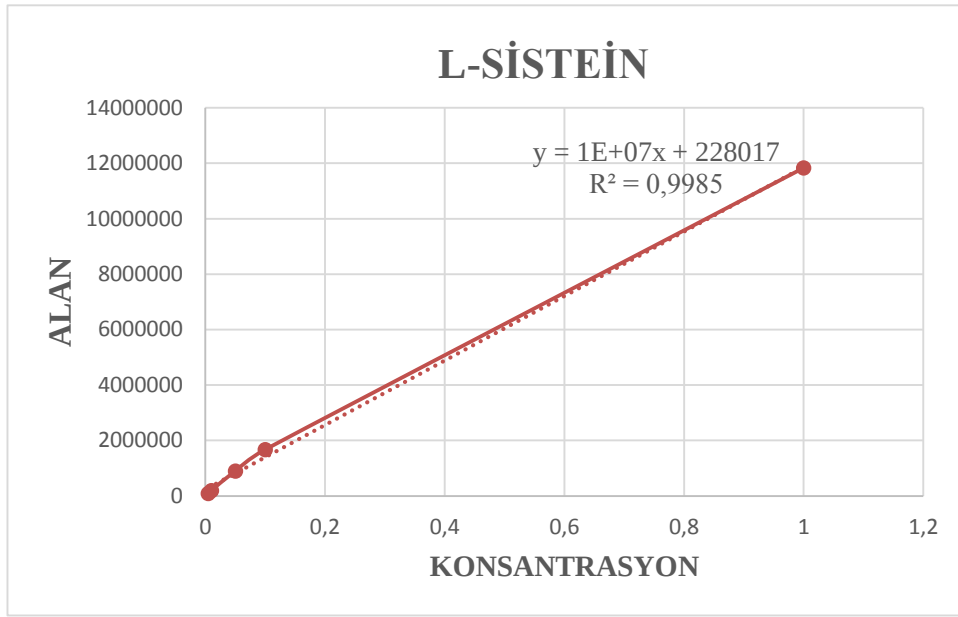
Çalışmada kullanılan L-sistein standardının farklı konsantrasyonlara karşılık gelen en az 3 tekrarlı okumaların aritmetik ortalamalarına karşılık gelen alanlar Çizelge 3.3'te gösterilmektedir. Şekil 3.5'te L-sistein ortalama alanlara karşılık gelen kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 L-sistein konsantrasyon değerlerine karşılık gelen alanlar ve konsantrasyonlar

Standart Konsantrasyonu (mg/kg)	Alan	Konsantrasyon (mg/kg)
0,005	89100	0,0089
0,005	96700	0,0097
0,005	92500	0,0093
0,005	91000	0,0091
0,005	91800	0,0092
0,005	91250	0,0091
0,01	189000	0,0189
0,01	206000	0,0206
0,01	192000	0,0192
0,05	921000	0,0921
0,05	899000	0,0899
0,05	883000	0,0883
0,1	1740000	0,1740
0,1	1630000	0,1630
0,1	1650000	0,1650
1	12200000	1,2200
1	11800000	1,1800
1	11500000	1,1500

Çizelge 3.4 Standart L-sistin ortalama konsantrasyon alanları

Standart (mg/kg)	Alan
0,005	92220
0,01	195667
0,05	901000
0,1	1673333
1	11833333



Şekil 3.5 L-sistein kalibrasyon eğrisi

Validasyon kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda sistin ve L-sistein için lineerite çalışması gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de gösterildiği gibidir. Lineer ölçüm aralığı çalışılan tüm analitler için farklı konsantrasyonlara bağlı olarak orantılı bir biçimde alan değişimi olduğu gözlemlenmiş ve korelasyon değerleri 0.99’ten büyük olduğu hesaplanmıştır. Bu sonuçlar kabul limitleri içerisinde uygun bulunmuştur.

Çalışmada tayin sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) hesabı için sistin ve L-sisteinin kalibrasyon eğrilerinin en düşük konsantrasyon noktası olan 0.005 mg/L için 6 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın konsantrasyonlarının aritmetik ortalama ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Tayin sınırı (LOD), ölçüm sınırı (LOQ) ve Rölatif (bağıl) standart sapma (RSD) ve yüzde Rölatif (bağıl) standart sapma (%RSD) değerleri (3.2),

(3.3) ve (3.4) eşitliklerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar sistin için Çizelge 3.5'te L-sistein için Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3.2)$$

s: Standart sapma

n: Değer sayısı

x_i : 1,2,..n

$\bar{x}$: Aritmetik ortalama

$$LOD = C + 3s$$

$$LOQ = C + 10s \quad (3.3)$$

LOD: Tespit sınırı

LOQ: Ölçüm sınırı

C: Serini aritmetik ortalaması

s: Standart sapma

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad (3.4)$$

RSD: Rölatif (bağıl) Standart sapma

s: Standart sapma

$\bar{x}$: Aritmetik ortalama

Çizelge 3.5 Sistin LOD VE LOQ değerleri

Standart konsantrasyonu (mg/L)	Alan	Konsantrasyon (mg/L)
0,005	32400	0,005
0,005	41900	0,007
0,005	38900	0,006
0,005	31000	0,005
0,005	39000	0,007
0,005	37000	0,006
Aritmetik ortalama	36700	0,006
Standart sapma	4201	0,001
%RSD	11	11
LOD		0,002
LOQ		0,007

Çizelge 3.6 L-sistein LOD VE LOQ değerleri

Standart konsantrasyonu (mg/L)	Alan	Konsantrasyon (mg/L)
0,005	89100	0,009
0,005	96700	0,010
0,005	92500	0,009
0,005	91000	0,009
0,005	91800	0,009
0,005	91250	0,009
Aritmetik ortalama	92058	0,009
Standart sapma	2543	0,000
%RSD	3	3
LOD		0,001
LOQ		0,003

Tayin sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) değerleri standart konsantrasyonuna yakın ve uygun olduğu görülmüştür. Ölçüm sınırı değerleri kaynaklara göre tayin limitinin 0.33 katı olması idealdir, bu durum değerlerin uygun olduğunu göstermektedir. Yüzde rölatif (bağıl) standart sapmanın kaynaklara göre < %20 olması beklenmektedir bu da sonuçların ideal olduğunu göstermektedir. Validasyon çalışmaları kapsamında LOD ve LOQ için elde edilen sonuçlar uygun olarak bulunmuştur.

Çalışmanın validasyon çalışmalarından kesinlik kapsamında yapılan tekraredilebilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları için gerçekleştirilen işlemde %100 gerçek standartlardan 5'er paralel 2 tekrarlı enjeksiyon olmak üzere birbirinden bağımsız 10 adet aynı gün içinde çalışma yapılmıştır. Bu çalışmadan tekraredilebilirlik %RSD değerleri denklem (3.4) kullanılarak hesaplanmıştır. Ardından farklı bir günde içeriği belli %100 gerçek örneklerle tekrarüretilebilirlik kontrolü için işlem tekrarlanmıştır.

