

**KEMOMETRİK YAKLAŞIMLARLA GIDA TAĞŞIŞLERİNİN
BELİRLENMESİNDE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERİN
KULLANILMASI**

**UTILIZATION OF SPECTROSCOPIC METHODS FOR
DETERMINING FOOD ADULTERATION WITH
CHEMOMETRIC APPROACHES**

HAVVA TÜMAY TEMİZ

PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin


Gıda Mühendisliğı Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

HAVVA TÜMAY TEMİZ'in hazırladığı "Kemometrik Yaklaşımlarla Gıda Tağışlarının Belirlenmesinde Spektroskopik Yöntemlerin Kullanılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Uğur Tamer
Başkan




.....

Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı
Danışman



.....

Doç. Dr. Hasan Murat Velioglu
Üye



.....

Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyda Dudak Şeker
Üye



.....

Doç.Dr. Kemal Efe Eseller
Üye



.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak / / onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*They say people come, they say people go
This particular diamond was extra special
And though you might be gone
And the world may not know
Still I see you, celestial*

*So if you love someone, you should let them know
Oh, the light that you gave me will everglow*

*Bu tez bana okumanın ve öğrenmenin erdemini aşıl原因, yakın zamanda
kaybettiğim dedem Mustafa Vasfi YÜCESAN'a ithaf edilmiştir.*

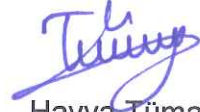
ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırdığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim

18./06/2019



Havva Tümay TEMİZ

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI


Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi/H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

18..06..2019


HAVVA TÜMAY TEMİZ

ÖZET

KEMOMETRİK YAKLAŞIMLARLA GIDA TAĞŞIŞLARININ BELİRLENMESİNDE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERİN KULLANILMASI

Havva Tümay TEMİZ

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Haziran 2019, 237 sayfa

Gıda bütünlüğü kavramı kontrol edilebilir, güvenli, kaliteli ve gerçek gıdanın sağlanması yoluyla gerçekleştirilebilmektedir. Bu kavramın günümüz koşullarında gerçekleştirilebilmesi için hızlı sonuç veren ve hassas analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Son yıllarda senkronize floresans spektroskopisi (SFS), lazer indüklü plazma spektroskopisi (LIBS) ve Raman spektroskopisi (RS) teknikleri yüksek hassasiyet ve sağladıkları detaylı bilgi nedeniyle yoğun olarak araştırılmaktadır. Bu yöntemlerden elde edilen yüksek boyuttaki veri setinden anlamlı bilginin ekstrakte edilmesi için kemometrik veri işleme yöntemleri kullanılmaktadır. Tez çalışmasında SFS, LIBS ve RS tekniklerinden elde edilen bilgi Temel Bileşen Analizi (PCA), Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi (PLS-DA), Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu (PLSR), Temel Bileşen Regresyonu (PCR) ve Çoklu Lineer Regresyon (MLR) ile analiz edilmiş ve üç farklı gıda tağşışının belirlenmesine yönelik metot geliştirilmiştir. Geliştirilen metotların ortak noktası gıdanın lipit kompozisyonuna ait bilgilerin kullanılmasıdır. Gıdaların lipit fazında majör ve minör olarak bulunan bazı moleküllerin farklı gıda tağşışlarının tespitinde kullanılabilme potansiyelleri incelenmiştir. SFS tekniğiyle yağların tokoferol ve klorofil içerikleri üzerinden tahin yağlarındaki ayçiçek yağı tağşışı belirlenmiştir. PCA modelinde ilk iki temel bileşen kümülatif varyansın %81.50 %99.45'ini açıklamıştır. Dalgaboyu seçim moduyla (WSM) en başarılı

PCA modeli dalgaboyu aralığı ($\Delta\lambda$) 60 nm'de toplanan veriyle oluşturulmuştur. Gruplar arası ayrımı sağlayan bantlar yağların fenolik madde ve tokoferol içeriklerinden kaynaklanmıştır. Kantitatif analiz PLSR, PCR ve MLR modelleriyle gerçekleştirilmiştir. PLSR en başarılı sonucu vermiştir. PLS modelinin farklı $\Delta\lambda$ 'lardaki kalibrasyon (RMSEC), çapraz validasyon (RMSECV) ve tahmin (RMSEP) modellerinin hata kareler ortalamasının karekökü değerleri 0.26-0.84, 0.74-1.40 ve 1.24-1.82 aralığındadır. Bağıl Standart Sapma (RSD) ve tahmin modelinin bağıl hata değeri (REP) 0.87-6.71 ile 13.98-20.64 arasındadır. Tespit ve tayin limiti (LOD, LOQ) değerleri %0.34-0.86 ile %1.14-2.88 arasındadır. WSM hata değerlerini arttırmış, REP, RSD, LOD ve LOQ değerlerini negatif etkilemiştir. SFS ve PLS kullanımıyla tahin yağlarındaki ayçiçek yağı taşışını yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlikle tespit eden kantitatif bir model geliştirilmiştir. LIBS tekniğiyle yağların elemental kompozisyonu üzerinden tereyağındaki margarin taşış belirlenmiştir. PCA modelinde ilk iki temel bileşen kümülatif varyansın %88.76 ve %97.92'sini açıklamıştır. Gruplar arası ayırım örneklerin Na, Ca, K, Fe, Mg ve Zn içeriklerindeki farklılıktan kaynaklanmıştır. PLSR sonucunda $R^2_{kal}=0.999$ ve $R^2_{pred}=0.984$ 'tür. RMSEC, RMSEP, RSD ve REP değerleri 2.02, 3.37, 11.3 ve 13.0'dır. LOD ve LOQ değerleri %3.9 ve %13.0'dır. RS tekniği kullanılarak lipit kompozisyonunda gerçekleşen değişiklikler üzerinden dondurulup eritilmiş olup tazeymiş gibi satışı sunulan tavuk örneklerindeki taşış belirlenmiştir. Tavuk örneklerinden hekzan ve Folch ekstraksiyonlarıyla yağ ekstrakte edilmiştir. Haftalık ve aylık bazda bir veya iki döngü olarak dondurulup eritilmiş örnekler PLS-DA modelleriyle birbirinden ayrılmıştır. Karakteristik Raman bantlarındaki değişimler detaylı olarak incelenmiştir. Tavuk yağlarının metabolomiks temelli analizi Kuadropol- Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. 1-monostearin, 1-monoolein, 11(12)-epoksieykozatrienoik asit-d₁₁, palmitik amid ve di(2-etilhekzil) adipat olmak üzere altı metabolit tanımlanmış ve oluşum mekanizmaları tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Raman spektroskopisi, lazer indüklü plazma spektroskopisi, senkronize floresans spektroskopisi, taşış, lipit kompozisyonu, gıdaların dondurulup eritilmesi

ABSTRACT

UTILIZATION OF SPECTROSCOPIC METHODS FOR DETERMINING FOOD ADULTERATION WITH CHEMOMETRIC APPROACHES

Havva Tümay TEMİZ

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

June 2019, 237 pages

Food integrity can be actualised by providing monitorable, safe, high quality and authentic food. The provision of these components reveals the need to develop rapid and precise analysis methods. In recent years, synchronous fluorescence spectroscopy (SFS), laser induced plasma spectroscopy (LIBS) and Raman spectroscopy (RS) have been extensively investigated due to their high sensitivity and the detailed information provided. Since data obtained from these techniques are of a high dimension, different chemometric methods are used to make the data meaningful. Within the scope of this thesis; SFS, LIBS and RS techniques, and Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA), Partial Least Squares Regression (PLSR), Principal Component Regression (PCR) and Multiple Linear Regression (MLR) were used to develop the detection methods for three different food adulterations. The common point of these methods is the use of information on the lipid composition of food. The potential of some of the major and minor molecules in the lipid phase of foods to detect different food adulterations was revealed. Addition of sunflower oil to the tahini oil was determined by using SFS. In the PCA model, the cumulative variances of PC1 and PC2 were 81.50% and 99.45%. Using the wavelength selection mode (WSM), the wavelength interval ($\Delta\lambda$) of the most

successful PCA model was determined to be the data collected at 60 nm. The separation between the groups resulted from the difference between the phenolic and tocopherol contents. PLSR, PCR and MLR models were developed for quantitative determination of adulteration. The best results were obtained by using PLSR. The root mean square error of calibration (RMSEC), cross validation (RMSECV) and prediction (RMSEP) models at different $\Delta\lambda$ are between 0.26-0.84, 0.74-1.40 and 1.24-1.82. The relative error of prediction (REP) and relative standard deviation (RSD) values are 0.87-6.71 to 13.98-20.64. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values are 0.34-0.86% and 1.14-2.88%. WSM application generally increased the error values, REP, RSD, LOD and LOQ. SFS and PLS techniques has enabled the development of a detection method with high sensitivity and reproducibility. The fatty acid composition of the oils was determined by GC. Using LIBS, addition of margarine to butter was determined. In the PCA model, the cumulative variance of PC1 and PC2 were 88.76% and 97.92%. The classification was caused by the differences in Na, Ca, K, Fe, Mg and Zn contents. PLSR resulted with $R^2_{cal}=0.999$ and $R^2_{pred}=0.984$. RMSEC, RMSEP, RSD and REP were 2.02, 3.37, 11.3 and 13.0. LOD and LOQ were 3.9% and 13.0%. The elemental composition of the oils was determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and flame atomic absorption spectrometry (FAAS). RS was used to monitor the changes in lipid composition due to the application of repeated freezing and thawing of the chicken samples. Lipid was extracted by hexane and Folch extractions. The fresh and frozen-thawed samples were separated by using their Raman spectra. The metabolomics analysis of the lipid phase was performed with quadrupole-time of flight liquid chromatography mass spectrometry (Q-TOF LCMS).

Keywords: Raman spectroscopy, laser induced plasma spectroscopy, synchronous fluorescence spectroscopy, adulteration, lipid composition, freezing-thawing of food

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince Hacettepe Üniversitesi'nde bana özgür bir çalışma ortamı sunan, karşılaştığım zorlukları aşmamda yenilikçi ve çözüm odaklı felsefesiyle her zaman destekleyici ve yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya

Çalışmalarımı bilimsel katkılarıyla geliştiren, zenginleştiren ve iyileştiren hocalarım Dr. Özay MENTEŞ, Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyda DUDAK ŞEKER, Doç.Dr. Haslet EKŞİ, Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT, Doç.Dr. Murat Velioğlu, Doç.Dr. Ali Topcu ve Prof. Dr. Uğur TAMER'e

Tez kapsamındaki elemental analizleri gerçekleştiren Doç. Dr. Aysel BERKKAN'a ve metabolomiks analizlerini gerçekleştiren Ozan Kaplan ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çelebier'e

Görevim süresince verdikleri destek ve her daim samimiyetleri için Nur KARAÇAĞLAR, Tuğba BULAT, Beyhan DAŞAN ve H. Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü personeline

Doktora sürecinin zorluklarını eş zamanlı olarak göğüslediğim değerli arkadaşlarım , Merve ERYILMAZ, , Aslıhan ÜNÜVAR, Fazilet MIDIK ve Gamze Nur MÜJDECİ'ye

Laboratuvar çalışmalarımıdaki destekleri için Kübra TAYYARCAN, Duygu GENİŞ, Banu SEZER, Elif ERCİOĞLU, Şefika EVRAN, Demet ATAMAN ve bir parçası olduğum için her zaman şanslı hissedeceğim Güverte Lab. ekibinin bunca yıllık tüm üyelerine

Dualarını eksik etmeyen DOĞAN, KARADENİZLİ, KISA, KÖSEMEHMETOĞLU, SEDEF, SOYER ve YÜCESAN ailelerine

Destek ve tavsiyeleriyle daima yolumu aydınlatan kıymetli dostlarım Ceren SEDEF, Akif Göktuğ BOZKURT ve Berdan ULAŞ'a,

Bana inanmaktan asla vazgeçmeyen ailem; annem Nesime TEMİZ ve babam Ali TEMİZ ile kardeşlerim Elçibey TEMİZ, Şebnem DOĞAN ve eşi Onur DOĞAN'a

Bana yaratıcı olmayı, koşulsuz sevmeyi, sabretmeyi, şükretmeyi ve mücadele etmeyi öğreten sevgili yeğenim Nil DOĞAN'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Gıda Hileciliği.....	5
2.2 Gıda Hilelerinin Tespiti ve Spektroskopik Yöntemler	8
2.2.1 Raman Spektroskopisi.....	14
2.2.2 Senkronize Floresans Spektroskopisi.....	18
2.2.3 Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi	24
2.3 Spektroskopik Yöntemlerin Lipit Analizlerinde Kullanılması	34
2.3.1 Lipitlerin Tanımı ve Sınıflandırılması.....	34
2.3.2 Lipitlerin Ekstraksiyonu	36
2.3.3 Spektroskopik Lipit Analizleri ve Gıda Hilelerinin Tespiti	39
2.4 Gıda Hilelerinin Tespitinde Kullanılan Kemometrik Veri Analizi Yöntemleri	52
2.4.1 Temel Bileşen Analizi	53
2.4.2 Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi	56
2.4.3 Çoklu Lineer Regresyon Analizi	59
2.4.4 Temel Bileşen Regresyon Analizi.....	61
2.4.5 Kısmi En Küçük Kareler-Regresyon Analizi	62

2.4.6	Kemometrik Veri Analizlerinde Kullanılan Önişlemler	65
2.4.7	Kemometrik Veri Analiz Yöntemlerinin Kalite Parametreleri	68
3.	MATERYAL VE METOT	70
3.1	Tahin Örneklerindeki Tağşışın SFS ile Belirlenmesi.....	70
3.1.1	Tahin Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması.....	71
3.1.2	Tahin Yağlarının Ekstraksiyonu.....	72
3.1.3	SFS Ölçümlerinin Alınması	72
3.1.4	SFS Verilerinin Analizi.....	73
3.1.5	Tahin ve Ayçiçek Yağı Örneklerinin GC ile Analizi.....	75
3.2	Tereyağı Örneklerindeki Tağşışın LIBS ile Belirlenmesi.....	76
3.2.1	Tereyağı ve Margarin Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması	76
3.2.2	LIBS Ölçümlerinin Alınması	78
3.2.3	LIBS Verilerinin Analizi.....	79
3.2.4	Tereyağı ve Margarin Örneklerinin ICP-MS ve FAAS ile Analizleri ..	81
3.3	Tavuk Örneklerindeki Tağşışın RS ile Belirlenmesi.....	82
3.3.1	Tavuk Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması	83
3.3.2	Tavuk Yağlarının Ekstraksiyonu	85
3.3.3	RS Ölçümlerinin Alınması	86
3.3.4	RS Verilerinin Analizi.....	86
3.3.5	Tavuk Yağı Örneklerinin Q-TOF LC/MS ile Metabolomik Analizleri..	88
4.	DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	90
4.1	Tahin Örneklerindeki Tağşışın SFS ile Belirlenmesi.....	90
4.2	Tereyağı Örneklerindeki Tağşışın LIBS ile Belirlenmesi.....	115
4.3	Tavuk Örneklerindeki Tağşışın RS ile Belirlenmesi	130
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	204
	KAYNAKLAR.....	213
	ÖZGEÇMİŞ	233

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1	Oleik asit ve stearik asite ait Raman bantlarının açıklamaları ...	49
Çizelge 2.2	Temel bileşen analizi için genel veri görünümü	53
Çizelge 3.1	Ayçiçek ve tahin örnekleri hakkında detaylı bilgi	72
Çizelge 3.2	Tereyağı ve margarin örnekleri hakkında detaylı bilgi	79
Çizelge 4.1	Tahin ve ayçiçek yağlarının PCA modeline ait bilgiler	92
Çizelge 4.2	iPLS ile regresyon metotları için önerilen dalgaboyu aralıkları ..	98
Çizelge 4.3	Farklı önışlemlerle kurulan PLS modellerine ait bilgiler	100
Çizelge 4.4	Farklı önışlemlerin PLSR modellerine etkisi	101
Çizelge 4.5	PLSR ve PLSR* modellerinin kalite parametreleri	102
Çizelge 4.6	PLSR ve PLSR* modellerine ait bilgiler	104
Çizelge 4.7	MLR ve MLR* modellerinin kalite parametreleri	105
Çizelge 4.8	MLR ve MLR* modellerine ait bilgiler	106
Çizelge 4.9	PCR ve PCR* modellerinin kalite parametreleri	108
Çizelge 4.10	PCR ve PCR* modellerine ait bilgiler	108
Çizelge 4.11	Yağ örneklerinin GC ile belirlenen yağ asidi kompozisyonları .	114
Çizelge 4.12	LIBS spektrumlarının muhtemel element tablosu	118
Çizelge 4.13	Yağların ICP-MS ve FAAS sonuçları	122
Çizelge 4.14	Kalibrasyon ve tahmin modellerine ait istatistiksel sonuçlar	128
Çizelge 4.15	Tavuk yağlarının karakteristik Raman bantları	131
Çizelge 4.16	Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin performans parametreeri	169
Çizelge 4.17	Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin konfüzyon matrisleri	176

Çizelge 4.18	Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin performans parametreleri.....	179
Çizelge 4.19	Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin konfüzyon matrisleri	187
Çizelge 4.20	Kat değişimi 1.5'tan fazla ve $p < 0.05$ olan piklerin listesi	190
Çizelge 4.21	Tanımlanan metabolitlere ait bilgiler ve kat değişim değerleri.	193

ŞEKİLLER

Şekil 2.1	Hedefli olmayan analiz süreçlerinin basamakları.....	9
Şekil 2.2	Raman saçılmasının molekülün titreşim düzeyleri ile olan ilişkisi	16
Şekil 2.3	Singlet ve triplet sistemlerde radyatif ve radyatif olmayan geçişler.....	20
Şekil 2.4	Hipotetik floresans spektrumları	22
Şekil 2.5	Lazer indüklü plazma oluşumunun temel basamakları [59].....	28
Şekil 2.6	Lazer İndüklü plazma emisyonunun zamana bağlı değişimi.....	30
Şekil 2.7	Tez çalışmasında kullanılan LIBS düzeneğinin şematik gösterimi.....	31
Şekil 2.8	Bazı lipit alt sınıflarının moleküler yapıları	36
Şekil 2.9	Triaçilgliserol molekülünün yapısı [67].....	37
Şekil 2.10	Balık yağı örneğine ait a) FT-IR ve b) Raman spektrumları [121]	43
Şekil 2.11	Bir bitkisel yağa ait MIR spektrumu	45
Şekil 2.12	Metilen birimlerine ait normal mod vibrasyonları	47
Şekil 2.13	Bir triaçilgliserol molekülüne ait Raman spektrumu	48
Şekil 2.14	Oleik asit ve stearik asidin Raman spektrumları a) sıvı oleik asit b) sıvı stearik asit c) katı stearik asit.....	49
Şekil 2.15	PLS-DA modeli oluşturma temelinin şekilsel gösterimi.....	57
Şekil 2.16	MLR analizinde matris denklemlerinin şematik gösterimi	60
Şekil 3.1	LIBS ölçümleri için hazırlanan margarin ve tereyağı örnekleri.....	77
Şekil 3.2	Tez kapsamında kullanılan LIBS sistemi	78
Şekil 3.3	Yağ ekstraksiyonunda kullanılmak üzere hazırlanan tavuk örneği	83
Şekil 3.4	Dondurulmak üzere paketlenen tavuk örnekleri	84

Şekil 4.1	a) TY ve b) AY karışımının SF spektrumları.....	90
Şekil 4.2	RMSEC ve RMSECV değerlerinin artan TBS ile değişimi.....	93
Şekil 4.3	PCA modeline ait Hotelling's T^2 - Q-Residuals değerleri.....	94
Şekil 4.4	Geliştirilen kalibrasyon modeline ait PCA skor grafiği	95
Şekil 4.5	Geliştirilen PCA modeline ait loadings grafiği.....	96
Şekil 4.6	Geliştirilen PCA modeline ait 1) $\Delta\lambda=10$ nm; 2) 60 nm; 3) 110 nm; 4) 160 nm; 5) 210 nm; 6) 260 nm; 7) 310 nm ve 8) 360 nm'deki loadings spektrumları	97
Şekil 4.7	RMSECV değerlerinin artan GDS ile değişimi	99
Şekil 4.8	Yağ örneklerinin ortalama LIBS spektrumları.....	115
Şekil 4.9	Yağ örneklerinin PCA skor grafiği	124
Şekil 4.10	Yağ örneklerinin düzenlenmiş PCA skor grafiği	125
Şekil 4.11	Loadings değerlerinin TB1 ve TB2 için gösterimi	126
Şekil 4.12	Loadings değerlerinin TB1 ve TB2 için ayrı ayrı gösterimi	127
Şekil 4.13	PLS (a) kalibrasyon ve (b) tahmin modelleri	128
Şekil 4.14	a) Hekzan b) Folch ekstrakte taze tavuk yağlarının ortalama Raman spektrumları	130
Şekil 4.15	Hekzan ekstrakte yağların a) 200-2000, b) 500-1000, c) 1000-1400 ve d) 1400-1800 cm^{-1} aralığındaki Raman spektrumlarının değişimi	136
Şekil 4.16	Folch ekstrakte yağların a) 200-2000, b) 500-1000, c) 1000-1400 ve d) 1400-1800 cm^{-1} aralığındaki Raman spektrumlarının değişimi	138
Şekil 4.17	Hekzan ekstrakte yağların 800 cm^{-1} 'in altındaki ortalama Raman spektrumları	139
Şekil 4.18	Folch ekstrakte yağların 800 cm^{-1} 'in altındaki ortalama Raman spektrumları	140
Şekil 4.19	726 cm^{-1} bandının değişimi	141

Şekil 4.20	767 cm ⁻¹ bandının değişimi	143
Şekil 4.21	Taze örneklerde 800-900 cm ⁻¹ aralığının dekonvolüsyonu	144
Şekil 4.22	Hekzan ekstrakte yağlarda 800-900 cm ⁻¹ aralığının değişimi	145
Şekil 4.23	Folch ekstrakte yağlarda 800-900 cm ⁻¹ aralığının değişimi	145
Şekil 4.24	813 cm ⁻¹ bandının değişimi	146
Şekil 4.25	843 cm ⁻¹ bandının değişimi	146
Şekil 4.26	872 cm ⁻¹ bandının değişimi	147
Şekil 4.27	890 cm ⁻¹ bandının değişimi	147
Şekil 4.28	954 cm ⁻¹ bandının değişimi	149
Şekil 4.29	974 cm ⁻¹ bandının değişimi	149
Şekil 4.30	Hekzan ekstrakte yağların 917 cm ⁻¹ bandının değişimi	151
Şekil 4.31	Folch ekstrakte yağların 917 cm ⁻¹ bandının değişimi.....	152
Şekil 4.32	Hekzan ekstrakte yağlarda 996-1140 cm ⁻¹ aralığının değişimi ..	153
Şekil 4.33	Folch ekstrakte yağlarda 996-1140 cm ⁻¹ aralığının değişimi	153
Şekil 4.34	1157 cm ⁻¹ bandının değişimi	154
Şekil 4.35	1187 cm ⁻¹ bandının değişimi	155
Şekil 4.36	1267 cm ⁻¹ bandının değişimi	156
Şekil 4.37	1306 cm ⁻¹ bandının değişimi	158
Şekil 4.38	1446 cm ⁻¹ bandının değişimi	159
Şekil 4.39	1656 cm ⁻¹ bandının değişimi	160
Şekil 4.40	1656/1446 pik yüksekliği oranları	161
Şekil 4.41	1656/1744 pik yüksekliği oranları	161
Şekil 4.42	1744 cm ⁻¹ bandının değişimi	166
Şekil 4.43	Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli hata değerleri.....	168
Şekil 4.44	Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli loadings değerleri	170

Şekil 4.45	Hekzan ekstrakte taze örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	171
Şekil 4.46	Hekzan ekstrakte 2A-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	172
Şekil 4.47	Hekzan ekstrakte 1A-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	173
Şekil 4.48	Hekzan ekstrakte 1H-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	174
Şekil 4.49	Hekzan ekstrakte 2H-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	175
Şekil 4.50	Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli hata değerleri.....	178
Şekil 4.51	Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli loadings değerleri ..	180
Şekil 4.52	Folch ekstrakte taze örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	181
Şekil 4.53	Folch ekstrakte 2A-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	182
Şekil 4.54	Folch ekstrakte 1A-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	183
Şekil 4.55	Folch ekstrakte 1H-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	184
Şekil 4.56	Folch ekstrakte 2H-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE).....	185
Şekil 4.57	Örnek gruplarının temel pik kromatogramları.....	188
Şekil 4.58	Deneysel (yukarıda) ve teorik (aşağıda) MS/MS spektrumları a) 1-Monopalmitin, b) 1-Monostearin, c) 1-Monoolein, d) 11(12)-EET-d11, e) Palmitik amid, f) Di (2-etilhekzil) adipat.....	199
Şekil 4.59	Tavuk örneklerinde metabolomiks verileri kullanılarak yapılan PCA skor grafiği.....	200

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
AES	: Atomik Emisyon Spektrometresi
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
AS	: Alıkonma Süresi
AY	: Ayçiçek Yağı
Ca	: Kalsiyum
CCD	: Yük Eşleşmiş Cihaz
CE	: Kapiler Elektroforez
Cu	: Bakır
Cr	: Krom
DHET	: Dihidroksi Eykozatrienoik asit
DN	: Doğru Negatif
DP	: Doğru Pozitif
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EET	: Epoksi Eykozatrienoik asit
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünoşörent Analiz
ESI-MS	: Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometresi
FAME	: Yağ Asidi Metil Esteri
FAAS	: Alev Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü
FS	: Floresans Spektroskopisi
Fe	: Demir
FT-IRS	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	: Gaz Kromatografisi
HPAEC	: Yüksek Performans Anyon Değişim Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICCD	: Güçlendirilmiş Yük Eşleşmiş Cihaz
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma- Kütle Spektrometresi
ICP-OES	: İndüktif Eşleşmiş Plazma- Optik Emisyon Spektrometresi
IPA	: İzopropil Alkol
IR	: Kızılötesi

IRMS	: İzotop Oranı Kütle Spektrometrisi
K	: Potasyum
LIBS	: Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
MALDI-TOF/MS	: Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı/Kütle Spektrometresi
MIR	: Orta Kızılötesi Spektroskopisi
Mg	: Magnezyum
MLR	: Çoklu Lineer Regresyon
Mn	: Mangan
MS	: Kütle Spektrometresi
-MS	: Kütle Spektrometresi Temelli Metotlar
Na	: Sodyum
Nd:YAG	: Neodimyum doplanmış İtiryum Alüminyum Garnet
NIR	: Yakın Kızılötesi Spektroskopisi
Ni	: Nikel
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PCA	: Temel Bileşen Analizi
PCR	: Temel Bileşen Regresyonu
PLSR	: Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu
PV	: Peroksit Değeri
Q-TOF LC/MS	: Kuadrupol Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
RS	: Raman Spektroskopisi
R ²	: Belirleme Katsayısı
REP	: Tahmin Modelinin Bağıl Hata Değeri
RMSEC	: Kalibrasyon Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü
RMSECV	: Çapraz Validasyon Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü
RMSEP	: Tahmin Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü
RSD	: Bağıl Standart Sapma
SFS	: Senkronize Floresans Spektroskopisi
SNIF	: Bölge Spesifik Doğal İzotop Fraksiyonu
TAG	: Triaçilgliserol

TBARS	: Tiyobarbiturik Asit-Reaktif Maddeler
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TY	: Tahin Yağı
YN	: Yanlış Negatif
YP	: Yanlış Pozitif
Zn	: Çinko
1A-1DE	: Aylık Bazda Bir Kere Dondurulup-Eritilmiş
2A-2DE	: Aylık Bazda İki Kere Dondurulup-Eritilmiş
1H-1DE	: Haftalık Bazda Bir Kere Dondurulup-Eritilmiş
2H-2DE	: Haftalık Bazda İki Kere Dondurulup-Eritilmiş

1. GİRİŞ

Gıda üretimi, uzun ve karmaşık üretim süreçleri ve gereksinim duyduğu çok sayıda tedarik zinciri nedeniyle ilk basamağından son basamağına kadar her aşamada tağşiş ve hileye karşı savunmasız durumda olan bir süreçtir. Farkındalığın yetersiz oluşu veya ihmaller nedeniyle piyasaya sunulan pek çok gıda mikrobiyolojik, kimyasal veya fiziksel tehlikeler içeren bir hale dönüşebilmekte ve tehlikelerin zamanında tespit edilip gerekli önlemlerin alınmaması halinde gıda kaynaklı hastalıklar ve ölümler kaçınılmaz olmaktadır. Günümüzde bu problemlere ek olarak gıdalarda taklit ve tağşiş uygulamalarıyla karşılaşmaktadır. İnsan sağlığı açısından ciddi riskler oluşturan ve üreticilerin haksız kazanç sağlamasına neden olan bu uygulamaların tespit edilmesi ülkemizde ve dünyada günden güne artan bir önem kazanmıştır. Bu kapsamda, gıdaların maruz kaldığı taklit ve tağşişleri güvenilir ve hızlı bir şekilde tespit edebilecek analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemlerde hızlı sonuç alma, kullanım kolaylığı, az miktardaki örneği analiz edebilme ve örnekte minimum hasar yaratma gibi özellikler aranmaktadır. Günümüzde kullanılan geleneksel yöntemler ise genellikle zaman alıcı, analiz protokolleri nedeniyle örnekte tahribat yaratan ve analizlerin uzman personeller tarafından yürütülmesine ihtiyaç duyan yöntemlerdir. Bu kapsamda bazı spektroskopik teknikler geleneksel yöntemlerin sahip olduğu birtakım dezavantajları ortadan kaldırmaktadır. Bu teknikler genellikle hızlı ve tahrip edici olmayan özellikte olmakla birlikte güvenilir sonuçların alınabilmesi adına göz önünde bulundurulması gereken pek çok faktörü de barındırmaktadır. Elde edilen kompleks spektrumların bir bileşen, sınıf veya parametre ile ilişkilendirilmesi amacıyla farklı istatistiksel tekniklerin kullanılması gerekmektedir. Cihaz tasarımı, örnek hazırlama ve veri analizinde sağlanan gelişmeler söz konusu yöntemlerin tespit kabiliyetini ve hassasiyet seviyesini arttırmıştır.

Mevcut tez çalışması kapsamında farklı spektroskopik yöntemlerin bazı gıda tağşişlerinin tespitinde kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır. Gıdanın lipid kompozisyonunda gerçekleşen değişikliklerin spektroskopik olarak takibi sağlanarak ilgili tağşişin belirlenmesi amaçlanmıştır. Mevcut literatürde lipidlerin majör komponenti olan triağılglicerol (TAG) kompozisyonunun analizi pek çok

bitkisel ve hayvansal yağdaki yağışın tespiti amacıyla kullanılmıştır [1, 2]. Bitkisel yağlarda hayvansal yağ kullanılarak yapılan yağışlar mevcut TAG profilinde değişimlere veya ekstra TAG piklerinin gözlemlenmesine neden olmaktadır [3]. Orijinal yağ ile adulterant olarak kullanılan yağın TAG kompozisyonunun benzemesi durumunda, örneğin; zeytinyağının kanola yağı veya yüksek oleik asitli ayçiçek yağı ile yağışı, TAG kompozisyonu kullanılarak yağışın tespit edilmesi zorlaşmaktadır [4, 5]. Steroller, triterpen alkoller, karotenoidler ve tokoferoller lipidlerin minör komponentleri olup yağlarda yapılan bir takım yağışların bu bileşenlerin analizi üzerinden tespit edilmesi mümkün olabilmektedir. Örneğin süt yağının bitkisel yağlarla, tereyağının margarinle ve zeytinyağının bazı tohum yağlarıyla yağışı sterol analizi üzerinden, hindistancevizi yağında palm yağıyla yapılan yağış karotenoid içeriği üzerinde tespit edilmiştir [6, 7]. Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda gıda bileşiminde doğal olarak bulunan yağın bir başka yağ ile değiştirilmesi veya karıştırılması yolları ile yapılan yağışların lipid kompozisyonunda bir takım değişikliklere neden olabileceği görülmektedir. Bunun yanında gıdaların maruz kaldığı uygun olmayan saklama koşulları, gıdanın üretim ve depolama sürecinde kullanılan kızartma, dondurma, ısıtma, radyasyon gibi işlemler de lipidlerin majör ve minör kompozisyonunda bir takım değişikliklerin gerçekleşmesine neden olmaktadır [8-12]. Bu noktada gıda bileşiminden lipid fazının ekstraksiyonu ve elde edilen ekstraktın analizi yoluyla gıda yağışının tespit edilmesinin mümkün olabileceği öngörülebilir. Bunlara ek olarak lipid bileşiminin elemental kompozisyonu bir diğer araştırma konusudur. Bitkisel ve hayvansal yağlara çevresel faktörler, toprak ve beslenme yollarıyla transfer olan elementler ile üretim ekipmanlarından veya üretim süreci gereği kullanılan katkı maddeleri ve katalizörlerden transfer olan elementler son ürünün elemental kompozisyonunu değiştirebilmektedir. Yağların elemental kompozisyonu genellikle atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) kullanılarak belirlenmektedir [13]. Elemental kompozisyon belirleme çalışmaları çoğunlukla metallerin oksidasyon hızını arttırmaları, sahip oldukları biyokimyasal fonksiyonlar ve toksik özellik gösterebilmeleri gibi araştırma konuları hedeflenerek yürütülmektedir [14]. Yağların elemental kompozisyonları arasındaki farklar veya üretim, depolama vb. süreçler nedeniyle elemental kompozisyonda gerçekleşen değişimlerin uygulanan taklit ve yağışların tespitinde kullanılması yeni bir yaklaşımdır.

Mevcut tez çalışması kapsamında gıdalardaki farklı tağşış uygulamalarının lipid kompozisyonunda neden olduğu değişikliklerin spektroskopik yöntemler kullanılarak takip edilmesinin gıda tağşışinin belirlenmesindeki etkinliği üç farklı örnek üzerinden araştırılmıştır. Tahin örneklerinde ayçiçek yağı ile yapılan tağşışin senkronize floresans spektroskopisi (SFS) kullanılarak belirlenmesi ve tereyağ örneklerinde margarin ile yapılan tağşışin lazer indüklü plazma spektroskopisi (LIBS) kullanılarak belirlenmesi çalışmaları ile gıda bileşimindeki orijinal yağın bir başka yağ ile karıştırılması ve/veya değiştirilmesi yoluyla yapılan tağşışin tespiti araştırılmıştır. Dondurulup eritilmiş olduğu halde tazeymiş gibi satışa sunulan tavuk örneklerindeki tağşışin Raman spektroskopisi (RS) kullanılarak belirlenmesi çalışması ile gıdaların depolanması sürecinde uygulanan işlemlerden biri olan dondurma işleminin gıdanın lipid kompozisyonunda neden olduğu değişikliklerin spektroskopik olarak takibi yoluyla taze tavuklardaki tağşış uygulamalarının tespiti araştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalarla farklı spektroskopik yöntemlerin gıda tağşışlerinin tespiti amacıyla başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu kapsamda farklı spektroskopik tekniklerden elde edilen verilere uygun kemometrik analiz yöntemlerinin uygulanması ile elde edilen verinin kalitatif ve kantitatif analizine imkan sağlayan kalibrasyon ve tahmin modellerinin geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Tez kapsamında multivariat analiz yöntemlerinden temel bileşen analizi (PCA), kısmi en küçük kareler-diskriminant analizi (PLS-DA), çoklu lineer regresyon analizi (MLR), temel bileşen regresyon analizi (PCR) ve kısmi en küçük kareler-regresyon analizi (PLSR) yöntemleri kullanılmıştır.

Mevcut tez kapsamında farklı gıda tağşışlerinin tespitine yönelik, yüksek hassasiyet ve kesinlik değerlerine sahip yöntemler geliştirilmiştir. Yağların minör bileşenlerinin SFS tekniği ile analizi sayesinde tağşış uygulamalarının tespit edilebileceği tahin yağlarına ayçiçek yağı ilavesiyle yapılan tağşış üzerinden gösterilmiştir. Yağların elemental kompozisyonun LIBS tekniği ile analizi sayesinde tağşış uygulamalarının tespit edilebileceği tereyağlarına margarin ilavesiyle yapılan tağşış üzerinden gösterilmiştir. Gıdalara uygulanan kısa ve uzun süreli dondurma-eritme işlemlerinin neden olduğu değişikliklerin lipid fazının RS tekniği ile analizi sayesinde takip edilebileceği haftalık ve aylık bazda dondurulup eritilmiş tavuk örnekleri üzerinden gösterilmiştir. Her çalışmada referans

yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlar desteklenmiştir. Yağ asidi kompozisyonun belirlenmesi amacıyla gaz kromatografisi, elemental kompozisyonun belirlenmesi amacıyla alev atomik absorpsiyon spektrometresi ve indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi, metabolomiks analizleri için kuadrupol uçuş zamanlı sıvı kromatografisi kütle spektrometresi kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Gıda Hileciliği

Gıdanın takip edilebilirliği, güvenliği, kalitesi ve gerçekliği 'gıda bütünlüğü (food integrity)' kavramını oluşturmaktadır. Gıda bütünlüğünün sağlanması bu dört ana bileşenin birlikte bulunmasıyla mümkün olmaktadır [15].

Gıda gerçekliği (food authentication) kavramı genel olarak bir gıdanın kendisine özgü özellikleri taşıyıp taşımadığını ifade etmektedir. Bu kavram gıdanın orijini, üretiminde kullanılan yöntem veya gıdanın kompozisyonuna dair özellikleri içermektedir [16].

T.C Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 27009 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Gıda Güvenliği ve Kalitesinin Denetimi ve Kontrolüne Dair Yönetmeliğin 4. maddesi kapsamında, tağşiş terimi; 'Gıda maddelerinin ve gıda ile temasta bulunan madde ve malzemelerin, mevzuata veya izin verilen özelliklerine aykırı olarak üretilmesi hali' olarak tanımlanmıştır. Taklit terimi ise 'Gıda maddesini ve gıda ile temasta bulunan madde ve malzemelerini; şekil, bileşim ve nitelikleri itibariyle evsafında olmayan özelliklerin haiz gibi gösterilmesi' olarak tanımlanmıştır [17].

Taklit ve tağşiş terimleri, Avrupa'da gıda hileciliği (food fraud) tanımı altında incelenmektedir. Avrupa Birliği (AB) Komisyonu gıda hileciliği için standart bir tanım yayınlamamış olmakla birlikte gıda hileciliğinin tüketicilerin aldatılması yoluyla ekonomik veya finansal bir kazanç elde etmek amacıyla kasıtlı olarak işlenen AB gıda yasasının ihlal edildiği durumları kapsadığını belirtmektedir. 2013 yılında İrlanda'da dana burgerlerinde ve İngiltere'de sığır lazanyası ürünlerinde %80-100 oranında at eti varlığının tespitiyle ortaya çıkan Avrupa at eti skandalının ardından gıda hileciliği AB tarafından organize suç kategorisine alınmıştır [18]. Takip eden süreçte AB gıda uzmanları, Europol (European Police Office) ve Eurojust (The European Union's Judicial Cooperation Unit) kurumlarının katılımıyla Avrupa Birliği Gıda Hileciliği Ağı (European Union Food Fraud Network) adı verilen bir bilgi paylaşımı, güvenlik, denetleme ve yargılama kurumu oluşturulmuştur [19, 20]. Öte yandan söz konusu skandaldan birkaç yıl sonra 2017 yılında pire ve kene ile mücadelede veteriner ilacı olarak kullanılan

ve tavuk gibi besin zincirine yönelik hayvanlarda kullanılması yasak olan fipronil ilacının yumurta ve yumurta ürünlerinde varlığı AB üyesi 28 ülkenin 26'sında tespit edilmiştir. Bu skandal üzerine ABD, Rusya, İsrail ve Kanada olmak üzere 45'ten fazla ülkedeki süpermarket raflarından milyonlarca yumurta geri çekilmiştir. Mevcut gıda zincirine kontamine gıda ürünleri girişinin önlenmesi adına AB Üye Devletlerinin gıda güvenliği yetkililerince etkilenen çiftliklerden gelen yumurtaların, yumurta ürünlerinin veya tavuk etlerinin AB pazarına girişi veya AB ülkelerine ihraç edilmesi yasaklanmıştır [21].

Gıda tedarik zincirlerinin küreselleşmesi ve karmaşıklaşması yeni ve aşılması zor risklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Hammadde tedariki, üretim, işleme, dağıtım ve perakendecilik gibi üretim zincirinin herhangi bir aşamasında ekonomik motivasyonla yapılan hileler endüstrinin, devletin ve standartları belirleyen resmi kuruluşların dikkatini çekmeye başlamıştır. Amerikan Savunma Bakanlığı tarafından hazırlanan ve Minnesota Üniversitesi Ulusal Gıda Koruma ve Savunma Merkezi tarafından finanse edilen raporda gıda hileciliği; gıda, gıda bileşenleri veya gıda ambalajında yapılan kasıtlı ikame, ekleme veya yanlış beyan ile bir ürün hakkında ekonomik kazanç amacıyla yapılan yanlış veya yanıltıcı ifadeler olarak tanımlanmıştır [22].

Gıda hileciliği, çoğu zaman, ekonomik bir problem olarak görülmüş olup gıda güvenliğine yapılan bir müdahale olarak değerlendirilmemiştir. Ancak, herhangi bir taşıma uygulaması; değişim, azalma veya fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak yapılan modifikasyon yollarıyla iddia edilen orijinal ürünün kimliğinin ve saflığının değişmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu kapsamda gıda hileciliğinin değiştirme (replacement), ilave (addition) ve uzaklaştırma (removal) olmak üzere üç kategoride incelenmesi mümkündür. Değiştirme yoluyla gıda hileciliği; gıdanın bir ingrediyenin veya değerli otantik bir bileşenin miktarının azaltılması veya daha ucuz bir bileşenle tüketicinin bilgisi olmadan değiştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Süte toplam azotu arttırmak amacıyla melamin eklenmesi [23], limon suyuna su ve sitrik asit eklenerek son üründe titre edilebilir asitliğin artırılması bu kapsamda incelenmektedir. Coğrafi, botanik, tür ve cins orijininin yanlış deklare edilmesi aynı kapsamda olup inek sütüne keçi veya koyun sütü eklenmesi, Yunanistan orijinli zeytinyağına İtalya orijinli zeytinyağı eklenmesi örnekleri ile açıklanabilir. Hammadde orijininin veya üretim sürecinin yanlış deklare

edilmesi aynı kapsamda olup sentetik vanilyanın botanik olarak üretilmiş vanilya olarak deklare edilmesi bu duruma örnek olarak verilebilir. Değişirme yoluyla yapılan gıda hileciliği uygulamaları en yaygın karşılaşılan uygulamalardır. Bu kapsamdaki gıda hileciliğinin belirlenmesinde genellikle uygulanan strateji spesifik bir tağşiş ajanının aranması olmakla birlikte bu strateji ile analizin amacı dışında kalan ikinci bir tağşiş ajanının tespiti mümkün olamamaktadır. İkinci strateji ise gıdada tağşiş ajanının aranması yerine belli bir ingrediyenin varlığının ve miktarının tespit edilmesine yöneliktir. İkinci strateji ilkinde kıyasla genellikle daha yüksek bir tespit limitine sahip olmaktadır. İlave yoluyla gıda hileciliği; otantik olmayan bir bileşenin tüketicinin bilgisi dışında ürüne eklenmesi olarak tanımlanmaktadır. Kötü kalitedeki paprika örneklerine Sudan kırmızısı boyalarının rengi iyileştirmek adına eklenmesi bu kategoriye örnek olarak verilebilir. Benzer şekilde nar suyunda kötü tadı maskelemek adına şeker ilavesi yapılmaktadır. Uzaklaştırma yoluyla gıda hileciliği; gıdadan tüketicinin bilgisi dışında otantik bir ingrediyenin uzaklaştırılması olarak tanımlanmaktadır. Paprika örneklerinden polar olmayan bileşenlerin uzaklaştırılarak ticari aroma bileşenlerinin üretilmesi ve geriye kalan yağı uzaklaştırılmış paprika küspesinin normal paprika olarak satılması ile örneklenebilmektedir [24].

2007 ve 2008 yıllarında yaşanan melamin olayları, gıda hilesi uygulamalarının gıda güvenliği sistemini nasıl çökertilebileceğini ve ekonomik kazanç amaçlı bu hilelerin ne tür tehlikelere neden olabileceğini göstermiştir [23]. Söz konusu gıda hilelerinde, protein oranının yükseltilmesi amacıyla kullanılan melaminin potansiyel bir kontaminant veya adulterant olarak sahip olabileceği toksikolojik yan etkiler, ilgili olaylar yaşanıncaya dek araştırılmamıştır [25]. Bu noktada gelinen sonuç; mevcut gıda güvenliği sistemlerinin gıda zincirinde karşılaşılabilecek neredeyse sonsuz sayıdaki potansiyel gıda tağşiş ajanının aranması üzerine dizayn edilmemiş olduğudur [26].

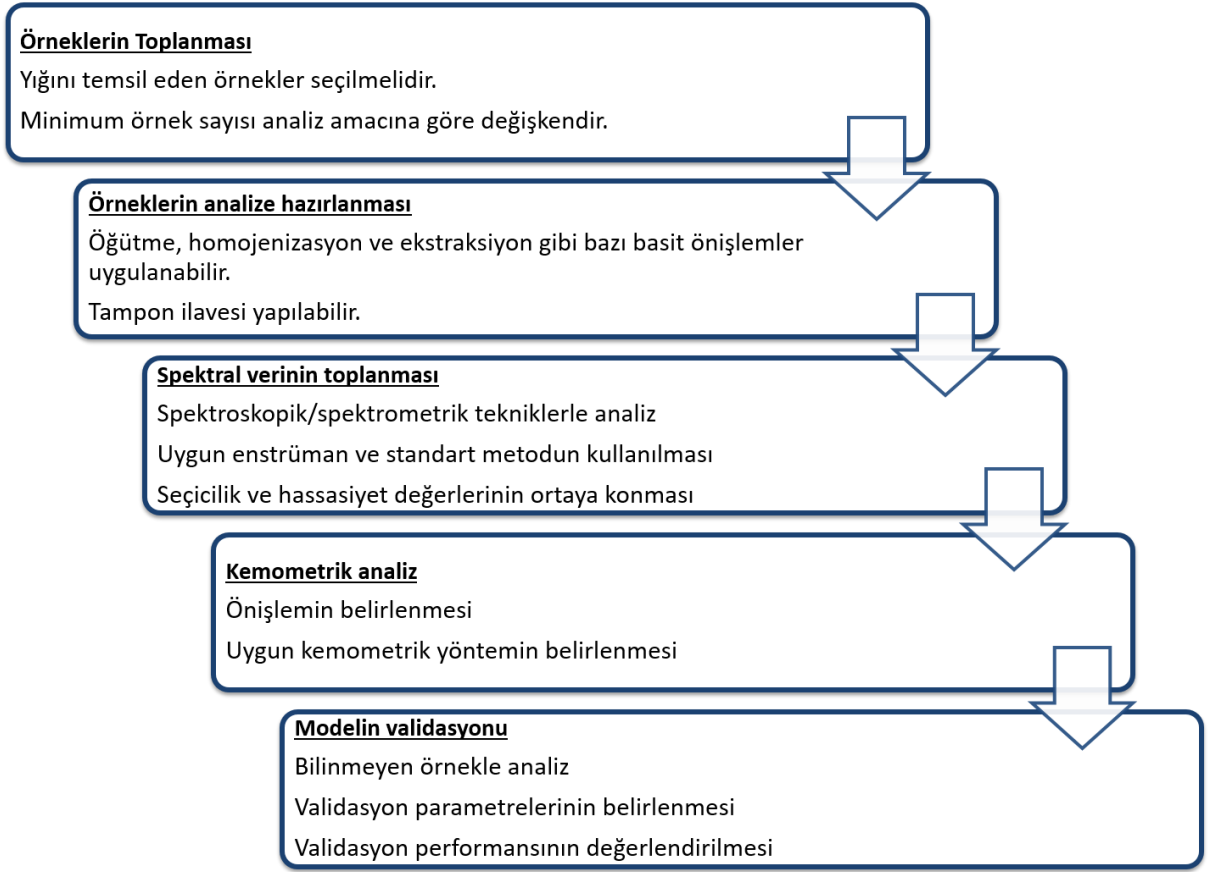
Moore ve ark. tarafından 1980-2010 yılları arasında mevcut kayıtlar içinde yapılan geniş kapsamlı araştırmada tağşişe maruz kalan gıda ürünleri içerisinde zeytinyağı, süt, bal, safran, portakal ve elma suyu, kahve, şarap, pirinç, vanilya ekstraktı, zerdeçal, bitkisel yağlar, kakao, durum buğdayı gibi pek çok farklı kategorideki ürün bulunmakta olup bunlar arasında en yüksek oranda tağşişe

uğrayanlar %16 oranında zeytinyağı ve %14 oranında süt ürünleri olarak tespit edilmiştir [27].

T.C Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesinde taklit ve tağşişin önüne geçilmesi, toplum sağlığının korunması ve tüketicilerin aldatılmasının engellenmesi ile haksız ekonomik kazancın önün geçilmesi amaçlarıyla gerekli mevzuatlar oluşturulmakta ve ilgili resmi kontroller yapılmaktadır. Bu kapsamda 2012-2018 yılları arasında 769 farklı firmanın 1605 farklı parti ürününde taklit ve tağşişin tespit edildiği rapor edilmektedir. Çikolata, enerji içecekleri, baharatlar, bitki çayları, kahve, gazlı aromalı içecekler, köfte, sosis, sucuk, kavurma gibi et ve et ürünleri, peynir, süt kreması, yoğurt, tereyağı gibi süt ürünleri, bal, zeytinyağı, ayçiçek yağı gibi bitkisel yağlar ile takviye edici gıdalar olmak üzere pek çok farklı kategorideki gıda bu ürünler içerisinde bulunmaktadır [28].

2.2 Gıda Hilelerinin Tespiti ve Spektroskopik Yöntemler

Gıda hileciliği genellikle ekonomik motivasyonla gerçekleştirilmekte ve tüketici güvenliği göz ardı edilerek kar marjınının arttırılması hedeflenmektedir. Sıklıkla karşılaşılmayan veya daha önce gıda tağşişi amacıyla kullanılmamış tağşiş ajanlarının kullanımı geleneksel hedefli analiz yöntemlerinin gıda tağşişinin tespitinde yetersiz kalması ile sonuçlanmaktadır [27]. Söz konusu durum, bilinen bir analitin özel olarak tarandığı hedefli analiz yöntemlerinin aksine tüm gıda matriksinin analiz edildiği ve gıdaya ait parmak izinin elde edilmesini sağlayan hedefli olmayan analiz sistemlerine olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır [29]. Şekil 2. 1 ile hedefli olmayan analiz süreçlerine ait basamaklar genel bir akış şeması ile gösterilmiştir.



Şekil 2. 1 Hedefli olmayan analiz süreçlerinin basamakları

Hedefli olmayan gıda analizlerinde örneğe ait detaylı bir profil elde edilmektedir. Bu profil kullanılan tekniğe göre değişim göstermekle birlikte elde edilen profil daha önce oluşturulmuş bir kütüphaneye karşılaştırılmaktadır. Uygun istatistiksel yöntemlerin kullanımı sayesinde yeni örnekle kütüphane arasında bir fark bulunup bulunmadığı ortaya konabilmektedir.

Sıklıkla kullanılan hedefli olmayan analiz yöntemleri titreşimsel spektroskopik yöntemler (Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FT-IR), yakın kızılötesi (NIR), hiperspektral görüntüleme (HSI), Raman ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopileri) ile spektrometri ve kromatografi temelli teknolojilerdir. Titreşimsel spektroskopik teknikler global gıda ağının hızlı temposuna yetişebilmeyi mümkün kılan hızlı, yüksek verimli (high throughput) ve tahribatsız analiz yöntemleridir. Ayrıca, bu teknolojilerin uzman olmayan kişilerce kullanımı kısa süreli bir eğitim sonrasında mümkün olabilmektedir. Yöntemler kullanıcı dostu olup sahada veya üretim hattında kullanıma uygun özellikler taşımaktadır [30].

Gıda hileciliğinin belirlenmesinde kullanılan en yaygın beş yöntem sıvı kromatografisi, kızılötesi spektroskopisi, gaz kromatografisi, izotop oranı kütle spektrometresi ve kütle spektroskopisi temelli tekniklerdir. Bunlar içerisinde sıvı ve gaz kromatografileri ile kızılötesi spektroskopisi pek çok kalite kontrol laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Öte yandan kütle spektrometresi ve izotop oranı kütle spektrometresi henüz yaygın olmayıp kullanımı giderek artmaktadır [27].

Spektroskopisi; maddenin elektromanyetik radyasyonla interaksyonu sonucunda oluşan spektrumun üretilmesi, ölçülmesi ve yorumlanması olarak açıklanmaktadır. Gıda bilimlerinde spektroskopik tekniklerin kullanımı giderek artan bir öneme sahiptir. Bu kapsamda UV-VIS, floresans, atomik, kızılötesi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bu enstrümanlar maddenin elektromanyetik radyasyonla olan ilişkisini kullanarak moleküler kompozisyon, yapı, dinamikler ve interaksyonlar gibi pek çok gıda özelliği hakkında bilgi sağlamaktadır. Spektroskopisi temelli metotlar hem kalitatif hem de kantitatif analizlerde kullanılmaktadır [31].

Elektromanyetik radyasyon, birbirine dik olarak konumlanmış yüzeylerde osilasyona uğrayan elektrik ve manyetik dalgalardan oluşmaktadır. Elektromanyetik dalgalar belli bir yönde ve belli bir hızda hareket etmekte olup bu hız ışık hızıdır ve vakum ortamındaki değeri 3×10^8 m/s'dir. Elektromanyetik radyasyon türleri arasındaki fark; dalgaboyu ve buna karşılık gelen enerjideki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Örneğin gamma ve X-ışını radyasyonunda dalgaboyu 10^{-16} m civarındayken görünür ışığın dalga boyu 400-700 nm aralığındadır.

Elektromanyetik radyasyon 'dalga-partikül dualite' kavramı ile açıklanmaktadır. Kuantum seviyesinde dalga davranışı ve partikül davranışı birbirinden ayırt edilemez hale gelmektedir. Işığın partiküller, hava veya birtakım yüzeylerce saçılması dalga modeli ile incelenirken absorpsiyon ve emisyon olayları partikül modeli ile incelenmektedir. Partikül modeline göre elektromanyetik radyasyon foton adı verilen enerji paketlerinden oluşmaktadır. Elektromanyetik radyasyon; dalgaboyu (λ , tekrarlanan birimler arasındaki uzaklık) frekans (ν , belli zamanda belli noktadan geçen dalga sayısı) hız (dalğanın ilerleme hızı) ve büyüklük (bir

dalga tarafından taşınan enerjinin büyüklüğü) değerleri ile karakterize edilmektedir. Buna göre bir dalganın enerjisi aşağıdaki Eş. 1 ile verilmiştir.

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Eş. 1}$$

Burada E; kj/mol cinsinden enerjiyi, λ ; metre cinsinden dalgaboyunu, c; ışık hızını ve h; Planck sabitini temsil edip değeri 3.99×10^{-13} kJ.s/mol'dür. Elektromanyetik dalgalar dalgaboyu veya frekans ile karakterize edilmekte olup bunlar arasındaki ilişki aşağıdaki Eş. 2 ile verilmiştir.

$$\lambda\nu = c \quad \text{Eş. 2}$$

Buradan yola çıkarak fotonun enerjisi (E_p) aşağıdaki Eş. 3 ile ifade edilebilmektedir.

$$E_p = h\nu \quad \text{Eş. 3}$$

Buradan yola çıkarak monokromatik bir radyasyonun enerjileri birebir aynı olan fotonlardan oluştuğu sonucuna varılmaktadır [32].

Atomlar ve moleküller yalnızca sınırlı sayıdaki enerji seviyelerinde bulunabilmekte ve bu seviyeler arasındaki herhangi rasgele bir noktada bulunamamaktadır. Bir diğer deyişle enerji seviyeleri kuantize haldedir. Her bir moleküler türün kendine özgü bir seri enerji seviyeleri bulunmakta ve bunlar moleküler türün atomik (elektronlar, protonlar, nötronlar) ve moleküler yapısına (atomların ve bağların tipi ve düzenlenişi) bağlılık göstermektedir. Enerji seviyelerinin en düşüğü 'temel enerji seviyesi (ground state)' olarak adlandırılmıştır. Bunun üzerindeki ise 'uyarılmış enerji seviyeleri (excited states)' adını almaktadır. Bir atom veya molekülün potansiyel enerjisi temel enerji seviyesine kıyasla yani bağıl olarak tanımlanmakta ve genellikle temel enerji seviyesinin sıfır enerjiye sahip olduğu kabul edilmektedir.

Bir atomun veya molekülün toplam bağıl potansiyel enerjisi Eş.4 ile gösterildiği gibi elektronik, titreşimsel, dönme ve öteleme hareketlerinin ortak bir sonucudur.

$$E_{Toplam} = E_{elektronik} + E_{titreşimsel} + E_{dönme} + E_{öteleme} \quad \text{Eş. 4}$$

Bir atomun elektronları belli sayıdaki orbitale yerleşmiş durumdadır. Bir elektron, enerji absorblaması veya yayması sonucunda bir orbitalden diğerine hareket

edebilmektedir. Moleküller, gerilme (stretching) veya eğilme (bending) olmak üzere iki farklı şekilde titreşebilmektedir. Bir bağ eksenini boyunca atomların titreşim hareketleri nedeniyle gerçekleşen gerilme titreşimleri sonucunda bağ uzunluğu periyodik olarak değişmektedir. Gerilme titreşimleri asimetrik veya simetrik olarak gerçekleşebilmektedir. Eğilme titreşimleri sırasında molekülün atomları arasındaki açı periyodik olarak değişmektedir. Eğilme titreşimleri; kesilme (scissoring), bükülme (rocking), sallanma (wagging) ve burulma (twisting) olarak gerçekleşebilmektedir [33]. Bazı atomların çekirdekleri dönme (spin) özelliğine sahiptir. Bir molekülün potansiyel enerjisi molekülün kendi ağırlık merkezi çevresindeki dönme enerjisi bakımından kuantize haldedir. Dönme hareketi enerji seviyeleri bunlara karşılık gelen titreşimsel enerji seviyelerine kıyasla daha sık aralıklarla konumlanmaktadır. Yüklü ve dönme hareketi yapan bir çekirdek küçük bir manyetik alan oluşturmakta ve küçük bir mıknatıs olarak düşünülebilmektedir. Normalde bu mıknatıs herhangi bir yönde oryente edilebilmektedir. Fakat harici bir manyetik alanın varlığında bu mıknatıs kendisini alanla aynı veya alana karşıt yönde konumlandırmakta bir diğer deyişle kuantize olmaktadır. Örneğe spesifik bir enerji seviyesindeki radyasyonun uygulanmasıyla çekirdek içerisindeki farklı enerji seviyeleri arasındaki geçişlerin gerçekleşmesi sağlanabilmektedir. Atomlar ve moleküller, sistemin sahip olduğu termal enerji nedeniyle sürekli bir öteleme hareketi içerisindedir. Öteleme hareketi enerji seviyeleri kuantize haldedir fakat enerji seviyeleri arasındaki fark çok küçük olduğundan moleküller enerji sürekli bir şekilde dağınık haldeymiş gibi davranmaktadır.

Organik ve inorganik maddeler farklı frekanslardaki elektromanyetik radyasyonu absorplayabilmektedir. Bu absorpsiyon atomun veya molekülün temel enerji seviyesinden daha yüksek enerjili bir uyarılmış enerji seviyesine geçişine neden olmaktadır. Gerçekleşen geçişler birer kauntum olayıdır. Bir diğer deyişle, bir atom veya molekülün uyarılmış enerji seviyesine geçişi yalnızca belli miktardaki enerjinin, kuantum mekaniğinin prensiplerine uygun olarak geçişe olanak sağlayacak miktara denk olan, temel enerji seviyesindeki atom veya molekül tarafından absorplanması sonucunda gerçekleşmektedir. Spektroskopi, kimyasal maddelerdeki bu değişiklikleri kalitatif ve kantitatif olarak ölçmektedir.

Spektroskopik teknikler absorpsiyon ve emisyon spektroskopileri olarak ikiye ayrılabilir. Elektromanyetik bir dalganın enerjisinin bir atom veya moleküle aktarılması ve bir üst uyarılmış enerji seviyesine geçişe neden olması olayı 'absorpsiyon' adını almaktadır. Absorpsiyon yalnızca atom veya molekül iki enerji seviyesi arasındaki enerji farkına eşdeğer miktardaki fotonu absorpladığında gerçekleşebilmektedir. Bir atom veya molekül farklı dalgalarda elektromanyetik radyasyona maruz bırakıldığında yalnızca o maddenin iki farklı enerji seviyesi arasındaki enerji farkına karşılık gelen fotonları absorplamaktadır. Emisyon ise absorpsiyonun tam tersi olup atom veya molekülden enerji yayımlanmaktadır. Bir molekül uyarılmış enerji seviyesine yükseldiğinde bu durumda çok kısa bir süre bulunabilmekte ve sonrasında relakse olup temel enerji seviyesine dönmektedir. Bu durum atom veya molekülün her zaman en düşük enerjili halde bulunmayı istemesinden kaynaklanmaktadır [31].

Spektroskopik tekniklerin sahip olduğu farklı avantajlar farklı gıda bileşenlerinin analizinde farklı tekniklerin ön plana çıkmasını sağlamaktadır. Bu durum lipid analizi açısından değerlendirildiğinde örneğin; floresans spektroskopisi floresan özellikli moleküllerin analizini hassas bir şekilde gerçekleştirebilmektedir [34]. Bitkisel yağların klorofil ve vitamin E içerikleri ile bazı yağ asidi oksidasyon ürünleri spesifik dalga boylarında floresans bantlarına sahip olduğundan bunların analizinde floresans spektroskopisinin kullanılması avantaj sağlamaktadır [9]. Kızılötesi ve Raman spektroskopisi tekniklerinde atomların titreşim frekansları takip edilerek moleküler yapı, bağlar ve $-OH$, $-NH_2$, $-CH_3$, $C=O$, C_6H_5- gibi fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sahibi olunmaktadır [35]. Bu bilgiler kullanılarak yağın trans doymamışlık, cis doymamışlık ve toplam doymamışlık gibi değerleri ölçülebilmekte, kalitesi ve stabilitesi belirlenebilmektedir [36]. LIBS tekniği ile analiz edilen örneklerin elemental kompozisyonu hakkında bilgi edinilerek karakterizasyon, taklit ve taşıma çalışmaları gerçekleştirilmektedir [37].

Tez kapsamında kullanılan SFS, LIBS ve RS hakkında detaylı bilgi aşağıda verilmiştir.

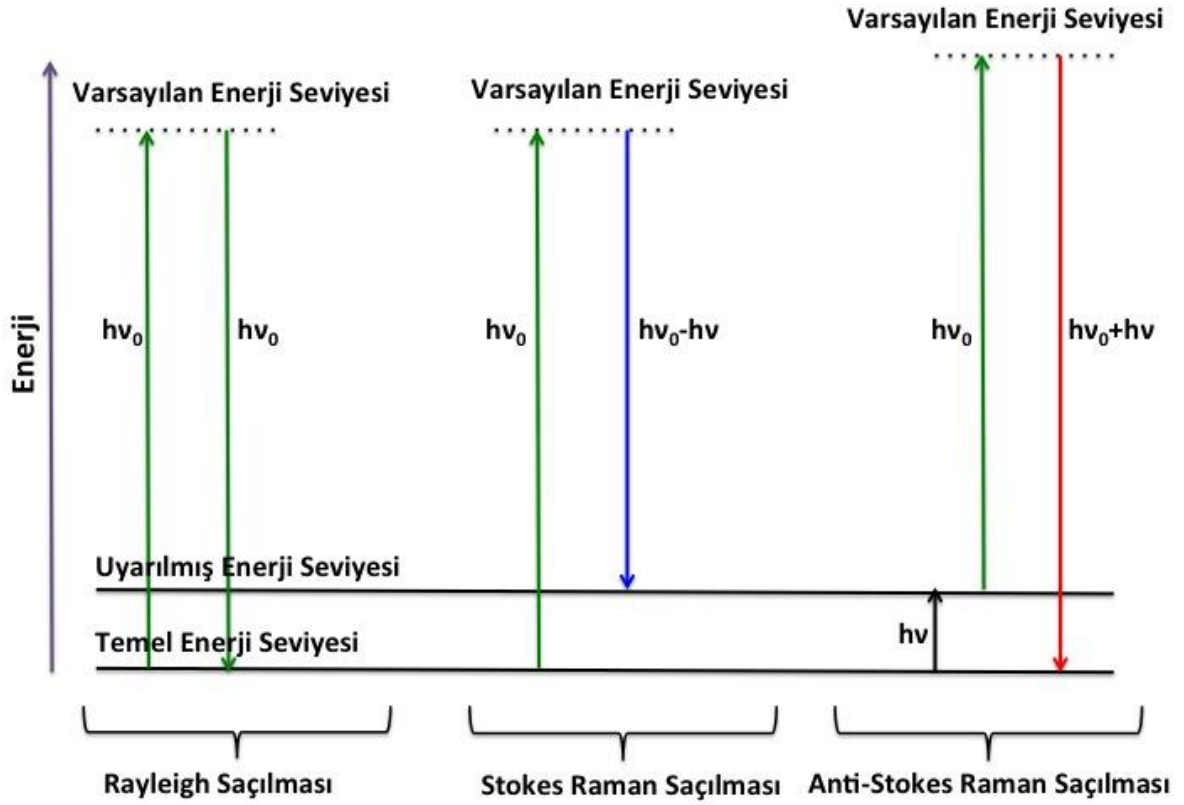
2.2.1 Raman Spektroskopisi

Günümüzde Raman saçılması olarak adlandırılan etki 1921 yılında Hindistan'da *Chandrasekhara Venkata Raman* tarafından keşfedilmiş olup ilgili teknik detayların anlatıldığı çalışması 1928 yılında yayınlanmıştır [38]. Raman etkisi sonucunda gözlenen sinyallerin ölçülmesi ve analizi Raman spektroskopisi olarak adlandırılmaktadır.

Bir ışık dalgası elektrik ve manyetik alanlardan oluşmaktadır. Bunlar içinde yalnızca elektrik alan Raman saçılması olayına sebep olmaktadır. Işık dalgası, bir çekirdek ve elektronlardan oluşan bir molekülle karşılaştığında bu ışık dalgasının sahip olduğu elektrik alan molekülün tüm elektronları üzerine etki etmekte ve elektronların pozitif yüklü çekirdek çevresindeki lokasyonlarını değiştirmektedir. Raman sürecinin gerçekleşebilmesi için elektronların lokasyonlarında gerçekleşen bu değişikliğin molekülde 'indüklenmiş dipol momente (π)' sebep olması gerekmektedir. Dipol moment ile elektrik alan kuvveti arasındaki ilişki aşağıdaki Eş.5 ile verilmiştir. Bu eşitlikte α ; molekülün elektriksel polarlanabilirlik değerini ifade etmektedir [39].

$$\pi = \alpha E \quad \text{Eş. 5}$$

Moleküllerin ışıkla olan interaksyonu molekülün serbestlik derecelerinin enerji seviyeleri ile belirlenmektedir. Bu durum elektronların elektronik enerji seviyelerindeki veya moleküldeki atomların titreşimsel, dönme veya öteleme enerji seviyelerindeki hareketi ile ilişkilidir. Bu enerji seviyeleri ve onlar arasındaki geçişin Rayleigh ve Raman saçılmaları için gösterildiği Jablonski diyagramı Şekil 2. 2 ile verilmiştir.



Şekil 2. 2 Raman saçılmasının molekülün titreşim düzeyleri ile olan ilişkisi

Şekil 2. 2'de enerji seviyeleri yatay çizgilerle, enerji seviyeleri arasındaki geçiş ise dikey oklarla gösterilmiştir. Buna göre başlangıç ışık kaynağının enerjisi ile saçılan ışığın enerjisinin aynı olması durumunda 'elastik saçılma' gerçekleşmektedir. Bu proses sonucunda saçılma ile molekülün enerji seviyesinde herhangi bir değişiklik olmamakta bir diğer deyişle molekül ve foton arasında herhangi bir enerji transferi gerçekleşmemektedir. Saçılan ışığın herhangi bir frekans değişimine uğramadığı elastik saçılma türü 'Rayleigh saçılması' olarak adlandırılmaktadır. Saçılan ışığın enerjisinin başlangıç ışık kaynağından farklı olması durumunda ise 'elastik olmayan saçılma' söz konusu olmaktadır. Aradaki enerji farkı moleküldeki iki enerji seviyesi arasındaki geçişe karşılık gelmektedir. Elastik olmayan saçılmanın en önemli türlerinden bir tanesi 'Raman saçılması'dır. Elastik olmayan saçılma sonrasında saçılan fotonun enerjisi başlangıç fotonundan daha yüksek veya daha düşük olabilmektedir. Saçılan fotonun enerjisi başlangıca göre düşmüşse molekül aradaki enerji farkına

denk gelecek kadar, bir yüksek enerji seviyesine uyarılmış demektir. Bu süreç 'Stokes saçılması' olarak adlandırılmaktadır. Genellikle molekülün temel enerji seviyesinden ilk uyarılmış enerji seviyesine yükseltilmesi sağlanmaktadır. Bunun tam aksine saçılan fotonun enerjisi başlangıca göre yükselmişse molekül uyarılmış bir enerji seviyesinden relakse olup temel enerji seviyesine dönmüş demektir. Bu süreç ise 'anti-Stokes saçılması' olarak adlandırılmaktadır. Oda sıcaklığında pek çok molekül temel enerji seviyesinde bulunduğundan bir fotonon Anti-Stokes saçılımına uğrama ihtimali çok düşüktür. Bu nedenle çoğu Raman ölçümü Stokes saçılımına uğramış ışık dikkate alınarak gerçekleştirilmektedir. Saçılma sürecinde fotonların enerji kaybetmesi olayı 'Raman kayması' olarak tanımlanmaktadır. Raman kayması genelde dalgasayısı cinsinden ifade edilmekte olup birimi cm^{-1} 'dir. Raman sinyal şiddetinin Raman kaymasının bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmesi ile Raman spektrumu elde edilmektedir. Raman spektrumunda gözlenen pikler molekülün titreşim modları ile ilgilidir. Her titreşim modu kuvvetli Raman bantlarına neden olmamakta ve farklı modlar için Raman sinyal şiddetleri değişiklik göstermektedir. Buna rağmen Raman spektrumu moleküle özgü bir parmak izinin elde edilmesine olanak sağlamaktadır [40].

Bir Raman spektroskopisi sistemi tipik olarak i) uyarma kaynağı (lazer), ii) örnek aydınlatma sistemi ve ışık toplayıcı optik ekipmanlar, iii) dalgaboyu seçici (filtre veya spektrofotometre) ve iv) dedektör (Yük Eşleşmiş Cihaz: Charge Coupled Device-CCD veya Fotodiod Dizi: Photodiod Array-PDA) bileşenlerinden oluşmaktadır. Örnek UV, Görünür veya Yakın-kızılötesi bölgedeki lazerle uyarılmaktadır. Saçılan ışık bir lens yardımıyla toplanmakta ve interferans filtresi veya spektrofotometreye gönderilerek örneğe ait Raman spektrumu elde edilmektedir. Raman saçılması süreci çok zayıf bir şekilde gerçekleştiğinden çok yoğun bir şekilde gerçekleşen Rayleigh saçılmasından ayırt edilmesi yöntemin en önemli zorluğunu oluşturmaktadır. Bu amaçla interferans filtreleri (Notch filtreler) kullanılmaktadır [41].

Gıda analizlerinde dispersif veya dispersif olmayan (Fourier dönüşümlü; FT) Raman spektroskopisi sistemleri kullanılabilir. Bu sistemlerden hangisinin gıda analizlerine daha elverişli olduğu yönünde bir genelleme yapmak mümkün olmamaktadır. Dispersif Raman spektrometreleri bir monokromatör, CCD

dedektör ve 200-800 nm aralığındaki lazer kaynağından oluşmaktadır. CCD dedektörler yüksek sinyal/gürültü oranına sahip olup hızlı bir şekilde veri toplanmasını sağlamaktadır. Gıda örneklerinden optimal bir Raman spektrumu elde edilebilmesi için genellikle UV ve Görünür bölgede ışık veren Argon ve Kripton iyon lazerler ile çok daha hassas olan He-Ne lazerler kullanılmaktadır. FT-Raman spektroskopisi sistemlerinde örnekten kaynaklı floresans ve örnekte fotodegradasyon gibi problemlerle daha az karşılaşılmaktadır. Bunun yanında 1064 nm'deki Raman saçılması, Görünür bölgedeki (514.5 nm) lazer kullanımına kıyasla daha zayıf olmaktadır. Nd:YAG lazerle ile NIR radyasyonu sağlanan FT-Raman spektroskopisi sistemlerinde enerji yeterince düşük olduğundan floresans süreçlerinden sorumlu olan elektronik geçişler uyarılmamaktadır [42]. FT-spektrometreyle sağlanan bir Raman saçılması Görünür bölgeye kıyasla çok daha zayıf olsa da floresans süreçleri açısından sağlanan eliminasyon pek çok farklı gıdanın analiz edilmesine olanak sağlamaktadır [41]. Raman spektroskopisinin Fourier transform tekniğiyle birlikte kullanılması sayesinde spektral çözünürlük artırılmakta ve daha iyi bir dalgaboyu hassasiyeti sağlanmaktadır [43].

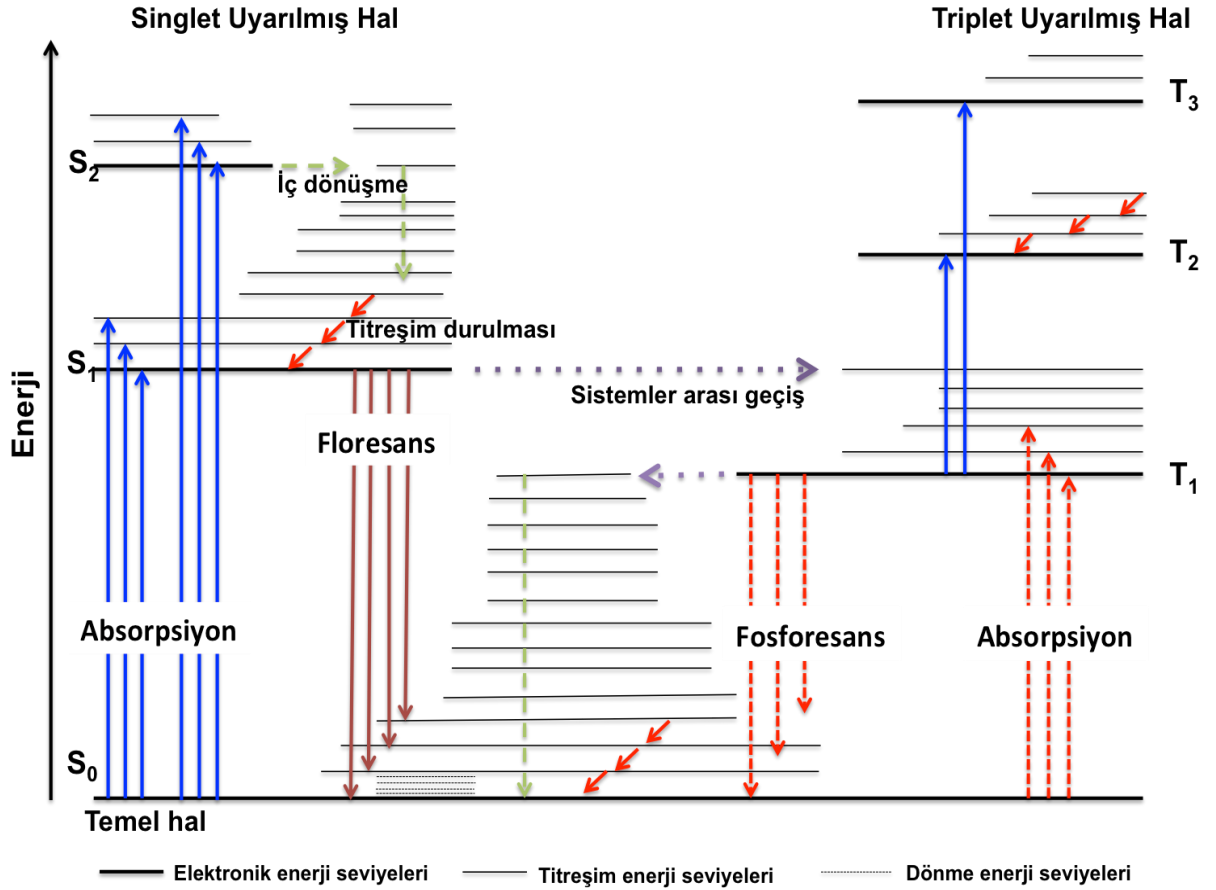
NIR ve MIR spektroskopilerine kıyasla suyun Raman sinyalinin çok zayıf olması dolayısıyla örneğin su içeriğinden kaynaklanan interferansın minimum olması ve bu sayede sulu çözelti formundan analiz gerçekleştirilebilmesi ve örneğin cam veya polimer paketleme materyali içindeyken de analizlenebilmesi Raman spektroskopisinin avantajlarını oluşturmaktadır. Öte yandan genel olarak Raman saçılmasının NIR ve MIR tekniklerindeki absorpsiyona kıyasla zayıf şiddetli bir fenomen oluşu RS tekniğini sinyal şiddeti bakımından sınırlı bir hale getirmektedir. Buna ilave olarak Raman saçılmasına kıyasla çok daha yüksek şiddette gerçekleşen floresans süreçleri de kaliteli bir Raman sinyalinin elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Yukarıda da söz edildiği gibi NIR eksitasyon lazerlerinin kullanımı ve uygun veri ön işleme tekniklerinin uygulanmasıyla floresans etkisi ortadan kaldırılabilmektedir. Lazer dalgalanmaları Raman sinyalini etkileyen bir diğer faktör olup sinyalde kaymalara neden olmaktadır. Bu kaymalar sinyal/gürültü oranında herhangi bir değişiklik yaratmadıklarından veriye uygulanacak ön işleme teknikleriyle düzeltilebilmektedir. Raman spektroskopisi katı ve heterojen örneklerin analizinde optik örneklem varyansının

fazla olması nedeniyle kısıtlı bir tekniktir. Örneğin rengi, absorbansı ve partikül boyutu gibi özellikleri katı örnekte varyasyonlara sebebiyet vermektedir [44].

2.2.2 Senkronize Floresans Spektroskopisi

Bir maddenin sahip olduğu yüksek sıcaklık nedeniyle radyasyon yayımlaması (incandescence) dışındaki tüm ışık yayılım şekilleri lüminesans olarak adlandırılmaktadır. Lüminesans gerçekleşirken sistem enerji kaybetmekte olup emisyonun sürekli olarak gerçekleşebilmesi için sisteme başka bir kaynakla enerji sağlanması gerekmektedir. Sağlanan enerjinin kaynağına bağlı olarak radyolüminesans, elektrolüminesans, kemilüminesans veya biyolüminesans gerçekleşebilmektedir. Harici enerji ihtiyacının kızılötesi, görünür veya UV ışığın absorplanması yoluyla karşılanması durumunda ışık yayılımı fotolüminesans olarak adlandırılmakta ve bu reaksiyon florometrik analizlerde takip edilmektedir [45].