Sistin ve L-sistein için tekraredilebilirlik ve tekrarüretilebilirlik değerleri Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8’de gösterilmektedir. Tekraredilebilirlik limiti S_r değeri eşitlik (3.5) kullanılarak, terarüretilebilirlik değeri (RSD_r) ise (3.6) eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ilk gün yapılan çalışmalarla karşılaştırılarak % RSD_r değeri hesaplanmıştır.

$$S_r = \sqrt{\sum w^2 / 2n} \quad (3.5)$$

S_r : Tekraredilebilirlik limiti

w: İki çalışma arasındaki fark

n: Tekrar sayısı

$$r = 2.83 * S_r$$

$$RSD_r = \sqrt{\frac{\sum [(a_i - b_i) / \bar{x}_i]^2}{2n}} \quad (3.6)$$

i: 1,2,..n

n: Tekrar sayısı

RSD_r : Tekrarüretilebilirlik

$(a_i - b_i) / \bar{x}_i$: Tekrar sonuçlarının bağıl farkı

Çizelge 3.7 Sistin Tekraredilebilirlik ve Tekrarüretilebilirlik çalışmaları

Değerler	%100 gerçek numune Tekraredilebilirlik 1.gün çalışması (%)	%100 gerçek numune Tekraredilebilirlik 2.gün çalışması (%)	W^2	$\left[(a_i - b_i) / \overline{x_i} \right]^2$
1	102	105	36	0,000909068
2	95	102	1	0,00494937
3	94	100	1	0,003636272
4	101	95	25	0,003636272
5	102	98	169	0,001616121
6	95	102	4	0,00494937
7	100	104	16	0,001616121
8	99	103	9	0,001616121
9	100	95	9	0,002525189
10	105	99	1	0,003636272
Aritmetik ortalama	100	101		Toplam=0,029090174
Standart sapma	4	4		
%RSD	4	4		
S_r	3,7			
r	10,4			
RSD_r	0,038138022			
% RSD_r	3,8			

Hesaplamalar sonucunda sistin için tekraredilebilirlik limiti (S_r) değeri 3,7 bulunmuş olup tekrarüretilebilirlik değeri %RSD 4 bulunmuş, tekrarüretilebilirlik değeri % RSD_r ise 3,8 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.8 L-sistein Tekraredilebilirlik ve Tekrarüretilebilirlik çalışmaları

Değerler	%100 gerçek numune Tekraredilebilirlik 1.gün çalışması (%)	%100 gerçek numune Tekraredilebilirlik 2.gün çalışması (%)	w^2	$\left[(a_i - b_i) / \overline{x_i} \right]^2$
1	102	104	4	0,00039603
2	100	105	81	0,002475186
3	95	96	0	0,000167323
4	94	98	100	0,001429668
5	104	95	81	0,008019603
6	98	105	64	0,004578105
7	101	102	1	0,000099007
8	105	103	4	0,00039603
9	100	102	4	0,00039603
10	99	100	0	0,000099
Aritmetik ortalama	100	101		Toplam=0,018055989
Standart sapma	4	4		
%RSD	4	4		
S_r	3			
r	8			
RSD_r	0,030046621			
% RSD_r	3			

Hesaplamalar sonucunda L-sistein için tekraredilebilirlik limiti (S_r) değeri 3 bulunmuş olup, tekraredilebilirlik %RSD 4 olup, tekrarüretilebilirlik ise %RSD_r ise 3 olarak bulunmuştur.

Bu değerlerin yorumlanması aşamasında kaynaklara göre tekraredilebilirlik, tekrarüretilebilirlikten büyük olmalıdır. Sonuçlarda %RSD>%RSD_r olmak üzere sonuçlar uygun olarak değerlendirilmiştir.

Kesinlik kapsamında gerçekleştirilen geri kazanım hesaplarında yüzde yüz standart örnekten faydalanılarak hesaplama yapılmıştır. Geri kazanım hesaplamalarında eşitlik (3.7)'den faydalanılmıştır. Hesaplamalar sonucunda Geri kazanım %100 bulunmuştur.

$$\% \text{Geri kazanım} = \frac{C_{pratik}}{C_{teorik}} \times 100 \quad (3.7)$$

C_{pratik} : Standart örnek gerçek konsantrasyon

C_{teorik} : Standart örnek ölçülen konsantrasyon

3.1.1 Numune Konsantrasyon Hesaplamaları

Gerçekleştirilen validasyon çalışmaları sonrası, numuneler çalışmanın materyal-metot bölümünde bahsedildiği gibi hazırlandı ve ardından hazırlanan numunelerin LC-MS/MS cihazı ile analizi gerçekleştirildi.

Hazırlanan standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisinde, yerleri belirlenen analitler analiz edildi. Çalışmaların sonucunda farklı buğday unu örneklerinin, laboratuvarda üretimi gerçekleştirilen L-sisteinlerin ve sistinlerin ve ayrıca lavaş ekmeği, hamburger ekmeği ve pizza hamuru olmak üzere her bir analit için dilüsyon faktörü hesaplanmıştır.

Klasik en küçük kareler kalibrasyon yöntemi ile analitik cihazlardan elde edilen ölçüm verileriyle elde edilen lineer denklem sistemlerine Lambert Beer yasasına uygulanmasıyla hesaplanmaktadır [35].

Bu doğrultuda, kromatogramda integrali yapılan alan, kalibrasyon eğrisinden gelen değişim, dilüsyon faktörleri ve örnek tartımları göz önüne alınarak analit konsantrasyonları eşitlik (3.8)'den faydalanılarak hesaplanmıştır.

$$C \text{ (mg/L)} = C_T \times F \quad (3.8)$$

C: Analit Miktarı (mg/L)

C_T : Kalibrasyon eğrisinden bulunan derişim (mg/L)

F: Seyreltme faktörü

Örneklerin sistin ve L-sistein yüzdeleri hesaplanmasında cihazdan kalibrasyon eğrisine karşılık konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Dilüsyon faktörleri tartım kütleleri (g) ile çarpılıp yüzde analit için çarpım faktörü hesaplanmış ve ardından % sistin ve L-sistein değerleri kalibrasyon eğrisi ve alana göre hesaplanmıştır. Sonuçlar buğday unlarının sistin değerleri Çizelge 3.9’da L-sistein değerleri ise Çizelge 3.10’da belirtilmiştir. Çizelge 3.11’de buğday unlarının toplam sistin ve L-sistein değerleri gösterilmektedir. Laboratuvar ortamında üretimi gerçekleştirilen L-sistein örneklerinin sistin analiz sonuçları Çizelge 3.12’de, L-sistein sonuçları ise Çizelge 3.13’te gösterilmektedir. Bu çalışmada domuz kılı ve insan saç örnekleri buğday unu örnekleri gibi hazırlanıp LC-MS/MS cihazında analizi gerçekleştirilmiştir. Domuz kılı ve insan saç sistin değerleri Çizelge 3.12’de L-sistein değerleri ise Çizelge 3.13’te gösterilmektedir. Ayrıca çalışmada ticari ürünlerden iki farklı markada pizza hamuru, hamburger ekmeği, lavaş ürünleri unlar gibi türevlendirme işlemine tabi tutularak LC-MS/MS’de L-sistein ve sistin değerleri incelenmiştir. Çizelge 3.14 iki farklı markada olmak üzere pizza hamuru, lavaş ve hamburger ekmeği gibi unlu mamullerin L-sistein ve sistin yüzdeleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.9 Buğday unları sistin değerleri