Florimetride elektromanyetik spektrumun UV ve görünür bölgesi ile ilgilenilmektedir. Bu bölgedeki absorpsiyon moleküllerin en dış katmanındaki elektronların uyarılmasına neden olmaktadır. Oda sıcaklığında çoğu molekül temel elektronik halin en düşük titreşimsel enerji seviyesinde yer almaktadır. Işığın absorplanması sonucunda moleküller uyarılmış titreşimsel enerji seviyelerine yükselmektedir. Uyarılmış haldeki molekül hızlıca enerjisini kaybetmekte ve uyarılmış halin en düşük titreşimsel enerji seviyesine düşmektedir. Bu seviyeden sonra molekül temel halin herhangi bir titreşimsel enerji seviyesine dönebilmektedir. Temel elektronik halin en düşük titreşimsel enerji seviyesinden, birincil uyarılmış halin en düşük titreşimsel enerji seviyesine geçiş absorpsiyon ve emisyon olaylarında en sık gerçekleşen geçiş olarak bilinmektedir [46]. Singlet ve triplet sistemlerde molekülün enerji seviyeleri ile radyatif (floresans ve fosforesans) ve radyatif olmayan (sistemler arası geçiş, titreşim durulması ve iç dönüşme) geçişler Şekil 2. 3'te özetlenmiştir.



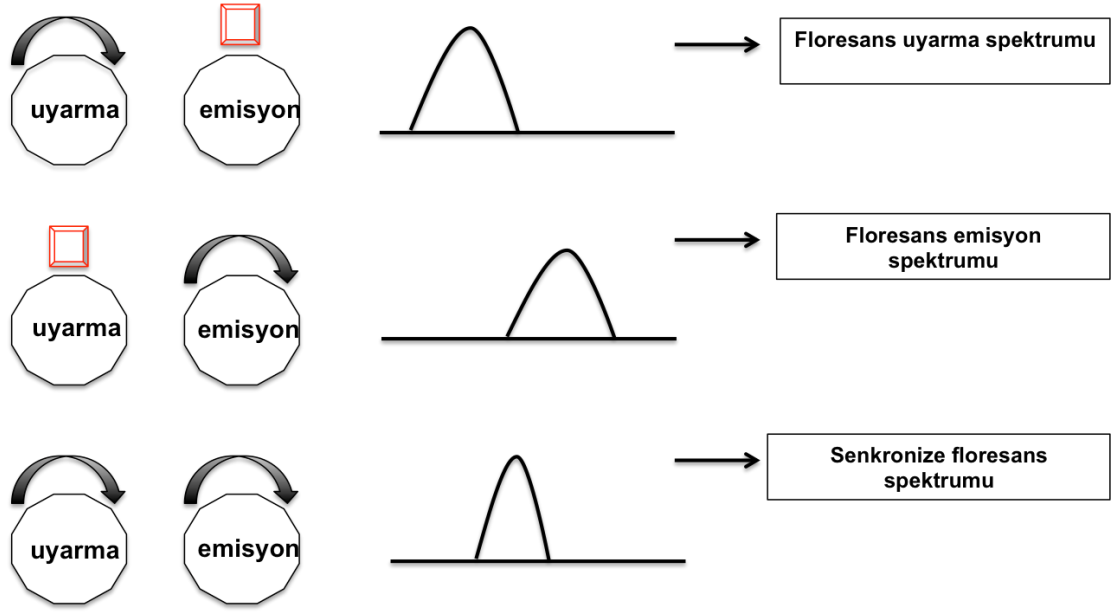
Şekil 2. 3 Singlet ve triplet sistemlerde radyatif ve radyatif olmayan geçişler

Konvansiyonel lüminesans spektrometride emisyon spektrumunun elde edilebilmesi adına emisyon dalgaboyu taraması yapılırken örnek sabit bir uyarma dalgaboyunda uyarılmaktadır. Benzer şekilde uyarma spektrumunun elde edilebilmesi için uyarma dalgaboyu taranmakta ve emisyon belirli bir dalgaboyunda takip edilmektedir.

Floresans spektrometri, sahip olduğu yüksek hassasiyet ve nispeten düşük cihaz maliyeti nedeniyle analitik kimyada önemli bir yere sahiptir. Küçük miktardaki analitler direkt olarak spektrofotometri ile analizlenebilmektedir. Fakat söz konusu teknik spektral çakışma problemleri nedeniyle birden çok bileşenin analizinde kullanılamamaktadır. Birden çok bileşen içeren karışımların herhangi bir önayırım aşamasına ihtiyaç duyulmaksızın analiz edilebilmesi rutin analizlerde avantaj sağlamaktadır. Floresans spektroskopisi yüksek hassasiyet ve seçiciliğe

sahip olması sayesinde birden çok bileşenin aynı anda analizine (multicomponent analysis) imkân sağlayan analitik tekniklerden bir tanesidir. Öte yandan, ölçümün tek bir dalga boyunda alınması, birden çok bileşen içeren karışımların veya çakışan emisyon/uyarma spektrumları veren basit bir çözeltinin analizinde sınırlayıcı olabilmektedir. Bu durum bir örneğe ait konvansiyonel floresans spektrumunun, örneğin belli bir spektral aralıktaki floresansı hakkında bilgi vermesi ve birbiriyle ilişkili iki veya daha çok molekülün ayırımına imkân verecek yeterli veriyi sağlayamamasından kaynaklanmaktadır. Konvansiyonel floresansın bu eksikliği lüminesans ölçüm boyutunun artırılmasıyla bazı durumlarda giderilebilmektedir. Ölçüm boyutu artırılarak çakışan floresans spektrumlarını ayırma gücü (resolution) artırılmakta ve analiz süresi azaltılmaktadır. Aynı deney içerisinde analitin birden çok floresans özelliğinin ölçülmesi sayesinde seçicilik artmaktadır. Bu amaçla senkronize lüminesans, faz-çözünürlüklü (phase-resolved) lüminesans ve çok boyutlu lüminesans teknikleri geliştirilmiştir. Birden çok floresan bileşik içeren ve birbiriyle çakışan floresan bantları veren çözeltilerin analizinde senkronize floresans spektroskopisi (SFS) tek başına veya diğer derivatif tekniklerle kombine olarak kullanılmaktadır. Bu sayede spektrumların çözünürlüğü artırılmakta ve bant genişliği daraltılmaktadır. Üst üste çakışan pikler azaltılarak daha dar bir veya birkaç pike dönüştürülmektedir. Ayrıca Rayleigh ve Raman saçılmalarının interferansı elimine edilmektedir [47].

SFS; Lloyd et. al., tarafından geliştirilmiştir. Buna göre uyarma ve emisyon dalgaboyları aynı hızda senkronize olarak taranmakta ve bu sırada $\Delta\lambda$ ($\lambda - \lambda'$) değeri yani emisyon (λ) ve uyarma (λ') dalga boyları arasındaki fark sabit tutulmaktadır [48]. Aşağıda Şekil 2. 4'de konvansiyonel floresans spektroskopisi ile SFS arasındaki uygulama farkı şematize edilmiştir.



Şekil 2. 4 Hipotetik floresans spektrumları

Şekil 2. 4'te oklar monokromatörün tarama durumunda, kırmızı kutular monokromatörün sabit durumda olduğunu göstermektedir. Bir analitin λ' dalgaboyunda uyarıldığı durum için, $E_m(\lambda)$ değeri emisyon intensite dağılım profilini bir diğer deyişle emisyon spektrumunu temsil etmektedir. Belli bir emisyon dalgaboyunda kaydedilen lüminesans sinyali I_λ ; λ dalgaboyundaki E_m değerine ve λ' dalgaboyunda uyarılan analitin lüminesansının spektral radyansına $R_{\lambda'}$ bağlı olarak değişmekte olup k deneysel faktör sabitidir. Bu durum aşağıdaki gibi formüle edilmiştir.

$$I(\lambda) = k R_{\lambda'} E_m(\lambda) \quad \text{Eş. 6}$$

Yukarıdaki eşitlikte λ (λ') ifadesi emisyon (uyarma) monokromatörünün dalgaboyunu ifade etmektedir. Lambert yasasının seyreltik çözeltiler için geçerli olduğu varsayılarak $R_{\lambda'}$ Eş.7'deki gibi ifade edilmektedir.

$$R_{\lambda'} = k' Y_L(\lambda') I_0(\lambda') \varepsilon(\lambda') c d \quad \text{Eş. 7}$$

Yukarıdaki eşitlikte Y_L lüminesans kuantum verimi, I_0 uyaran ışığın intensitesi, ε molar sönmelenme katsayısı, c analit konsantrasyonu, d örnek kalınlığı ve k' deneysel sabit faktör sabitini temsil etmektedir. $Y_L I_0 \varepsilon$ ifadesi λ' değerine bağlı olup uyarma spektrumuyla $E_x(\lambda')$ aşağıdaki gibi ilişkilendirilebilmektedir. k'' deneysel faktör sabitidir.

$$E_x(\lambda') = k'' Y_L(\lambda') I_0(\lambda') \varepsilon(\lambda') \quad \text{Eş. 8}$$

Eş.6,7 ve 8'in birleştirilmesi sonucunda senkronize lüminesans intensitesi (I_s); λ ve λ' değerlerinin bir fonksiyonu olarak aşağıdaki şekilde ifade edilebilmektedir.

$$I_s(\lambda, \lambda') = K c d E_x(\lambda') E_m(\lambda) \quad \text{Eş. 9}$$

K deneysel faktör sabiti; $K = k k' k''$ temsil etmektedir. Senkronize teknikte $\lambda - \lambda' = \Delta\lambda$ değeri sabittir ve $\lambda = \lambda' + \Delta\lambda$ olarak düzeltilenmektedir. Yukarıdaki eşitlik $\Delta\lambda$ parametresini içerek şekilde aşağıdaki gibi yazılabilmektedir.

$$I_s = K c d E_x (\lambda - \Delta\lambda) E_m (\lambda) \quad \text{Eş. 10}$$

Konvansiyonel luminesansta emisyon spektrumunun intensitesi uyarma dalgaboyuna bağlıdır. Bu bağıllık spketrumun intensite faktörüne etki etmekte olup diğer spektral özellikleri değiştirmemektedir. Bir diğer deyişle, konvansiyonel lüminesansta uyarma dalgaboyu yalnızca emisyon ifadesi üzerinde çarpım faktörü etkisi göstermektedir. SFS tekniğinde ise lüminesans intensitesi ifadesi hem λ hem de λ' değerlerine bağlı olduğundan hassasiyet arttırılmıştır. Ayrıca intensite ifadesine deneyi yapan kişi tarafından değiştirilebilen bir $\Delta\lambda$ parametresinin de katılmasıyla yöntemin seçiciliği arttırılmıştır [49].

Tüm floresans enstrümanları temel olarak bir ışık kaynağı, bir örnek haznesi ve bir dedektörden oluşmaktadır. Analitik amaçlı kullanımlar için başlangıç radyasyonunun ve uyarma ve emisyon ışıklarının dalgaboylarının seçimi monokromatörler ve filtrelerle sağlanmaktadır.

Floresans spektrometride ışık kaynağı olarak tungsten-halojen lamba, civa lamba veya ksenon ark kullanılmaktadır. Işık kaynağından spesifik dalgaboyundaki ışığın seçimi cut-off filtreler kullanılarak yapılmaktadır. Pek çok modern enstrümanda uyarma ve emisyon dalgaboylarının seçimi amacıyla monokromatörler kullanılmaktadır. Difraksiyon grating monokromatörler bu amaçla en çok kullanılanlardır. Bu sayede hem uyarma hem de emisyon spektrumları kaydedilebilmektedir. Monokromatör kullanımı sayesinde uyarma ve emisyon monokromatörlerinin slit aralıklarının birbirinden bağımsız olarak değiştirilmesi mümkün olmaktadır. Tüm ticari floresans cihazları dedektör olarak fotoçoğaltıcı tüp (PMT) kullanılmaktadır.

Floresans ölçümleri çoğunlukla çözelti ortamında gerçekleştirilmektedir. Örnek bir küvet veya akış hücrelerine yerleştirilmektedir. Küvet materyalinin uyarma ve emisyon ışıklarına geçirgen olması önemlidir. Küvet uyarma ışığına dik olarak yerleştirilmektedir. Floresans her yönden eşit şekilde yayılmakta olup küvetin ön yüzünden, uyarma ışığına sağ açıyla veya uyarma ışığıyla aynı hizadan toplanabilmektedir. Bazı cihazlarda toplama metodu seçeneği bulunmaktadır. Bu durum örnek karakteristiğine bağlı olarak değişmektedir. Çok seyreltik çözeltilerde floresans, uyarma ışığının örnek içinde aldığı yol boyunca her

noktada eşit şekilde yayılmaktadır. Bu koşullarda sağ açıyla toplama metodunun kullanılması ile ışık saçılmasının neden olacağı etki minimize edilmektedir. Pek çok analitik prosedürde bu yöntem kullanılmaktadır [50].

2.2.3 Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi

Gıdaların elemental kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan analitik atomik spektrometri teknikleri; elektrotermal atomizasyon-atomik absorpsiyon spektrometrisi (ETA-AAS), indüktif eşleşmiş plazma-atomik emisyon spektrometrisi (ICP-AES), indüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektrometrisi, (ICP-OES), indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometrisi (ICP-MS), enstrümental nötron aktivasyon analizi (INAA) ve X-ışını floresans spektrometrisi olarak bilinmektedir. Bu teknikler hassasiyet ve kesinlik bakımından üstün özelliklere sahip olmakla birlikte yüksek miktarda toksik özellikli atığın üretilmesine sebep olmakta, analizler pahalı kimyasalların kullanımını gerektirmekte ve yoğun örnek hazırlama prosedürlerine ihtiyaç duymaktadır. Söz konusu teknikler kullanılarak üretim hattı boyunca in-situ analiz yapılması mümkün olamamaktadır. Lazer indüklü plazma spektroskopisi (LIBS); bu tekniklere potansiyel bir alternatif olarak sunulmuş olup analiz edilen materyalden plazma oluşturulmasını hedefleyen odaklanmış atımlı lazer kullanılan bir atomik emisyon tekniği olarak tanımlanmaktadır.

1962 yılında Brech ve Cross, lazer ışınının bir örneğin uyarılması için kullanılabilir bir eksitasyon kaynağı olabileceğini göstermiştir. Çalışma kapsamında mikroyutta bir plazma oluşumu gözlenmiş ve metal yüzeyine odaklanan lazer sayesinde örneğe ait bir spektrum kaydedilmiştir [51]. 1983 yılında Cremers ve Radziemski kıvılcım (spark) emisyonunun elemental analiz amacıyla kullanılabilirliğini göstermiştir [52]. LIBS tekniği lazer indüklü olarak üretilmiş bir plazmaya ait atomik ve iyonik emisyon spektrumlarının spektral ve zaman çözünürlüklü analizine dayanan spektroskopik bir metottur. LIBS tekniğinde temel olarak atımlı lazer ışını örnek üzerine odaklanmakta ve lazer atımı yeterince güçlüyse odaklanan elektrik alan yeterince güçlü olmaktadır. Lazer atımı hedef materyalde hızlı bir lokal ısınmaya, vaporizasyona, disosiyasyona ve atomların iyonizasyonuna sebep olmaktadır. Tüm bu değişimler sonucunda sıcak ve parlak bir kıvılcım oluşmaktadır. Bu kıvılcım yüksek sıcaklık

ve yüksek elektron yoğunluğu ile oluşturulmakta ve lazer indüklü plazma olarak adlandırılmaktadır. Oluşturulan plazma içerisinde nötral atomlar, iyonlar ve serbest elektronlar bulunmakta olup, bunlar plazma soğurken elektromanyetik radyasyon yaymaktadır. Yayılan ışık bir spektrometre yardımıyla çözümlenerek analiz edilen örnek içeriğine ait elementlerin karakteristik spektrumu elde edilmektedir [53].

LIBS tekniği ile katı, sıvı, gaz, aerosol ve jel formundaki örneklerde kalitatif ve kantitatif analizler yapılabilmektedir. Çok farklı örnek tiplerinde analize imkan sağlaması LIBS tekniğinin önemli bir avantajını oluşturmaktadır. Pek çok örneğin LIBS tekniği ile analizinde örnek hazırlama prosedürlerine ihtiyaç duyulmadan hızlı bir şekilde analiz gerçekleştirilebilmektedir. Aynı anda birden çok elementin analizi bir diğer deyişle multielemental analiz yapılabilmektedir [54].

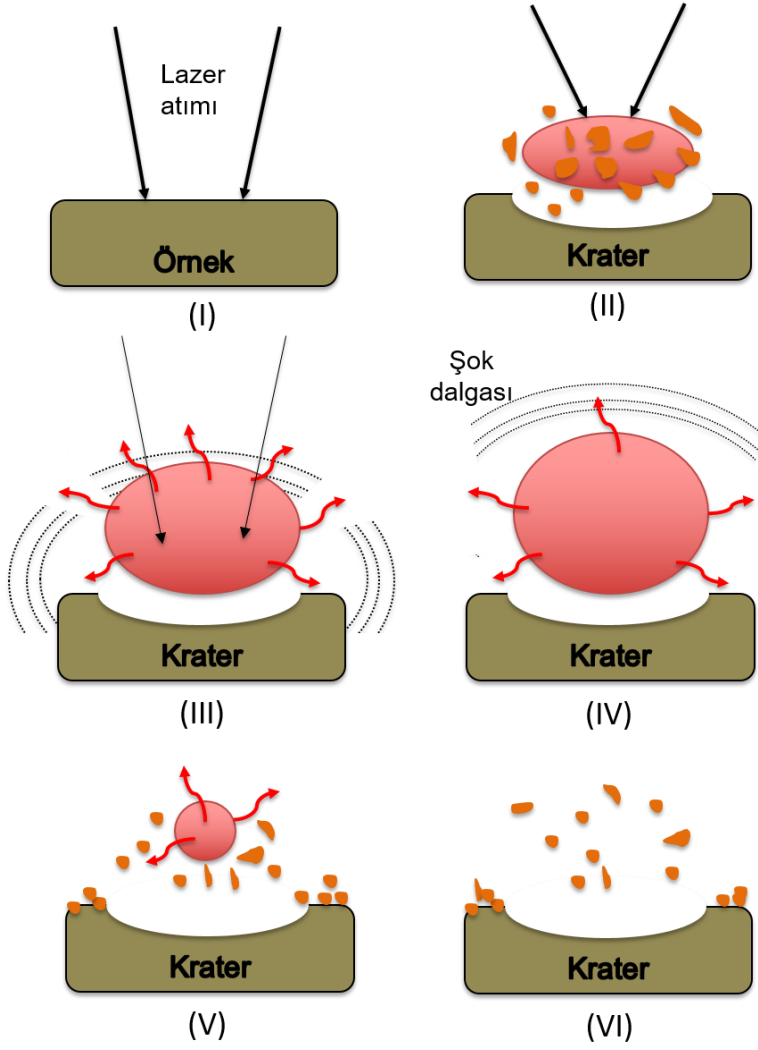
LIBS tekniği kullanılarak yapılan kantitatif analizlerde örneğin kompleks doğasına, elemental bileşimine, fiziksel yapısına ve örneği çevreleyen atmosfere bağlı olarak bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Kompleks organik kompozisyona sahip gıda örneklerinde sinyal/gürültü oranının düşük olması ve ablasyona uğratılan madde miktarının çok düşük olması LIBS tekniğini örneğin homojenitesine yüksek oranda bağımlı hale getirmektedir. Analiz edilen örneğin fiziksel veya kimyasal özelliklerinden kaynaklı olarak emisyon bantlarının sinyal şiddetinde gözlenen varyasyonlar matriks etkisi olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle örnek hazırlama basamağı ve ölçüm parametrelerinin optimizasyonu büyük öneme sahiptir. LIBS tekniğinde karşılaşılan bu ve benzeri limitasyonlar ekipman seçimi, konfigürasyon tasarımı, örnek hazırlama prosedürleri ve analiti çevreleyen atmosfer bileşimi gibi parametrelerin optimizasyonu ile büyük ölçüde elimine edilebilmektedir [55]. Bunun yanında LIBS ölçümlerinin gerçekleştirileceği optimum sistem konfigürasyonunun sağlanabilmesi adına tekniğin temelini oluşturan plazma fiziğinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Pek çok çevresel faktör plazma ömrünü, plazma özelliklerini ve spektral emisyonu büyük oranda değiştirmekte dolayısıyla atomik seviyede gerçekleştirilecek olan kimyasal analizin performansını direkt olarak etkilemektedir [56]. Materyali karakterize eden hatların dalgaboyu, sinyal şiddeti ve şekil olmak üzere üç temel özelliği bulunmaktadır. Bu özellikler foton yayımlayan atomların yapısına ve çevresel koşullara bağlılık göstermektedir. Her tür atom farklı enerji seviyelerine

sahip olup bunlar hattın dalgaboyunu belirlemektedir. Analiz edilen örnekteki elementlerin tanımlanmasının yanı sıra lokal termodinamik denge şartlarındaki gerekli koşulların ve matriks etkisinden kaynaklanan problemlerin dikkate alınması durumunda elementlerin miktarsal tayinin yapılması mümkün olabilmektedir [57]. Hatlara ait sinyal şiddeti ve şekil özellikleri daha çok foton yayımlayan atomun bulunduğu çevresel koşullara bağlılık göstermektedir [58].

LIBS tekniği yüksek güçlü lazerin analiz edilen örnekle olan etkileşimini temel almaktadır. Lazer-madde etkileşimleri fotonların atomlar tarafından absorbe edilmesi ve yayımlanmasını açıklayan kuantum mekaniği yasalarına göre yönetilmektedir. Elektron fotonu absorbe ederek daha yüksek enerjili bir kuantum mekanik duruma ulaşmaktadır. Elektronlar, olası düşük enerji seviyelerine geçmeye eğilim göstermekte ve düşük enerji seviyelerine geçişlerde (atomun deeksitasyonu) foton yayımlamaktadır. Her bir atom türünün farklı enerji seviyeleri, Heisenberg belirsizlik ilkesi tarafından tanımlanan bir belirsizlikle, her atom türü için farklı ve somut foton enerjilerine ve kuantizasyon nedeniyle dar bant emisyonlarına neden olmaktadır. Bu emisyonlar LIBS spektrumunda bulunan spektral emisyon bantları olup özellikleri ve enerji seviyeleri her bir atom için bilinmektedir [58]. Atoma uygulanan enerji iyonizasyon potansiyelini aşacak kadar yüksek seviyede ise elektronlar atomdan ayrılmakta ve serbest elektronlar ile katyonlar oluşabilmektedir. Atomdan ayrılan elektronlar en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olduklarından çekirdeğe en uzak konumda bulunmaktadır. Uygulanan enerji seviyesinin arttırılması yoluyla ikinci, üçüncü, dördüncü ve diğer iyonizasyon potansiyeli değerlerinin de aşılması ve daha fazla serbest elektron oluşturulması mümkün olabilmektedir. Bu iyonlar rekombinasyon ve deeksitasyon süreçlerinde foton yayımlayabilmektedir. Rekombinasyon süreci katyonların serbest-bağlı geçişi (free-bound transition) adı verilen süreçler esnasında serbest elektronlardan birini absorplaması olarak tanımlanmaktadır. Deeksitasyon süreci ise serbest-serbest geçişi (free-free transition) adı verilen kinetik süreçler esnasında katyonların ve elektronların enerji kaybetmesi olarak tanımlanmaktadır. Söz konusu emisyonlar, iyonların farklı enerji seviyelerine ve farklı enerji geçişlerine sahip olması nedeniyle sürekli yayılım halinde olabilmektedir. Öte yandan katyonların deeksitasyonu belirli (kuantize) enerji seviyelerinden oluşmakta ve her bir element için karakteristik emisyon hatlarına

sahip olmaktadır ve bunlar atomik emisyon bantlarıyla birlikte elementin tanımlanmasını sağlamaktadır.

Şekil 2. 5 ile lazer indüklü plazmanın oluşum aşamaları şematize edilmiştir Birinci aşamada; lazer ışını örnek tarafından absorplanmakta veya yansıtılmaktadır. Ardından absorbe edilen enerji ısıya dönüşmekte ve küçük miktardaki örnek ablasyona uğratılmaktadır. Ablasyon hızlı bir erime veya buharlaşma veya süblimleşme olarak tanımlanabilecek termal bir süreçtir. Ablasyona uğratılan örnek miktarı ng-µg seviyesindedir. İkinci aşamada; örneğin ablasyonu plazma içindeki elementlerin iyonizasyonuna sebep olan aşırı ısıtılmış bir plazma oluşumuna neden olmaktadır. Plazma oluşumu, bozunum (breakdown) olarak adlandırılan süreç içerisinde hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Oluşturulan plazma analiz edilen materyale ait atomların, iyonların ve serbest elektronların bir karışımını içermektedir.

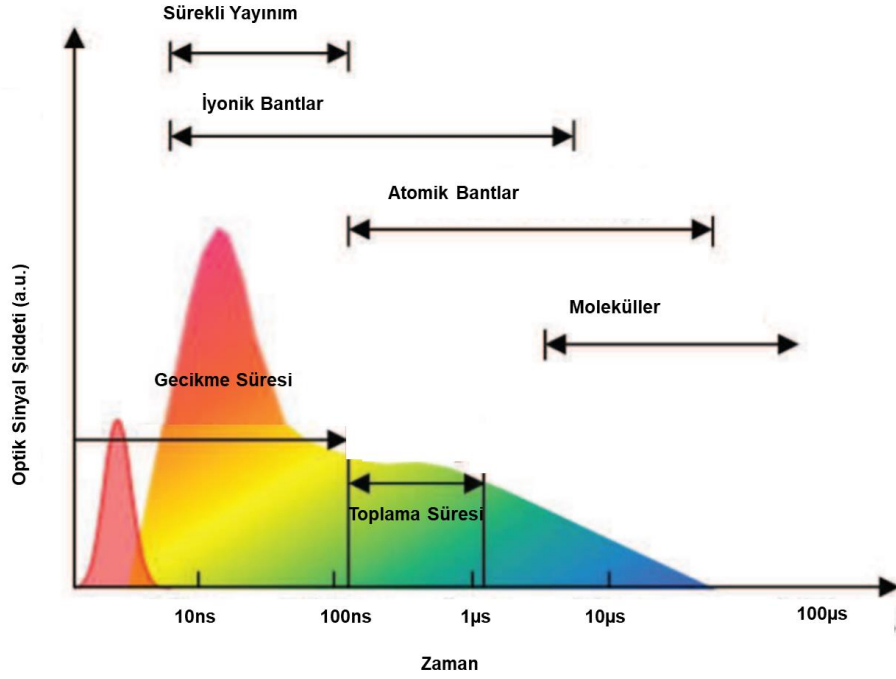


Şekil 2. 5 Lazer indüklü plazma oluşumunun temel basamakları [59]

Lazer örnek etkileşimi sürecinde 10^{-8} ile 10^{-9} s gibi bir süre arasında oluşan plazma, lazer radyasyonuna opak hale gelmekte ve bu nedenle lazer atımının son kısmı plazma yüzeyiyle interaksiyona girmekte ve absorbe edilmekte veya yansıtılmaktadır. Bu nedenle bu son kısım çok fazla materyalin iyonizasyonuna neden olamamaktadır. Bu etki plazma kalkanlama (plasma shielding) etkisi olarak adlandırılmaktadır. Bu etki çevresel koşullar; çevreleyen gaz ortamı veya vakum ile lazer ışınımı ve dalgaboyu gibi deneysel koşullara yüksek bağlılık göstermektedir. Lazer ışınımı örnek yüzeyine ulaşamadığından söz konusu kalkanlama etkisi ablyasyon oranını azaltmaktadır. Bu durumda erimiş ve çevresinde materyal birikimi olmuş bir krater gözlenmekteyken plazma yeniden ısıtıldığından plazma boyutu ve ömrü arttırılmaktadır [60]. Plazma kalkanlama etkisi Şekil 2. 5 ile şematize edilen sürecin III. basamağında gözlemlenmektedir.

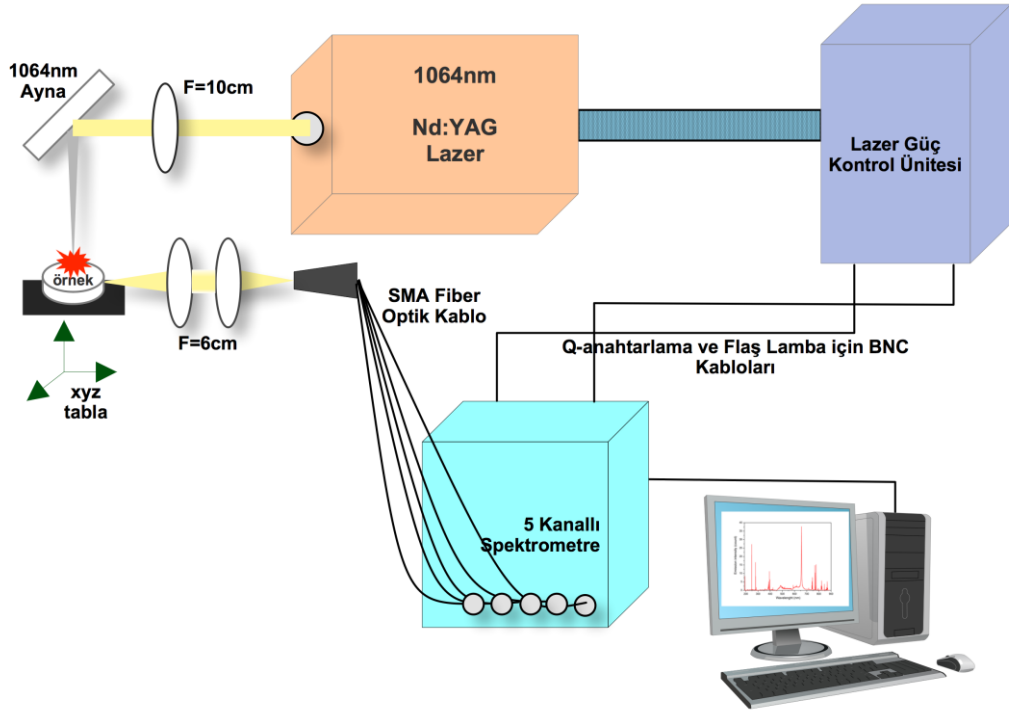
Üçüncü ve dördüncü aşamalarda; lazer atımından sonra oluşan plazma genişlemekte ve soğumaktadır. Aynı zamanda elektron yoğunluğu ve sıcaklığı ablasyona uğratılan madde miktarı, spot büyüklüğü, uygulanan enerji ve çevresel koşullar gibi etkenlere bağlı olarak değişmektedir. Plazma bir gaz veya sıvı ortamında oluşmuşsa kendisini çevreleyen ortamı sıkıştırarak ve şok dalgaları oluşturacaktır. Bu durum Şekil 2. 5 ile şematize edilen sürecin III. basamağında Bremsstrahlung etkisi ile birlikte gözlenmektedir. Bu noktada plazma, vaporize edilen materyal ve ortamdaki gazdan üretilen atom ve iyonların bir karışımı şeklindedir [58]. Atımlı lazer ışını ile örneğin interaksiyonu sonucunda oluşan plazma belirli ve birbirinden ayrı halde bulunan hatlar ve bantlar ile bunların üzerini örten bir sürekli yayınımdan oluşmaktadır. Atomik türlere ait emisyon hatlarının gözlenmesi sürekli yayılım (continuum) nedeniyle mümkün olamayabilmekte ve bu nedenle bu etkiden kaçınılması gerekmektedir. Sürekli yayılım Bremsstrahlung etkisi ile açıklanmakta olup bu etki çekirdeğe yakın bölgedeki bir elektronun kinetik enerjisini kaybetmesi ile ilgilidir. Lazer atımının plazmayı oluşturmasından hemen sonraki birkaç mikrosaniye içinde plazma enerjisine güçlü bir beyaz ışık hakim olmaktadır. Bu ışık 'Bremsstrahlung ışınımı' olarak adlandırılmaktadır.

Son aşamada buhar veya plazma fazında ablasyona uğratılmamış ve radyasyon yayımlamayan bir kısım materyal, partikül olarak ablasyona uğratılmıştır ve kondense buhar, sıvı örnek ejeksiyonu ve katı örnek eksfoliyasyonuna neden olmaktadır. Buna ek olarak ablasyona uğratılmış atomlar soğumakta ve plazmanın rekombinasyon sürecinde nanopartiküller oluşturmaktadır. Uyarılmış atomlar foton yayını yapılmaktadır. Plazma soğudukça uyarılmış atomlar, iyonlar ve elektronlar enerji kaybetmekte ve temel hale geçişleri esnasında hedef materyalde bulunan elementlerin karakteristik spektral yapılarına spesifik ışık yayınlamaktadır. Atımlı lazer kaynaklı plazma emisyonunun zamana bağlı olarak (temporal) değişimi Şekil 2.6 ile şematik olarak gösterilmiştir [61].



Şekil 2. 6 Lazer indüklü plazma emisyonunun zamana bağlı değişimi

Tipik bir LIBS sistemi atımlı lazer, lazer odaklayıcı optik ekipmanlar, plazma ışığını toplayıcı optik ekipmanlar, spektrometre ve örnek haznesinden oluşmaktadır. Şekil 2. 7 ile tez çalışması kapsamında kullanılan LIBS düzeneğinin şematik olarak gösterimi verilmiştir. LIBS sistemlerinde sıklıkla kullanılan lazer türlerinden bir tanesi yüksek güçlü Q-anahtarlamalı atımlı Nd:YAG (Neodimyum doplanmış İtiryum Alüminyum Garnet) lazerdir. Genellikle 532 nm görünür dalgaboyu veya 1064 nm kızılötesi dalgaboyundaki lazerler kullanılmakla birlikte 256 ve 355 nm UV emisyon dalgaboyuna sahip Nd:YAG lazerlerin kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Kısa dalgaboyuna sahip lazer kullanımının ablyasyon için daha düşük bir akı değeri ihtiyacını sağladığı ve örnekte daha tekrarlanabilir bir analiz gerçekleştirilebildiği belirtilmektedir. Q-anahtarlamalı mod 5-1000 ns aralığında uzunluğa sahip lazer atımlarının üretilmesini sağlamaktadır. Lazer atım sonucunda örnek yüzeyinde oluşan enerji; akı (J/cm^2) ve güç yoğunluğu/ışınım (W/cm^2) değerleri ile ifade edilmekte olup kullanılan odaklama optik konfigürasyonu ile sağlanan spot büyüklüğüne bağlıdır. Maksimum ışınım lazer spotunun minimum odaklanma bölgesinde elde edilmektedir [58].



Şekil 2. 7 Tez çalışmasında kullanılan LIBS düzeneğinin şematik gösterimi

Gıda analizlerinde kullanılan çoğu çalışmada örnekler üzerine uygulanan atım enerjileri 30-100 mJ arasında olup akı değerleri ise 25-50 J/cm² arasında değişmektedir. Bu değişkenlik analiz edilecek gıdanın fiziksel hali, kompozisyonu ve analiz ortamına bağlıdır. Lazerin atım tekrarlama hızı; lazer tarafından bir saniyede üretilen atım sayısını (Hz) ifade etmektedir. Genellikle atım tekrarlama hızı arttıkça tespit edilen spektrum sayısının arttığı ve ölçüm süresinin azaldığı belirtilmektedir. Gıda analizlerinde kullanım açısından bu değer genellikle 1-20 Hz arasında değişmektedir [62].

Laboratuvar koşullarında kullanılan sistemlerde lazer odaklayıcı ekipman olarak genellikle uygun odak numarasına sahip lensler kullanılmaktadır. Saha çalışmalarında ve endüstriyel amaçlı analizlerde ise lensler yerine daha çok fiber optikler kullanılarak lazer istenen lokasyona gönderilebilmektedir [63]. Toplayıcı optik ekipmanlar, lensler ve aynalardan oluşmaktadır. Bu sayede mikro-plazmadan yayımlanan ışık fiber optiğin girişine veya spektrometrenin girişine odaklanmaktadır [64].

Lazer indüklü plazma, deneysel koşullara bağlı olmakla birlikte genellikle 0.1-100 µs arasında çok kısa süreli ömüre sahip bir fenomen olduğundan emisyon

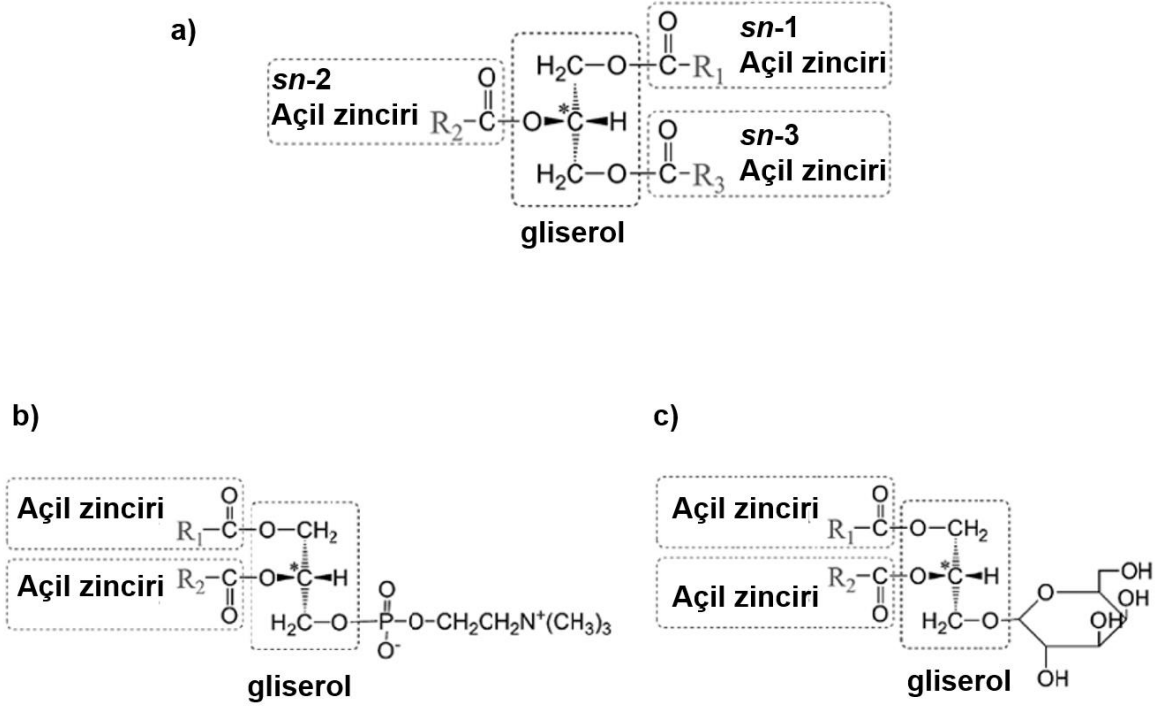
spektrumunun uygun şekilde kaydedilebilmesi için LIBS sistemlerinde hızlı ve operasyonu lazer atımıyla birebir senkronize olmuş bir spektrometrenin kullanılması gerekmektedir. Spektrometre, LIBS sisteminin tamamlayıcı bir parçası olup spektrograf ve dedektörden oluşmaktadır. Spektrograf gelen ışığı bir frekans spektrumuna ayırmakta ve dedektör elektromanyetik radyasyonun farklı frekanslardaki sinyal şiddetini ölçmektedir. Spektrometrenin performansını etkileyen üç parametre spektral aralık, çözünürlük ve veri toplama süresidir. Spektral aralık LIBS sisteminin ölçüm kabiliyetini belirlemektedir. Genellikle önemli elementlere ait atomik emisyon bantları 190-850 nm aralığında konumlanmaktadır. Spektral aralığın geniş olması aynı anda tayin edilebilecek element sayısını arttırmaktadır. Spektral çözünürlük spektrografın elektromanyetik spektrumu ayrıştırabilme yeteneğini belirlemektedir. Ayrıştırma gücü (R); dalgaboyunun bant genişliğine oranı ile ifade edilmektedir. 0.003-0.01 nm aralığındaki yüksek bir çözünürlük bantların birbirleriyle olan interferansını azaltmakta ve daha iyi tanımlanmış bir spektrum elde edilmesini sağlamaktadır. Spektral bilginin elde edilmesi için geçen veri toplama süresi (acquisition time); gecikme süresi (delay time) ve integrasyon süresi (integration time) parametrelerine bağlıdır. Gecikme süresi; plazma oluşumu ile dedektörün aktivasyonu arasında geçen süre olarak tanımlanmakta olup bu sayede background continuum; bremsstrahlung ve rekombinasyon olaylarından kaçınılması sağlanmaktadır. En güçlü background continuum sinyali plazma ömrünün başlangıç kısmında plazma sıcakken gözlenmektedir. Genellikle 0.1 µs gibi bir gecikme süresi ile arka plan gürültüsü ihmal edilebilir seviyeye gelmektedir. Çoğu nötral atomun spektral bantlarının sinyal şiddetleri ise 0.1-2.0 µs aralığında maksimum seviyede olmaktadır. Toplama süresi (gate width); dedektör penceresinin sinyal kaydetme için açık kaldığı süreyi belirtmektedir [65]. Delay time ve gate width parametreleri lazer ile senkronize edilmiş bir puls jeneratörü ile kontrol edilebilmekte ve değerleri mikrosaniye aralığında değişmektedir. Bu parametrelerin sinyal/gürültü oranının optimizasyonu adına dikkatli bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu parametrelerin optimizasyonunun µs altındaki seviyelerde yapılması büyük önem taşımaktadır. Bu sayede analite ait türlerin (atomlar, iyonlar, moleküller) ışınması plazma içinde baskın durumdayken ve background continuum sinyali düşükken tespit edilebilmektedir. LIBS tekniği kullanılarak multielemental analiz yapılabilmesi için

geniş bir spektral aralıkta çalışan spektrometrelere ihtiyaç duyulmaktadır. Geleneksel Czerny-Turner spektrometre 20 nm gibi sınırlı bir spektral aralığı kapsamakta olup bu aralıkta yüksek bir çözünürlük sağlamaktadır. Bu nedenle Czerny-Turner spektrometre kullanılması durumunda birden fazla elementin analizinin yapılabilmesi için çok fazla ölçüm alınması gerekmektedir. Böyle durumlarda bir CCD dedektör ile birlikte Echelle spektrometre kullanılması daha uygun olmaktadır. Bu sistem multi elemental analiz için çok kompakt bir sistem olup 200-780 nm dalgaboyu aralığında maksimum çözünürlük sağlamaktadır. CCD dedektörler; dijital görüntüleme için kullanılan yüksek hassasiyetli fotoelektron dedektörlerdir. Piksel olarak adlandırılan çok sayıda ışığa duyarlı toplama bölgelerinden oluşmaktadır. Lazer atımı sonucunda üretilen fotoelektronlar pikseller ile toplanmakta ve elektronlara dönüştürülmektedir. Elektron sayısı ise sinyal şiddeti ile direkt olarak orantılıdır. LIBS teknolojisine yeni kazandırılan ICCD dedektörlerde (Güçlendirilmiş Yük Eşleşmiş Cihaz: Intensified Charge Coupled Devices-ICCD) ise CCD dedektöre iliştirilmiş bir çok kanallı plaka yoğunlaştırıcı (multichannel plate intensifier) bulunmaktadır. Fotokatoda ulaşan ışık burada elektronlara dönüştürülmekte ardından çok kanallı plaka tabakasında yoğunlaştırılmakta ve ardından fosfor ekrana ulaşarak fotonlar üretilmekte ve son aşamada CCD tarafından dedekte edilmektedir [58]. Işık şiddeti dalgaboyunun bir fonksiyonu olarak bir bilgisayarda kaydedilmekte ve uygun bir arayüz programıyla analiz edilmektedir. Spektrometreden çıkan son ürün bir spektrum olarak elde edilmektedir.

2.3 Spektroskopik Yöntemlerin Lipit Analizlerinde Kullanılması

2.3.1 Lipitlerin Tanımı ve Sınıflandırılması

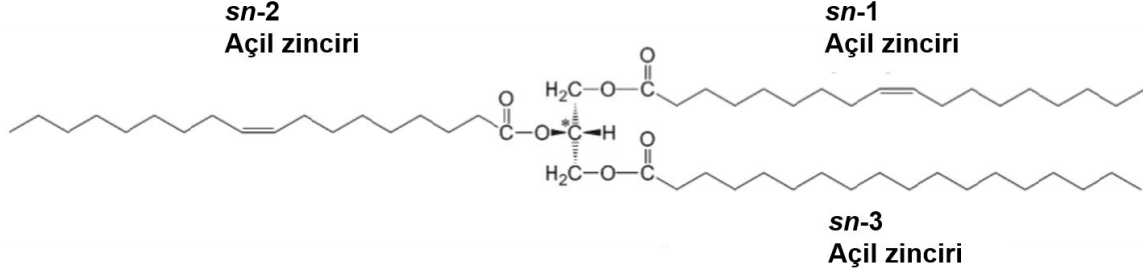
Lipitler; ortak özelliği dietil eter, hekzan, benzen, kloroform ve metanol gibi organik çözücülerde çözünebilmek olan yağ asitleri ve türevleri, steroidler, terpenler, karotenoidler ve safra asitleri gibi doğal bileşenler olarak tanımlanmaktadır [66]. Bir diğer tanımda ise lipitler suda çözünmeyen, organik çözücülerde çözünen, uzun zincirli hidrokarbon grupları içeren ve canlı organizmalarda bulunan veya canlı organizmalardan elde edilen bileşikler olarak tanımlanmaktadır [67]. Lipitler oda sıcaklığındaki fiziksel hallerine göre (oil; sıvı yağ ve fat; katı yağ), polaritelerine göre (polar ve nötral lipitler), insan beslenmesindeki önemlerine göre (esansiyel ve esansiyel olmayan yağ asitleri) veya yapılarına göre (basit ve kompleks) sınıflandırılabilir. Genel anlamda basit lipitler hidrolize olduklarında bir alkol ve bir yağ asidi oluşurken, kompleks lipitlerin hidrolizi sonunda üç veya daha fazla bileşik oluşmaktadır. Lipit alt sınıfları; yağ asitleri, açilgliseroller, sterol ve sterol esterleri, vakslar, fosfolipitler (fosfolipitler), eterfosfolipitler (plasmalogenler), gliseroglikolipitler, sfingolipitler ve hidrokarbonlardan oluşmaktadır. Şekil 2. 8 ile bir triaçilgliserole ait genellenmiş yapısal formül (a) ile bir fosfolipit olan fosfatidil kolin (b) ve bir glikolipit olan galaktolipite (c) ait temel moleküler yapılar gösterilmiştir.



Şekil 2. 8 Bazı lipit alt sınıflarının moleküler yapıları

Lipit yapılarının oluşumundaki başlangıç noktası yağ asitleridir. Açılgliceroller; yağların majör bileşenleri olup gliserol bir, iki veya üç yağ asidiyle esterleşerek sırasıyla monoaçılglicerol (monoglicerid), diaçılglicerol (diglicerid) ve triaçılgliceroller (triglicerid) oluşturabilmektedir. Fosfolipitler; gliserol, yağ asitleri, fosfat ve bir organik baz/polihidroksi bileşikten oluşmaktadır [68].

Şekil 2. 9'de *sn*-1 ve *sn*-2 pozisyonlarında oleoil açil ve *sn*-3 pozisyonunda palmitoil açilin bağlı bulunduğu '1, 2-dioleoil-3-palmitoil-*sn*-gliserol' molekülünün yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2. 9 Triaçilgliserol molekülünün yapısı [68]

2.3.2 Lipitlerin Ekstraksiyonu

Karbonhidrat ve proteinlerle birlikte bitkisel ve hayvansal kaynaklı gıdaların majör bileşenlerinden bir tanesi lipitlerdir. Lipitlerin benzersiz özelliklerini belirleyen nokta yapısal özelliklerinden çok çözünebilirlik özellikleridir. Gıdaların yapısında bulunan en önemli lipit alt sınıfları triaçilgliseroller ve fosfolipitlerdir. Lipitler doğada diğer moleküllerle ilişkili halde bulunmaktadır. Proteinlerle van der Waals bağları, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları üzerinden; diğer lipitler, karbonhidratlar ve proteinlerle ise kovalent bağlar üzerinden bağlı halde bulunmaktadırlar. Bu nedenle lipitlerin kompleks bir matriksten ayrılması ve izole edilmesi i) kurutma, boyut azaltma, hidroliz gibi ön işlemler ii) bir çözücü varlığında homojenizasyon, iii) organik ve sulu faz ile katı fazın birbirinden ayrılması iv) lipit yapıda olmayan bileşenlerin uzaklaştırılması v) çözücünün uzaklaştırılması ve ekstraktın kurutulması gibi pek çok basamaktan oluşmaktadır. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) tarafından tanımlanmış pek çok ekstraksiyon metodu olmakla birlikte farklı materyal ve doku örneklerinden yapılacak ekstraksiyonlar için bu metotlar üzerinde pek çok modifikasyon gerekmektedir.

Lipitlerin ekstraksiyonu açısından kritik olduğu belirtilen bazı parametreler bulunmaktadır. Ekstraksiyonun gerçekleştirileceği materyal hızlı bir şekilde analize alınmalıdır. Bunun mümkün olmadığı durumlarda materyal düşük sıcaklıklarda, inert gaz atmosferinde, kapalı örnek kaplarında muhafaza edilmelidir. Materyalin dondurulması ozmotik şok nedeniyle örnekte kalıcı

değişikliklere neden olabilmekte, lipit ile enziminin biraraya gelmesini sağlayabilmektedir. Dondurulmuş örneğin ekstraksiyondan önce eritilmesi bozulmasını hızlandıracağından örnek çözülmeye müsaade edilmeden ekstraksiyona alınmalıdır [66].

Bitkisel ve hayvansal dokulardaki lipolitik enzimler polar çözücülerle homojenizasyon sırasında deaktive edilmektedir. Ekstraksiyon sırasında yüksek sıcaklık uygulamalarından kaçınılmalı, mümkünse örnek hazırlama ve ekstraksiyon basamakları inert gaz atmosferinde gerçekleştirilerek doymamış lipitlerin oksidasyon reaksiyonları minimize edilmelidir. Örneğin partikül büyüklüğünün azaltılması örnek-çözücü etkileşiminin gerçekleştiği yüzey alanını artırarak ekstraksiyon verimini arttırmaktadır.

Lipitlerin suda çözünmüyor olması protein, karbonhidrat ve sudan ayrılmalarını kolaylaştırmaktadır. Moleküler bileşimine bağlı olarak lipitler farklı hidrofobiklik seviyelerine sahiptir. Rutin gıda analizlerinde yağ içeriği (eter ekstraktı, nötral yağ, ham yağ) ile genellikle kastedilen düşük polaritedeki petrol eteri veya dietil eter gibi çözücülerle ekstrakte edilebilen serbest lipit bileşikleridir. Bağlı lipit bileşiklerinin ekstraksiyonu için ise polaritesi yüksek çözücüler gerekmektedir. Çözücü ekstraksiyonunda van der Waals, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları kırılmakta, kovalent bağlar korunmaktadır.

Nötral lipitler hidrofobik olarak bağlı haldedir ve polar olmayan çözücülerle ekstrakte edilebilirler. Polar lipitler ise elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla bağlı halde olup bu bağları kırabilecek polar çözücüler ile ekstrakte edilebilirler. Düşük polaritedeki triaçilgliserol ve kolesterol esterlerinin polar olmayan çözücülerle ekstraksiyonu tam olarak gerçekleştirilemeyebilir. Polisakkarit ve polipeptidlere kovalent bağlarla bağlı olan lipitler ise ancak bir hidroliz basamağı sonrasında yapıdan ekstrakte edilebilmektedir.

Ekstraksiyonda kullanılan çözücünün lipitleri yüksek oranda çözerken protein, amino asit ve karbonhidratları hiç çözmemesi veya çok az oranda çözmesi istenmektedir. Çözücünün lipitlerin enzimatik hidrolizini engelleyerek olası yan reaksiyonları minimize etmesi istenmektedir. Çözücünün düşük kaynama noktasına sahip olması ve örnek partiküllerine kolayca nüfuz edebilmesi gerekmektedir. Lipit ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılan çözücüler alkoller

(metanol, etanol, isopropanol, n-bütanol), aseton, eterler, asetonitril, halokarbonlar (kloroform, diklorometan) ve hidrokarbonlar (hekzan, benzen, siklohekzan) ile bunların karışımlarıdır.

Lipitlerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri yağ asidindeki polar olmayan hidrokarbon zincirinin veya diğer alifatik kısımların ve fosfat veya şeker gibi diğer polar fonksiyonel grupların moleküldeki oranına bağlıdır. Polar grup içermeyen triaçilgliserol veya kolesterol ester gibi lipitler hekzan, benzen gibi hidrokarbon çözücüler ile daha polar olan kloroform ve dietil eter gibi çözücülerde oldukça kolay çözünürken metanol gibi polaritesi daha yüksek çözücülerde çözünmemektedir. Bu lipitlerin alkolik çözücülerdeki çözünürlükleri alkolün hidrokarbon zincir uzunluğu arttıkça artmaktadır. Benzer şekilde düşük zincir uzunluklu yağ asitlerinin polar çözücülerdeki çözünürlükleri yüksektir. Polar lipitler hidrokarbon çözücülerde iz miktarda çözünmekte; metanol, etanol ve kloroform gibi polar çözücülerde kolaylıkla çözünmektedir [66].

Diyetle alınan lipitlerin %95'ten fazlası triaçilgliseroller, geri kalanı ise mono- ve diaçilgliseroller, fosfo- ve glikolipitler ile sterollerdir. Bu nedenle gıdalardan lipit ekstraksiyonu için genellikle polar olmayan çözücüler kullanılmaktadır. Polar olmayan tek bir çözücü kullanılarak örnekteki tüm polar lipitlerin ekstraksiyonu mümkün olmamaktadır. Bu amaçla polar ve polar olmayan çözücüler farklı oranlarda içeren çözücü sistemleri kullanılmaktadır. Bu kapsamda Folch [69] ve Bligh ve Dyer [70] metotları en yaygın kullanılan toplam lipit ekstraksiyonu metotlarıdır. Kloroform:metanol (2:1, v/v) çözücü sistemi hayvansal, bitkisel veya bakteriyel bir materyalden lipitlerin tam ekstraksiyonu için uygun bir ortam sağlamaktadır. Folch ekstraksiyonu ile nötral lipitler, diaçilgliserofosfolipitler ve sfingolipitlerin çoğu ekstrakte edilmektedir. Lizofosfolipitler düşük oranda alınabilirken polar asidik fosfolipitler ve glikolipitler suyla yıkama basamağında kaybedilebilmektedir. Folch ve Bligh-Dyer metotlarında tüm lipitlerin organik faza transferi gerçekleştirilememekte lisofosfolipitler, fosfoinositidler ve diğer yüksek polaritedeki lipitler kaybedilmektedir. Ekstrakte edilen lipitlerin ileri analizlere sokulacağı durumlar için Folch metodu önerilmektedir. Bu metotta lipitler kloroform tabakasında bulunmakta olup çözücünün vakum altında düşük sıcaklıkta uzaklaştırılması sonucunda elde edilmektedir.

2.3.3 Spektroskopik Lipit Analizleri ve Gıda Hilelerinin Tespiti

Gıdanın lipit kompozisyonuna ait spektroskopik bilginin kullanımı ile gıda hilelerinin tespiti yapılabilmektedir. Mevcut tez kapsamında SFS, LIBS ve RS teknikleri farklı gıdaların lipit fazının analizinde kullanılmış ve elde edilen bilgi sayesinde söz konusu gıdalardaki tağşiş uygulamaları geliştirilen yüksek hassasiyet ve kesinlik değerlerine sahip kalitatif ve kantitatif yöntemlerle başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Aşağıda SFS, LIBS ve RS tekniklerinin lipit fazına dair sağladığı bilgiler kısaca açıklanmıştır.

2.3.3.1 SFS'nin Lipit Analizlerinde Kullanımı

FS tekniği diğer spektroskopik tekniklere kıyasla düşük sinyal/gürültü oranı, ölçüm süresinin kısalığı ve düşük ekipman maliyeti gibi avantajlar sunmaktadır.

Bitkisel yağlar; %95-98 oranında sabunlaştırılabilen triaçilgliseroller ile %2-5 oranında sabunlaştırılmayan minör bileşenlerden oluşmaktadır. Minör bileşenler arasında en çok analiz edilenler fitosteroller, sterol esterler, karotenoid vb. hidrokarbonlar, klorofil a ve b ile bunların oksidasyon ürünleri feofitin a ve b gibi pigmentler, tokoferoller ve tokotrienoller gibi lipofilik fenolikler ve fenolik asitler, fenolik alkoller, lignanlar ve flavonlar gibi hidrofilik fenoliklerdir [71]. Bitkisel yağlarda tokoferol miktarının belirlenmesi amacıyla normal faz ve ters faz HPLC kullanımına dayanan metotlar rapor edilmiş olup bunlar sabunlaştırma, ekstraksiyon, konsantrasyon ve kurutma gibi pek çok ön işlem basamağı gerektirmektedir. Bu basamaklar zahmetli ve zaman alıcı olmasının yanısıra bileşimdeki tokoferolün degradasyonuna sebep olarak kantifikasyon hataları doğurmaktadır [72, 73].

Yağların bileşiminde bulunan karotenoidler, tokoferoller, fenoller, yağ asitlerinin oksidasyon ürünleri ve klorofil gibi maddeler güçlü floresans sinyallerine sahiptir [74]. SFS tekniği ise birden çok floroforun tek bir spektrum kullanılarak kısa bir sürede karakterize edilmesini sağlamaktadır. Tarama modunun (scanning mode) kullanımı özellikle örneğin kimyasal kompozisyonunun bilinmediği durumlarda avantaj sağlamaktadır. Bu kapsamda FS tekniği bitkisel yağların karakterizasyonu [75] ve tağşişin belirlenmesi [76, 77], yağlara uygulanan termal

süreçlerin takibi [78, 79] ve oksidasyon reaksiyonlarının izlenmesi [80] ile kalite parametrelerinin ölçülmesi [81] amaçlarıyla kullanılmıştır.

Son yıllarda FS tekniğinin gıda tağışışlarının ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla başarılı bir şekilde kullanıldığı pek çok çalışma rapor edilmiştir. Bunlar arasında et ve ürünlerinde kimyasal kompozisyonun [82] ve kalite parametrelerinin ölçülmesi [83], tağışışın belirlenmesi [84], ette sıcaklık uygulamasıyla gerçekleşen reaksiyonların takibi [85], soğukta muhafaza veya dondurarak muhafazanın farklı balık türlerinin kalite parametrelerine etkisinin gözlenmesi ve tazeliğın takibi [86-88] ile oksidasyon reaksiyonlarının takibi [89, 90], süt [91, 92] ve süt ürünlerindeki tağışışın [93-95] belirlenmesi çalışmaları yer almaktadır.

2.3.3.2 LIBS'in Lipit Analizlerinde Kullanımı

Multielemental analize imkan sağlaması, analiz süresinin kısa oluşu, uzaktan analiz yürütülebilmesi (remote sensing), bazı durumlarda örnek hazırlık basamağı gerektirmemesi ve cihazın kullanım kolaylığı gibi pek çok avantaj son yıllarda LIBS tekniğinin gıda analizlerindeki kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir. Öte yandan analiz edilen örneğın katı veya sıvı formda bulunması LIBS ölçümlerinin başarısını etkilemektedir. Katı maddelerle karşılaştırıldığında, sıvıların direkt LIBS analizi; güçlü lazer atımının neden olduğu şok dalgaları nedeniyle gerçekleşen yüzey dalgalanmaları ve sıçramalar ile daha kısa plazma süresi gibi çeşitli doğal dezavantajlar bulundurmaktadır. Ölçüm tekrarlanabilirliği ve duyarlılığı negatif etkilenmekte LIBS analitik performansı düşmektedir. Söz konusu dezavantajların aşılması amacıyla iki temel stratejiden faydalanılmaktadır. İlk yaklaşımda deneysel konfigürasyonda değişiklikler yapılmaktadır. Laminer akış ve jetlerin kullanımı [96, 97], damlacık ve aerosol analizi [98] veya çift atımlı lazer konfigürasyonları [99, 100] bu kapsamda araştırılmaktadır. İkinci yaklaşımda, katı numunenin avantajlarından yararlanmak için sıvı numune katı veya "yarı katı" bir numuneye dönüştürülmektedir. Bu kapsamda örneğın dondurulması [101, 102], emici bir substrat kullanılarak küçük bir çözelti hacminin gözenekli bir katı substrat üzerine biriktirilmesi ve kurutulması [100, 103], sıvı matriksteki örneğın presipitasyon [104], filtrasyon, membran separasyonu [105], liyofilizasyon [106] gibi aşamalarla konsantre edildikten sonra

pellet oluşturma veya kalıplama [107] yollarıyla katılaştırılması gibi yöntemler araştırılmaktadır. Tez alışması kapsamında oda sıcaklığında yarı katı halde bulunan tereyağı ve margarin örneklerinden alınan LIBS spektrumlarının kalitesini arttırmak amacıyla -18°C'de dondurma işlemi kullanılmıştır.

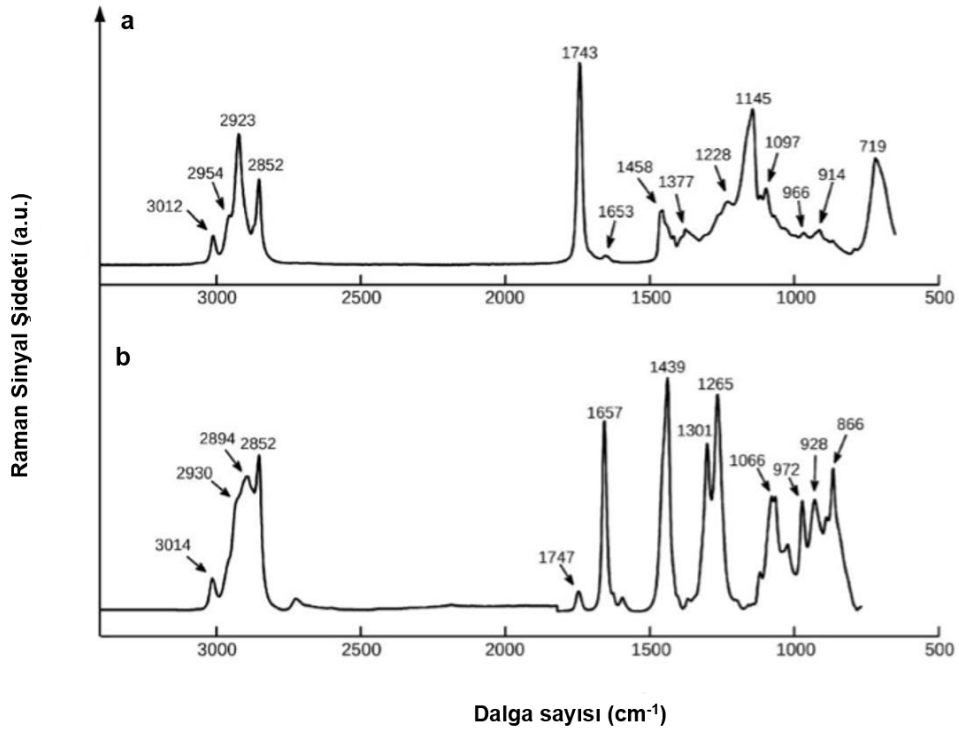
Yağ rneklerinin LIBS tekniği ile analizi kapsamında rapor edilen çalışmalar motor yağı [100] ve ham petrol [107] örneklerine yoğunlaşmıştır. İnsan tüketimine uygun yağ örnekleri üzerindeki çalışmalar ise oldukça sınırlı sayıdadır. Kongbonga ve ark. tarafından yapılan çalışmada bitkisel yağların doymuşluk oranı ile C₂ Swan bandının LIBS emisyon şiddeti arasında direkt bir ilişki ortaya konmuştur [108]. Caceres ve ark. tarafından yapılan çalışmada LIBS ve yapay sinir ağları kullanılarak zeytinyağı örneklerinde orijin ve tağşişin tespitine yönelik bir yöntem rapor edilmiştir [37]. Söz konusu çalışmalarda örnek ile odaklama lensi arasındaki mesafe optimize edilerek sıçramalardan kaynaklanan örnek miktarı değişimleri sınırlandırılmıştır.

Pek çok farklı gıda grubunun elemental analizinde LIBS tekniği başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bunlar içerisinde et ve et ürünlerinde farklı elementlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi [109] ve bu bilgiler kullanılarak et türlerinin birbirinden ayrılması ve et ürünlerinde yapılan tağşişlerin belirlenmesi [110, 111] çalışmaları bulunmaktadır. Buğday unu ve fıncılık ürünlerinde gerçekleştirilen analizlerle LIBS tekniği kullanılarak gıdalarda sodyum ve kalsiyum gibi elementlerin yanı sıra örnekteki toplam mineral madde miktarını temsil eden kül miktarının tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir [110, 112-114]. Bunlara ek olarak peynir altı suyu, bitkisel yağ, peynir, şarap, hurma, patates, elma, portakal ve ıspanak gibi pek çok farklı gıda grubunun elemental karakterizasyonu LIBS tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir [108, 110, 115-119]. Literatürde LIBS tekniğini gıdalarda pestisit tayini amacıyla kullanan çalışmalar da bulunmaktadır [120, 121].

2.3.3.3 IR ve Raman Spektroskopilerinin Lipit Analizlerinde Kullanımı

IR ve Raman spektroskopisi teknikleri tamamlayıcı teknikler olup her ikisi de temel geçişler hakkında bilgi vermektedir. Genellikle bir bileşiğin IR spektrumunda gözlenen kuvvetli bantlar Raman spektrumunda zayıf bantlar olarak gözlenmektedir. Bu durumun tam tersi de geçerli olabilmektedir. Aşağıda

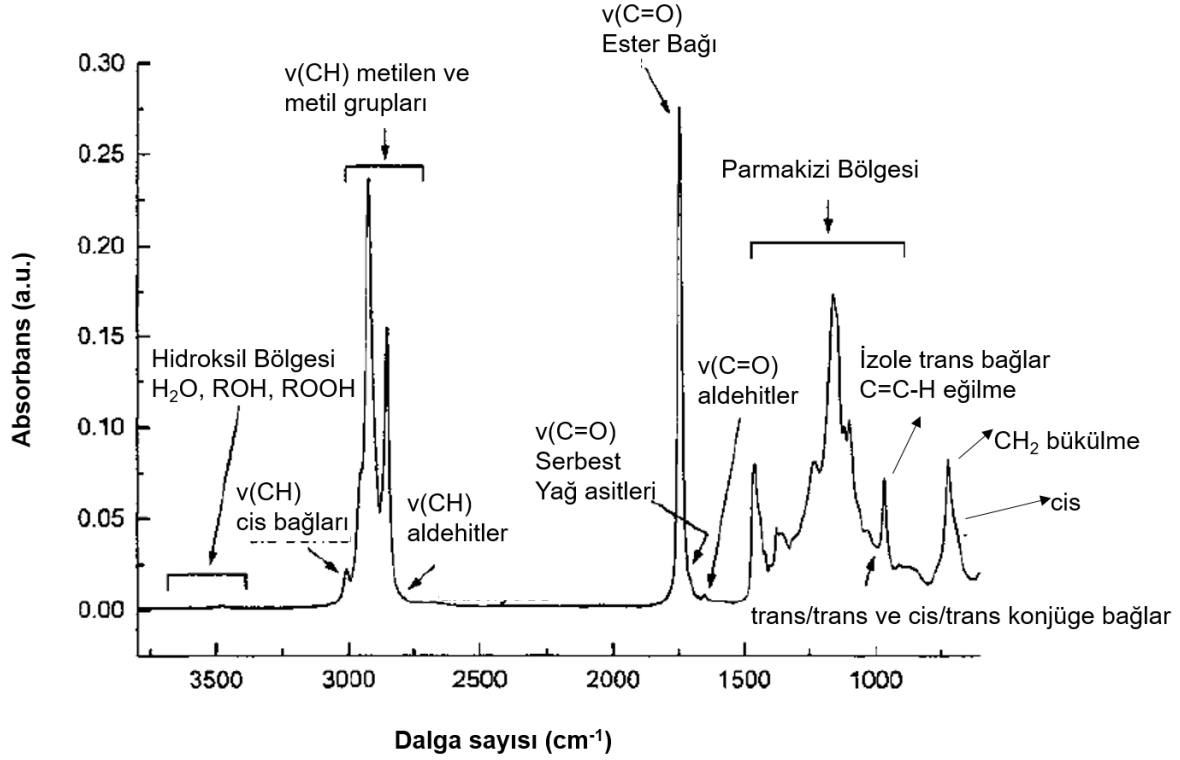
Şekil 2. 10 ile bir balık yağı örneğine ait FT-IR ve Raman spektrumları verilmiştir. Grafikler üzerinde önemli fonksiyonel gruplara ait frekanslar işaretlenmiştir.



Şekil 2. 10 Balık yağı örneğine ait a) FT-IR ve b) Raman spektrumları [122]

İki teknik arasındaki bu tamamlayıcılık özelliği vibrasyonun elektriksel karakterine bağlıdır. Eğer bir bağ yüksek oranda polarize ise bu bağın uzunluğundaki, örneğin bir vibrasyon sırasında gerçekleşebilen, küçük bir değişiklik polarizasyon üzerinde küçük bir etkiye neden olacaktır. Bu nedenle polar bağların (C-O, N-O, O-H vb.) vibrasyonu göreceli olarak daha zayıf bir Raman saçılması gerçekleştirirler. Öte yandan bu bağlar simetri faktörleri nedeniyle nötrlenmedikleri sürece vibrasyonel hareket sırasında mevcut yüklerini taşırlar. Bu durum yüksek bir net dipol moment ile sonuçlanır ve kuvvetli bir IR absorpsiyon bandı elde edilir. Rölatif olarak daha nötr bağlar (C-C, C-H, C=C vb.) vibrasyon sırasında polarlanabilirliklerinde büyük değişiklikler yaşarlar. Dipol moment değerinde ise önemli bir değişiklik gerçekleşmez. Bu nedenle bu tür bağların vibrasyonu kuvvetli Raman bantları veya zayıf IR bantları ile sonuçlanır [122].

Bir molekülde simetrisinin bulunup bulunmaması hangi vibrasyonların Raman ve IR aktif olacağını belirlemektedir. Genellikle simetrik veya faz içi vibrasyonlar ile polar olmayan gruplar Raman spektroskopisi kullanılarak çalışılabilirken asimetric veya faz dışı vibrasyonlar ile polar gruplar IR spektroskopisi kullanılarak çalışılmaktadır [123]. Lipitlere ait IR spektrumu, yapısal ve fonksiyonel gruplar ile yağda bulunan safsızlıklar hakkında bilgi sağlamaktadır. IR bantlarına ait sinyal şiddetleri ile absorbans gösteren moleküllerin konsantrasyonları arasında doğru orantı olduğundan lipid hakkında kantitatif bilgi edinmek mümkündür. Bunun yanında polimorfizm, kristal yapısı, konformasyon ve zincir uzunluğu hakkında katı lipidler üzerinde yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Şekil 2. 11'da bir bitkisel yağ örneğine ait MIR spektrumu verilmiştir.



Şekil 2. 11 Bir bitkisel yağa ait MIR spektrumu

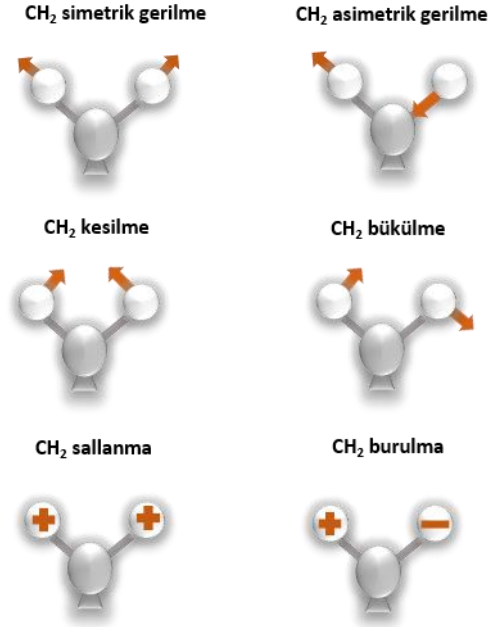
Şekil 2. 11 ile verilen spektrumun yüksek frekans bölgesinde ($3700-3400\text{ cm}^{-1}$) su (H-OH), hidroperoksitler (R-OH) ve bunların bozulma ürünleri gibi hidroksil grubu içeren bileşikler absorbans vermektedir. $3025-2850\text{ cm}^{-1}$ bölgesi CH gerilme bölgesi olup zayıf bir cis çift bağ CH absorpsiyonu ($\text{CH}=\text{CH}$), trigliseridlerin alifatik zincirlerinin CH_2 grupları ile terminal metil gruplarından kaynaklanan güçlü bantlar gözlenmektedir. Bu bölgenin hemen yanında lipidlerin ikincil oksidasyon ürünlerinden aldehitler ve ketonlara ait zayıf bir bant bulunmaktadır. Spektrumun merkezine doğru trigliserid yapısındaki yağ asitlerini gliserole bağlayan ester bağından kaynaklanan çok güçlü bir bant bulunmaktadır. Hemen yanında eğer hidrolize olmuş bir lipid söz konusuysa serbest yağ asitlerinin COOH gruplarından kaynaklı zayıf bir bant bulunmaktadır. Aynı bölgede eğer yağ oksidasyona uğramışsa aldehit (R-CHO) ve ketonlara ait (R-CO-R) karbonil absorpsiyon bantları bulunmaktadır. $1500-900\text{ cm}^{-1}$ bölgesi parmakizi bölgesi olup bu bölgedeki bantların profili yağın moleküler kompozisyonuna karakteristiktir ve farklı bileşenlerin tespiti amacıyla kullanılabilir. Parmakizi bölgesinin düşük frekanslı ucunda, bileşiminde

trans yapıda yağ asidi bulunduran trigliseridler içeren yağlar için izole trans çift bağlara ait CH=CH eğilme absorpsiyonu görülmektedir.

Oksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinde bulunabilecek trans-trans ve cis-trans çift bağları içeren konjüge dienlere ait absorpsiyon yüksek frekans bölgesinde görülmektedir. Bunun hemen yanında ise eğilme titreşimlerinden kaynaklanan kuvvetli bir cis absorpsiyonu görülmektedir [124]. FTIR spektroskopi tekniği ile sabunlaşma sayısı, iyot sayısı, serbest yağ asitleri ile peroksitler ve ikincil oksidasyon ürünleri üzerinden oksidatif stabilite hakkında bilgi edinilebilmektedir [125].

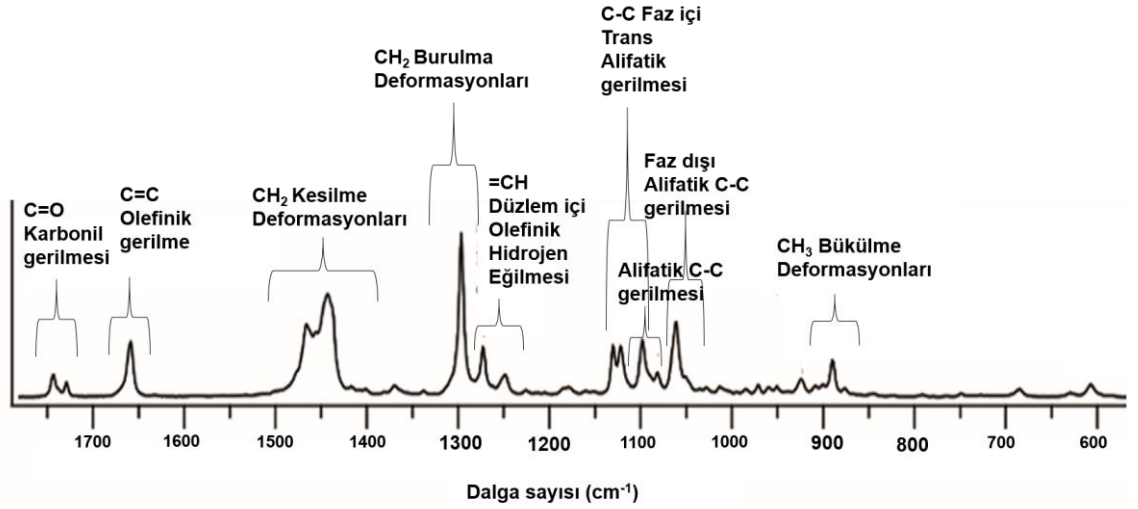
Keskin Raman bantlarından oluşan spektral veri sayesinde Raman spektroskopisi kullanılarak lipitlerin moleküler yapıları hakkında detaylı bilgi edinilebilmektedir. Moleküler kompozisyonun büyük bir kısmını oluşturan açıl zincirleri nedeniyle triaçilgliserollerin polarlanabilirlikleri çok yüksektir ve kuvvetli Raman saçılması gerçekleştirirler.

Triaçilgliserollerin Raman spektrumlarının değerlendirilmesinde tekrarlayan –CH₂- birimlerinden oluşan polietilen zinciri referans olarak kullanılmaktadır. Bu birimlere ait olası normal mod vibrasyonları aşağıda Şekil 2. 12 ile şematize edilmiştir.