Numune İsimleri	Un Tipleri %Kül Değerleri	Alan	Konsantrasyon (ppm)	Çarpım Faktörü	% Sistin	Standart Sapma
U1	0,55	2,14E+07	3,3	0,098	0,323	0,0014
U2	0,55	2,35E+07	3,63	0,098	0,353	0,0035
U3	0,65	1,91E+07	2,94	0,1	0,295	0,0007
U4	0,75	1,76E+07	2,71	0,1	0,271	0,0028
U5	1,25	1,44E+07	2,23	0,1	0,223	0,0028
U6	1,00	1,97E+07	3,05	0,1	0,305	0,0007
U7	0,55	1,26E+07	1,94	0,1	0,193	0,0014
U8	1,25	1,93E+07	2,98	0,1	0,299	0,0007
U9	0,65	2,48E+07	3,82	0,1	0,382	0,0000
U10	0,65	2,46E+07	3,8	0,1	0,370	0,0035
U11	0,65	2,03E+07	3,13	0,1	0,307	0,0000
U12	0,65	2,87E+07	4,42	0,1	0,448	0,0042
U13	0,65	2,61E+07	4,03	0,1	0,397	0,0085
U14	0,65	2,46E+07	3,79	0,1	0,367	0,0069
U15	0,65	2,85E+07	4,4	0,1	0,432	0,0007
U16	0,65	2,49E+07	3,84	0,1	0,384	0,0049
U17	0,55	1,56E+07	2,4	0,1	0,248	0,0051
U18	0,55	1,72E+07	2,65	0,1	0,270	0,0029
U19	0,55	1,53E+07	2,35	0,1	0,230	0,0010
U20	0,65	3,12E+07	4,82	0,1	0,482	0,0057
U21	0,55	1,28E+07	1,97	0,1	0,197	0,0064
U22	0,55	1,20E+07	1,85	0,1	0,185	0,0074
U23	0,65	1,65E+07	2,54	0,1	0,257	0,0042
U24	0,55	1,10E+07	1,69	0,1	0,170	0,0014
U25	1,20	2,22E+07	3,43	0,1	0,339	0,0064
Aritmetik ortalama					0,309	
Standart Sapma						0,003
%RSD	0,8					

Çizelge 3.10 Buğday unları L-sistein değerleri

Numune İsimleri	Un Tipleri %Kül Değerleri	Alan	Konsantrasyon (ppm)	Çarpım Faktörü	% L-sistein	Standart Sapma
U1	0,55	8,09E+05	0,0678	0,098	0,007	0,0002
U2	0,55	4,72E+05	0,0395	0,098	0,004	0,0002
U3	0,65	7,08E+05	0,0593	0,1	0,006	0,0002
U4	0,75	4,27E+05	0,0357	0,1	0,004	0,0001
U5	1,25	1,97E+05	0,0165	0,1	0,002	0,0000
U6	1,00	1,88E+05	0,0157	0,1	0,002	0,0000
U7	0,55	4,92E+05	0,0412	0,1	0,004	0,0002
U8	1,25	2,81E+05	0,0235	0,1	0,002	0,0000
U9	0,65	6,23E+05	0,0523	0,1	0,005	0,0000
U10	0,65	3,51E+05	0,0295	0,1	0,003	0,0000
U11	0,65	4,15E+05	0,0347	0,1	0,003	0,0001
U12	0,65	1,80E+06	0,151	0,1	0,015	0,0001
U13	0,65	4,69E+05	0,0393	0,1	0,004	0,0001
U14	0,65	1,65E+05	0,0138	0,1	0,001	0,0001
U15	0,65	2,94E+05	0,0247	0,1	0,002	0,0000
U16	0,65	8,90E+04	0,00746	0,1	0,0007	0,0000
U17	0,55	5,01E+04	0,0042	0,1	0,0004	0,0001
U18	0,55	2,45E+05	0,0205	0,1	0,0021	0,0001
U19	0,55	6,25E+04	0,00524	0,1	0,0005	0,0001
U20	0,65	1,52E+05	0,0127	0,1	0,0012	0,0001
U21	0,55	8,41E+04	0,00705	0,1	0,0007	0,0000
U22	0,55	4,10E+04	0,00343	0,1	0,0003	0,0001
U23	0,65	1,28E+05	0,0107	0,1	0,0011	0,0000
U24	0,55	4,86E+04	0,00407	0,1	0,0004	0,0000
U25	1,20	8,57E+05	0,0718	0,1	0,0071	0,0001
Aritmetik ortalama					0,003	
Standart Sapma						6E-05
%RSD		2,1				

Çizelge 3.11 Buğday unlarının L-sistein ve sistin değerlerinin toplamı

Örnek Adı	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9
Toplam sistin+L-sistein	0,330	0,357	0,301	0,275	0,225	0,307	0,197	0,301	0,387
Örnek Adı	U10	U11	U12	U13	U14	U15	U16	U17	U18
Toplam sistin+L-sistein	0,373	0,310	0,463	0,401	0,368	0,434	0,385	0,248	0,272
Örnek Adı	U19	U20	U21	U22	U23	U24	U25		
Toplam sistin+L-sistein	0,231	0,483	0,198	0,185	0,258	0,170	0,410		

Çizelge 3.12 Laboratuvar ortamında üretilen L-sisteinlerin sistin değerleri

Örnek isimleri	Alan	Konsantrasyon (ppm)	Çarpım Faktörü	% Sistin
Domuz kılından elde edilmiş L-sistein (pH ayarı yapılmamış)	5,53E+07	8,53	0,2	1,706
İnsan saçından elde edilmiş L-sistein (pH ayarı yapılmamış)	4,72E+07	7,29	0,2	1,458
İnsan saçından elde edilmiş L-sistein (pH 5-5,5)	6,44E+07	9,94	0,2	1,988
Domuz kılından elde edilmiş L-sistein (pH 5-5,5)	5,87E+07	9,06	0,2	1,812
Toz saç	5,49E+07	8,48	0,22	3,494
Toz domuz kılı	6,44E+07	9,94	0,42	4,319

Çizelge 3.13 Laboratuvar ortamında üretilen L-sisteinlerin L-sistein değerleri

Örnek isimleri	Alan	Konsantrasyon (ppm)	Çarpım Faktörü	% L-sistein
Domuz kılından elde edilmiş L-sistein (pH ayarı yapılmamış)	2,58E+05	0,0217	0,2	0,00434
İnsan saçından elde edilmiş L-sistein (pH ayarı yapılmamış)	4,27E+05	0,0358	0,2	0,00716
İnsan saçından elde edilmiş L-sistein (pH 5-5,5)	1,23E+05	0,0103	0,2	0,00206
Domuz kılından elde edilmiş L-sistein (pH 5-5,5)	3,48E+05	0,0291 0	0,2	0,00582
Toz saç	1,99E+06	0,167	0,22	0,03674
Toz domuz kılı	2,16E+07	1,81	0,42	0,75298

Çizelge 3.14 Ticari ürün L-sistein ve sistin yüzdeleri

Ticari ürünler	% Sistin	% L-sistein	% Toplam sistin ve L-sistein
Marka 1 Pizza Hamuru	0,112	0,00221	0,114
Marka 2 Pizza Hamuru	0,163	0,00311	0,166
Marka 1 Lavaş Ekmeği	0,132	0,00139	0,134
Marka 2 Lavaş Ekmeği	0,092	0,00163	0,094
Marka 1 Hamburger Ekmeği	0,172	0,00206	0,174
Marka 2 Hamburger Ekmeği	0,117	0,0419	0,159