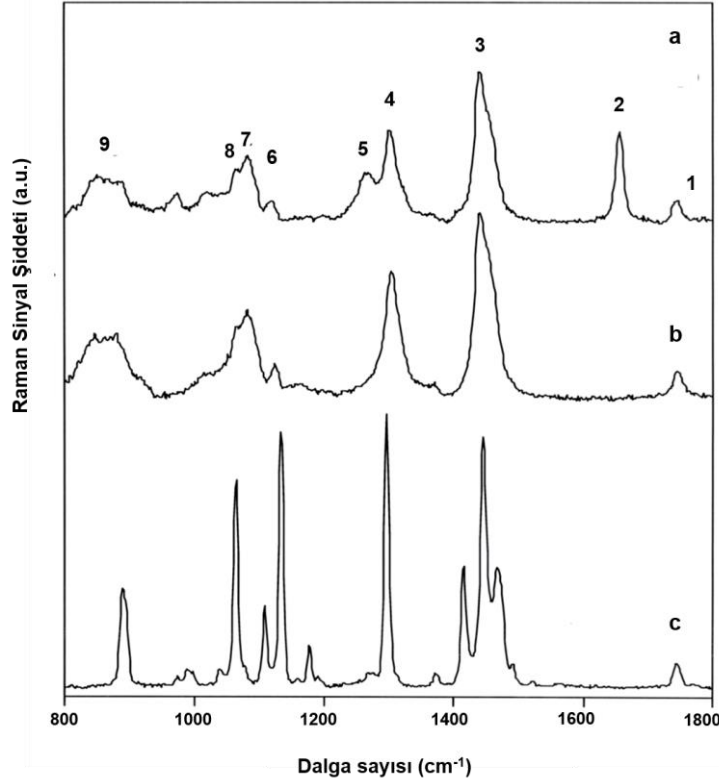
Şekil 2. 12 Metilen birimlerine ait normal mod vibrasyonları

Aşağıda Şekil 2. 13 ile bir triaçilgliserol molekülüne (1,3-dioleoil-2-palmitoil-*sn*-gliserol) ait Raman spektrumu ile gözlemlenen bantlara ait açıklamalar verilmiştir. 1720-1760 cm⁻¹ bölgesindeki bantlar ester C=O gerilme modlarından kaynaklanmaktadır [126]. Triaçilgliseroller üç ester bağı içerdiğinden 1720-1760 cm⁻¹ bölgesinde üç vibrasyonel bant beklenirken genellikle daha az sayıda gözlenebilmektedir [127]. Bu aralıkta gözlenen bantların triaçilgliserollerin ester bölgesinin geometrisi hakkında bilgi içerdiği ve trigliseridlerin polimorfik formlarının belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir [128]. Öte yandan bir başka çalışmada örneklerde bulunabilecek iz miktardaki nemin C=O bağıyla interaksiyona girerek konformasyonda değişikliğe sebep olacağı ve bu durumun yine söz konusu bölgede üç farklı bandın gözlenmesine neden olabileceği belirtilmektedir [129].



Şekil 2. 13 Bir triaçilgliserol molekülüne ait Raman spektrumu

Yaklaşık 1745 cm^{-1} 'de konumlanan karbonil bandı genellikle diğer bantların interferansından sıyrılmış olup izole bir halde bulunmaktadır. Kantitatif analizlerde internal standart olarak kullanılabilceği belirtilmektedir. $880\text{-}920 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde karbonil karbonu ile zincirdeki ilk karbon atomunun $\text{C}_1\text{-C}_2$ gerilme vibrasyonlarından kaynaklı bandın da internal standart olarak kullanılabilceği belirtilmektedir. Karbonil bandı molar doymamışlığın ve zincir uzunluğunun belirlenmesi amacıyla referans pik olarak pek çok çalışmada kullanılmıştır [130]. Aşağıda Şekil 2. 14 ile doymuş bir yağ asidinin katı ve sıvı haline ait ve doymamış bir yağ asidinin sıvı haline ait Raman spektrumları verilmiş ve önemli bantlar numaralandırılmıştır.



Şekil 2. 14 Oleik asit ve stearik asidin Raman spektrumları a) sıvı oleik asit b) sıvı stearik asit c) katı stearik asit

Doymamış açil zinciri bulunduran trigliseridlere ait Raman spektrumunun 1630-1680 cm^{-1} bölgesinde C=C gerilmesine dayalı bant 1655 cm^{-1} civarında gözlenmektedir. Bu vibrasyonel modun frekansı konformasyona hassas bir şekilde bağlılık göstermektedir. Natürel trigliseridlerde C=C bandı cis konfigürasyonunda bulunmaktadır. Açil zincirlerinin genel şeklini cis C=C bağı etrafındaki konformasyon belirlemektedir. Olefinik bağların tespiti için en çok kullanılan bantlar 1650-1670 cm^{-1} civarındaki C=C gerilmesi ve 1260 cm^{-1} civarındaki H-C= eğilmesidir. Bu iki bağı pozisyonu cis/trans izomerizasyonuna ve olefinik grubun her iki tarafındaki bağların konformasyonuna bağlılık göstermektedir. 1640-1665 cm^{-1} bölgesinde cis formunun olefinik gerilmesi, 1670-1680 cm^{-1} bölgesinde trans formunun olefinik gerilmesi gözlenmekte olup konjuge olefinik bağlar için 1630 cm^{-1} ve aşağısına kaymaktadır [131]. Sıvı halde 1400-1500 cm^{-1} kesilme bölgesi 1440 cm^{-1} civarında konumlanmış tek bir dominant bant içermektedir. Bu bölgenin zincir uzunluğunun belirlenmesi

amacıyla kullanılabileceği belirtilmektedir. Şekil 2. 14'te numaralandırılan karakteristik Raman bantlarına ait açıklamalar Çizelge 2. 1 ile özetlenmiştir.

Çizelge 2. 1 Oleik asit ve stearik asite ait Raman bantlarının açıklamaları

Bant no	Bant pozisyonu (cm^{-1})	Titreşimsel mod
1	1730-1750	C=O Karbonil gerilmesi
2	1640-1680	C=C Olefinik gerilme
3	1400-1500	CH ₂ Metilen kesilme deformasyonları
4	1295-1305	CH ₂ Metilen burulma deformasyonları
5	1250-1280	=CH Düzlem içi olefinik hidrojen eğilmesi
6	1100-1135	C-C Faz içi alifatik trans gerilmeleri
7	1080-1110	C-C sıvı: alifatik gerilme <i>gauche</i> C-C katı: alifatik gerilme trans
8	1060-1065	C-C Faz dışı alifatik trans gerilmeleri
9	800-920	C ₁ -C ₂ , CH ₃ , C-O Açıl ve metil terminallerinde gerilme ve bükülmeler

Eriye ve kristalizasyon süreçlerinde yağ asidi metil esterlerinin Raman spektrumlarında 6nemli değişiklikler gerçekleşmekte çoğu bant daralmakta ve dalga sayısı değişmektedir. Bu değişimler 6zellikle C-C gerilmeleri ve CH₂ kesilme vibrasyonlarıncada domine edilen 1000-1100 ve 1400-1500 cm⁻¹ b6lgelerinde g6zlenmektedir. Sıcaklık lipit yapısında molekül içi ve moleküller arası interaksiyonları etkilediğinden Raman spektroskopisine dayanan bir metodoloji geliştirilirken sıcaklığın etkisinin ortaya konması gerekmektedir [132].

Raman spektroskopisi lipitler, proteinler ve karbohidratlar gibi gıdanın maj6r bileşenleri ile gıda bozulmasına sebep olan mikroorganizmalar gibi min6r bileşenlere karşı hassas olduğundan gıda analizlerinde pek çok farklı amaçla kullanılmaktadır. Zeytinyağının daha düşük kalitedeki yağlarla tağşişi en sık rastlanılan gıda tağşişlerinden birisidir. Raman spektroskopisi kullanılarak 6rneklerin yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılık belirlenebilmekte ve tağşiş tespit edilebilmektedir [133]. Yağların doymamışlık oranından yola çıkan diğer çalışmada tereyağı, domuz iç yağı, balık yağı, kanola yağı, hindistancevizi yağı, mısır yağı, zeytinyağı, yerbıştığı yağı, soya yağı ve aspir yağı olmak üzere on farklı yağ eşişi Raman spektroskopisi kullanılarak birbirinden ayrılmıştır [134]. Yapılan kapsamlı bir çalışmada bitkisel kaynaklı yağlar (brezilya fıncığı, hindistancevizi, mısır, yüksek oleik asitli ayçiçeği, zeytin, yerbıştığı, palm, palm çekirdeği, kolza, soya, ayçiçek) ile hayvansal kaynaklı yağlar (tereyağ, hidrojene balık yağı ve kuyruk yağı) toplanarak toplamda yirmi bir farklı kaynaktan yüz otuzsekiz yağ 6rneği toplanmış ve GC ile belirlenen yağ asidi kompozisyonlarının Raman spektrumlarıyla olan korelasyonu ortaya konmuştur [135]. Sıklıkla tağşişi uğrayan bir diğer gıda grubu ise et ve et ürünleridir. Ette duyuusal 6zelliklerin belirlenmesinin [136] yanı sıra yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi [137], balık eti 6rneklerinde yağ oranının belirlenmesi [44], soğukta depolama sırasında balık proteinlerinde g6zlenen değişikliklerin takip edilmesi [138] ile mikrobiyal bozulmanın tespiti [139] gibi farklı amaçlarla Raman spektroskopisi kullanılmıştır. Bu kapsamda grubumuzca yürütülen çalışmalarda bal [140] ve gazlı içecek [141] 6rneklerinde şeker kompozisyonun belirlenmesi, et [142] ve et ürünlerinde [142] tağşişin belirlenmesi, alkollü içeceklerde etanol ve metanol miktarının belirlenmesi [143], tereyağında margarin tağşişinin belirlenmesi [144], sirke üretim sürecinde gerçekleşen kompozisyon değişikliğinin takip edilmesi [144],

taze ve dondurulup eritilmiş balık örnekleri ayrımının gerçekleştirilmesi [145], bitkisel yağların yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi [146, 147], pastanecilik ürünleri [148] ile krema ve yoğurt gibi süt ürünlerindeki [149] yabancı yağ ilavesinin tespiti gibi pek çok farklı amaç için Raman spektroskopisinden faydalanılmıştır.

2.4 Gıda Hilelerinin Tespitinde Kullanılan Kemometrik Veri Analizi Yöntemleri

Spektroskopik analizler sonucunda elde edilen ham spektrumlar gözle değerlendirilebilmek için çok kompleks olduğundan ancak kemometrik veri analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Kemometrik modeller farklı grupları birbirinden ayıran bilgiyi ekstrakte etmekte ve gereksiz veriyi kapsam dışında bırakarak değerlendirme sürecini kolaylaştırmaktadır. Kemometri, matematiksel ve istatistiksel modellerden faydalanarak kompleks veri grupları içindeki örüntüleri ve ilişkileri ortaya çıkarmakta ve bunları matematiksel olarak kullanılabilen analitik parametrelere dönüştürmektedir. Sonuçlar içindeki örüntüler tespit edilmekte ve veriler arasındaki ilişkiye göre sınıflandırılmaktadır. Bu sayede coğrafi orijin ve tür tespiti veya kontaminasyon ve taşıyıcı tespiti yapılabilmektedir [29].

Kemometri; titreşimsel spektroskopik yöntemler gibi veri bakımından oldukça zengin enstrümental metotlar ile birlikte kullanılan multivariat veri analiz yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Gıda hileliliğinin tespiti amacıyla kullanılan çalışmalarda veri boyutunun azaltılması, örneklerin kalitatif olarak gruplandırılması veya bilinmeyen örneklerin sınıflandırılması ile örnekteki taşıyıcının kantitatif olarak tespit edilmesi gibi amaçlarla kemometrik veri analizi yöntemleri kullanılmaktadır [27].

Kalitatif veri analizinde sıklıkla kullanılan iki multivariat veri analizi yöntemi Temel Bileşen Analizi (PCA) ve Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi (PLS-DA) olarak bilinmektedir. PCA daha çok veri boyutunun azaltılması ve veri içerisindeki benzerlik paternlerinin belirlenmesi amaçlarıyla kullanılmakta olup gözetimsiz (unsupervised) bir tekniktir. PCA modeli geliştirilmeden önce nesne grupları hakkında bilgiye ihtiyaç duyulmamaktadır. PLS-DA ise sınıflandırma amacıyla kullanılan gözetimli (supervised) bir tekniktir. Bilinmeyen örnekler önceden tanımlanmış nesne grubu bilgilerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu amaçla PLS-DA, spektral veri içerisindeki lineer kombinasyonları araştırmakta ve nesne sınıflarını maksimum kovaryans gösterdikleri gruplara göre birbirinden ayırmaktadır [150].

2.4.1 Temel Bileşen Analizi

Temel Bileşen Analizi (PCA); veri boyutunun azaltılması amacıyla kullanılan multivariat veri analizi tekniklerinden bir tanesidir. Bu teknikte veri setindeki toplam varyasyon, orijinal değişkenlerin birkaç lineer kombinasyonla yeniden ifade edilmesini sağlayan ve aralarında herhangi bir korelasyon bulunmayan yeni 'temel bileşenler' aracılığıyla açıklanmaktadır. Veri setini oluşturan değişkenlerin birbiriyle olan negatif veya pozitif korelasyonunun en yüksek olduğu durumda PCA ile en iyi sonuç elde edilmektedir.

Her bir örnek için k tane rasgele değişkenin ölçüldüğü (Y) ve toplamda n tane örnek olduğu durumda PCA ile k tane rasgele değişkeni kullanarak; Y_1, Y_2, \dots, Y_k veri setindeki varyasyonu mümkün olan en yüksek oranda açıklayan en az sayıda bileşenin; Z_1, Z_2, \dots, Z_k üretilmesi hedeflenmektedir.

$$\begin{aligned} Z_1 &= a_{11}Y_1 + a_{12}Y_2 + a_{13}Y_3 + \dots + a_{1k}Y_k \\ Z_2 &= a_{21}Y_1 + a_{22}Y_2 + a_{23}Y_3 + \dots + a_{2k}Y_k \\ &\cdot \\ &\cdot \\ &\cdot \\ Z_k &= a_{k1}Y_1 + a_{k2}Y_2 + a_{k3}Y_3 + \dots + a_{kk}Y_k \end{aligned}$$

Burada ilk temel bileşen Z_1 lineer kombinasyonla maksimum varyansı açıklarken ikinci temel bileşen Z_2 varyansı Z_1 'e kıyasla daha az oranda açıklayabilmektedir. Bu durum diğer bileşenler için de azalarak devam etmektedir. Temel bileşenler varyansı açıklama oranlarına göre $\text{var}(Z_1) \geq \text{var}(Z_2) \geq \text{var}(Z_3) \geq \dots \geq \text{var}(Z_k)$ olarak sıralanmaktadır. Genel olarak veri setindeki varyasyonun ilk birkaç bileşen kullanılarak açıklanması beklenmekte ve diğer bileşenler temsil ettikleri varyasyon oranının çok düşük olması sebebiyle ihmal edilmektedir.

Temel bileşenler veri setindeki tüm değişkenlerin lineer bir kombinasyonunu ifade etmekte olup a değerleri temel bileşenin katsayısını temsil etmektedir. Aşağıdaki Çizelge 2. 2, verilerin PCA için nasıl düzenlendiğini göstermektedir.

Çizelge 2. 2 Temel bileşen analizi için genel veri görünümü

Değişken Örnek numarası	Y₁	Y₂	Y_k
1	Y ₁₁	Y ₁₂	Y _{1k}
2	Y ₂₁	Y ₂₂	Y _{2k}
.
.
.
n	Y _{n1}	Y _{n2}	Y _{nk}

İlk temel bileşen, var (Z₁) değerini maksimize eden ilk lineer kombinasyon; (Z₁) ile temsil edilmektedir;

$$a^2_{11} + a^2_{12} + \dots a^2_{1k} = 1$$

Yukarıda belirtilen koşul kritik önem taşımaktadır çünkü Z₁ değeri, lineer kombinasyondaki a_{1i} ifadesinde yer alan herhangi bir değer artırılması yoluyla yükseltilebilmektedir. Benzer şekilde ikinci temel bileşen var (Z₂) değerini maksimize eden ikinci lineer kombinasyon; (Z₂) ile temsil edilmektedir;

$$a^2_{21} + a^2_{22} + \dots a^2_{2k} = 1$$

Z₁ değeri ile Z₂ değeri arasında herhangi bir korelasyon bulunmamaktadır;

$$\text{Kovaryans (Z}_1, \text{Z}_2) = 0$$

Geriye kalan temel bileşenler de benzer şekilde k tane korele olmayan temel bileşen elde edilene kadar oluşturulmaktadır.

Temel bileşenler veri setinin içeriğine bağlı olarak bir kovaryans veya bir korelasyon matrisinden hesaplanmaktadır. Temel bileşenlerin kovaryans matrisinden hesaplanması ile korelasyon matrisinden hesaplanması arasında bir fark bulunmamaktadır.

Söz konusu hesaplama aşağıdaki basamaklarla özetlenmiştir;

1. Farklı değişkenler arasındaki kovaryans matrisi hesaplanır. Matrisin diyagonal olan değerler varyansı temsil etmektedir, matrisin diyagonal olmayan değerler ise değişkenlerin kovaryansını temsil etmektedir.
2. Kovaryans matrisinin eigenvalue λ_i değerleri hesaplanır. Eigenvalue sayısı ile değişken sayısı eşittir ve aşağıdaki gibi sıralanmaktadır;

$$\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_k \geq 0$$

Eigenvalue değerleri temel bileşenlerin Z_i varyansını temsil etmektedir. λ_1 ; birinci temel bileşen Z_1 'in varyansını, λ_2 ; ikinci temel bileşen Z_2 'nin varyansını temsil etmektedir.

3. Eigenvalue değerlerinin hesaplanmasının ardından her bir eigenvalue değeri ile ilişkili olan eigenvektör değeri hesaplanmaktadır. Eigenvektör değerleri temel bileşenlerin katsayıları; $a_1, a_2, a_3, \dots, a_k$ şeklinde ifade edilmektedir. Her bir eigenvektör değerinin bileşenleri 'loadings' olarak adlandırılmaktadır.
4. Son basamakta veri setinin, üretilen ilk birkaç temel bileşen seçilerek içerisindeki varyasyonu maksimum oranda açıklayacak şekilde ifade edilmesi sağlanmaktadır.

Eigenvalue değerlerinin toplamı, kovaryans matrisinin diyagonal elementlerinin toplamına bu değer de orijinal değişkenlerin varyanslarının toplamına eşittir;

$$\sum_{i=1}^k (S_{ii}) = \lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_k$$

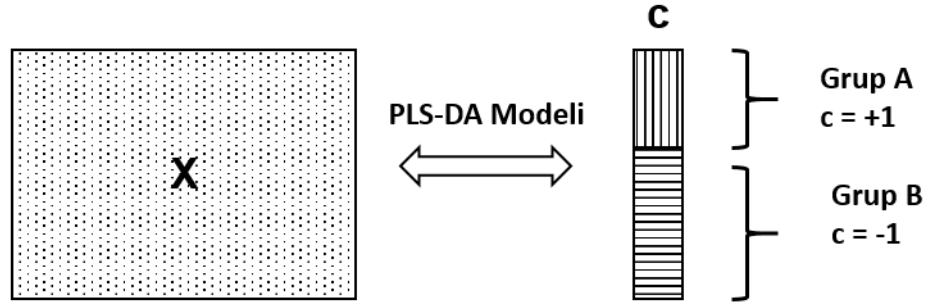
Yukarıdaki ifadede S_{ii} değişkenlerin varyansını temsil etmekte ve kovaryans matrisine diyagonal olarak ifade edilmektedir. Loadings a_i değeri; tek bir

değişkenin diğer değişkenlerden bağımsız olarak bir temel bileşen için taşıdığı önemi ifade etmektedir [151].

2.4.2 Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi

Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi (PLS-DA); analiz edilen sınıflar arasındaki ayrımı keskinleştirmek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Klasik PLS regresyon tekniğini temel almakta olup cevap değişkeni söz konusu örneğin hangi gruba ait olduğunu gösteren kategorik bir değişkendir. PLS algoritması başlangıçta regresyon amacıyla geliştirilmiş olup zaman içinde PLS-DA adıyla bir sınıflandırma metoduna dönüşmüştür. PLS-DA algoritması veri boyutunun azaltılması (PLS bileşenlerinin inşa edilmesi) ve diskriminant analiz (tahmin modellerinin inşa edilmesi) özelliklerini kombine ederek tek bir algorithmada birleştirmektedir. Özellikle çok yüksek boyutlu verilerin analizinde kullanılmaktadır. PLS-DA tekniğinin daha kolay anlaşılması adına modelin temelinde yatan mantık iki gruplu PLS-DA analizi üzerinden detaylandırılmaktadır. Bu algoritma genel olarak PLS1 algoritması olarak adlandırılmaktadır [152]. İki'den çok grubun bulunduğu PLS-DA analizlerinde PLS2 algoritması kullanılmaktadır [153]. Temel amaç örneğe ait spektrum veya kimyasal profil gibi bir verinin kullanılması yoluyla örneğin hangi gruba ait olduğunu belirlemesidir. PLS-DA yöntemiyle örnek uzayını iki ayrı bölgeye ayıracak doğrusal bir çizginin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Söz konusu lineer çizgi; farklı yöntemlerde diskriminatör, seperatör, karar fonksiyonu gibi farklı isimler alabilmektedir.

I tane örnekten oluşan veri setinde, X veri matrisi; iki farklı örnek grubuna ait J tane analitik ölçümü temsil etmektedir. I uzunluğundaki c vektörü; her bir örneğin ait olduğu grubu ifade eden nümerik bir işarettir. İşareti +1 olan grup I_A örneklerini bir diğer deyişle A grubunun üyelerini, işareti -1 olan grup I_B örneklerini yani B grubunun üyelerini ifade etmekte olup $I_A + I_B = I$ 'dir. Aşağıda Şekil 2. 15 ile belirtildiği gibi PLS-DA tekniğinde amaç X ve c arasında bir regresyon modelinin inşa edilmesidir.



Şekil 2. 15 PLS-DA modeli oluşturma temelini şekilsel gösterimi

Klasik PLS regresyon analizinde c ; analiz edilen örneğin konsantrasyon değeri gibi bir seri sürekli sayıdan oluşmaktadır. PLS-DA analizinde ise genellikle +1 ve -1 olmak üzere iki seviyeden oluşan kesintili sayılardan oluşmaktadır. Aşağıda PLS-DA analizinin temel eşitlikleri verilmiştir.

$$X = TP + E$$

$$c = Tq + f$$

Bu eşitliklerde T ; skor matrisini, E ve f residual (artık) değerleri ifade etmektedir. PLS-DA algoritmasında skor matrisinin kolonları yani PLS bileşenleri ortogonal olup PCA algoritmasından farklı olarak X matrisinin satırlarını oluşturan P loadings matrisi ortogonal değildir.

PLS-DA modelinin oluşturulmasında bir bileşenin elde edilmesi amacıyla izlenen basamaklar aşağıda özetlenmiştir;

- I. PLS ağırlık vektörü w 'nin hesaplanması

$$w = X'c$$

- II. Skorların hesaplanması

$$t = \frac{Xw}{\sqrt{\sum w^2}}$$

- III. x Loadings değerlerinin hesaplanması

$$p = \frac{t'X}{\sum t^2}$$

- IV. c Loading değerinin hesaplanması

$$q = \frac{c't}{\sum t^2}$$

- V. Yeni hesaplanan PLS bileşeninin etkisinin veri matrisinden çıkarılması ve residual (artık) veri matrisinin elde edilmesi

$$residX = X - tp$$

- VI. c 'nin residual değerinin hesaplanması

$$residc = c - tq$$

- VII. Modelin kurulmasında daha fazla bileşene ihtiyaç duyuluyorsa X ve c değerlerinin yerine bunlara ait residual değerleri koyularak I. basamaktan yeniden devam edilmektedir.

PLS-DA modelinin kurulmasının ardından orijinal veri seti içindeki veya bilinmeyen bir örneğin c değerinin tahmin edilmesi mümkün olmaktadır. X ve c arasındaki ilişki aşağıdaki gibi ifade edilmektedir.

$$c = Xb + f = Tq + f$$

b değeri $J \times 1$ boyutlarının regresyon katsayısı vektörüdür. Buradan bilinmeyen örneğe ait c değeri; $\hat{c} = xb$ ile tahmin edilebilmekte ve b değerinin tahmini ise $b = W(PW)^{-1}q$ eşitliğinden yola çıkılarak yapılabilmektedir. Bir örneğin hangi gruba ait olduğu o örneğe ait \hat{c} değeri ile belirlenmektedir. Bu değer sıfırın üzerindeyse örnek A grubuna, sıfırın altındaysa örnek B grubuna aittir sonucuna varılmaktadır [154].

2.4.3 Çoklu Linear Regresyon Analizi

Kimyasal analizler genel olarak iki temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlardan ilki metodun veya enstrümanın karakteristiklerinin araştırıldığı ve bağımlı Y değişkeni ile bağımsız X değişkeni arasındaki ilişkinin $Y = f(X)$ şeklindeki bir fonksiyonla modellendiği kalibrasyon veya eğitime (training) basamağıdır. Oluşturulan modelin parametreleri regresyon katsayısı adını almaktadır. İkinci basamak ise bir veya daha fazla örnek için bağımsız değişkenlerin toplandığı tahmin (test) basamağıdır. Bu basamakta kullanılan veri seti ise tahmin veya test seti olarak adlandırılmaktadır.

Çoklu lineer regresyon analizinde (MLR); m tane değişken için ve y değişkeni için ölçüm x_j ($j = 1-m$) yapıldığı durumda amaç bunlar arasında lineer bir ilişki kurmaktır. Bu durum aşağıdaki gibi matematiksel olarak ifade edilebilmektedir;

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_mx_m + e \quad \text{Eş. 11a}$$

$$y = \sum_{j=1}^m b_jx_j + e \quad \text{Eş. 11b}$$

$$y = x'b + e \quad \text{Eş. 11c}$$

Yukarıdaki eşitlikte x_j bağımsız değişkenleri ve y bağımlı değişkeni, b_j değerleri hassasiyetleri ve e artık hata (error of residual) değerini ifade etmektedir. Eş. 11b 'de y değeri skalar bir büyüklükken b sütun vektörü, x' ise satır vektörüdür. Eş. 11 yalnızca bir örneğe ait çoklu bağımlılığı göstermektedir. n tane örnek için y_i ($i =$

1-n) bir sütun vektörü olarak yazılabilmekte, b değeri değişmemekte ve x_j vektörleri X matrisinin satır vektörlerini oluşturmaktadır.

$$Y = Xb + e$$

Matriks denklemlerinin daha iyi anlaşılabilmesi adına aşağıda Şekil 2.15 ile grafiksel bir gösterim verilmiştir.

$$\begin{matrix} 1 \\ \boxed{y} \\ n \end{matrix} = \begin{matrix} m \\ \boxed{X} \\ n \end{matrix} \begin{matrix} 1 \\ \boxed{b} \\ m \end{matrix} + \begin{matrix} 1 \\ \boxed{e} \\ n \end{matrix}$$

Şekil 2. 16 MLR analizinde matriks denklemlerinin şematik gösterimi

Bu gösterimde n örnek sayısı ve m bağımsız değişken sayısını göstermektedir. Bu bilgiler ışığında üç farklı durum söz konusu olmaktadır;

- i. $m > n$. Örnek sayısından daha fazla değişken olması durumunu ifade eder. Bu durumda b değeri için sonsuz sayıda çözüm vardır ve hepsi denkleme uygunluk göstermektedir. İstenen bir durum değildir.
- ii. $m = n$. Örnek ve değişken sayısının eşit olduğu durumu ifade eder. Pratik uygulamalarda çok sık karşılaşılan bir durum değildir. Bu durumda b değeri için tüm X aralığı için tek bir çözüm vardır.

$e = y - Xb = 0$ olarak yazılabilmektedir. e değeri artık vektör adını almaktadır.

- iii. $m < n$. Örnek sayısının değişken sayısından fazla olması durumunu ifade eder. Bu durum b değeri için kesin bir çözüm olmasına olanak sağlamamaktadır. Aşağıdaki eşitlikte artık vektör e uzunluğunun minimize edilmesi yoluyla çözüme gidilebilmektedir.

$$e = y - Xb$$

Bu durum için kullanılan en yaygın metot 'en küçük kareler metodu'dur. En küçük kareler çözümü;

$$b = (X'X)^{-1}X'y$$
 şeklinde ifade edilmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında değişken sayısı kadar örnek sayısı olması gerektiği sonucuna varılmakla birlikte $m > n$ durumları için bazı değişkenlerin silinmesi yoluna gidilebilmekte ve silinmesi gereken değişkenlerin seçilmesinde kullanılmak üzere farklı metotlar önerilmektedir.

MLR yöntemi birden çok bağımlı değişken olması durumunda kullanılabilir. Örneğin iki bağımlı değişken y_1 ve y_2 vektörleri için b_1 ve b_2 hassasiyet vektörleri olmak üzere; $y_1 = Xb_1 + e_1$; $y_2 = Xb_2 + e_2$ olarak yazılabilmekte ve y_1 ve y_2 ifadeleri ile b_1 ve b_2 ve e_1 ve e_2 değerlerinin $n \times 2$ şeklindeki bir matrikste yanyana yazılmasıyla $Y = XB + E$ eşitliği elde edilebilmekte burada; $Y = (y_1, y_2)$; $B = (b_1, b_2)$ ve $E = (e_1, e_2)$ 'dir. MLR yöntemindeki en büyük problem $X'X$ ifadesinin tersinin bulunmamasıdır. Bu problem PCR ve PLSR yöntemlerinde X 'in ortogonal skorlara (T) ve loadings değerlerine (P) dekompoze edilmesiyle ve $X = TP$, Y değerlerinin X ile değil de T skor değerlerinin ilk a sütun değerleri kullanılarak regresyon analizine tabi tutulmasıyla aşılmaktadır [152].

2.4.4 Temel Bileşen Regresyon Analizi

Temel Bileşen Regresyon Analizi (PCR) çoklu doğrusallık (multikolinearite) probleminde sahip çoklu regresyon verilerinin incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Çoklu doğrusallık söz konusu olduğunda en küçük kareler ile tahmin edilen değerler bias içermemekte fakat varyans değerleri çok yüksek olmakta ve tahmin edilen değerler gerçek değerden çok uzakta bulunmaktadır. Regresyon tahmin değerlerine belli oranda bias eklenmesi yolu ile PCR tekniğinde standart hata azaltılmaktadır.

Regresyon denkleminin matriks formunda aşağıdaki gibi yazıldığı kabul edilirse; $Y = XB + e$; Y bağımlı değişken, X bağımsız değişkenleri, B tahmin edilecek regresyon sabitlerini ve e artık hatayı ifade etmektedir. PCR tekniğinde ilk basamak bağımlı ve bağımsız değişkenlerin standardize edilmesidir. Bu amaçla ortalama değer her bir değişkenden çıkarılmakta ve standart sapma değerine bölünmektedir. Klasik en küçük kareler yönteminde regresyon sabitleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmaktadır. $B' = (X'X)^{-1}X'Y$; değişkenler standardize edildikten sonra $X'X = R$ olup R bağımsız değişkenlerin korelasyon matriksini ifade etmektedir. PCR regresyonu yapılabilmesi için bağımsız değişkenler onlara

karşılık gelen temel bileşenlere dönüştürülmektedir. Bu durum $X'X = PDP' = Z'Z$ şeklinde ifade edilmektedir.

D; $X'X$ e ait eigenvalue değerlerinin bir diyagonal matriksini, P; $X'X$ e ait eigenvector matriksini ve Z; temel bileşenlerden oluşan veri matriksini ifade etmektedir. P ortogonal olduğundan $P'P = I$ ifadesi yazılabilmektedir.

PCR regresyonu ile yeni değişkenleri ifade eden Z oluşturulmakta olup bu orjinal değişkenler matriksi X'ten ağırlıklı olarak oluşturulmuştur. Oluşturulan yeni değişkenler temel bileşenler olduğundan birbirleriyle olan korelasyonu sıfırdır. Veri seti içindeki yüksek orandaki çoklu doğrusallık, çok küçük eigenvalue değerleri olarak gözlemlenmektedir. Veri setinin çoklu doğrusallıktan kurtarılabilmesi için küçük eigenvalue ile ilgili olan bileşenler uzaklaştırılmaktadır. Örneğin üç bağımsız değişkenli bir problemde yalnızca küçük bir eigenvalue değeri tespit edildiyse Z3 (üçüncü temel bileşen) çıkarılmaktadır. Ardından Z1 ve Z2'ye karşı regresyon analizine koyulduğunda çoklu doğrusallık bir problem yaratmamaktadır. Sonrasında elde edilen sonuçlar X skalasına dönüştürülebilmekte ve B tahmin değerleri elde edilebilmektedir. Bu tahmin değerlerinde belli oranda bias bulunacaktır, fakat uygulanan işlem sayesinde varyans değerinde sağlanan azalma ile bias değerleri kompanse edilmiş olacaktır. Matematiksel olarak tahmin formülasyonu $A' = (Z'Z)^{-1}Z'Y = D^{-1}Z'Y$ şeklinde ifade edilebilmektedir;

Yeni regresyon sabitleri setleri arasındaki ilişki $A = P'B$ ve $B = PA$ şeklinde ifade edilmektedir. Bir temel bileşenin uzaklaştırılması, ona karşılık gelen elementin sifıra eşitlenmesi yoluyla başarılabilir [155].

2.4.5 Kısmi En Küçük Kareler-Regresyon Analizi

Kısmi En Küçük Kareler Regresyon (PLSR) tekniği; bir grup bağımlı değişkenin veya sistem cevabının bir başka grup bağımsız değişken kullanılarak tahmin edilmesini sağlayan bir multivariat veri analizi tekniğidir. Özellikle spektroskopik veri analizi gibi bağımsız değişken sayısının çok yüksek olduğu durumlarda oldukça büyük fayda sağlamaktadır. PLSR tekniği latent değişken adı verilen yeni değişkenlerin hesaplanmasına dayanmaktadır [150]. Latent değişkenler veya faktörler en yüksek tahmin kabiliyetine sahip prediktörlerden ve bunların sistem

cevabıyla olan korelasyonundan ekstrakte edilmektedir. Bunu yapmak için PLS, X (prediktör matrisi) ve Y (cevap matrisi) orjinal veri bloklarını daha küçük ortogonal matrislere dekompoze etmekte ve bunu yaparken X ile Y arasındaki kovaryansı mümkün olan en yüksek oranda açıklamaktadır. Sonuç olarak yeni hesaplanan faktör seti kullanılarak bir lineer regresyon modeli geliştirilmekte ve bu model sayesinde sistem cevabı daha yüksek bir başarıyla tahmin edilebilmektedir [156].

PLSR tekniğinde X ve Y olarak isimlendirilmiş iki veri matrisinin doğrusal çok değişkenli bir model kullanılarak birbiriyle ilişkilendirilmesi söz konusudur. Bu teknik MLR tekniğinden farklı olarak boyutu yüksek, çok sayıda X-değişkeni içeren, fazlaca gürültü içeren, kolinearite barındıran verilerin analizini gerçekleştirebilmektedir. PLSR tekniğinde ilgili değişken ve gözlem sayısının artırılması kurulan modelin tahmin kabiliyetini arttırmaktadır. Geleneksel çoklu regresyon yaklaşımından farklı olarak PLSR, X ve Y matrislerini yapısal olarak da modellemektedir.

Regresyon problemi bir diğer deyişle bir veya daha fazla sayıdaki bağımlı değişkenin, cevap verisinin yani Y matrisinin prediktör değişkenler yani X matrisi kullanılarak nasıl modellenebileceği sorusu en büyük analitik veri problemlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Kimya alanında; Y: kimyasal örneğinin özelliklerinin X: örneklerinin kimyasal kompozisyonlarıyla; Y: üretilen ürünün kalitatif veya kantitatif özelliklerinin X: üretim süreci koşullarıyla ilişkilendirilmesi en sık rastlanılan örnekler arasındadır. Geleneksel olarak bu tür problemler, X kullanılarak Y'nin modellenmesi, çok sayıda X-değişkeni mevcut değilse ve yüksek oranda kolinearite bulunmuyorsa MLR tekniği ile çözülmektedir. Fakat günümüzde spektrometreler ve kromatograflar gibi modern ölçüm enstrümanlarının kullanılması sonucunda toplanan veri çok sayıda X-değişkeni içermekte ve yüksek oranda kolinearite göstermektedir. Bu nedenle bu değişkenler bağımsız değişken olarak değil de prediktör olarak veya X-değişkenleri olarak adlandırılmaktadır. PLSR tekniğinin kullanımında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta çok sayıda değişkene karşılık az sayıda örnek sayısının bulunduğu durumlardır.

PLSR modeli \mathbf{x}_k ($k= 1, 2, \dots, K$) ile sembolize edilen K tane X-değişkeni ile \mathbf{y}_m ($m= 1, 2, \dots, M$) ile sembolize edilen M tane Y-değişkeni içeren N tane gözlemden oluşan eğitim setinden (training set) geliştirilmektedir. Bu eğitime verisi $N \times K$ ve $N \times M$ boyutlarındaki X ve Y matrislerinden oluşmaktadır. Yeni gözlemler için tahminler bu gözlemlere ait X verileri kullanılarak yapılmaktadır. Sonuç olarak X -skor değerleri (t -değerleri), X -residual değerleri ve bunların residual standart sapma değerleri ve y -değerleri elde edilmektedir. X -skor değerleri t_a ($a= 1, 2, 3, \dots, A$) ile sembolize edilmektedir. X -skor değerleri sayıca daha az olup ortogondur. Bunlar, \mathbf{x}_k orijinal değişkenlerin lineer kombinasyonları olarak w^*_{ka} ($a= 1, 2, \dots, A$) ile sembolize edilen ağırlık (weight) katsayıları ile tahmin edilmektedir.

$$t_{ia} = \sum_k W^*_{ka} X_{ik} \quad T = XW^* \quad \text{Eş. 12}$$

X -skor değerleri (t_a 'lar) loadings değerleri p_{ak} ile çarpılmakta ve X -residual değerleri e_{ik} çok küçük olmaktadır.

$$X_{ik} = \sum_a t_{ia} p_{ak} + e_{ik} \quad X = TP' + E \quad \text{Eş. 13}$$

Çok değişkenli Y söz konusuysa yani $M > 1$ ise buna karşılık gelen Y -skor değerleri (u_a) ağırlık değerleri c_{am} ile çarpılmakta ve Y -residual değerleri g_{im} çok küçük olmaktadır.

$$Y_{im} = \sum_a u_{ia} c_{am} + g_{im} \quad Y = UC' + G \quad \text{Eş. 14}$$

X -skor değerleri Y 'nin iyi birer prediktörüdür;

$$Y_{im} = \sum_a c_{ma} t_{ia} + f_{im} \quad Y = TC' + F \quad \text{Eş. 15}$$

Y -residual değerleri f_{im} gözlemlenen değerler ile modellenen cevaplar arasındaki sapmaları ifade etmekte ve Y -residual matrisi F 'nin bileşenlerini oluşturmaktadır. Söz konusu eşitlikler çoklu lineer regresyon modelini ifade etmesi açısından aşağıdaki gibi yazılabilmektedir;

$$y_{im} \sum_a c_{ma} \sum_k w^*_{ka} x_{ik} + f_{im} = \sum_k b_{mk} x_{ik} + f_{im} \quad \text{Eş. 16}$$

$$Y = XW^*C' + F = XB + F$$

PLS-regresyon katsayıları b_{mk} (B) aşağıdaki gibi ifade edilebilir;

$$b_{mk} = \sum_a c_{ma} w_{ka}^* \quad B = W^* C' \quad \text{Eş. 17}$$

Her bir a bileşeninden sonra X matrisinin boyutu $t_{ia}^* p_{ka}$ değerlerinden x_{ik} değerlerinin çıkarılması yoluyla azaltılmaktadır. Bu sayede PLS modelinin X -değişkenleri yerine bir önceki boyut; E_{a-1} 'e ait residual değerlerince ifade edilen ağırlık değerleri (weights) w_a bakımından ifade edilmesi sağlanır. Buradan yola çıkılarak aşağıdaki eşitlik yazılabilir;

$$t_{ia} = \sum_k w_{ka} e_{ik,a-1} \quad t_a = E_{a-1} W_a \quad \text{Eş. 18}$$

$$e_{ik,a-1} = e_{ik,a-2} - t_{i,a-1} p_{a-1,k}$$

$$E_{a-1} = E_{a-2} - t_{a-1} p_{a-1}'$$

$$e_{ik,0} = X_{ik} \quad E_0 = X \quad \text{Eş. 19}$$

Ağırlık değerleri, w , w^* değerlerine dönüştürülebilir bu sayede X ile ilişkilendirilebilir ve yukarıdaki eşitlik elde edilir. Bu ikisi arasındaki ilişki aşağıdaki gibi ifade edilebilir;

$$W^* = W (P'W)^{-1} \quad \text{Eş. 20}$$

Verinin modelle açıklanamayan kısmı bir diğer deyişle residual değerleri model başarısı açısından önemli bir parametredir. Yüksek Y -residual değerleri modelin zayıf bir model olduğuna işaret etmektedir. X -residual değerleri ise verinin Y 'nin modellenmesi için kullanılmayan kısmını ifade etmektedir. X -residual değerleri X -boyutundaki sapan veri noktalarının tespit edilmesinde fayda sağlamaktadır.