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler literatürle kıyaslandığında buğday unlarının içeriğindeki toplam sistin ve L-sistein oranı yaklaşık %0.2-0.4 aralığında olduğu kaynaklarda belirtilmiştir [36], [37]. Ancak literatürdeki çalışmalar oldukça eski ve

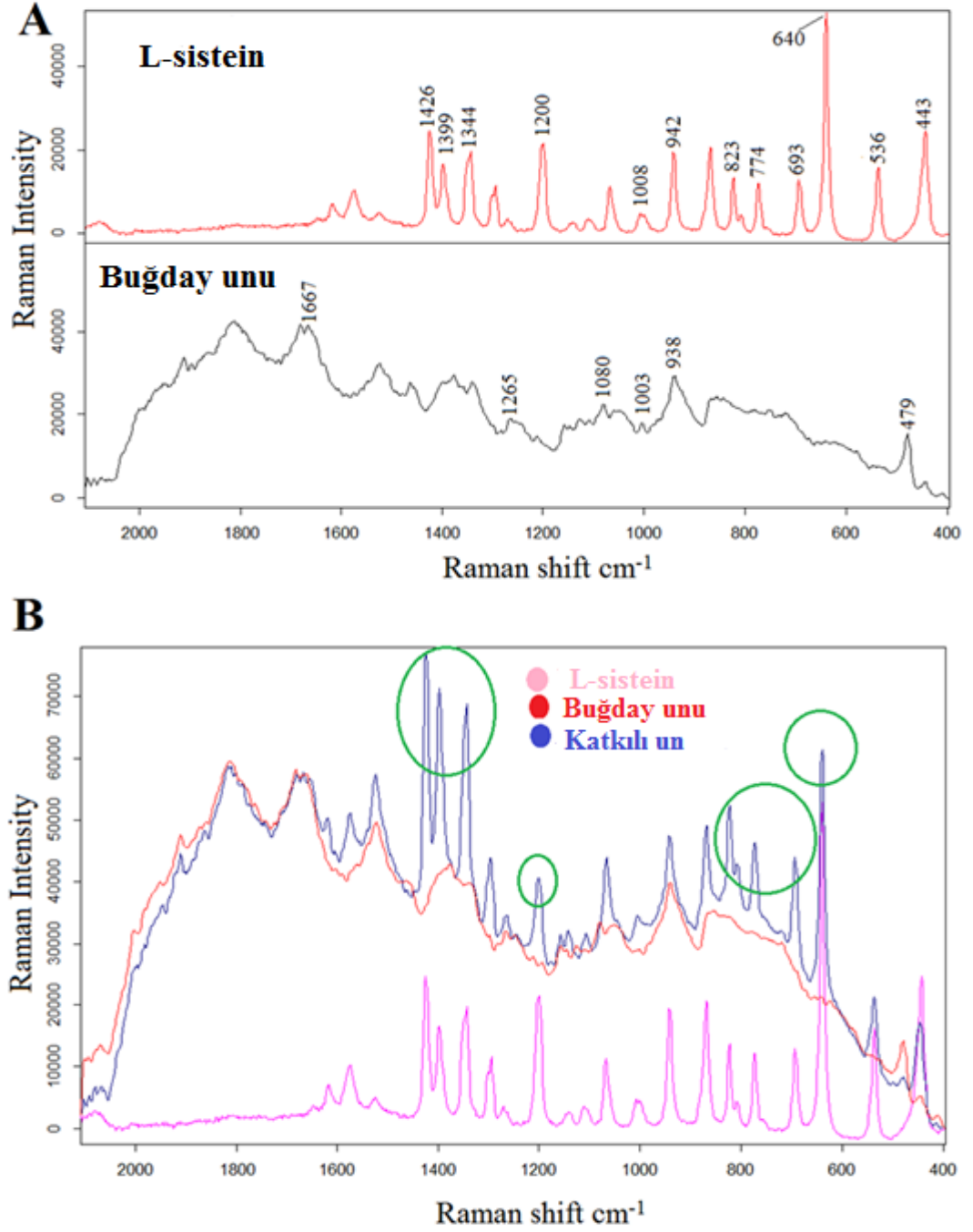
detaylı yeterince güncel çalışma mevcut değildir. Çalışmada 25 adet farklı buğday unu örneklerinin sonuçları incelendiğinde örneklerin toplam sistin ve L-sistein sonuçlar % 0.170-0.483 aralığında bulunmuştur. Bu değerler literatüre kıyasla uygun kabul edilebilir ancak literatürde buğday unlarında L-sistein ve sistinin kantitatif tespiti mevcut değildir. Laboratuvar ortamında domuz kılı ve insan saçından üretilen L-sisteinlerin toplam sistin ve L-sistein değerleri %1-2 arasında bulunmuştur. İnsan saçındaki sistein yüzdesi %6.5-14.5 arasında değişmektedir. Bulunan değer literatüre göre miktarsal olarak azdır ancak bunun sebebi laboratuvar ortamında gerçekleşen kayıplar olduğu söylenebilir. Ticari ürün olarak piyasadan alınan farklı iki markaya ait pizza hamuru, lavaş ekmeği ve hamburger ekmeğine ait % sistin ve L-sistein değerleri %0.9-1.6 arasında değiştiği görülmektedir.