2.4.6 Kemometrik Veri Analizlerinde Kullanılan Önişlemler

Hedeflenmiş analizlerde analiz edilen örnek; dalgaboyu, alıkonma süresi veya kütle spektrumu gibi karakteristik parametrelerle tanımlanmış haldedir. Hedeflenmemiş analizlerde ise tüm örnek matrisine dair ölçülen özellikler 'spektral parmakizini' oluşturmakta ve analiti temsil etmektedir. Spektral parmakizlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi öncesinde yoğun bir veri hazırlama basamağı gerektirmektedir. Genellikle her enstrümental platform veriye ulaşılabilmesi ve uygun formata dönüştürülebilmesi adına kendi spesifik önişlem metotlarını gerektirmektedir [29].

Önişlem uygulamaları veri analizinin önemli bir basamağını oluşturmaktadır. Bu aşamada ham veri (raw data) temizlenmiş veriye (cleaned data) dönüştürülmekte, istenmeyen enstrümental ve deneysel hatalardan kaynaklı varyasyonlar uzaklaştırılarak toplanan veri, veri analizine hazır hale getirilmektedir. Önişlem uygulamaları doğru şekilde gerçekleştirilmediğinde ise veri setinde istenmeyen varyasyonların oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle doğru önişlemlerin seçilmesi ve uygulanması elde edilen deneysel sonucun başarısını direkt olarak etkileyen kritik bir basamaktır.

Önişlemler temel olarak ölçülen her bir değişkenin varyasyonunu ve değişkenler arasındaki ilişkileri ayarlamak için kullanılmaktadır. Spektroskopik tekniklerde baseline kaymaları veya kromatografik tekniklerde pik kaymaları gibi kullanılan analitik tekniğe spesifik veri karakteristikleri de önişlemlerle düzenlenebilmektedir. Günümüzde farklı tekniklerin kombine kullanımı, farklı zamanlarda veya farklı laboratuvarlarca elde edilmiş verilerin incelenmesi gibi durumlar önişlem kullanımını zorunlu hale getirmektedir [157].

Optimum önişlem çeşidinin veya kombinasyonlarının belirlenmesi veri özelliklerine ve veri analizinin amacına bağlılık göstermektedir. Özellikle büyük boyuttaki verilerle çalışılırken her bir önişlem metodunun veri üzerindeki etkisinin direkt olarak gözlemlenmesi mümkün olamamaktadır. Ancak elde edilen sonuçların uygulanan önişlemin çeşidine bağlı olarak çok fazla değişiklik göstermemesi gerekmektedir [158]. Günümüzde hangi önişlemin hangi durumlarda kullanılması gerektiğine yönelik kesin standart kurallar bulunmamaktadır. Bunun yanında önişlemlerin uygulanma sırasının da elde edilen sonucu etkilediği unutulmamalıdır [159]. Aşağıda mevcut tez kapsamında kullanılan bazı önişlem tekniklerine ait detaylar açıklanmıştır.

Autoscale: Boyutlandırma (scaling) amaçlı önişlemlerden bir tanesidir. Boyutlandırma önişlemlerinde her bir değişken o değişkene özgü bir boyutlandırma faktörüne (scaling factor) bölünmektedir. Autoscale önişleminde boyutlandırma faktörü olarak standart sapma değeri kullanılmaktadır [160].

Ölçülen bağımsız değişkenlerin ölçüm birimlerindeki farklılıklar nedeniyle sayısal değerleri arasında önemli farklılıklar olması durumunda kurulan model yalnızca yüksek değerlere odaklanmaktadır. Fakat amaç tüm değişkenleri kullanarak bir

model oluşturmak olduğundan autoscale önışleminin kullanılması gerekmektedir. Bu önışlemlerle her bir kolon aynı boyuta getirilmekte ve böylece bütün değişkenlerin modele katkı sağlama şansı eşitlenmektedir. Bu önışlemlerde her bir değişkenden ortalama değer çıkarılmakta ve sonrasında değişken kendi standart sapma değerine bölünmektedir. Bu uygulamaya göre ortalama örneğin değeri sıfıra karşılık gelecektir. Bu durum bu örneğe ait herhangi bir sinyalin olmadığına değil örneğin ortalama bir sinyal değerine sahip olduğuna işaret etmektedir [161]. Autoscale önışlemi; 'mean centering' ve 'variance scaling' önışlemlerinin bir kombinasyonu olarak da tanımlanmaktadır.

Detrend: Baseline düzeltme yöntemlerinden bir tanesidir. Sabit dereceli bir polinom spektruma fit edilmekte ve ardından polinom spektrumdan çıkarılmaktadır [162].

Derivative: Baseline düzeltmesi amacıyla kullanılabilir. Birinci derece türev alınmasıyla sabit bir baseline offset, ikinci derece türev alınmasıyla baseline offset ve baseline slope spektrumdan çıkarılmaktadır. Türev alınması sinyal/gürültü oranını azaltabileceğinden Savitzky-Golay algoritması fit edilen polinomların türevlerinin alınması yoluyla sıklıkla uygulanmaktadır.

Smoothing: Hemen her analitik teknikte belli oranda gürültü bulunmaktadır. Gürültünün uzaklaştırılması amacıyla sinyal bazı algoritmalar kullanılarak düzeltilmektedir. Savitzky-Golay algoritması bu amaçla en sık kullanılanlardandır. Burada polinomlar çok sayıdaki veri pencerelerinin herbirine, bir veri penceresine bir polinom olmak üzere, fit edilmektedir [163].

Mean centering: Veri setindeki her bir değişken için ortalama değer hesaplanmakta ve her bir değişkene ait ortalama değer orjinal spektrumdan çıkarılmaktadır. Bu sayede örnekler arasında gözlemlenen farklılığın direkt olarak örnekten gelen varyasyonlardan kaynaklandığı sonucuna gidilebilmektedir [164]. Mevcut literatürde mean centering önışleminin her veri yapısına uygun olmadığı kalibrasyon modelinin meancenter uygulanmış ve uygulanmamış sonuçlarının mutlaka karşılaştırılması gerektiği belirtilmektedir [165].

2.4.7 Kemometrik Veri Analiz Yöntemlerinin Kalite Parametreleri

Q-Residuals: Q-Residuals istatistikleri ile oluşturulan modelin verilen bir örneği ne kadar iyi tanımladığı ifade edilmektedir. Genellikle veri setinde sapan (outlier) verilerin tespiti amacıyla kullanılmaktadır. Bir m satır ve n kolondan oluşan bir X veri matrisini P loading değerleri ve T skor değerleri üzerinden tanımlayan bir model $X = TP^T + E$ şeklinde ifade edilmektedir. Bir örnek ile bu örneğin k tane faktör kullanılarak modele projekte edilmiş hali arasındaki farkı ifade etmektedir. Q-Residuals değeri bir başka deyişle her bir örneğin modele uyumluluğunu göstermektedir.

Hotelling's T²: Q residuals değerleri model kullanılarak yapılan projeksiyon sonrasında örnekte kalan varyasyonun bir ölçüsü iken Hotelling's T² değerleri modeldeki her bir örneğin varyasyonunu ifade etmektedir [166]. Bu parametreler için optimum durum Hotelling's T² değerinin %100 ve Q-Residuals değerinin %0 olmasıdır.

Hata Değerleri: Çok değişkenli kalibrasyon modellerinin performanslarının kıyaslanmasında kullanılmak üzere tanımlanmış üç temel hata değeri bulunmaktadır. Bunlar Kalibrasyon Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü (Root Mean Squared Error of Calibration: RMSEC), Çapraz Validasyon Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü (Root Mean Squared Error of Cross Validation: RMSECV) ve Validasyon Modelinin Hata Kareler Ortalamasının Karekökü (Root Mean Squared Error of Prediction: RMSEP) değerleridir. Tüm bu değerler Hata Kareler Ortalamasının Karekökü (Root Mean Squared Error) değeri üzerinden hesaplanmakta olup ilgili formül aşağıdaki eşitlikte verilmiştir.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \hat{c}_i)^2}{n}}$$

Eş. 21

RMSE değeri model tarafından tahmin edilen değer (\hat{c}_i) ile gerçekte ölçülen değer (c_i) arasındaki farkı ifade eden kalite parametrelerinden bir tanesidir. Yukarıdaki eşitlikte n; çalışılan konsantrasyon sayısını göstermektedir.

Tek bir konsantrasyon için hesaplanan RMSE değeri 'residual (artık değer)' olarak tanımlanmaktadır. Her bir konsantrasyon için bu değer hesaplanıp söz

konusu model için ortalama bir RMSE değeri rapor edilmektedir. Bu sayede artık değerlerin biriktirilmesi yoluyla geliştirilen modelin tahmin gücünü ifade eden tek bir ölçüt ortaya konulmaktadır.

RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri arasındaki fark; \hat{c}_i değerinin belirlenme şekline kaynaklanmaktadır. Geliştirilen kalibrasyon modelinin gelecekteki performansını gösteren en güvenilir parametre RMSEP değeridir. RMSEP değerinin hesaplanmasında kullanılan her bir \hat{c} değeri kalibrasyon modelinin daha önce hiç görmediği yeni bir veri setiyle test edilmesi sonucunda elde edilmektedir. Harici bir veri setinin bulunmadığı durumda RMSECV değeri değerlendirilmelidir. RMSECV değerinin hesaplanmasında kullanılan her bir \hat{c} değeri mevcut veri setinden her bir verinin tekrar tekrar çıkarılıp sırasıyla yeniden eklenmesi yoluyla elde edilmektedir. Bir örnek veri setinden çıkarıldığında kalan örneklerle bir kalibrasyon modeli oluşturulmakta ve çıkarılan örneğin değeri kurulan bu kalibrasyon modeliyle tahmin edilmektedir. RMSEC değeri ise kalibrasyon modelinin kalibrasyon veri setine olan uyumluluğunu göstermektedir. Üç değer arasında en az bilgi veren değer RMSEC değeridir. RMSEC değeri; model performansının optimistik bir öngörüsü olarak tanımlanmaktadır [167]. Hata değerlerinin artan değişken sayısı ile değişimi incelenerek kurulacak olan modelde kullanılması gereken değişken sayısına karar verilmektedir. Bu noktada grafikte çok önemli bir azalış görülmediği sürece gözlenen ilk minimum hata noktası tespit edilip buna karşılık gelen sayıda değişken kullanılarak model oluşturulmaktadır. Kalibrasyon modelinin kurulması için kullanılan değişken sayısı arttırıldıkça RMSEC değeri daima azalmaktadır. Bunun aksine modele dahil edilen değişken sayısı arttıkça RMSECV ve RMSEP değerleri genellikle artmaktadır. Bu durumun sebebi değişken sayısı arttıkça kalibrasyon modelinin spektrumlarında ve konsantrasyonlarda gömülü olan rasgele hatalara uyum göstermeye başlaması olarak açıklanmaktadır. Fakat aynı model kalibrasyon modeline dahil olmayan yeni örneklerle benzer derecede bir uyum gösterememekte dolayısıyla RMSECV ve RMSEP değerlerinde artış görülebilmektedir [168].

3. MATERYAL VE METOT

Yürütülen tez çalışmasının amacı; gıdanın lipit fazına ait spektroskopik parmakizi bilgisini kullanarak gıda tağışışlerinin tespitine yönelik hızlı, güvenilir ve hassas yöntemler geliştirmektir. Bu amaçla SFS, RS ve LIBS teknikleri kullanılmıştır. Bu kapsamda uygun ekstraksiyon metodunun belirlenmesi, ölçüm parametrelerinin optimizasyonu, uygun veri analiz tekniğinin tespit edilmesi ve elde edilen sonuçların referans analizlerle desteklenmesi basamakları üzerinde yoğunlaşmıştır.

Tez çalışması;

- Tahin Örneklerindeki Tağışışin Senkronize Floresans Spektroskopisi ile Belirlenmesi
- Tereyağı Örneklerindeki Tağışışin Lazer İndüklü Plazma Spektroskopisi ile Belirlenmesi
- Tavuk Örneklerindeki Tağışışin Raman Spektroskopisi ile Belirlenmesi

olmak üzere üç ana başlık altında yürütülmüştür.

3.1 Tahin Örneklerindeki Tağışışin SFS ile Belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı; tahin örneklerine uygulanan tağışışinin SFS tekniği ile belirlenmesine yönelik hızlı ve hassas bir yöntemin geliştirilmesidir. Tahin; kabuklarından ayrılmış susam tohumlarının kavrulduktan sonra öğütülmesi ile elde edilen bir süspansiyon sistemidir. Öğütülen tohumlardan sızan yağ bu süspansiyon sisteminin sürekli fazını oluştururken kısmen yağı uzaklaştırılmış tohumlar ise bu sistemde süspanse halde bulunmaktadır. Orta Doğu ve Doğu Akdeniz ülkeleriyle benzer şekilde ülkemizde de susam tohumları direkt susam yağı yerine tahin formunda tüketilmektedir. Söz konusu durumun en iyi şekilde yansıtılması açısından çalışma kapsamında tahin örnekleri analiz edilmiştir.

Tahin örneklerinin bileşiminde bulunan susam yağı değerli bir yağ olduğundan tamamı veya bir kısmı daha düşük kalitedeki yağlarla tüketicinin bilgisi dışında değiştirilebilmektedir. Geliştirilen yöntemde tahinin hammaddesi olan susam yağının bileşimindeki yüksek miktardaki tokoferol ve klorofil içeriği SFS tekniği ile

takip edilmiştir. Çalışma kapsamında tahin örneklerine ayçiçek yağı ilavesiyle yapılan tağşişin kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ticari tahin örneklerinden ekstrakte edilen susam yağlarına farklı oranlarda ticari ayçiçek yağı ilave edilmiştir. Kullanılan ticari yağların orijinalliği referans yöntem olarak GC analizleriyle ortaya konmuştur. SFS tekniğinden toplanan yüksek boyuttaki veri farklı kemometrik yöntemlerle işlenerek tağşişin tespitine yönelik kalitatif ve kantitatif modeller geliştirilmiştir.

3.1.1 Tahin Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması

Yağ ekstraksiyonunda çözücü olarak kullanılan analitik sikloheksan Riedel-de Haën (Seelze, Almanya) ve çözücünün uzaklaştırılması amacıyla kullanılan %99.9 saflıktaki azot gazı Oksan (Ankara, Türkiye) firmalarından temin edilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan yağ örneklerinin mümkün olduğunca varyasyonu barındırması açısından piyasada satışa sunulan beş farklı marka ayçiçek yağı (AY) ve altı farklı marka tahin ticari olarak bölgesel marketlerden temin edilmiştir. Geliştirilen kalitatif analiz yönteminde örnekler arasındaki farklılıktan kaynaklanacak olası varyasyonları gözlemleyebilmek açısından ayçiçek yağları kendi içerisinde, tahin yağları kendi içerisinde olmak üzere ikili karışımlar hazırlanmıştır. Yapılan kalitatif analiz sonucunda ikili AY (n=10) karışımları ve ikili TY karışımlarının (n=15), %100 AY ve %100 TY örneklerini temsil eden kümeler içerisinde konumlanması öngörülmüştür.

Farklı oranlarda ayçiçek yağı ilavesi ile tağşişe uğratılmış tahin yağı örneklerinin hazırlanması aşamasında kullanılmak üzere stok yağ karışımları oluşturulmuştur. Bu amaçla ayçiçek stok yağ karışımı temin edilen beş farklı marka ayçiçek yağından eşit ağırlıkta örnek alınıp karıştırılarak ve tahin stok yağ (TY) karışımı temin edilen altı farklı marka tahin yağından eşit ağırlıkta örnek alınıp karıştırılarak hazırlanmıştır. Stok yağ karışımı hazırlama işlemi tağşiş çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda amaç kurulan kalibrasyon modelinin içereceği varyasyonu maksimize ederek kalibrasyon modelinin hiç tanımadığı örneklerdeki tahmin başarısını arttırmaktır. Bu yağ karışımları kullanılarak kantitatif modelin geliştirilmesinde kullanılmak üzere tağşişe uğratılmış tahin yağı örnekleri (n=22) hazırlanmıştır. Bu amaçla tahin yağı karışımına %2 ile %95 aralığında %5 artışla ayçiçek yağı karışımı ilave edilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan ticari ayçiçek ve tahin yağlarının üretim yerleri ve üretim tarihlerine ait detaylı bilgiler Çizelge 3. 1 Ayçiçek ve tahin örnekleri hakkında detaylı bilgi ile verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Ayçiçek ve tahin örnekleri hakkında detaylı bilgi

Örnek No	Örnek Türü	Üretim Yeri	Üretim Tarihi
Marka 1	Tahin	Avcılar, İstanbul	23.10.2016
Marka 2	Tahin	Ataşehir, İstanbul	03.05.2016
Marka 3	Tahin	Karaman, OSB	14.09.2016
Marka 4	Tahin	Bozkır, Konya	18.04.2016
Marka 5	Tahin	Avcılar, İstanbul	09.08.2016
Marka 6	Tahin	Ataşehir, İstanbul	19.01.2016
Marka 7	Ayçiçek	Altınordu, Ordu	04.12.2016
Marka 8	Ayçiçek	Ayvalık, Balıkesir	04.01.2016
Marka 9	Ayçiçek	Altunizade, İstanbul	04.05.2016
Marka 10	Ayçiçek	Lüleburgaz, Kırklareli	15.02.2016
Marka 11	Ayçiçek	Aliağa, İzmir	03.03.2016

3.1.2 Tahin Yağlarının Ekstraksiyonu

Tahin örneklerinden yağ ekstraksiyonu için 150 g tahin örneği üzerine 50 ml siklohekzan eklenmiştir. Bu karışım 1 sa boyunca karıştırıcıda bekletilerek yağ fazının çözücü siklohekzan fazına geçmesi sağlanmıştır. Ardından yağ-siklohekzan karışımı 15485 g hızda 15 dak boyunca safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen karışım kaba filter kağıdından geçirilerek geriye kalan safsızlıklar da uzaklaştırılmıştır. Ardından çözücü-yağ karışımlarından yağ fazının elde edilmesi amacıyla örneklere çekerocak altında azot gazı püskürtülerek çözücü uzaklaştırılmıştır. Ekstrakte edilen tahin yağı örnekleri karanlık bir ortamda oda sıcaklığında kullanıma kadar saklanmıştır.

3.1.3 SFS Ölçümlerinin Alınması

SFS spektrumlarının elde edilmesi amacıyla Varian Cary Eclipse Spektrofotometre (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA) kullanılmıştır. Uyarma ışık kaynağı ksenon flaş lambadır. Sağ aç geometrisine sahip sistem

kullanılmıştır. Yağ örneklerinin ölçümü 10 mm mesafeye sahip kuvarz küvetlerde gerçekleştirilmiştir. Uyarma ve emisyon slit aralıkları 5 ve 2.5 nm olarak ayarlanmıştır. Ölçüm alma frekansı (acquisition interval) 1 nm ve integrasyon süresi 0.1 s olarak ayarlanmıştır. Senkronize floresans spektrumu, uyarma ve emisyon monokromatörlerinin simültane olarak taranmasıyla alınmıştır. Uyarma dalgaboyu aralığı 250-600 nm aralığında 1 nm artışla taranmıştır. Uyarma ve emisyon monokromatörleri arasındaki dalgaboyu aralığı 10 nm ile 370 nm arasında 20, 40, 60 ve 80 nm birim aralıklarla değiştirilmiştir. Floresans sinyal şiddetleri uyarma dalgaboyunun bir fonksiyonu olarak kaydedilmiştir. Her örneğe ait ölçüm üç kez tekrarlanmıştır.

3.1.4 SFS Verilerinin Analizi

Tahin örneklerinin içerdikleri gerçek ayçiçek yağı oranları ile tağşişe uğratılmış örneklerden toplanan SFS spektrumları arasındaki korelasyonun ortaya konması amacıyla multivariat veri analizi teknikleri kullanılmıştır. Toplanan SFS verilerinin multivariat analizinde PCA, PLS, PCR ve MLR yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla Stand-alone Chemometrics Software (PLS_Toolbox Versiyon 8.2 Windows 7, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, ABD) programından faydalanılmıştır. Toplanan veri kalibrasyon ve tahmin modellerinin geliştirilmesinde kullanılmak üzere kalibrasyon seti ve tahmin seti olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Kalibrasyon modelleri Venetian Blinds çapraz validasyon ile valide edilmiştir. Çapraz validasyonda temel amaç kullanılan verinin bir kısmını model dışında bırakıp geriye kalan veri ile oluşturulan modeli kullanarak dışarıda bırakılan verinin tahmin edilmesini sağlamaktır. Bu sayede geliştirilen modelde doğabilecek bir aşırı uyum (over-fitting) probleminin önüne geçilmektedir [161].

Tahmin değerlerinin bağıl hatası (Relative Error of Prediction, REP) ile Bağıl standart sapma (Relative Standard Deviation, RSD) değerleri kurulan modelin sırasıyla doğruluk (accuracy) ve kesinlik (precision) değerleriyle korelasyon içinde bulunmakta olup aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$REP (\%) = \frac{100}{N_V} \sum_{i=1}^{N_V} \left| \frac{\hat{c}_i - c_i}{c_i} \right| \quad \text{Eş. 24}$$

Eş. 24'de N_v ; validasyon spektrumlarının sayısını, c_i ; gerçek konsantrasyon değerini ve \hat{c}_i ; tahmin edilen konsantrasyon değerini ifade etmektedir [169].

$$RSD (\%) = \frac{100}{N_k} \sum_{j=1}^{N_k} \frac{\sigma_{c_j}}{c_j} \quad \sigma_{c_j}^2 = \sum_{i=1}^p \frac{(\hat{c}_{ij} - c_j)^2}{(p-1)} \quad \text{Eş. 25}$$

Eş. 25'de N_k ; kalibrasyon spektrumlarının sayısını, c_i ; gerçek konsantrasyon değerini ve \hat{c}_i ; tahmin edilen konsantrasyon değerini, p ; her bir konsantrasyon için toplanan spektrum sayısını bir diğer deyişle paralel sayısını ve σ_{c_j} ; c_j konsantrasyon değerindeki standart sapmayı ifade etmektedir [170]. Geliştirilen kalibrasyon modellerinin taşıma oranını tahmin edebilme performanslarının karşılaştırılması ve tahmin kabiliyetlerinin tanımlanması RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri üzerinden yapılmıştır. Bunlar içerisinde RMSEP değerinin modelin ileriki denemelerdeki performansını gösteren en iyi belirteç olduğu bilinmektedir. Kalibrasyon modellerinin kalite parametreleri olarak RSD, REP, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Mevcut tez kapsamında rapor edilen RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri kullanılan istatistiksel program tarafından program çıktısı olarak alınmış olup manuel olarak hesaplanmamıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi hakkında bilgi veren tespit limiti (limit of detection, LOD) ve tayin limiti (limit of quantification, LOQ) değerlerinin hesaplanması büyük önem taşımaktadır. Bu değerlerin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır [171].

$$LOD = 3.3 \times \frac{\text{En düşük konsantrasyonun standard sapma değeri}}{\text{Kalibrasyon Eğrisinin Eğimi}} \quad \text{Eş. 26}$$

$$LOQ = 3.3 \times LOD \quad \text{Eş. 27}$$

Veri seti büyüklüğünün geliştiren modellerin tahmin kabiliyetine etkisinin incelenmesi amacıyla kemometrik program tarafından sağlanan 'dalga boyu seçim modu (wavelength selection mode)' kullanılmıştır. Burada amaç her bir $\Delta\lambda$ değerinde toplanan veri içerisinde model oluşturmaya en elverişli veri aralığının araştırılmasıdır. Bu kapsamda 'forward mode' tercih edilmiş ve diğer regresyon analizlerinde belirlenen önışlemler ile devam edilmiştir. Aralık sayısı 1, aralık boyutu 351, maksimum temel bileşen sayısı 20 olarak seçilmiş olup adım boyutu program tarafından otomatik olarak atanmıştır.

3.1.5 Tahin ve Ayçiçek Yağı Örneklerinin GC ile Analizi

Supelco 37 FAME karışımı Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

Tahin örneklerindeki yağışın SFS ile belirlenmesi çalışması kapsamında ticari olarak temin edilen ve stok olarak kullanılan tahin ve ayçiçek yağı örneklerinin yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi ve ilgili standartlarla uyumluluğunun ortaya konması amacıyla GC analizi referans yöntem olarak kullanılmıştır. Bütün yağ örneklerinin yağ asidi kompozisyonları FAME formunda GC (Agilent Technologies 7890A GC Sistemi, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA) kullanılarak belirlenmiştir. FAME hazırlanması IUPAC Metot 2.301'e göre yapılmıştır [172]. Buna göre yaklaşık 100 mg örnek üzerine 2 mL heptan eklenip iyice karıştırılmıştır. Ardından 200 μL 2 N metanolik KOH eklenip 30 s süreyle karıştırılmıştır. Karışım bir süre bekletilerek faz ayrımının gerçekleşmesi sağlanmıştır. Üst faz berrak bir görünüm kazandıktan sonra metil esterlerin bulunduğu bu üst faz toplanarak analiz gerçekleştirilene kadar ağzı kapaklı kahverengi küvetlerde -18°C 'de saklanmıştır. Elde edilen örnek oldukça uçucu özellikte olduğundan 24 saat geçmeden analize alınmıştır.

GC analizinde alev iyonlaşma dedektörü (FID) kullanılmıştır. Ayrım, 100 m \times 0.25 mm iç çap ve 0.20 μm kalınlığa sahip Rt-2560 kapiler kolonda (Restek Corporation, Bellefonte, PA) gerçekleştirilmiştir. GC fırını 2 dak 100 $^\circ\text{C}$ ve ardından 15 dak 240 $^\circ\text{C}$ final sıcaklığına 4 $^\circ\text{C}$ /dak hızda ulaşacak şekilde programlanmıştır. Enjeksiyon ve FID sıcaklığı 240 ve 250 $^\circ\text{C}$ olarak kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 μL 'dir. Örnekler split modunda enjekte edilmiş olup split oranı 20:1 olarak kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dak akış hızında helyum gazı

kullanılmıştır. Alıkonma sürelerinin kıyaslanabilmesi adına Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) standart karışımı kullanılmıştır. Sonuçlar her bir yağ asidinin tespit edilen bütün yağ asitlerinin tamamındaki oranı (ağırlık/ ağırlık) olarak hesaplanmıştır.

GC verilerinin değerlendirilmesinde varyans analizi (ANOVA), SPSS Windows, Versiyon 15.0 (IBM, Corporation, Armonk, NY) kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler $\alpha=0.05$ tek yönlü Tukey's test kullanılarak kıyaslanmıştır.

3.2 Tereyağı Örneklerindeki Tağışın LIBS ile Belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı; tereyağı örneklerine yapılan margarin ilavesinin elemental kompozisyonda neden olduğu değişikliklerin LIBS tekniği ile takip edilmesi yoluyla tereyağındaki tağışın tespit edilmesidir. Bu amaçla ticari olarak temin edilen tereyağı ve margarin örnekleri kullanılarak farklı oranlarda tağışe uğratılmış örnekler hazırlanmıştır. Örneklere ait LIBS spektrumları toplanıp kalitatif ve kantitatif kemometrik veri analizi metotları ile analiz edilmiştir. Tereyağındaki margarin miktarını tespit eden LIBS temelli kantitatif bir yöntem geliştirilmiştir. Tereyağı ve margarin örneklerinin elemental kompozisyonu referans yöntem olarak ICP-MS ve FAAS analizleri ile belirlenmiştir.

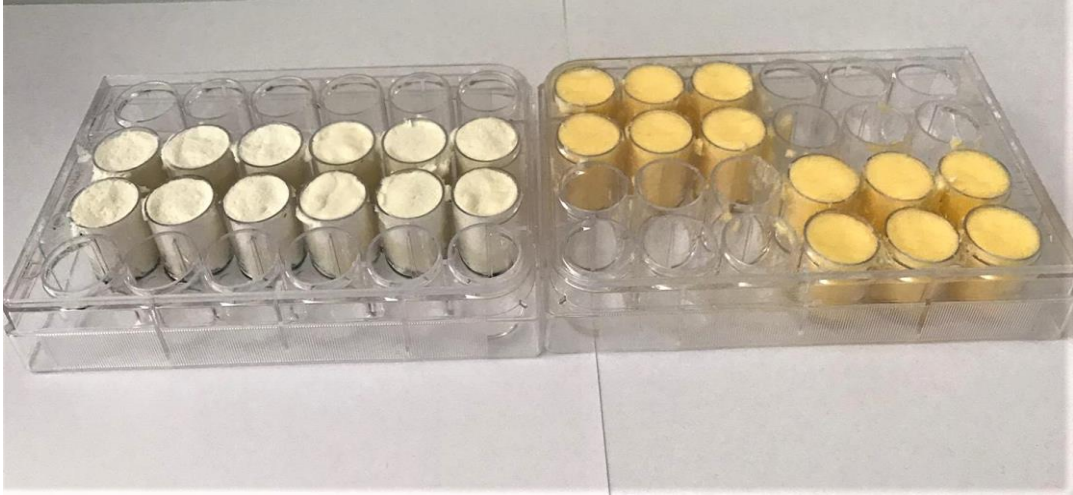
3.2.1 Tereyağı ve Margarin Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması

Çalışma kapsamında Ankara ilindeki güvenilir üreticilerden temin edilen 12 farklı tereyağı ve 5 farklı margarin örneği kullanılmıştır. Örneklerin üretim yerleri ve üretim tarihleri hakkında detaylı bilgi Çizelge 3. 1 Ayçiçek ve tahin örnekleri hakkında detaylı bilgi ile verilmiştir.

Kantitatif LIBS temelli metodun geliştirilmesi amacıyla toplanan tereyağı ve margarin örnekleri kullanılarak bir tereyağı stoğu ve bir margarin stoğu hazırlanmıştır. Bu amaçla 12 farklı marka tereyağından eşit miktarda alınıp oda sıcaklığında homojen olarak karıştırılmasıyla tereyağı stoğu, benzer şekilde 5 farklı marka margarininden eşit miktarda alınıp oda sıcaklığında homojen olarak karıştırılmasıyla margarin stoğu oluşturulmuştur. Bu iki ayrı stok kullanılarak son örnek ağırlığı 400 mg olacak şekilde margarin ilavesi aracılığıyla ağırlıkça %5 ile

%50 oranları arasında tağşışe uğratılmış 12 adet tereyağı örneği kalibrasyon modelinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Kantitatif LIBS metodunun tahmin kabiliyeti kalibrasyon modelinde kullanılan örneklerden tamamen farklı yeni bir örnek setinin kullanımıyla ölçülmüştür. Bu amaçla bir marka tereyağı ve bir marka margarin kullanılarak margarin ile ağırlıkça %10 ile %50 oranları arasında tağşışe uğratılmış tereyağı örnekleri tahmin modelinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bu örnekler dışında ayrıca temin edilen dört farklı tereyağı ve üç farklı margarin örneği geliştirilen LIBS temelli kalitatif metodun tahmin kabiliyetinin ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır. Kalibrasyon ve tahmin modellerinin kurulmasında hangi örneklerin kullanıldığına dair detaylı bilgi Çizelge 3. 2 ile verilmiştir.

LIBS ölçümlerinde kullanılacak olan tereyağı ve margarin örnekleri 2.5 cm genişlik, 4 cm uzunluk ve 1.5 cm yüksekliğe sahip olacak şekilde homojen boyutta hazırlanmış olup Şekil 3. 1'de LIBS ile analiz edilmek üzere hazırlanmış örneklere ait fotoğraflar verilmiştir. Analiz edilen her bir örnekten üçer paralel hazırlanmış ve tüm örnekler LIBS ölçümleri alınana kadar -18°C'de saklanmıştır. Sırayla her bir örnek LIBS ölçümünden hemen önce buzluktan çıkarılmış ve ölçüm tamamlandıktan sonra yeniden buzluğa yerleştirilmiştir.



Şekil 3. 1 LIBS ölçümleri için hazırlanan margarin ve tereyağı örnekleri

3.2.2 LIBS Ölçümlerinin Alınması

LIBS spektrumlarının elde edilmesi amacıyla 150 mJ 1064 nm Litron Nano SG 150 mJ Nd:YAG lazer (Warwickshire, İngiltere) ve 186-900 nm aralığında spektrum veren 5 kanallı Applied Spectra Aurora LIBS spektrometre (Fremont, CA, ABD) kullanılmıştır. Şekil 2. 7 ile tez çalışması kapsamında kullanılan LIBS sistemi şematize edilmiştir. Lazer Q-anahtarlamalı modda (Q-switch mode) 8 Hz atım tekrarlama hızına (repetition rate) 40 mJ/puls enerjisine sahiptir. Spektrometre 650 ns gecikme süresi ve 1.05 ms integrasyon süresine sahiptir. Lazer örneğe Nd:YAG lazer aynası aracılığıyla yönlendirilmiştir. Plano konveks lens 10 cm odak uzaklığı ve 1 inç çapa sahip olup lazerin odaklanması amacıyla kullanılmıştır. Toplama sistemi bir kafes sistemi olarak tasarlanmış olup 2 farklı 2 inç çaplı 6 cm odak uzaklığına sahip plano konveks lens ve bunlarla aynı optik eksene yerleştirilmiş fiber optik kablodan oluşmaktadır. LIBS spektrumları her örneğin 4 farklı bölgesinden ve her bir bölgeden 10 ölçüm olarak toplanmıştır. Her örnek 3 paralelli olarak hazırlanmıştır. Aşağıda Şekil 3. 2 ile tez kapsamında kullanılan LIBS sistemi gösterilmiştir.



Şekil 3. 2 Tez kapsamında kullanılan LIBS sistemi

3.2.3 LIBS Verilerinin Analizi

Mevcut çalışma kapsamında LIBS verilerinin analizi amacıyla multivariat veri analiz yöntemlerinden PCA ve PLS metotları kullanılmıştır. Bu amaçla Stand-alone Chemometrics Software (PLS_Toolbox Versiyon 8.2 Windows 7, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, ABD) programından faydalanılmıştır. Kalibrasyon ve tahmin olmak üzere toplanan veri iki alt gruba ayrılmıştır. Aşağıdaki Çizelge 3. 2'de çalışma kapsamında kullanılan tereyağı ve margarin örneklerinden her birinin hangi veri seti grubuna dahil edildiği açıklanmıştır. Kalibrasyon modelleri Venetian Blinds çapraz validasyon ile valide edilmiştir. Geliştirilen kalibrasyon modellerinin performanslarının karşılaştırılması ve tahmin kabiliyetlerinin tanımlanması RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri üzerinden yapılmıştır. Bunlar içerisinde RMSEP değerinin modelin daha önce hiç karşılaşmadığı örneklerdeki performansını gösteren en iyi belirteç olduğu bilinmektedir. Kalibrasyon modellerinin kalite parametreleri olarak RSD, REP, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3. 2 Tereyağı ve margarin örnekleri hakkında detaylı bilgi

Örnek No	Örnek Türü	Üretim Yeri	Üretim Tarihi	PCA modelinde kullanım amacı
Marka 1	Tereyağı	Kemalpaşa, Bursa	24.09.2016	Kal
Marka 2	Tereyağı	Karacabey, Bursa	16.07.2016	Kal
Marka 2	Tereyağı	Karacabey, Bursa	21.03.2016	Pred
Marka 3	Tereyağı	Susurluk, Balıkesir	23.09.2016	Kal
Marka 4	Tereyağı	Bayramiç, Çanakkale	09.08.2016	Kal
Marka 5	Tereyağı	Merkez, Ankara	30.09.2016	Kal
Marka 5	Tereyağı	Merkez, Ankara	04.12.2016	Pred
Marka 6	Tereyağı	Vakfıkebir, Trabzon	04.01.2016	Kal
Marka 7	Tereyağı	Üsküdar, İstanbul	04.05.2016	Kal
Marka 7	Tereyağı	Üsküdar, İstanbul	15.02.2016	Kal
Marka 8	Tereyağı	Karacabey, Bursa	15.01.2016	Kal
Marka 9	Tereyağı	OSB, Eskişehir	17.09.2016	Kal
Marka 9	Tereyağı	OSB, Eskişehir	06.11.2016	Pred

Marka 10	Tereyağı	Meram, Konya	31.12.2016	Kal
Marka 11	Tereyağı	Pamukova, Sakarya	17.02.2016	Kal
Marka 12	Tereyağı	Kemalpaşa, Bursa	03.08.2016	Kal
Marka 13	Margarin	Üsküdar, İstanbul	19.12.2016	Kal
Marka 13	Margarin	Üsküdar, İstanbul	10.03.2016	Pred
Marka 14	Margarin	Ümraniye, İstanbul	21.04.2016	Kal
Marka 14	Margarin	Ümraniye, İstanbul	20.06.2016	Pred
Marka 15	Margarin	Pendik, İstanbul	12.01.2016	Kal
Marka 15	Margarin	Pendik, İstanbul	05.10.2016	Pred
Marka 16	Margarin	Pendik, İstanbul	20.02.2016	Kal
Marka 17	Margarin	Pendik, İstanbul	03.03.2016	Kal

Kal: Kalibrasyon, Pred: Tahmin

3.2.4 Tereyağı ve Margarin Örneklerinin ICP-MS ve FAAS ile Analizleri

Nitrik asit Merck (Billerica MA, ABD) and hidrojen peroksit Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Bütün sulu çözeltiler Milli-Q sisteminden (Millipore, Bedford, MA, ABD) elde edilen ultra saf su (18.2 MΩ.cm) ile hazırlanıp kullanılmıştır. Standart Cu, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn ve Mg kalibrasyon çözeltileri 1000 g/mL multielement standart çözeltisinden (Hacimce %2'lik HNO₃ çözeltisi içindeki mix24 Lab Chemical solutions, Hamminkeln, Almanya) nitrik asitle seyreltilerek hazırlanmıştır. ⁴⁵Sc and ⁷²Ge (Hacimce %5'lik HNO₃ çözeltisi içindeki 1000 mg/L mix24 Lab Chemical solutions, Hamminkeln, Almanya) iç standart olarak kullanılmıştır. KCl ve NaCl Sigma-Aldrich (Almanya) and Sigma-Aldrich (Danimarka) firmalarından temin edilmiştir. Lanthanumnitrat heksahidrat (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanımı yoluyla Ca(NO₃)₂ and La kullanılmıştır.

100 mg örnek 7.0 ml HNO₃ ve 1.0 ml H₂O₂ varlığında ETHOS EASY mikrodalga yakma sistemi (Milestone, Sorisole, İtalya) kullanılarak yakılmıştır. Her örnekten 3 paralel hazırlanmıştır. Mikrodalga yakma işlemi için sıcaklık 15 dak içerisinde 200°C'ye yükseltilmiş ve burada 15 dak bekletilmiştir. Mikrodalga fırının gücü ilgili literatür göz önünde bulundurularak 1800 W olarak seçilmiştir [173]. Soğutulduktan sonra poli-propilen tüpler içindeki örnekler deiyonize su ile 10.0 ml'ye tamamlanmıştır. Yakılan örnekler ICP-MS (7800 ICP-MS; Agilent, Santa Clara, CA) ve Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (Unicam 939) ile analiz edilmek üzere hacimce %2'lik HNO₃ kullanılarak 20 kat seyreltilmiştir. Örnek hazırlama basamaklarının aynen tekrar edilmesiyle kör (blank) örnekler hazırlanmıştır. Her analizden sonra hazneler 10 ml 1:1 oranında HNO₃:H₂O₂ karışımı ile mikrodalga temizleme programı kullanılarak temizlenmiştir. Bu amaçla sıcaklık 15 dak içerisinde 180°C'ye çıkarılmış ve 1800 W 180°C'de 10 dak tutulmuştur.