3.1.2 Raman Bulgular Sonuçlar

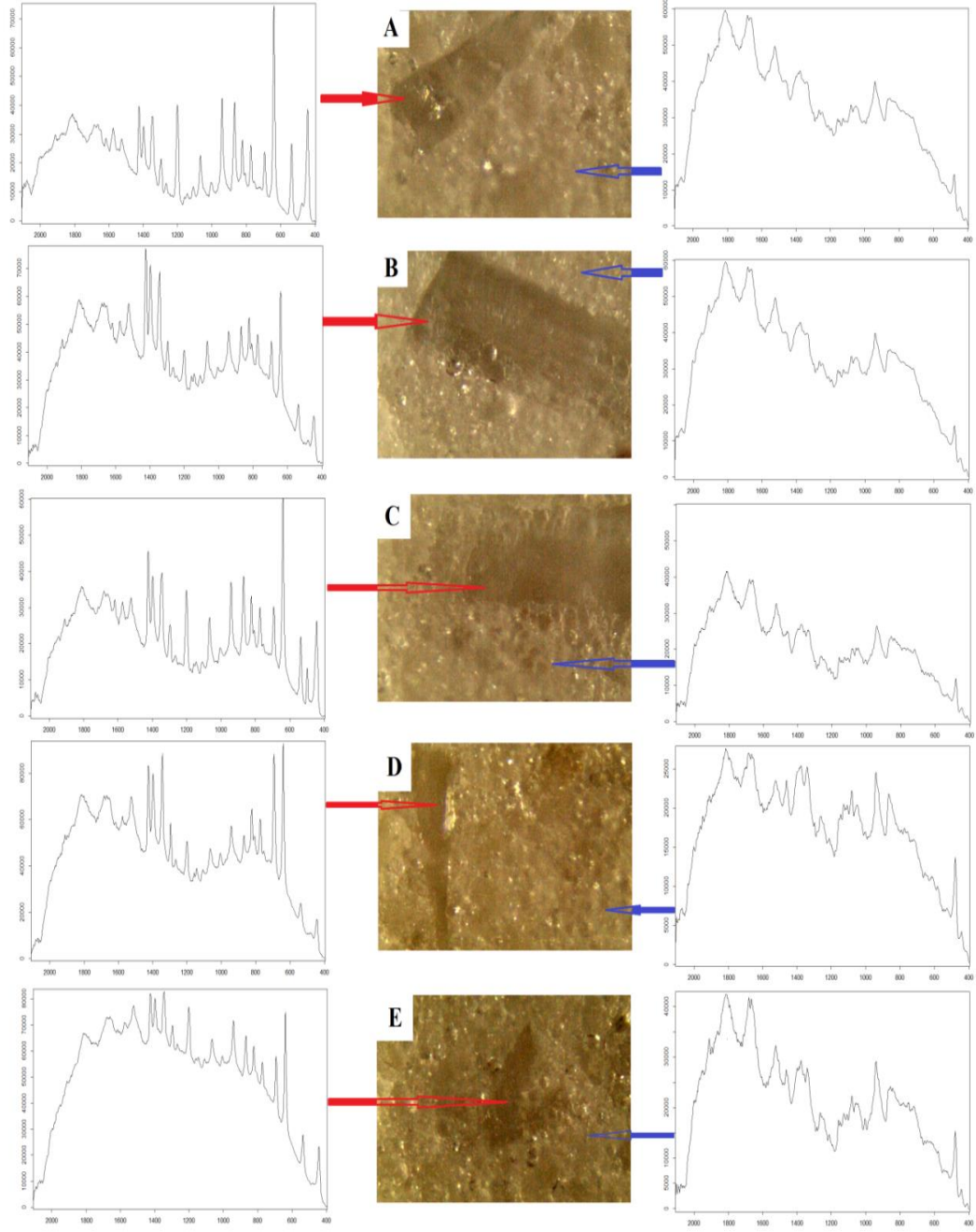
Raman Spektroskopisi çalışma kapsamında Raman mikroskop kullanılarak L-sistein ile %0.5, 1, 2, 4 oranlarında olmak üzere L-sistein katkılı ve katkısız buğday un numunelerine ait canlı video görüntüleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. İncelemeler sırasında peletler üzerinde farklı özellikte Raman pikleri tespit edilmiştir. Raman Mikroskop görüntülerinde bu bölgelerin diğer bölgelere nazaran daha koyu renklerde belirgin sınır ve farklılıklara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Raman mikroskop ile elde edilen 5 çeşit buğday ununa ait canlı video görüntüleri Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Şekildeki kırmızı okların uç kısımları koyu sarı renkteki bölgeleri göstermektedir. Mavi okların uç kısımları ise açık sarı renkteki bölgeleri göstermektedir. Okların gösterildiği bölgelerden Raman spektroskopisi cihazı ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Raman spektrumu alınmış bölgeler Şekil 3.7’de gösterildiği gibi karşılaştırılmıştır. Koyu renkli bölgelerden alınan spektrumlar ile açık renkli bölgelerden alınan spektrumlar farklılık göstermektedir. Bölgenin koyu renkli oluşu orada L-sisteinin katıldığını göstermektedir. L-sistein ve buğday unu için yapılan raman spektrumları Şekil 3.6’da gösterilmektedir. Görüntülerde yer alan 443, 536, 640, 693, 774, 823, 942, 1008, 1200, 1344, 1399, 1426 cm^{-1} bantları L-sistein için raman kaymalarını tanımlamaktadır [43], [44]. Bu bantlar L-sisteinin kimyasal yapısındaki mevcut kimyasal grup ve moleküllere aittir. Özellikle 942 cm^{-1} ’de elde edilen pik S-H bant titreşimine aittir. 1008 cm^{-1} raman kaymasındaki pik NH_3 ile S-H bağları arasındaki etkileşimi gösteren titreşimsel banttır [43], [44]. Raman spektrumundaki buğday ununa

ait titreşimsel bantlar ise 479, 938, 1003, 1080, 1265, 1667 cm^{-1} bölgesindeki piklerdir. Bu bantlardan 479 cm^{-1} ve 938 cm^{-1} molekül içindeki karbon bantlarıdır ve bu bantlar undaki nişastayı temsil etmektedir [45].

Şekil 3.7’de görüldüğü üzere, dışarıdan L-sistein eklenen örneğe ait spektrumda L-sisteine özgü titreşimsel bantlar belirgin şekilde görülmektedir. Canlı video görüntülerinden yola çıkarak un içerisine dışarıdan eklenen L-sisteinin tespiti bu sayede mümkün olmaktadır.



Şekil 3.6 (A) L-sistein ve buğday ununa ait Raman spektrumu, (B) L-sistein, buğday unu ve taşıdığı örneğe ait Raman spektrumları



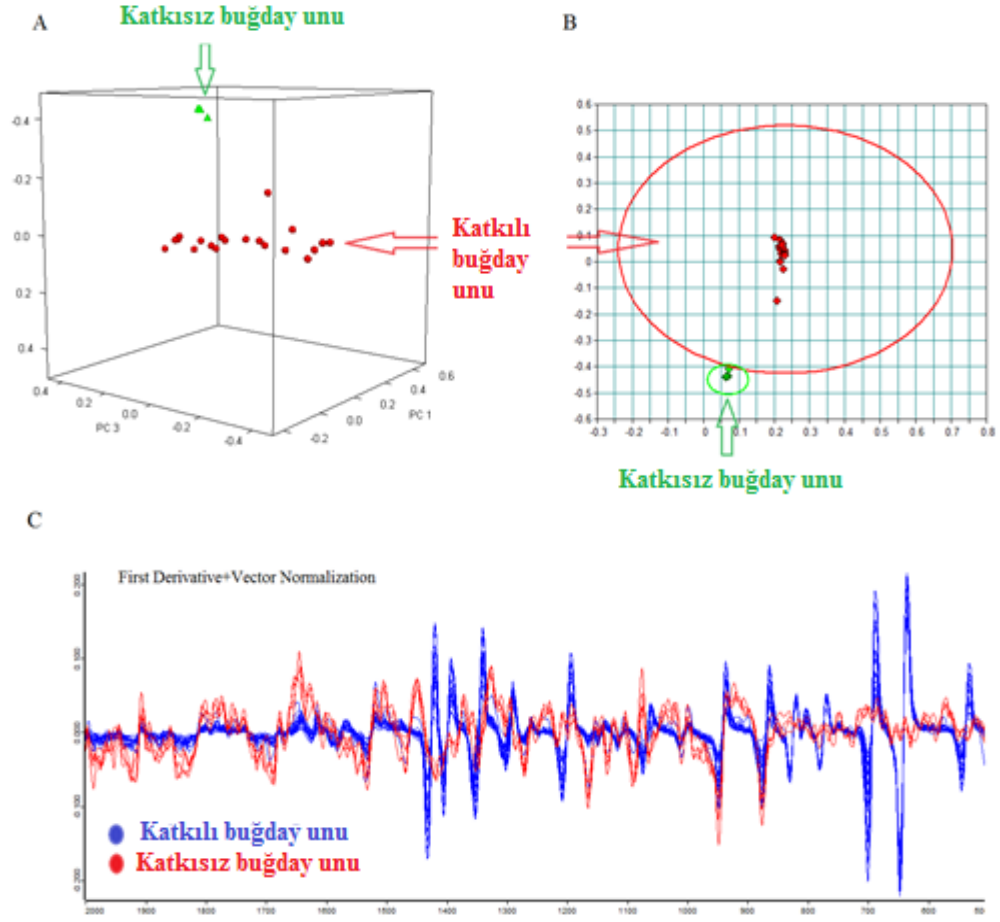
Şekil 3.7 Raman mikroskop ile elde edilen canlı video görüntüleri ve spektrum noktaları (A) WF1, (B) WF2, (C) WF3, (D) WF4, (E) WF5