İlgili literatür göz önünde bulundurularak Cu, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn ve Mg elementlerinin analizi ICP-MS kullanılarak yapılmıştır [173, 174]. Cu, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn ve Mg elementlerinin standart çözeltileri 10.0 mg/L multielement standart çözeltilerinin taze olarak seyreltilmesi yoluyla hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri 0.5 ile 500 µg/L arasındaki on farklı konsantrasyonda hacimce %10'luk HNO₃ çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. ICP-MS koşullarının optimize edilmesi amacıyla indiyum içeren hacimce %5'lik HNO₃ çözeltisi (Labmix24, GmbH) kullanılmıştır. Cu, Cr, Mn, Fe, Ni, ve Mg ile Zn için internal standart olarak

hacimce %5'lik HNO₃ çözeltisi içindeki 1000 mg/L stok çözeltilerinden, sırasıyla, 1 µg/L ⁴⁵Sc ve ⁷²Ge hazırlanıp kullanılmıştır. ICP-MS için operasyon koşulları; plazma koşulları RF güç 1550 W, plazma Ar akış hızı 15 L/dak, yardımcı Ar akış hızı 0.80 L/dak, taşıyıcı Ar akış hızı 1.08 L/dak, örnekleme derinliği 8.0 mm, enstrüman örnekleme konisi nikel uçlu 1.0 mm çaplı orifice?, skimmer konisi nikel 0.4 mm çaplı orifice olarak kullanılmıştır. Ölçülen izotoplar ⁶³Cu, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁵⁷Fe, ⁶⁰Ni, ⁶⁶Zn ve ²⁴Mg'dir.

Tereyağı ve margarin örneklerindeki K, Na ve Ca elementlerinin miktarı emisyon modunda, hava-asetilen karışımı alevi ile FAAS kullanılarak belirlenmiştir. İlgili literatür göz önünde bulundurularak K, Na ve Ca elementlerine ait emisyon intensiteleri sırasıyla 766.5, 589.0 ve 422.7 nm dalgaboylarında ölçülmüştür [14, 175]. KCl, NaCl ve Ca(NO₃)₂ kullanılarak 1000mg/L standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması adına gerekli seyreltmeler bu standart çözeltilerden yapılmıştır. Kalibrasyon eğrileri 0.25 ile 5.0 mg/L aralığında beş farklı konsantrasyonda oluşturulmuştur. Kalsiyumun belirlenmesi için releasing agent olarak ağırlık/hacimce %0.1 La⁺ çözeltisi lantanum nitrat hexahidrat kullanılarak hazırlanmıştır. Sodyum ve potasyumun belirlenmesi için ağırlık/hacimce %0.2 K⁺ çözeltisi KCl tuzundan ve ağırlık/hacimce %0.2 Na⁺ çözeltisi NaCl tuzundan hazırlanarak iyonizasyon tampon çözeltileri olarak kullanılmıştır.

3.3 Tavuk Örneklerindeki Tağşişin RS ile Belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı; dondurma-eritme döngülerinin lipit fazında neden olduğu değişikliklerin Raman spektroskopisi kullanılarak takip edilmesi yoluyla dondurulup eritilmiş tavuk ile taze tavuğun birbirinden ayrılmasıdır. Bu amaçla herhangi bir dondurma-eritme döngüsüne maruz kalmamış örnekler temin edildikten sonra kontrollü koşullarda haftalık ve aylık olarak dondurma-eritme döngülerine maruz bırakılmıştır. Söz konusu örneklerden iki farklı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen lipit fazı Raman spektroskopisiyle analiz edilmiştir. Sınıflar arası farklılaşma kemometrik diskriminasyon yöntemlerinden PLS-DA ile ortaya konmuştur. Dondurma-eritme döngüleri nedeniyle Raman spektrumlarında meydana gelen değişiklikler majör bantların konum, pik yüksekliği ve pik alanı

değerleri üzerinden yorumlanmıştır. Q-TOF LC/MS kullanılarak lipit fazında gerçekleşen değişiklikler metabolomiks analizi sonuçlarıyla ortaya konmuştur.

3.3.1 Tavuk Örneklerinin Temini ve Analize Hazırlanması

Analitik n-hekzan Sigma-Aldrich (Münih, Almanya) ve %99.9 saflıktaki azot gazı Oksan (Ankara, Türkiye) firmalarından temin edilmiştir. Tekirdağ ilindeki beş farklı yerel kasaptan günlük kesilen tavuk örneklerinin kanat kısımları temin edilmiştir. Örnekler soğutucu özellikli, 4°C sabit sıcaklıktaki termal izolasyonlu örnek saklama kaplarıyla laboratuvara transfer edilmiştir. Herbir örnek grubu yaklaşık 650 g olup içerisinde 20 adet derisinden ayrılmamış kanat bulundurmaktadır. Aşağıda Şekil 3. 3'te tez kapsamında kullanılan tavuk örneklerinden tek bir paralel için kullanılan dört parça tavuk gösterilmiştir.



Şekil 3. 3 Yağ ekstraksiyonunda kullanılmak üzere hazırlanan tavuk örneği

Öncelikle her bir kanat örneği kemiğinden ayrılmıştır. Ardından beş farklı örnek grubu karıştırılıp buradan dondurma-eritme uygulamalarında kullanılmak üzere yeni örnek setleri hazırlanmıştır. Bu amaçla her dört parça kanat örneği ayrı bir polietilen torbaya koyulmuş ve her bir deney seti için beşer torba örnek kullanılmıştır.

Dondurma-eritme süreçlerinde incelenen örnekler taze, haftalık bazda bir kere dondurulup-eritilmiş (1H-1DE), haftalık bazda iki kere dondurulup-eritilmiş (2H-

2DE), aylık bazda bir kere dondurulup-eritilmiş (1A-1DE) ve aylık bazda iki kere dondurulup-eritilmiş (2A-2DE) olmak üzere beş gruba ayrılmış ve Şekil 3. 4 ile gösterilmiştir. Uygulanan dondurma işlemi -18°C 'de aylık veya haftalık olarak yapılırken eritme işlemi 12 sa süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ buzdolabı sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1H-1DE örnekleri bir hafta süreyle -18°C 'de bekletildikten sonra 12 sa süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ buzdolabı sıcaklığında eritilip yağ ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu durumda bir dondurma-eritme döngüsü tamamlanmıştır. 2H-2DE örnekleri ise bir hafta süreyle -18°C 'de bekletildikten sonra 12 sa süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ buzdolabı sıcaklığında eritilip ardından yeniden bir hafta süreyle -18°C 'de bekletilmiş ve yeniden 12 sa süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ buzdolabı sıcaklığında eritilmiştir. Bu durumda iki dondurma-eritme döngüsü tamamlanmıştır. Benzer şekilde 1A-1DE ve 2A-2DE örnekleri hazırlanmış olup dondurarak saklama süresi bu örnekler için bir döngüde bir ay olacak şekilde uygulanmıştır. Döngülerin uygulanması sırasında örnekler paketlerinden çıkarılmamıştır. Ancak döngüler tamamlandıktan sonra örnekler paketlerinden çıkarılıp ekstraksiyon basamağına geçilmiştir.



Şekil 3. 4 Dondurulmak üzere paketlenen tavuk örnekleri

3.3.2 Tavuk Yağlarının Ekstraksiyonu

Kemiksiz kanat örnekleri laboratuvar tipi bir blender kullanılarak homojenize hale getirilmiştir. Bir set deneydeki 4 kanat örneği için 50 ml n-hekzan kullanılmıştır. Örnek-hekzan karışımı bir havanda iyice dövüldükten sonra yağ ekstraksiyonunu arttırmak amacıyla Stomacher BagMixer® 400 P (Interscience, St Nom, France) kullanılarak 120 s boyunca tekrar homojenizasyon yapılmıştır. Stomacher torbasının üst kısmında biriken yağ-hekzan karışımı ependorf tüplerine transfer edilmiştir. Tüpler 4°C'de 15 dak 9361 g hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant toplanmıştır. Toplanan yağ fazı filtre kağıdından geçirilip safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Ardından, elde edilen yağ-çözücü karışımından 50°C'deki su banyosunda azot gazı altında hekzanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen yağ örnekleri analiz edilinceye kadar +4°C buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

Tavuk örneklerinden yağ ekstrakte edilmesi amacıyla iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Burada amaç polarite indeksleri farklı derecelerde olan çözücülerin kullanılması ve bu sayede farklı polaritelere sahip lipit alt gruplarının ekstraksiyonunun sağlanmasıdır. Polarite indeksi; çözücünün farklı polar test çözünenleriyle girdiği interaksiyonun derecesinin relatif bir ölçüsüdür. Hekzanın polarite indeksinin 0.1 olduğu durumda, kloroform, metanol ve suyun polarite indeks değerleri sırasıyla 4.1, 5.1 ve 10.2 olarak belirtilmektedir [176, 177]. Uygulanan ikinci ekstraksiyon yöntemi gıdalardan yağ ekstraksiyonu işlemlerinde referans yöntem olarak kabul edilen Folch yöntemidir [69]. Bu yöntemde her bir örnek için homojenize edilen 4 adet tavuk kanat örneği üzerine 2:1 kloroform:metanol çözeltisinden 50 ml eklenmiştir. Bu karışım 30 dak süreyle karıştırılmıştır. Karışım kaba filtre kağıdından geçirilerek safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yağ-çözücü karışımında 15 dak süreyle 9361 g hızda santrifüj yapılarak faz ayrımı sağlanmıştır. Üstteki faz ve ara faz toplanıp uzaklaştırıldıktan sonra alttaki kloroform fazı ayrı bir yerde toplanmıştır. Elde edilen filtrat kloroform ve olası metanol kalıntıları uzaklaştırılana dek 50°C'deki vakum etüvde bekletilmiştir. Çözücülerin tamamen uzaklaştırılmasının ardından elde edilen yağ örnekleri analiz edilinceye kadar +4°C buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

3.3.3 RS Ölçümlerinin Alınması

İki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen tavuk yağı örneklerine ait Raman spektrumlarının toplanması amacıyla 785 nm lazer kaynağı ve CCD dedektöre sahip DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi (DeltaNu Inc., Laramie, WY, ABD) kullanılmıştır. Ölçüm parametreleri kullanılan sistemde yüksek seviye olarak belirtilen 100 mW lazer gücü ve 30 s integrasyon süresi olarak ayarlanmıştır. Elde edilen Raman spektrumları 200 ile 2000 cm⁻¹ aralığındadır.

3.3.4 RS Verilerinin Analizi

Her bir örnek küvetinden 3 paralelli ölçüm alınıp bunların ortalama değeri o örneğe ait ortalama Raman spektrumu olarak kaydedilmiştir. Spektrumlara kullanılan arayüz tarafından baseline düzeltmesi uygulanmıştır. Ekstrakte edilen tavuk yağı örnekleri Raman spektroskopisi ölçümlerinin öncesinde 1 sa süreyle 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Isıtılan örneklerin hızlıca ölçümleri alınmıştır.

Toplanan Raman spektrumlarının diskriminasyon amaçlı analizinde PLS-DA yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla Stand-alone Chemometrics Software (PLS_Toolbox Versiyon 8.2 Windows 7, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, ABD) programından faydalanılmıştır. Toplanan veri kalibrasyon ve tahmin olmak üzere ikiye bölünmüştür. Venetian Blinds çapraz validasyon tekniği ile kalibrasyon modelinin validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerinin performansları RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri üzerinden yapılmıştır. PLS-DA yönteminin sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan kalitatif performans parametrelerinden doğru pozitif (DP), yanlış pozitif (YP), doğru negatif (DN) ve yanlış negatif (YN) oranlarından oluşan konfüzyon matrisi değerleri ile duyarlılık ve özgüllük değerleri kullanılmıştır. Yanlış pozitif oranı; negatif olduğu bilinen bir test örneğinin model tarafından pozitif olarak sınıflandırılma oranıdır.

Aşağıda bu değerlerin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler verilmiştir.

$$\text{Yanlış pozitif oranı} = \frac{\text{Yanlış pozitif}}{\text{Doğru negatif} + \text{Yanlış pozitif}} \quad \text{Eş. 29}$$

Yanlış negatif oranı; pozitif olduğu bilinen bir test örneğinin model tarafından negatif olarak sınıflandırılma oranıdır [178].

$$\text{Yanlış negatif oranı} = \frac{\text{Yanlış negatif}}{\text{Doğru pozitif} + \text{Yanlış negatif}} \quad \text{Eş. 30}$$

Duyarlılık (sensitivity); kalitatif metotlarda metodun gerçek pozitif değerleri pozitif olarak tahmin edebilme yeteneğidir. Duyarlılık oranı ise pozitif olduğu bilinen test örneğinin pozitif olarak sınıflandırılma oranıdır.

$$\text{Duyarlılık oranı} = \frac{\text{Pozitif test örnekleri}}{\text{Total gerçek pozitif örnek sayısı}} \quad \text{Eş. 31}$$

$$= \frac{\text{Doğru pozitif}}{\text{Doğru pozitif} + \text{Yanlış negatif}}$$

Özgüllük (specificity); metodun gerçek negatif değerleri negatif olarak tahmin edebilme yeteneğidir. Özgüllük oranı ise negatif olduğu bilinen test örneğinin negatif olarak sınıflandırılma oranıdır [179].

$$\text{Özgüllük oranı} = \frac{\text{Negatif test örnekleri}}{\text{Total gerçek negatif örnek sayısı}} \quad \text{Eş.32}$$

$$= \frac{\text{Doğru negatif}}{\text{Doğru negatif} + \text{Yanlış pozitif}}$$

3.3.5 Tavuk Yağı Örneklerinin Q-TOF LC/MS ile Metabolomik Analizleri

İzopropil alkol, asetonitril, asetik asit ve amonyum asetat tamponu Sigma-Aldrich (Münih, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Yağ örnekleri Q-TOF LC/MS analizi öncesinde ekstra bir lipit ekstraksiyonu basamağından geçirilmiştir. Bu amaçla 100 µL birleştirilmiş örnek temiz bir tüpe yerleştirilip üzerine 300 µL izopropil alkol (İPA) ilave edilmiştir. Tüp içeriği 5 dak vortekslelendikten sonra, 16000 rpm hızda 45 dak süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst İPA fazı Q-TOF LC/MS analizleri için kullanılmıştır. Bu basamaklar her bir gruba ait birleştirilmiş örnek için tekrarlanmıştır. İPA ile ekstraksiyon basamağından sonra elde edilen örnek 6 farklı vial bölünmüştür. Beş farklı örnek grubu için toplamda 30 vial elde edilmiştir. Her grubun ilk üç viali 40 µL örnek+40 µL mobil faz olmak üzere eşit konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Bu üç vial ile tekrarlanabilirlik kontrol edilmiştir. Kalan üç vial ise regresyon analizi amacıyla hazırlanmıştır. Metabolomik analizlerde dilüsyon serisi hazırlama yoluyla regresyon analizi gerçekleştirilmekte ve bu sayede gürültü veya kirlilikten kaynaklanan pikler belirlenmektedir. Regresyon analizi amacıyla azalan konsantrasyonlarda; 4.vial: 30 µL örnek+50 µL mobil faz, 5.vial: 20 µL örnek+60 µL mobil faz, 6.vial: 10 µL örnek+70 µL mobil faz eklenerek hazırlanmıştır. Dilüsyon setlerinde yapılan regresyon analizi sonrasında $R < 0.90$ ve $p > 0.05$ değerlerindeki pikler toplanan veri grubunun dışında bırakılmıştır.

Örnek hazırlama aşamalarından kaynaklanan rasgele hatalar kıyaslama setleri arasında pozitif veya negatif hatalara neden olabilmektedir [180]. Birleştirilmiş örneklerin (pooled samples) hazırlanması yoluyla örnek hazırlamadan kaynaklanan rasgele hatalar elimine edilmektedir. Bu kapsamda tez çalışmasında, homojenliğin artırılması ve aynı grupta bulunan örnekler arasındaki varyasyonların azaltılması adına Q-TOF LC/MS ile analiz edilmek üzere birleştirilmiş örnekler hazırlanmıştır. Birleştirilmiş örnek hazırlanması için bir gruba ait beş paralelin her birinden 60 µL örnek alınarak her bir grup için 300 µL birleştirilmiş örnek hazırlanmıştır.

Q-TOF LC/MS ölçümlerinin gerçekleştirilmesi adına Agilent 6530 Q-TOF LC/MS cihazı (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) kullanılmıştır. Kromatografi kolonu olarak C18 kolon (Agilent Zorbax) kullanılmıştır. Kolon 1.8 µM partikül

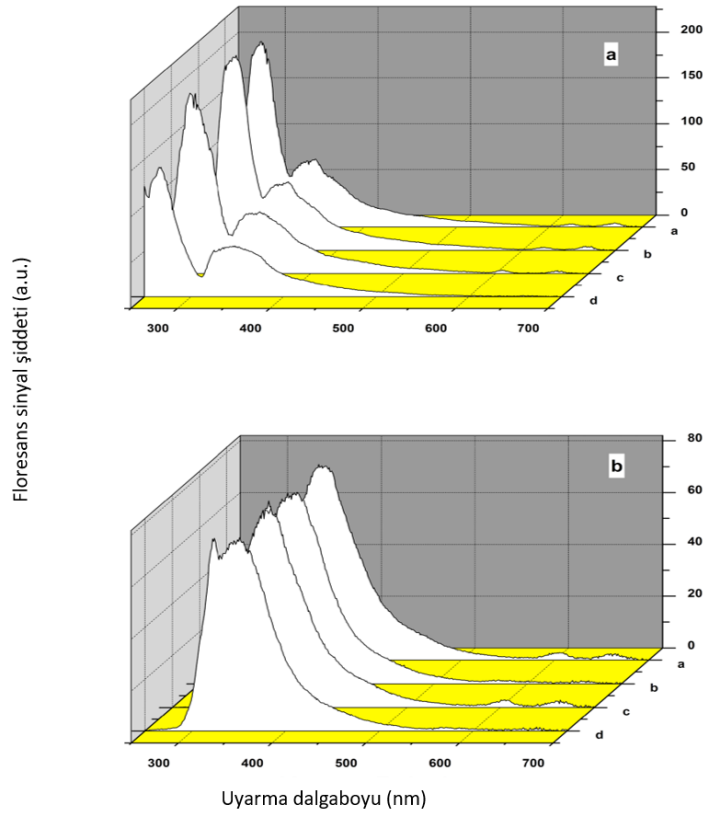
boyutu, 50 mm uzunluk ve 2.1 mm iç çap değerlerine sahiptir. Mobil faz olarak A hattında %0.1 asetik asit içeren %1'lik 1 M amonyum asetat tamponu, B hattında 70:30 asetonitril: izopropil alkol ile karıştırılmış %0.1 asetik asit içeren %1'lik 1 M amonyum asetat tamponu kullanılmıştır. Gradyent elüsyon 1. dakikaya kadar %45, 3. dakikaya kadar %25, 8.dakikaya kadar %11 ve 11. dakikaya kadar %0 A hattıyla yapılmıştır. Q-TOF LC/MS 0.200 ml/dak akış hızı, 65 °C kolon sıcaklığı ve 100-1700 m/z tarama hızında 10 µL enjeksiyon hacmi parametreleriyle çalıştırılmıştır. Her bir örnek sisteme iki paralel olarak enjekte edilmiştir.

Ham veri dosyaları ProteoWizard (Palo Alto, CA) programı kullanılarak XCMS metabolit profilleme altyapısına (<https://xcmsonline.scripps.edu>) yüklenebilecek mxml formatına dönüştürülmüştür. XCMS; <http://metlin.scripps.edu/download/> bağlantısıyla direkt erişime açık ücretsiz bir programdır. XCMS kullanımıyla şiddeti kontrol grubuna kıyasla 1.5 kattan fazla değişen potansiyel moleküllerin belirlenmesi ve piklerin anlamlandırılarak örneklerin yarıkantitatif olarak değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. XCMS, her bir örnek için lineer olmayan bir alıkonma süresi (AS) düzeltme profili hesaplayarak metabolit tanımlamasına gitmektedir. Bu programda metabolit iyon intensiteleri spesifik metabolitlerdeki değişikliklerle kıyaslanmaktadır. Söz konusu çalışmaya ait PCA işlemleri MetaboAnalyst 4.0 programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bu programa ise <http://www.metaboanalyst.ca/> bağlantısıyla erişilebilmektedir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Tahin Örneklerindeki Tağışın SFS ile Belirlenmesi

SFS tekniği kullanılarak AY karışımı ve TY karışımına ait SF spektrumları farklı dalgaboyu aralığı ($\Delta\lambda$) değerlerinde; a) 20 nm, b) 40nm, c) 60 nm ve d) 80 nm elde edilmiş ve ilgili sonuçlar Şekil 4. 1 ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 1 a) TY ve b) AY karışımının SF spektrumları

Şekil 4. 1 incelendiğinde her iki örnek grubunda ortak olarak gözlenen bandın 348-355 nm arasında konumlandığı görülmektedir. Söz konusu bandın sinyal şıddeti TY karışımı için yaklaşık 50 birim iken AY karışımı için yaklaşık 70 birimdir. Literatürde rapor edilen çalışmalarda bu bant yağın tokoferol içeriğiyle ilişkilendirilmekte olup yağın tokoferol kompozisyonuna bağlı olarak söz konusu bandın pik noktası konumunun değişebileceği belirtilmektedir [181]. TY karışımında gözlenen ikinci bant 266-291 nm aralığında konumlanmıştır. Bu bant 315 nm dalgaboyunun altında konumlanmış olup literatürde fenolik madde içeriğiyle ilişkilendirilmekte ve genellikle rafine edilmemiş yağlarda

gözlenmektedir [12, 182]. Elde edilen sonuç ilgili literatürle uyum içerisindedir. AY ve TY karışımlarının SF spektrumlarında bu bant nedeniyle gözlenen farklılık mevcut çalışmanın temelini oluşturmuştur. Bu farklılık sayesinde iki farklı gruba ait yağ örnekleri birbirinden başarıyla ayrılmıştır.

Bitkisel yağlar güçlü birer vitamin E kaynağı olarak bilinmektedir. Vitamin E; 4 tokoferol (α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol and δ -tokoferol) ve 4 tokotrienol (α -tokotrienol, β -tokotrienol, γ -tokotrienol and δ -tokotrienol) olmak üzere 8 doğal izomerden oluşmaktadır. Bunlar arasında en aktif formun α -tokoferol olduğu ve ayçiçek yağındaki konsantrasyonunun 500–600 mg/kg arasında değiştiği belirtilmektedir [183]. Bitkisel yağların SFS tekniği ile incelendiği çalışmalarda SF spektrumlarında majör olarak tokoferol ve klorofil gruplarının gözlemlendiği bildirilmiştir [184].

SFS tekniği ile her bir yağ örneğine zđđ spektral parmak izleri uyarma ve emisyon dalgaboylarının simültane olarak taranması yoluyla elde edilmiştir. Elde edilen spektrumlarda çok fazla bilgi bulunması geleneksel veri analizi yöntemleriyle kalitatif ve kantitatif sonuçlara gidilmesini zorlaştırmaktadır. Bu zorluğun aşılması amacıyla kalitatif değerlendirme için PCA, kantitatif regresyon analizleri için ise PLSR, MLR ve PCR teknikleri kullanılmıştır.

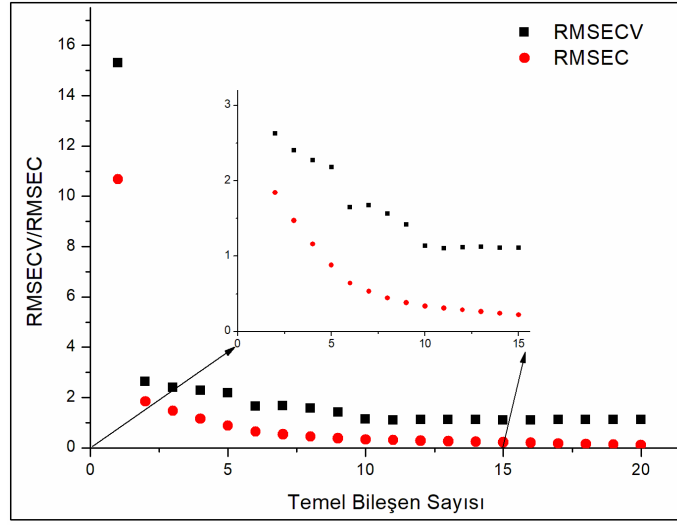
PCA analizinde saf TY ve saf AY rneklerinin yanı sıra veri sayısının arttırılması adına ikili TY ve ikili AY karışımları da veri analizine dahil edilmiştir. Kalibrasyon modelinde toplam 33, tahmin modelinde toplam 13 örnek kullanılmıştır. PCA analizinde kullanılacak verinin toplanması için dalgaboyu aralığı ($\Delta\lambda$) değer 50 nm olarak girilmiş ve toplanan verinin tamamı kullanılmıştır. Yapılan PCA analizi ile her bir gruba ait örneğin model içerisindeki davranışı incelenmiştir. Öncelikle toplanan SFS verisine herhangi bir önişlem uygulanmadan toplanan veri eksploratif olarak incelenmiştir. nişlemsiz olarak kurulan kalibrasyon modeline ait bilgiler izelge 4. 1 ile özetlenmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde ilk iki temel bileşen kullanarak toplam varyansın %99.45'inin açıklandığı görülmektedir. Bu oran %100'e oldukça yakın olup tatmin edici bir sonuç olarak değerlendirilmektedir.

Çizelge 4. 1 Tahin ve ayçiçek yağlarının PCA modeline ait bilgiler

Önişlem	TBS	RMSEC	RMSECV	%Varyans-TB1	%Varyans-TB2
Yok	6	0.64	1.65	81.50	17.95

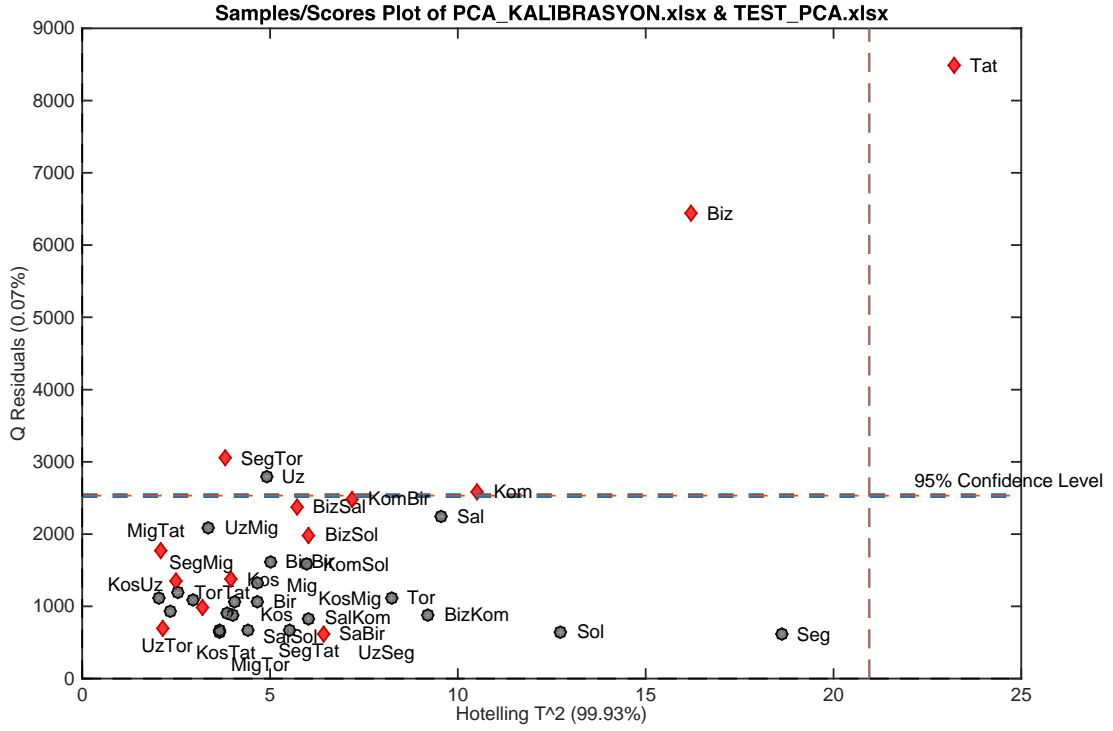
Kalibrasyon modelinin kurulmasında TBS sayısı belirlenirken RMSEC ve RMSECV değerlerinin artan bileşen sayısıyla değişim grafiği dikkate alınmıştır. Veri setindeki varyasyon toplamda maksimum 20 temel bileşen ile açıklanmaktadır. Fakat, 6. temel bileşenenden sonra RMSEC ve RMSECV değerlerindeki değişimin çok az olduğu tespit edilmiş ve kalibrasyon modelinin kurulmasında 6'dan fazla temel bileşenin gerekli olmadığına karar verilmiştir.

Şekil 4. 2'de RMSECV ve RMSEC değerlerinin artan temel bileşen sayısı ile değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4. 2 RMSECV ve RMSEC değerlerinin artan TBS ile değişimi

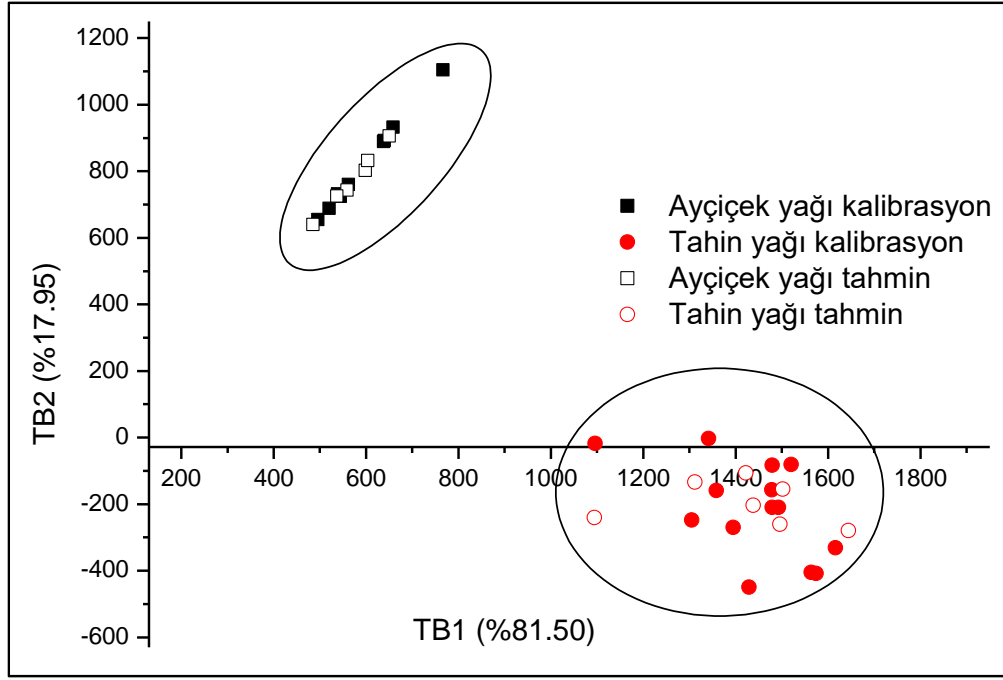
Kalibrasyon modelinin kurulmasında kullanılan örneklerin model içerisindeki davranışlarının anlaşılması açısından Hotelling's T^2 ile Q-Residuals değerlerinin örneklere göre değişim grafikleri incelenmiştir. İlgili grafik Şekil 4. 3 ile gösterilmektedir.



Şekil 4. 3 PCA modeline ait Hotelling's T^2 - Q-Residuals değerleri

Şekil 4. 3 incelendiğinde kalibrasyon ve tahmin grubunda bulunan örneklerin büyük bir kısmının %95 güven aralığı limit çizgileri içinde bulunduğu görülmektedir. Biz ve Tat kodlarıyla ifade edilen örnekler ise bu çizgilerden oldukça uzakta konumlanmıştır. Bu örnekler tahmin modelinde yer almakta olup Biz kodlu örneğin AY, Tat kodlu örneğin TY grubunda yer aldığı bilinmektedir. Bu noktada amaç yalnızca veri davranışını incelemek olduğundan sapan veri (outlier) olarak nitelendirilebilecek olan bu veriler analiz dışında bırakılmamıştır. Bunun yanında Hotelling's T^2 değeri %99.93; Q-Residuals değeri %0.07 olarak hesaplanmıştır. İlgili literatürle uyumlu olarak [185], Hotelling's T^2 değerinin %100'e, Q-Residuals değerinin %0'a yakın olduğu görülmektedir.

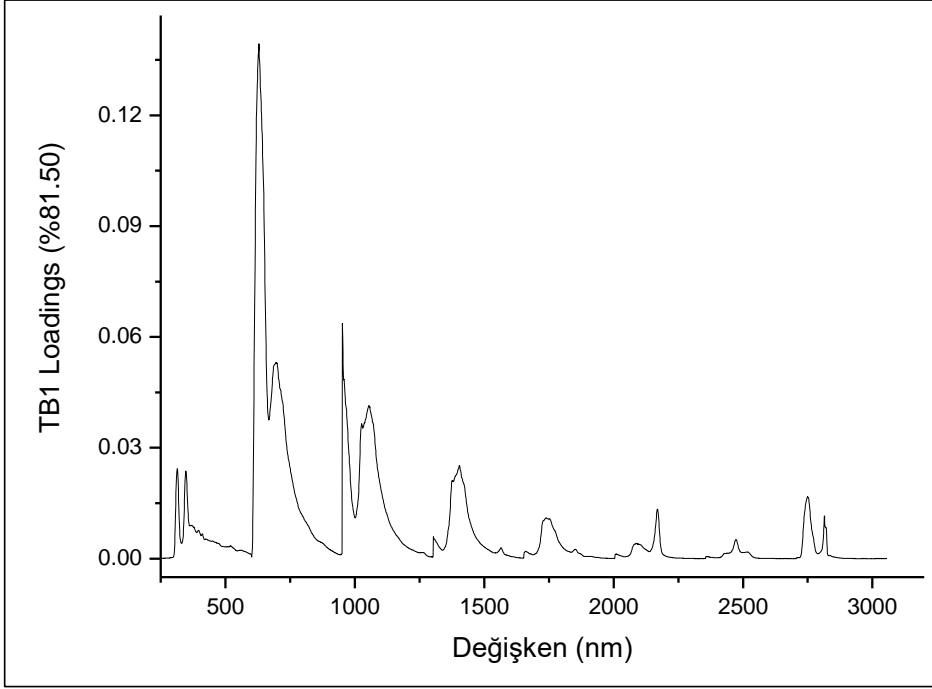
TY ve AY örneklerinin kalitatif analizi amacıyla geliştirilen PCA kalibrasyon modeline ait skor grafiği Şekil 4. 4 ile verilmiştir.



Şekil 4. 4 Geliştirilen kalibrasyon modeline ait PCA skor grafiği

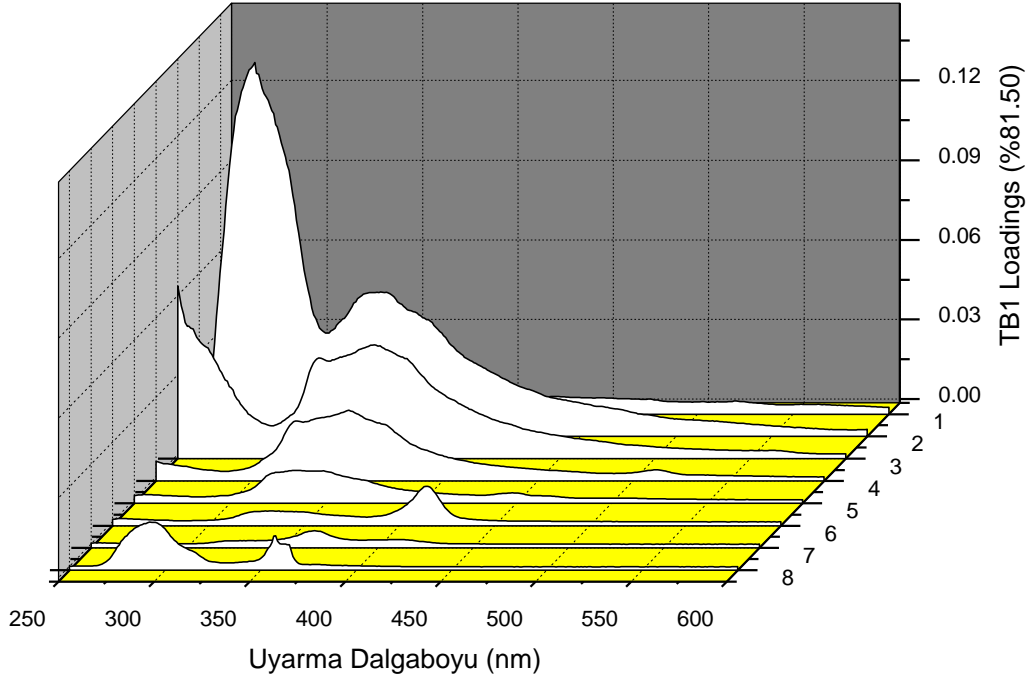
Şekil 4. 4 incelendiğinde AY ve TY karışımlarının birbirinden başarılı bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Test verisi kullanılarak geliştirilen kalibrasyon modeli daha önce hiç görmediği yeni bir veri grubuyla başarılı bir şekilde test edilmiştir. Kalibrasyon modeli çapraz validasyon yöntemlerinden 'Venetian blinds' metodu kullanılarak valide edilmiştir. Maksimum TBS 20 ve veri aralık sayısı 10 olarak kullanılmıştır. Program tarafından kullanılan algorithmada veri boyutuna bağlı olmak kaydıyla söz konusu çapraz validasyon yönteminde verinin minimum %9, maksimum %13 ve ortalama %10'luk kısmı dışarıda bırakılmaktadır.

Geliştirilen PCA modeline ait loadings grafiği Şekil 4. 5 ile verilmiştir. Loadings grafiği incelendiğinde yüklenen toplam veri setinin aynı boyuttaki 8 gruptan oluştuğu rahatlıkla görülmektedir. Her bir veri setinde ayırma katkı sağlayan iki temel bandın olduğu anlaşılmaktadır. En büyük katkının ise 0.14 oranıyla 2.grup veri setinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Buna göre 2. gruptan sonra $\Delta\lambda$ değeri arttıkça bantların ayırma olan katkısı azalmaktadır. Başlangıç $\Delta\lambda=10$ nm olup 50 nm artışla veri toplantiği göz önünde bulundurulursa ikinci veri setinin $\Delta\lambda=60$ nm değerinde toplanan gruba karşılık geldiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 5 Geliştirilen PCA modeline ait loadings grafiği

Söz konusu loadings grafiği uyarma dalga boyuna (250-600 nm) karşılık her bir dalgaboyu aralığı değeri için ayrı ayrı çizildiğinde ayırma olanak sağlayan bantların yağ bileşimine özgü olan ve 266-291 nm ile 348-355 nm aralığında konumlanmış karakteristik bantlar olduğu görülebilmektedir. İlgili grafik Şekil 4. 6 ile verilmiştir.