3.1.3 Kemometrik İnceleme

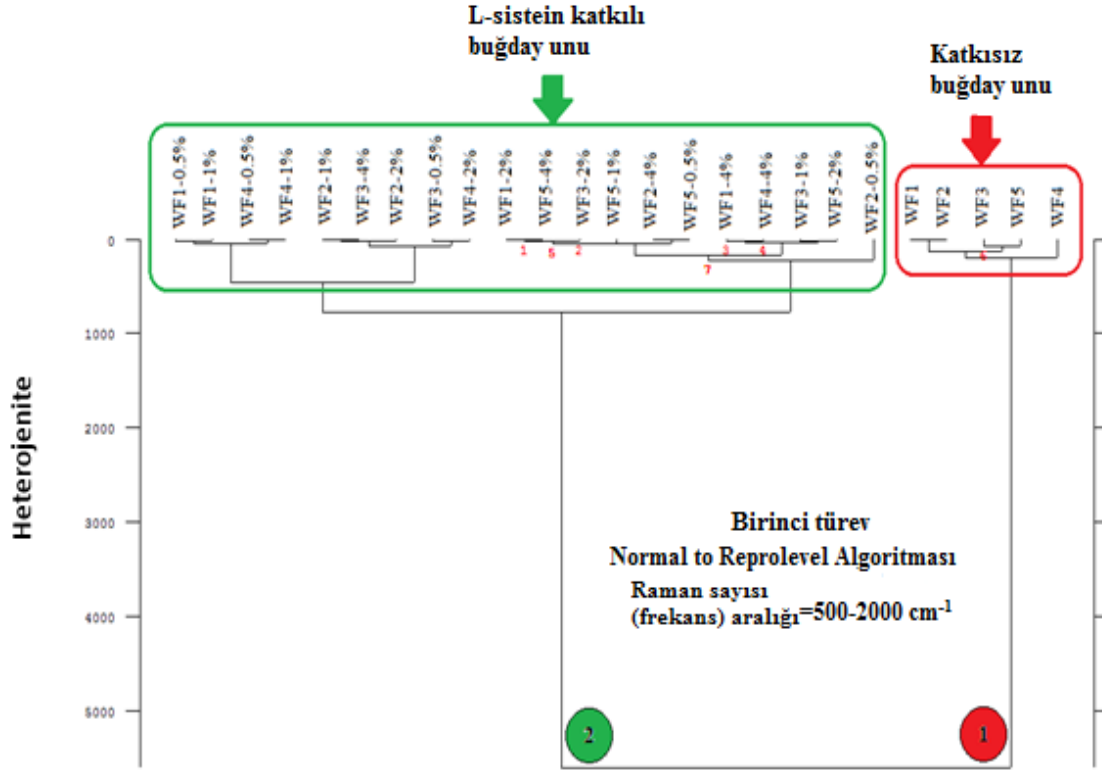
Kemometrik analiz kapsamında Raman mikroskop ile elde edilen canlı video görüntülerindeki koyu sarı renkteki bölgelerden alınan spektrumlar yani L-sisteinin mevcut olduğu bölgeler ile katkısız unlara ait spektrumlar sınıflandırma analizine dâhil edilmiştir. Buğday unu ve L-sistein katkısına ait spektrumlar karşılaştırıldığında 2100-

400 cm^{-1} raman kaymasında (Parmak izi bölge) karakteristik farklılıklar olduğu dikkat çekmektedir. Kemometrik analizde de 2100-400 cm^{-1} aralığından yararlanılmıştır. Tüm spektrumlara birinci türev ve vektör normalizasyonu ön işlemi uygulanarak hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ve temel bileşen analizi (PCA) gerçekleştirilmiştir. Temel bileşen analiz grafiğinde katkılı ve katkısız unlar ikiye ayrılmış kümeler gözlemlenmiştir. Şekil 3.8’de temel bileşen analizine ait sonuçlar sunulmuştur. Katkısız ve L-sistein ilave edilmiş örneklerle ait üç boyutlu temel bileşen analizi grafiğinde katkılı ve katkısız unlar belirgin farklı kümelere ayrıldığı görülmektedir. Katkısız ve L-sistein ilave edilmiş örneklerle ait iki boyutlu temel bileşen analizi grafiğinde de ayrımlar belirgindir. 2 boyutlu ve 3 boyutlu grafiklerde görüldüğü üzere L-sistein katkılı ve katkısız unlar çok belirgin şekilde birbirinden ayrılmıştır. Ayrıca Şekil 3.8’de birinci türev ve vektör normalizasyon ön işlemi görmüş spektrumlar gösterilmiştir. Şekil 3.9’da ise hiyerarşik kümeleme analiz sonucunda elde edilen dendrogram gösterilmektedir. Katkılı ve katkısız buğday unlarının kolayca ayırt edilmekte olduğu sonucuna varılmıştır. İki farklı Kemometri sınıflandırma (HCA ve PCA) tekniğiyle işlenmiş verilerin sonuçları birbiriyle oldukça uyumludur.

Bu çalışmada L-sistein katkılı unların ve saf unların birbirlerinden %100 doğruluk ve yüksek heterojenite ile ayırt edilebildiği açıkça görülmektedir. Sonuç olarak, Raman mikroskop kullanılarak buğday unundaki L-sistein taşışını hızlı, etkin ve %100 doğruluk ile tespit etmenin mümkün olduğu görülmektedir.



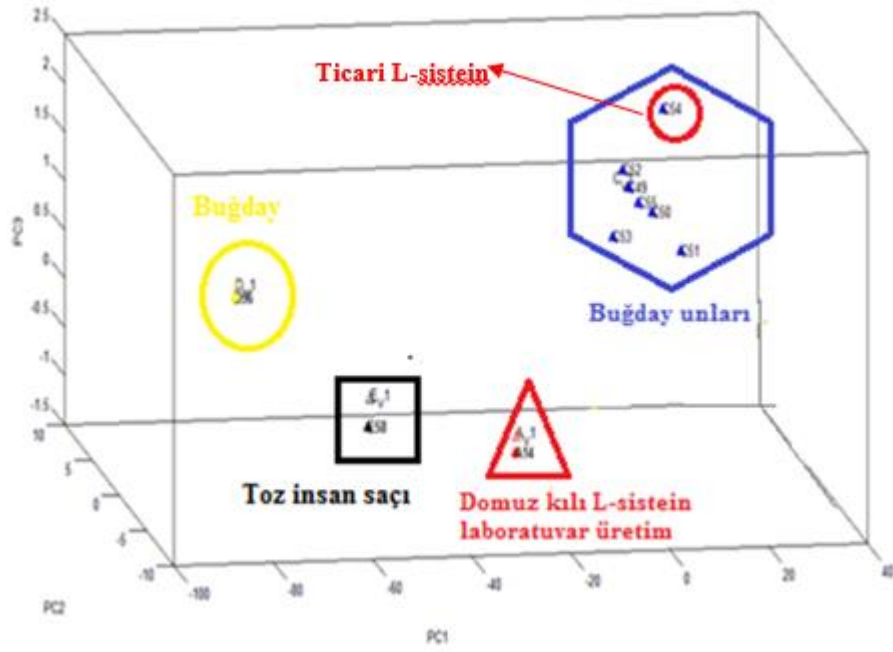
Şekil 3.8 (A) Katkısız ve L-sistein ilave edilmiş örneklerle ait üç boyutlu temel bileşen analizi grafiği, (B) Katkısız ve L-sistein ilave edilmiş örneklerle ait iki boyutlu temel bileşen analizi grafiği, (C) Birinci türev ve vektör normalizasyonu ön işlemi görmüş spektrumlar



Şekil 3.9 Katkısız ve L-sistein ilavesi yapılmış un numunelerine ilişkin hiyerarşik sınıflandırma analizi dendrogramı

Ayrıca, Raman mikroskobunda domuz kılı ve insan saçından laboratuvar ölçekli üretimi gerçekleştirilen L-sisteinler, buğday, farklı buğday unları, ticari L-sistein, toz domuz kılı ve toz insan saçının analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen spektrumlar İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümünde GADA/Kemometri metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçta domuz kılından elde edilen L-sistein ile insan saçından elde edilen L-sistein verilerinden ayırım yapılabildiği gösterilmiştir. Statik cihaz modunda analizleri gerçekleştirilen ve kemometri ile işlenen buğday unları ve ticari L-sisteinin aynı grupta olması dikkat çekmektedir. Yapılan LC-MS/MS çalışmaları ile ticari L-sisteindeki L-sistein oranlarının %10-15 civarında olması aslında sistein katkı maddesi olarak sektöre satılan bu üründe de ciddi taşış yapıldığını doğrulamaktadır. Buğday, toz insan saç ve domuz kılından laboratuvar ölçekli üretilen L-sisteinin ise her birinin farklı gruplandırıldığı görülmüştür. Bu da gelecekte yapılacak çalışmalar için umut vadetmektedir. Şekil 3.6'da Kemometrik değerlendirme işleminde GADA metodu kullanılarak hesaplanan üç temel bileşene (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiğinde örnek ayrımları gösterilmektedir.

Sonuç olarak buğday, buğday unu, toz insan saçı, toz domuz kılı, laboratuvar ortamında domuz kılından üretilen L-sisteinin ayrımlarının gerçekleşmesinde, Raman analiz verilerinin Kemometriyle birleştirilmesinin verimli sonuçlar ve belirgin değerlendirmeler sağladığını göstermiştir. Ancak şuana kadar yapılan çalışmalarda insan saçından laboratuvar ölçekli üretilen L-sisteinin ayrımı tam olarak gerçekleştirilememiştir. Bu doğrultuda yeni çalışmalar ve denemeler gerçekleştirilerek çalışmaya devam edilmektedir.



Şekil 3.10 GADA metodu kullanılarak hesaplanan üç temel bileşene (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda önemli bir tartışma konusu olan L-sistein aminoasidi ile ilgili literatürde özellikle unlarda tespitine yönelik çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu sebeple çalışmada daha hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi sebebiyle LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır. Bu çalışma, L-sisteinin LC-MS/MS metodunun hassas ölçümünden yararlanılmasının yanı sıra buğday unları ve unlu mamuller ile kantitatif olarak L-sistein tespitine yönelik başka bir çalışmanın yapılmaması açısından oldukça önemlidir. Çalışmada LC-MS/MS metot validasyonu ve 25 farklı buğday un örneğinin içeriğindeki L-sistein ve sistin yüzdeleriyle beraber piyasadan temin edilen iki farklı markada lavaş ekmeği, hamburger ekmeği ve pizza hamurunun içeriğindeki L-sistein ve sistin hesaplanmıştır. Ayrıca Spektroskopik bir yöntem olan Raman mikroskobu ile L-sistein ile katkılanmış buğday unlarının analizleri gerçekleştirilmiş değerler kemometrik olarak değerlendirilmesi yapılmış ayrıca görsel olarak video görüntülerinden yararlanılmıştır.

Sonuçta L-sisteinin tespiti amacıyla LC-MS/MS cihazıyla kantitatif analizi gerçekleştirilip metot validasyonu yapılmış, Raman spektroskopisi ile buğday ununa dışarıdan taşıyıcı amaçlı eklenen L-sisteinlerin tespitinin hızlı ve pratik %100 doğrulukta tespitinin gerçekleştirildiği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca Raman sonuçlarına uygulanan Kemometri çalışmaları ile sisteinin farklı kökenden üretilmesi durumunda da farklılandırma yapılabilmektedir.

Bu çalışma buğday unlarında L-sistein ve sistin tespiti ile ilgili olarak literatürde daha önce yapılmamış bir çalışma olması sebebiyle ilerideki çalışmalara ışık tutacak bir çalışmadır. Çalışmanın ileriki aşamalarında izotop oran-kütle spektrometresi (IR-MS) ile L-sistein kökenine yönelik çalışmalarla devam edilecektir.

Türkiye’de L-sistein ve sistinin tespiti bununla birlikte helal gıda kapsamında üretimi için yeni çalışmalar yapılmalı ve bu sayede L-sistein ile ilgili şüphelerin giderilmesi sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

-
- [1] Ruzanna, M., (2007). "L-cysteine", The Halal Journal, 40-43.
 - [2] Nur, I., Yumi, Z. H. ve Jamal, P., (2014). "Production of Cysteine: Approaches, Challenges and Potential Solution", International Journal of Biotechnology for Wellness Industries, 3: 95-101.
 - [3] Blech, R., (2003). Like Mountains Hanging by a Hair. http://www.kashrut.com/articles/L_cysteine/. 10 Ekim 2016.
 - [4] Berehou, R., Popa, C. ve Popescu, S., (2013). "Assessment of the E 920 Additive (L-Cysteine) in Relation to Some Problems of Modern Food Industry", Scientific Papers Series Management, 13: 413-417.
 - [5] Demirkol, O., Adams, C. ve Ercal, N., (2004). "Biologically Important Thiols in Various Vegetables and Fruits", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 8151-8154.
 - [6] Ryu, O.E., Ju, J.Y. ve Shin, C.S., (1997). "Continuous L-cysteine Production Using Immobilized Cell Reactors and Product Extractors", Process Biochemistry, 32: 201-209.
 - [7] Robert, H. ve Howard, B.L., (1927). "Cystine Content of Hair and Other Epidermal Tissues", Biol. Chemistry, 73: 543-553.
 - [8] Scientific committee on consumer products (SCCP). (2005). Opinion on Aminoacids Obtained by Hydrolysis of Human Hair. SCCP/0894/05.
 - [9] Angioloni, A. ve Rosa, M.D., (2007). "Effects of Cysteine and Mixing Conditions on White/Whole Dough Rheological Properties", Journal of Food Engineering, 80: 18-23.
 - [10] Ertugay, Z., (1982). Buğday, Un ve Ekmek Arasındaki Kalite İlişkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt ve Gıda Teknolojisi Bölümü.
 - [11] Dizlek, H., (2011). "Gluten Oluşumu ve Bunu Sınırlayan Engelleyen Etmenler", Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 6: 14-22.
 - [12] T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği. (28606), 2.4.2013.
 - [13] Özkaya, H., (1986). Buğday, Un ve Ekmeğin Besin Değeri ve Ekmeğin Zenginleştirilmesi, www.gidadernegi.org/TR/Genel/dg.ashx?BELGEANAH=1177&DIL=1...pdf, 10 Ekim 2016.

- [14] İHA., (2014). Gimdes'ten L-Sistein Açıklaması. http://www.milligazete.com.tr/haber/gimdesten_l-sistein_aciklamasi/343069, 9 Mayıs 2016.
- [15] T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. (28693), 30.6.2013.
- [16] Athilakshmi, J., Mohan, M. ve Chand, D.K., (2013). "Selective Detection of Cysteine/Cystine Using Silver Nanoparticles", Tetrahedron Letters, 54: 427-430.
- [17] Kwanyuen, P. ve Burton, J.W., (2010). "A Modified Amino Acid Analysis Using PITC Derivatization for Soybeans with Accurate Determination of Cysteine and Half-Cystine", J Am Oil Chem. Soc., 87: 127-132.
- [18] Jenkinsa, A. L., Larsen, R. A. ve Williams, T. B., (2005). "Characterization of Amino Acids Using Raman Spectroscopy", Spectrochimica Acta Part A, 61: 1585-1594.
- [19] Akhtar, W., Edward, H.G.M., Farwell, D.W. ve Nutbrown, M., (1997). "Fourier-Transform Raman Spectroscopic study of Human Hair", Spectrochimica Acta Part A, 53: 1021-1031.
- [20] Adar, F., (2015). "Multiparticle Analysis by Raman Microscopy", Spectroscopy, 30: 14-24.
- [21] Tcherkas, Y.V. ve Denisenko, A.D., (2001). "Simultaneous Determination of Several Amino Acids, Including Homocysteine, Cysteine and Glutamic Acid, In Human Plasma by Isocratic Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection", Journal of Chromatography A, 913: 309-313.
- [22] Podstawka, E., Ozaki, Y. ve Proniewicz, L.M., (2004). "Part I: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of Amino Acids and Their Homodipeptides Adsorbed on Colloidal Silver", Society for Applied Spectroscopy 58: 570-580.
- [23] Holler, S.W., (1999). Analitik Kimya, İkinci baskı, 7, Bilim Yayınları, Ankara.
- [24] Niessena, W.M.A. ve Tinkeb, A., (1995). "Fluid chromatography-Mass Spectrometry General Principles and Instrumentation", Journal of Chromatography, 703: 37-57.
- [25] Skoog D.A., Holler J.F. ve Nieman T.A., (1998). "In Principles of Instrumental Analysis. Molecular Mass Spectrometry", Saunders College Publishing, 498-534.
- [26] Çelik, M., (2009). Plazma/Serumda Toplam Homosistein Miktarının ESI-LC-MS/MS Yöntemiyle Ölçülmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- [27] Likit Kromatografisi-Kütle Spektrometresi, <http://ttm.istanbul.edu.tr/?p=8677>, 3 Nisan 2016.
- [28] Karadibi, H., (2013). LC-MS/MS'in Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı; İlaç, Aminoasit, Hormon ve Vitamin Analizleri, Kahramanmaraş Biyokimya Günleri. 7-9 Kasım 2013.

- [29] Raman Spektroskopisi, http://www.bayar.edu.tr/besergil/raman_spektroskopisi.pdf, 12 Ekim 2016.
- [30] Tiryaki, G.Y., (2012). Raman Spektroskopisinin Gıdaların Kalite Kontrolünde Kullanım Potansiyeli. www.gidadernegi.org/TR/Genel/dg.ashx?DIL=1&BELGEANAH...TiRYAKi.pdf, 12 Ekim 2016.
- [31] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/proteinlerin_ozellikleri.pdf, 18 Ekim 2016.
- [32] Nimbalkar, M.S., Pai, S.R., Pawar, N.W., Oulkar, D. ve Dixit, G.B., (2012). “Free Aminoacid Profiling in Grain Amaranth Using LC–MS/MS”, Food Chemistry, 134: 2565-2569.
- [33] Anonim, (2000). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Second Edition, EUROCHEM/CITAC Guide.
- [34] Olgun, E.Ö., (2016). Kırmızı Et Dokusunda Yasaklı Anabolizanların Tespitine Yönelik Hızlı ve Pratik Analitik Yöntem Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [35] Dinç, E., (2007). “Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri”, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 27: 61-92.
- [36] Li, M. ve Lee, T.C., (1996). “Effect of Cysteine on the Functional Properties and Microstructures of Wheat Flour Extrudates”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1871-1880.
- [37] Murphy, J.C. ve Jones, D. B., (1926). Proteins of Wheat Bran. The Nutritive Properties of The Proteins of Wheat Bran, www.jbc.org/content/69/1/85.full.pdf, 30 Ekim 2016.
- [38] Kurtcebe, A., (2001). Buğday Unu Komponentlerinin Kompozisyonu ve fonksiyonları, Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta.
- [39] Zhu, Q., Kakino, K., Nogami, C. ve Ohnuki, K., (2016). “An LC-MS/MS-SRM Method for Simultaneous Quantification of Four Representative Organosulfur Compounds in Garlic Products”, Food Analytical Methods, 9: 3378-3384.
- [40] Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwold, W. ve Oefner, P.J., (2008). “Aminoacid Analysis in Biological Fluids by GC-MS”, Journal of Chromatography B, 870: 222-232.
- [41] Dettmer, K., Stevens, A.P., Fagerer, S.R., Kaspar, H. ve Oefner, P.J., (2011). “Aminoacid Analysis in Physiological Samples by GC-MS with Propyl Chloroformate Derivatization and ITRAQ-LC-MS/MS”, Springer Protocol, 828: 165-181.
- [42] Özer, H., (2001). Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Eğitimi. TÜBİTAK MAM.
- [43] Minkov, V.S., Goryainov, S.V., Boldyreva, E.V. ve Görbitz, C.H., (2010). “Raman Study of Pressure-Induced Phase Transitions in Crystals of

- Orthorhombic and Monoclinic Polymorphs of L-Cysteine: Dynamics of The Side Chain”, *Journal of Raman Spectroscopy*, 41: 1748-1758.
- [44] Minkov, V.S., Krylov, A.S., Boldyreva, E.V., Goryainov, S.V., Bizyaev, S.N. ve Vtyurin, A.N., (2008). “Pressure-Induced Phase Transitions in Crystalline L- and DL-Cysteine”, *Journal of Physical Chemistry B*, 112: 8851-8854.
- [45] Piot, O., Autran, J.C. ve Manfait, M., (2000). “Spatial Distribution of Protein and Phenolic Constituents in Wheat Grain as Probed by Confocal Raman Microspectroscopy”, *Journal of Cereal Science*, 32: 57-71.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşen DEVELİOĞLU ARSLAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 03/01/1991 İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : aysendevelioglu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Gıda Mühendisliği	İstanbul Teknik Üniversitesi	2014
Lise	Fen	Çağrıbey Anadolu Lisesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2015-2017	TÜBİTAK Gıda Enstitüsü	Bursiyer

YAYINLARI

Proje

1. Helal Gıda Denetiminde jelatin, glutamat ve L-sisteinin kaynağına yönelik hızlı, ekonomik ve pratik tespit metotlarının geliştirilmesi, uygulanması ve yaygınlaştırılması