Şekil 4. 6 Geliştirilen PCA modeline ait 1) $\Delta\lambda=10$ nm; 2) 60 nm; 3) 110 nm; 4) 160 nm; 5) 210 nm; 6) 260 nm; 7) 310 nm ve 8) 360 nm'deki loadings spektrumları

Tahin örneklerindeki tağşişin SFS tekniği ile belirlenmesi çalışması kapsamının ikinci kısmını kantitatif yöntemin geliştirilmesi oluşturmaktadır. AY kullanılarak tağşişe uğratılmış TY örneklerindeki tağşiş oranının belirlenmesi amacıyla PLSR, MLR ve PCR metotları kullanılarak regresyon modelleri geliştirilmiştir. Her metotta her bir $\Delta\lambda$ değeri için kalibrasyon ve tahmin modelleri oluşturulmuştur. Bu amaçla saf AY ve TY örnekleri ile artan oranda tağşişe uğratılmış TY örneklerine ait spektrumlar %0'dan %100'e doğru sıralanmıştır. Her bir konsantrasyona ait üç paralelin üç spektrumu da model inşa edilirken kullanılmıştır. Kalibrasyon ve tahmin kısmına hangi örneklerin yükleneceği rasgele seçilmiştir.

Regresyon analizlerinde $\Delta\lambda$ değeri 20, 40, 60 ve 80 nm ayarlanarak toplanmış veriler ayrı ayrı analiz edilmiştir. Burada farklı $\Delta\lambda$ değerlerinde toplanan verilerin model başarısına etkisinin incelenmesi ve her bir regresyon metodu için optimum $\Delta\lambda$ değerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan program tarafından interval PLS (iPLS) algoritması ile sağlanan 'dalga boyu aralığı seçim modu (Wavelength Selection Mode-WSM) uygulanmıştır [186]. Buna göre her bir $\Delta\lambda$ değerinde toplanan tüm verinin kullanılması durumuyla bu veri seti içerisinde program

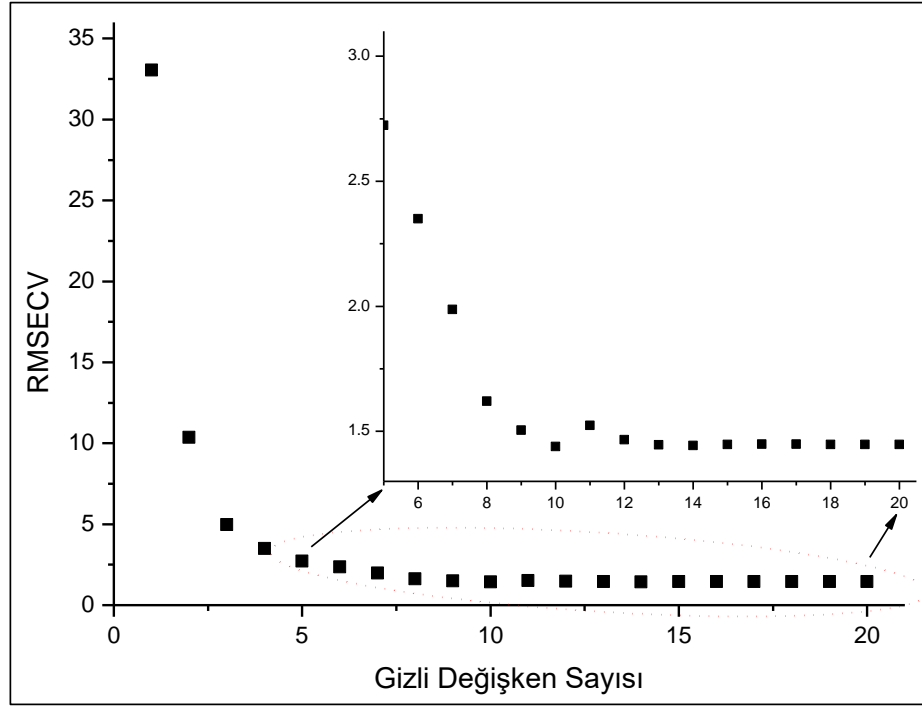
tarafından seçilen bir kısım verinin kullanılması durumları karşılaştırılmıştır. İlgili literatürde optimum dalgaboyu aralığı seçiminin önemi; korele olmayan bileşenlerin elimine edilmesi, hesaplama süresi ve depolama alanının azaltılması ile kurulan modellerin tahmin yeteneğinin geliştirilmesi gibi önemli noktalar açısından vurgulanmaktadır [187]. Çizelge 4. 2’de programın WSM özelliği ile herbir regresyon metodu için herbir $\Delta\lambda$ değerinde toplanan veride kullanılmak üzere önerilen dalgaboyu aralıkları verilmiştir. Aşağıdaki çizelgelerde, PLSR*, MLR* ve PCR* ile ifade edilen kısımlar WSM özelliğinin kullanılması durumunda elde edilen sonuçları göstermektedir.

Çizelge 4. 2 iPLS ile regresyon metotları için önerilen dalgaboyu aralıkları

$\Delta\lambda(\text{nm})$	20	40	60	80
PLSR	300-600	340-600	260-600	340-600
MLR	280-600	340-600	260-600	340-600
PCR	340-600	420-600	260-600	340-600

Çizelge 4. 2 incelendiğinde $\Delta\lambda=60$ ve $\Delta\lambda=80$ nm değerlerinde kullanılan regresyon yönteminden bağımsız olarak aynı dalgaboyu aralığının program tarafından önerildiği görülmektedir. Buna rağmen regresyon yöntemlerinin kullandığı algoritmalar arasındaki farklılıklar nedeniyle aynı dalgaboyu aralığı kullanılsa da farklı regresyon yöntemleri kullanılarak elde edilen modellerin birbirinden farklı sonuçlar verdiği görülecektir. Öte yandan $\Delta\lambda=20$ ve 40 nm ile toplanan veri setinin kullanılması durumunda farklı regresyon yöntemlerinde kullanılmak üzere farklı dalgaboyu aralıkları önerilmiştir. PLSR, MLR ve PCR yöntemleri ile kurulan kalibrasyon ve tahmin modellerine ait bilgiler ile modellerin kalite parametreleri aşağıdaki çizelgelerde özetlenmiştir. Kurulan modeller LOD, LOQ, RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri ile R^2 , RSD ve REP değerleri üzerinden değerlendirilmiştir. TY’nın AY ile tağışışının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla kurulan PLSR ve PCR temelli kalibrasyon ve tahmin modelleri inşa edilirken öncelikle modelin kaç adet gizli değıışken (latent variable:GD)

kullanılarak kurulacağına karar verilmiştir. Bu amaçla RMSECV değerleri artan GD değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. Burada RMSECV değerinin minimize olduğu ilk nokta dikkate alınıp kalibrasyon modelinin inşa edilmesinde bu noktaya karşılık gelen sayıda GD kullanılmıştır. Söz konusu duruma örnek teşkil etmesi açısından Şekil 4. 7’de temel hat düzeltmesi (baseline correction-BLC) önişlemi ile kurulan modele ait RMSECV değerlerinin GD ile değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4. 7 RMSECV değerlerinin artan GDS ile değişimi

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi 10.LV’ye kadar RMSECV değerinde önemli bir düşüş görülürken bu noktadan sonraki salınımlar çok anlamlı değildir. Böyle bir modelin 10 GD kullanılarak kurulması uygundur. PLSR, MLR ve PCR ile kurulacak kalibrasyon modellerinin başarısını etkileyen bir diğer parametre modele yüklenecek olan veriye uygulanan önişlemlerdir. Bu noktada kullanılan program tarafından sunulan pek çok önişlem seçeneği bulunmaktadır. Tez çalışması kapsamını sınırlandırabilmek adına önişlemlerin etkisi $\Delta\lambda=20$ nm ile toplanan veri kullanılarak PLSR modeli üzerinden incelenmiştir. Burada başarılı sonuç veren önişlem MLR ve PCR modellerinde de kullanılmıştır. Uygulanan veri analizinin temel amacı regresyon yöntemlerini kıyaslamak olduğundan önişlem ve TBS

parametreleri sabit tutulmuştur. Çizelge 4. 3'te farklı önışlemlerle kurulan kalibrasyon modellerine ait bilgiler özetlenmiştir. Çizelge 4. 4'te ise farklı önışlemler uygulanarak kurulan PLSR modellerinin performans parametreleri özetlenmiştir.

Çizelge 4. 3 Farklı önışlemlerle kurulan PLS modellerine ait bilgiler

Önişlem	TBS	RMSEC	RMSECV	RMSEP	%Varyans GD1	%Varyans GD2
Yok	10	0.57	1.44	1.39	88.38	10.91
BLC	10	0.57	1.44	1.41	87.68	11.56
SMO	10	0.89	1.53	1.21	88.92	10.50
NORM	10	0.27	0.92	1.26	89.65	9.65
MCN	10	49.25	49.24	49.04	93.54	4.68
DET	10	0.55	1.45	1.42	81.36	17.57
1DERIV	10	0.54	1.66	1.81	68.22	26.97
SMO+1DERIV	10	0.54	1.66	1.81	68.22	26.97
NORM+DET	10	0.26	0.88	1.25	83.72	15.23
NORM+SMO	10	0.46	0.70	1.04	90.15	9.28

Çizelge 4.3 ve 4.4 incelendiğinde MCN dışındaki önışlemler sonucunda takip edilen parametreler genel olarak kabul edilebilir seviyelerde bulunmuştur. MCN önışlemi spektroskopik verilerin kemometrik analizinde sıklıkla kullanılan bir önışlem olmasına rağmen söz konusu çalışmada RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinin çok yüksek olduğu görülmektedir. MCN önışlemiyle elde edilen REP değerlerinin de çok yüksek olduğu görülmektedir. Kalibrasyon ve tahmin modellerine ait belirleme katsayısı ile LOD ve LOQ değerleri kabul edilebilir seviyelerdedir. Söz konusu durum önışlem seçiminde birden fazla parametrenin bir arada değerlendirilmesinin kritik bir önem taşıdığını açıkça göstermektedir.

Çok yüksek hata oranlarına sahip bu modelde R^2 değerlerinin yüksek olması tek başına anlam taşımamaktadır. Buradan yola çıkarak yalnızca R^2 değerleri dikkate alınarak model oluşturulmasının hatalı sonuca neden olacağı da görülmektedir. Geriye kalan önışlemler arasında NORM+DET önışlemleri RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinin düşük olması, ilk iki temel bileşenin varyans açıklama oranlarında önemli bir kayıp olmaması, kalibrasyon modeli üzerinden hesaplanan RSD değerinin düşük olması gibi sebeplerle seçilmiştir. Bu noktadan sonra PLSR, MLR ve PCR teknikleri kullanılarak kurulan bütün modellerde NORM+DET önışlemleri kullanılmıştır.

Çizelge 4. 4 Farklı önışlemlerin PLSR modellerine etkisi

Önışlem	REP	RSD	LOD	LOQ	Kal- R^2	CV- R^2	Pred- R^2
Yok	10.56	5.73	0.40	1.33	0.9997	0.9984	0.9992
BLC	11.55	6.10	0.38	1.25	0.9997	0.9984	0.9991
SMO	11.26	22.29	0.87	2.90	0.9994	0.9992	0.9990
NORM	16.45	4.40	0.86	2.87	0.9999	0.9995	0.9993
MCN	654.14	1.07	1.51	5.03	0.9999	0.9995	0.9995
DET	11.32	5.87	0.37	1.23	0.9997	0.9984	0.9990
1DERIV	19.46	5.41	1.13	3.76	0.9998	0.9986	0.9996
SMO+1DERIV	19.31	4.95	1.10	3.65	0.9998	0.9986	0.9966
NORM+DET	16.65	3.15	0.86	2.88	0.9999	0.9995	0.9993
NORM+SMO	15.35	8.27	0.86	2.86	0.99986	0.99969	0.9997

Aşağıda sırasıyla PLSR, MLR ve PCR modellerine ait kalite parametreleri ile aynı veride WSM kullanılması durumunda elde edilen parametreler çizelgeler halinde özetlenmiştir.

Çizelge 4. 5 ve Çizelge 4. 6 tahin yağının ayçiçek yağıyla tağışışının belirlenmesi amacıyla farklı $\Delta\lambda$ değerleri için kurulan PLSR ve PLSR* modellerine ait sonuçları

göstermektedir. RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri kullanılan program tarafından modelin birer çıktısı olarak sağlanmaktadır. RMSEC ve RMSECV değerleri kurulan kalibrasyon modelinin hata oranına işaret etmektedir. RMSEP değeri ise tahmin amacıyla yüklenen ve daha önce modele hiç tanıtılmamış olan verilerin kalibrasyon modeli tarafından ne kadar başarıyla tahmin edildiğini ifade eden bir hata ortalamaları değeridir. Başarılı bir model için bu değerlerin mümkün olduğunca küçük olması istenmektedir. PLSR için farklı $\Delta\lambda$ değerlerinde RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.26-0.84, 0.74-1.40 ve 1.24-1.82 arasında değişmektedir. WSM uygulandığında aynı sırayla değerler 1.60-3.41, 2.13-3.65 ve 2.02-2.71 arasında değişmiştir. WSM uygulamasıyla RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinde artışa neden olduğundan her üç parametrede negatif yönde değişiklik gözlenmiştir.

Çizelge 4. 5 PLSR ve PLSR* modellerinin kalite parametreleri

Model	REP	RSD	RMSEC	RMSECV	RMSEP
PLSR20	16.65	3.15	0.26	0.88	1.25
PLSR20*	14.40	6.15	2.67	2.86	2.71
PLSR40	20.29	0.87	0.65	1.00	1.82
PLSR40*	12.20	3.02	1.60	2.13	2.02
PLSR60	20.64	3.51	0.84	1.40	1.47
PLSR60*	38.27	1.81	3.41	3.65	2.31
PLSR80	13.98	6.71	0.45	0.74	1.24
PLSR80*	7.00	6.49	1.66	2.25	2.03

Kalibrasyon (Kal), çapraz validasyon (CV) ve tahmin (Pred) modelleri sonucunda programdan her bir konsantrasyon için üç paralelli tahmin verileri alınmaktadır. Bu veriler kullanılarak her bir konsantrasyon için ilgili modelce verilen ortalama tahmin değerleri hesaplanmaktadır. Bu değerler kullanılarak ilgili grafikler çizilmekte ve bu grafiklerin eğim değerleri ile LOD ve LOQ parametreleri

hesaplanmaktadır. Yine bu değerler kullanılarak Kal-R², CV- R² ve Val-R² değerleri tespit edilmektedir. Oluşturulan tüm modellerde R² değerlerinin 0.99 seviyesinde olduğu değişimlerin virgülden sonra üçüncü hanede geręekleřtięi görülmektedir. Bu durum modellerin R² değerlerinin model başarisını değerlendirmede tek başına doğru ve yeterli bir parametre olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde bu eğriler kullanılarak hesaplanan LOD ve LOQ değerleri ortaya konan modelin bilinmeyen bir örnekteki tağşiş oranını tespit ve tayin etme limitini ifade etmektedir. Genel olarak tüm modeller açısından tatmin edici LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olsa da hem kalibrasyon hem de tahmin modellerinin tekrarlanabilirliklerini de göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Bu kapsamda geręek değerler ile tahmin edilen değerler arasındaki farkı kantitatif olarak ifade edebilmek adına her bir modelin kalibrasyon modeli sonuçlarından RSD, tahmin modeli sonuçlarından REP değeri hesaplanmıştır.

PLSR metodu ile farklı $\Delta\lambda$ değerleri için hesaplanan RSD değerleri 0.87 ile 6.71, REP değerleri 13.98 ile 20.64 arasında değişmiştir. PLS metodunda WSM uygulandığında RSD değerleri 1.81-6.49, REP değerleri 7.0-38.27 arasında değişmiştir. WSM uygulamasının RSD ve REP değerlerinde tüm $\Delta\lambda$ verileri için ortak bir etkisi gözlenmemiştir. WSM uygulamasıyla amaç RSD ve REP değerlerinde azalmaya sebep olarak kurulan modelin tahmin başarisını arttırmakken bu durum yalnızca $\Delta\lambda = 80$ nm için gözlenebilmiş olup söz konusu iyileşmenin aynı modelin RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerine yansımadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4. 6 PLSR ve PLSR* modellerine ait bilgiler

Model	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Pred-R ²
PLSR20	0.86	2.88	0.99996	0.99955	0.99939
PLSR20*	0.50	1.68	0.99373	0.99295	0.99152
PLSR40	0.63	2.10	0.99965	0.99932	0.99915
PLSR40*	3.1	10.3	0.99783	0.99620	0.99651
PLSR60	0.34	1.14	0.99952	0.99883	0.99811
PLSR60*	1.11	3.70	0.99042	0.98916	0.99686
PLSR80	0.49	1.62	0.99987	0.99957	0.99912
PLSR80*	0.91	3.03	0.99752	0.99535	0.99668

Çizelge 4. 7 ve Çizelge 4. 8 tahin yağının ayçiçek yağıyla tağşışının belirlenmesi amacıyla kurulan MLR ve MLR* modellerine ait sonuçları göstermektedir. Bu metotla özellikle elde edilen R² değerlerinin diğer iki regresyon tekniğine kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. MLR sonuçlarında dikkat çeken bir diğer nokta RMSEC değerlerinin sıfırlanmış olmasıdır. RMSECV ve RMSEP değerlerinin ise kabul edilebilir seviyelerde olduğu görülmektedir. WSM uygulanması ise bu değerleri olumsuz yönde etkilemiştir. RMSEC değerleriyle uyumlu olarak LOD ve LOQ değerlerinin de bir hayli düşük elde edildiği görülmektedir. Öte yandan modellerin bu değerler açısından gösterdiği başarının tahmin yeteneğine transfer edilemediği özellikle RMSEP değerleri ile görülebilmektedir. Bu durumun sebebi kurulan modellerin kalibrasyon veri setine aşırı-uyum (over-fitting) göstermesi ile açıklanabilmektedir. Multivariat regresyon tekniklerin karşılaşılabilen bu problemin kalibrasyon modeli kurulmak üzere kullanılan örnek veri setinde yer alan bazı örneklere ait temsil edici olmayan (nonrepresentative) özellikleri yakınsamasından kaynaklandığı belirtilmektedir [167].

Çizelge 4. 7 MLR ve MLR* modellerinin kalite parametreleri

Model	REP	RSD	RMSEC	RMSECV	RMSEP
MLR20	22.58	3.34	0.00	0.85	1.17
MLR20*	25.95	2.71	0.00	1.30	1.60
MLR40	20.98	7.11	0.00	0.74	1.33
MLR40*	35.99	3.47	0.00	1.35	1.23
MLR60	65.20	3.91	0.00	1.14	1.15
MLR60*	38.85	4.57	0.00	1.52	1.48
MLR80	17.00	3.60	0.00	0.64	0.98
MLR80*	118.14	1.64	0.00	1.25	1.30

Kurulan MLR ve MLR* modellerinin REP ve RSD değerleri incelendiğinde yüksek REP değerleri elde edildiği görülmektedir. Bununla uyumlu olarak RSD değerlerinin de yüksek olması beklenirken nispeten düşük değerler elde edilmesi de yine over-fitting probleminin bir sonucu olarak görülmektedir. Kalibrasyon modeli sonuçlarıyla hesaplanan RSD değeri tahmin değerleri ortalamasının gerçek değere oranlanmasıyla hesaplanmakta olup bu değer söz konusu modellerde yalnızca en düşük konsantrasyon için yüksek olduğu daha yüksek konsantrasyonlarda over-fitting nedeniyle standart sapma değerlerinin sıfır seviyesinde olduğu gözlenmiştir. Bundan dolayı da ortalama standart sapmayı ifade eden RSD değeri bu denli yüksek REP değerlerine sahip olan modellere göre değerlendirildiğinde düşük bir RSD değeri olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 8 MLR ve MLR* modellerine ait bilgiler

Model	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Pred-R ²
MLR20	4.61	15.36	0.99970	0.99961	0.999777
MLR20*	2.61	8.71	0.99984	0.99840	0.99456
MLR40	5.80	19.33	0.99988	0.99957	0.99804
MLR40*	7.59	25.31	0.99916	0.99859	0.97554
MLR60	7.95	26.51	0.99927	0.99929	0.98937
MLR60*	13.88	46.28	0.99838	0.99861	0.98632
MLR80	4.20	14.00	0.99976	0.99976	0.99558
MLR80*	3.27	10.90	0.99930	0.99901	0.92430

Çizelge 4. 9 ve Çizelge 4. 10 tahin yağının ayçiçek yağıyla tağışışının belirlenmesi amacıyla kurulan PCR ve PCR* modellerine ait sonuçları göstermektedir. Bu teknikte diğler iki teknikle benzer şekilde WSM uygulamasıyla RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinde hemen hemen tüm $\Delta\lambda$ değerleri için artış gözlenmiştir. Bu durum WSM uygulamasının modellerin kalibrasyon ve tahmin başarısını olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Benzer şekilde bu modeller kullanılarak hesaplanan LOD ve LOQ değerlerinin de WSM uygulamasıyla negatif yönde değiştiiği gözlenmiştir. Öte yandan WSM uygulamasının REP ve RSD üzerinde genellenebilir nitelikte bir etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4. 9 PCR ve PCR* modellerinin kalite parametreleri

Model	REP	RSD	RMSEC	RMSECV	RMSEP
PCR20	18.16	7.46	1.77	1.95	3.32
PCR20*	19.00	7.72	3.75	3.90	3.83
PCR40	27.89	3.68	1.44	1.58	3.59
PCR40*	12.93	6.34	3.96	4.04	2.86
PCR60	16.17	6.72	2.02	2.41	1.96
PCR60*	33.55	4.30	3.56	3.79	2.36
PCR80	21.75	4.30	2.28	2.58	2.39
PCR80*	17.24	1.53	3.56	3.69	3.25

Çizelge 4. 10 PCR ve PCR* modellerine ait bilgiler

Model	LOD	LOQ	Kal-R ²	CV-R ²	Pred-R ²
PCR20	0.74	2.48	0.99713	0.99659	0.99096
PCR20*	2.68	8.94	0.99948	0.99865	0.99908
PCR40	0.34	1.15	0.99831	0.99801	0.99105
PCR40*	0.89	2.97	0.99778	0.99721	0.99830
PCR60	0.28	0.92	0.99644	0.99511	0.99674
PCR60*	2.07	6.89	0.99755	0.99563	0.99602
PCR80	0.83	2.76	0.99481	0.99337	0.99428
PCR80*	0.82	2.74	0.98911	0.98673	0.98515

PLS, MLR ve PCR olmak üzere üç farklı regresyon yönteminin tahin yağı örneklerindeki ayçiçek yağı taşımasını tespit edebilme başarısı incelenmiştir. Hesaplanan kalite parametreleri açısından bir kıyaslama yapıldığında REP değerleri bakımından PLS ve PCR sonuçlarının benzer olduğu MLR yönteminin REP değerlerinin bunlara kıyasla yüksek olduğu görülmektedir. RSD değerleri bakımından yapılacak kıyaslamada MLR üzerinden yorum yapmak hatalı olacağından PLS ve PCR yöntemleri kıyaslandığında PLS yönteminin kalibrasyon modelinin standart sapma değerleri bakımından daha tekrarlanabilir sonuçlar verdiği görülmektedir. Kalibrasyon modellerinin eğim ve en düşük ayçiçek yağı konsantrasyonuna karşılık gelen tahmin değerlerinin standart sapması ile hesaplanan LOD ve LOQ değerleri açısından değerlendirildiğinde PLS ve PCR yöntemlerinin benzer sonuçlar verdiğini, MLR yöntemiyle kurulan modelin yüksek LOD ve LOQ değerleri nedeniyle %10'un altındaki olası taşıma uygulamalarının tespitinde yeterli olamayabileceği görülmektedir. PLS ve PCR yöntemleri arasında bir karşılaştırmaya gidildiğinde kalibrasyon modelinin ortalama hatasını ifade eden RMSEC değerleri ile tahmin modelinin ortalama hatasını ifade eden RMSEP değerleri açısından PLSR yönteminin daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Söz konusu sonuçlar ışığında üç teknik arasında PLSR tekniğinin daha tekrarlanabilir ve hata oranı düşük tahmin değerlerine sahip olduğu sonucuna varılmaktadır. PLS yöntemiyle kurulan modellerde kullanılan $\Delta\lambda$ değerleri açısından karşılaştırma yapılırken tüm $\Delta\lambda$ değerlerinde elde edilen LOD ve LOQ değerleri oldukça tatmin edici olduğundan bu iki parametre dışarıda bırakılarak değerlendirme yapıldığında kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerine ait hata değerlerinin (RMSEC, RMSECV ve RMSEP) minimum olduğu $\Delta\lambda=20$ nm seçilmesinin uygun olacağı belirlenmiştir.

Literatürde MLR tekniği elde edilen spektrumdaki bir veya daha fazla bölgenin bir arada kullanıldığı çoklu dalgaboyu modelleme tekniklerinden (multiple wavelength modeling technique) biri olarak tanımlanırken PCR ve PLS teknikleri elde edilen spektrumlarının tamamının kullanıldığı tam spektrum modelleme tekniklerinden (full spectrum modelling technique) biri olarak tanımlanmaktadır. Genellikle birinci çeşit tekniklerde ikinci çeşide kıyasla kalibrasyon setinde daha az matriks değişkenliğine ihtiyaç duyulmaktadır. MLR benzeri tekniklerin kimyasal olarak kompleks matrikslerde yapılan modelleme çalışmalarında daha

az kesinlik sunduğu ve modellenemeyen matriks varyasyonlarına karşı daha az hassasiyet gösterdiği belirtilmektedir. PCR ve PLS benzeri tekniklerin kalibrasyon veri setinin sahip olmasını gerektiren özellikler bakımından daha talepkâr olduğu bilinmektedir. Kompleks modelleme tekniklerinin sunduğu avantaj ise kompleks matriks değişkenlerini karakterize edebilme kabiliyetlerinden kaynaklanmaktadır [167].

SFS tekniği bitkisel yağların karakterizasyonu, sınıflandırılması ve yapılan tağışışların belirlenmesi amacıyla literatürde pek çok çalışma kapsamında kullanılmıştır [184, 188]. Sikorska ve ark. tarafından yapılan pek çok çalışmada luminesans ve floresans spektroskopilerinin farklı uygulamaları ile bitkisel yağların karakterizasyonu ve bu yağlarda yapılan tağışış uygulamalarının tespitinde floresans spektroskopisinin kullanılabilme potansiyeli rapor edilmiştir. Total lüminesans spektroskopisi ve SFS teknikleri kullanılarak soya, ayçiçek, yarfıstığı, zeytin, keten tohumu, üzüm çekirdeği, kolza ve mısır gibi pek çok yağ çeşidi analiz edilmiştir [184]. Bu çalışmalarda SFS tekniğinin yüksek seçicilik kabiliyeti ve bir karışım içindeki birden çok bileşeni aynı anda analizleyebilme özelliğinden faydalanılmıştır.

Tereyağı ve zeytinyağı gibi yüksek oranda üretilen ve tüketilen yağların yanı sıra ceviz yağı, üzüm çekirdeği yağı gibi üretimi ve tüketimi kısıtlı olmasına rağmen taşıdığı birtakım biyoaktif özellikler nedeniyle gün geçtikçe tüketici ilgisinin arttığı yağlarda da bazı tağışış uygulamaları tespit edilmektedir [95, 189, 190]. Fakat bunlar arasında tahin veya susam yağındaki tağışışın belirlenmesine yönelik FS tekniğini kullanan bir çalışma rapor edilmemiştir. Rodriguez ve ark. tarafından yapılan çalışmada susam yağındaki tağışışın tespiti amacıyla FT-IR ölçümleriyle toplanan bilgi soft independent modelling by class analogy (SIMCA) ve one class partial least squares (OC-PLS) teknikleriyle işlenmiştir. Söz konusu çalışmada %1 seviyesindeki tağışışın belirlenmesinde hata değerlerinin yüksek olduğu ve bu durumun adulterant amacıyla kullanılan mısır, yarfıstığı, soya ve ayçiçek yağları ile susam yağının yağ asidi bileşiminin yüksek bezerlikte olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir [191]. Ozulku ve ark. tarafından yapılan çalışmada soğuk sıkım susam yağına fındık, kanola ve ayçiçek yağı ilavesiyle yapılan tağışışın ATR-FTIR spektroskopisi ile tespiti üzerinde çalışılmıştır [192]. Söz

konusu çalışmada saf ve tağşişli örneklerin sınıflandırılması PCA ve dendogram analizleriyle gerçekleştirilmiş, geliştirilen kantitatif metoda ait yalnızca R^2 değerleri rapor edilmiş ve bu değerlerin 0.96 seviyesi ile mevcut tez çalışması ile rapor edilen R^2 değerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür. Rohman ve Man tarafından yapılan çalışmada susam yağlarına palm yağı ilavesiyle yapılan tağşiş FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. FTIR spektrumunda üç farklı dalgasayısı bölgesinin kombine olarak kullanımı ile geliştirilen PLS temelli kantitatif metodun RMSEC, RMSECV, RMSEP değerleri 1.32, 1.84 ve 1.83; kalibrasyon ve tahmin modellerinin R^2 değerleri 0.997 ve 0.996; tespit limiti değeri %1.86 olarak rapor edilmiştir [193]. Tez çalışması ile geliştirilen SFS ve PLS temelli metodun tespit limiti değerlerinin farklı $\Delta\lambda$ 'larda %0.34-%0.86 arasında değiştiği görülmüştür. Kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerine ait R^2 değerleri 0.999 seviyesindedir. RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri ise farklı $\Delta\lambda$ 'lar için 0.26-0.84, 0.74-1.40 ve 1.24-1.82 arasında değişmiştir. Rohman ve Man tarafından yapılan çalışma ile kıyaslandığında geliştirilen metodun daha düşük tağşiş oranlarını daha düşük hata değerleri ile tahmin edebildiği görülmektedir. Deng ve ark. tarafından yapılan çalışmada FTIR spektroskopisi ile toplanan veri SIMCA ve partial least squares class model (PLSCM) yöntemleri ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda susam yağında kolza, palm, soya ve yerfıstığı yağı ilavesiyle yapılan tağşişlerin %3 ve üzerinde olması durumunda tespit edilebileceği rapor edilmiştir. Geliştirilen sınıflandırma modellerine ait hassasiyet ve özgüllük değerleri SIMCA temelli yöntem için 0.905 ve 0.944; PLSCM temelli yöntem için 0.952 ve 0.937 olarak belirtilmiştir. Aynı çalışma kapsamında dalgaboyu seçim özelliğinin sınıflandırma başarısı üzerine etkisi incelenmiş olup az sayıda spektral değişken kullanılması durumunda kullanılan yöntemin yağların karakterizasyonunda yetersiz kalabileceği belirtilmiştir [194]. Mevcutta geliştirilen yöntem ile tespit limiti açısından kıyaslandığında SFS ve PLS temelli yöntemin daha düşük oranlardaki tağşişi tespit edebildiği görülmektedir. Ayrıca tez çalışması kapsamında dalgaboyu aralığı seçim modu uygulmasının geliştirilen modellerin başarısı üzerinde genel olarak negatif bir etkisi görülmüş olsa da gelecekteki çalışmalarda alternatif dalgaboyu aralığı seçim algoritmaları denenerek bu durumun farklı şekillerde analiz edilmesi ve yeterli kıyaslamaların yapılmasının ardından genel bir kaniya varılması gerektiği düşünülmektedir. Tez

çalışması kapsamında kullanılan dalgaboyu aralığı seçim algoritması interval PLS (iPLS) olarak adlandırılmakta ve bu algorithmada tüm spektrum çok sayıda aralığa bölünmektedir. Ardından ileri/geri yönlü aşamalı seçim uygulamasıyla en verimli aralık kombinasyonları tespit edilmektedir [186]. Örneğin bu algorithmada başlangıçta seçilen aralık sayısı, aralıkların boyutça eşit olup olmaması gibi pek çok faktörün detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Chen ve Wang tarafından rapor edilen çalışmada farklı dalgaboyu seçim aralığı algoritmaları hakkında detaylı bilgi bulunmaktadır [195]. Tez çalışması kapsamında bu konu tek bir algoritma üzerinden incelenmiştir.

Zhao ve ark. tarafından yapılan çalışmada ayçiçek yağı veya mısır yağına kemosentetik susam aroması ve gıda renklendiriciler ilavesiyle hazırlanan sahte susam yağlarının orijinal susam yağlarından ayrılmasına yönelik olarak MIR spektroskopisi ve kemometrik yöntemlerden SIMCA ve PCA kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada sentetik susam aroma bileşeninin miktarıyla orantılı olarak kayma gösteren ve sinyal şiddeti değişen bantlar tespit edilmiş fakat kantitatif bir analiz metodu ortaya konamamıştır [196]. Düşük fiyatlı bitkisel yağlara aroma ve renklendirici ilavesiyle yapılan susam yağı tağşişi mevcut tez çalışması kapsamının dışında tutulmuş olup bu durumun gelecekte yapılacak çalışmalarda irdelenmesi planlanmaktadır.

SFS tekniği kullanılarak tahin yağı ve ayçiçek yağının birbirinden ayrılmasını hedefleyen mevcut çalışmada bu yağlar arasındaki tokoferol ve fenolik madde içeriği farklı temel oluşturmaktadır. Literatürde benzer temel üzerine kurulmuş tağşiş tespitini amaçlayan çalışmalar bulunmaktadır. Bakre ve ark. tarafından rapor edilen çalışmada zeytinyağındaki ayçiçek yağı tağşişi ters faz HPLC ile belirlenmiş olup ayçiçek yağının zeytinyağına kıyasla yüksek α -tokoferol içeriği yağlar arasındaki diskriminant faktörü olarak tanımlanmıştır [197].

Çalışma kapsamında analiz edilen ayçiçek ve tahin yağlarının orijinalliğinin desteklenmesi adına GC ile yağ asidi kompozisyonları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 11 ile verilmiştir. Çizelge 4. 11 incelendiğinde çalışma kapsamında kullanılan tahin ve ayçiçek yağlarında literatür ile uyumlu olarak oleik ve linoleik asitlerin majör yağ asitleri olarak bulunduğu ve bağıl miktarlarının sırasıyla ayçiçek yağı için %29.10-%37.73 ve %52.10-%61.58 ile tahin yağı için

%39.89- %41.55 ve %43.43-%46.57 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Analiz edilen yağlar palmitik asit içerikleri bakımından birbirlerinden anlamlı derecede ($P < 0.05$) farklı bulunmuştur. Palmitik asit iğeriği AY için %5.15-%5.87 ve TY için %7.36-%8.80 aralığında değişmiştir. Benzer şekilde stearik ve α -linolenik asit içerikleri; AY için %2.39-%3.08 ile %0.11-0.20 ve TY için %3.93-%6.42 ile %0.39-%0.44 olarak literatürle uyumlu bulunmuştur [198, 199]. Tespit edilen yağ asidi kompozisyonu değerleri Codex Alimentarius tarafından kabul edilen aralıklar içerisindedir [200]. Referans değerler dikkate alındığında AY ve TY örnekleri arasında palmitik, oleik, linoleik ve α -linolenik asit iğeriği bakımından anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. TY örneklерinin palmitik, oleik ve α -linolenik asit iğeriği AY örneklерinden yüksekken AY örneklерinin linoleik asit iğeriği TY örneklерinden yüksek bulunmuştur. Yürütölen ęalıřma ile yağ asidi kompozisyonları birbirine ęok benzeyen iki yağ ęeřidi olan ayęięek yağını ve tahin yağını SFS ve kemometrik analizleri bir arada kullanarak ayıran kalitatif ve kantitatif modeller geliştirilmiştir.

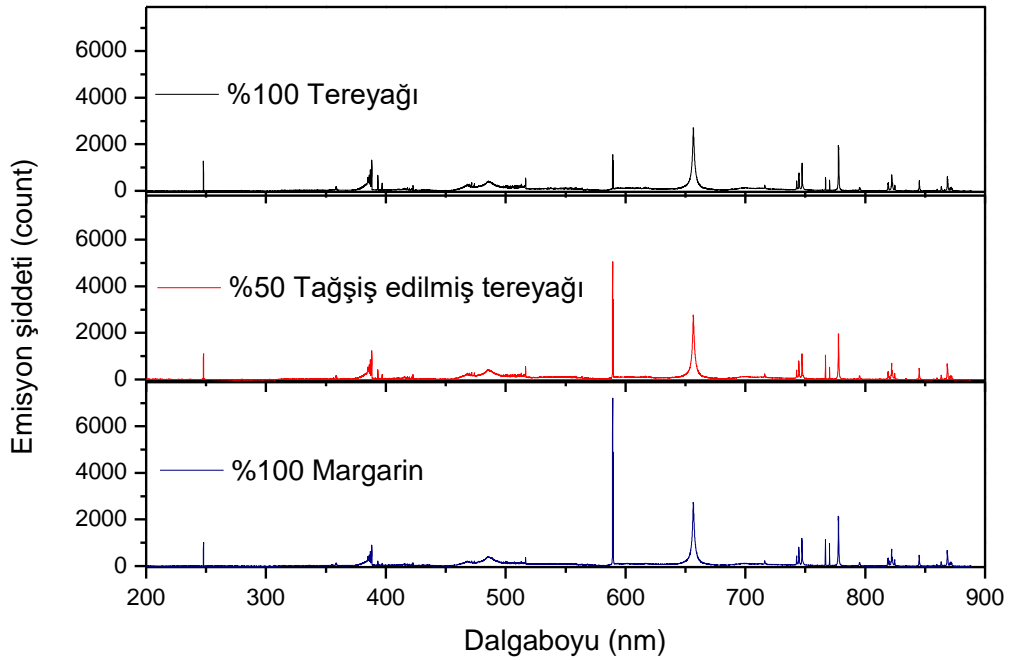
Çizelge 4. 11 Yağ örneklerinin GC ile belirlenen yağ asidi kompozisyonları

Yağ asidi	AY-1	AY-2	AY-3	AY-4	AY-5	TY-1	TY-2	TY-3	TY-4	TY-5	TY-6	Susam Yağı ^{CS}	Ayçiçek Yağı ^{CS}
C10:0 (Kaprik asit)	0.04±0.01 ^a	0.06±0.00 ^{ab}	0.06±0.01 ^{ab}	0.07±0.01 ^{ab}	0.07±0.00 ^{ab}	0.07±0.00 ^b	0.07±0.00 ^b	0.09±0.00 ^b	0.08±0.00 ^b	0.12±0.01 ^c	0.06±0.00 ^{ab}	TE	TE
C12:0 (Laurik asit)	0.04±0.00 ^a	0.06±0.00 ^{ab}	0.06±0.00 ^{ab}	0.06±0.01 ^{ab}	0.06±0.00 ^b	0.07±0.00 ^b	0.06±0.00 ^{ab}	0.08±0.00 ^b	0.07±0.00 ^b	0.11±0.01 ^c	0.06±0.00 ^{ab}	TE	TE-0.1
C13:0 (Tridesiklik asit)	0.08±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	TE	TE	TE	TE	TE	TE	-	-
C15:1 (Pentadekanoik asit)	0.13±0.00 ^e	0.14±0.00 ^f	0.12±0.00 ^d	0.10±0.00 ^a	0.16±0.00 ^g	0.12±0.00 ^{cd}	0.11±0.00 ^{ab}	0.11±0.00 ^b	0.11±0.00 ^{ab}	0.11±0.00 ^{bc}	0.12±0.00 ^d	-	-
C16:0 (Palmitik asit)	5.49±0.51 ^a	5.87±0.19 ^a	5.40±0.13 ^a	5.65±0.24 ^a	5.15±0.16 ^a	7.97±0.20 ^b	8.80±0.37 ^b	7.36±0.36 ^b	7.94±0.29 ^b	8.53±0.23 ^b	7.78±0.40 ^b	7.9-	5.0-7.6
C18:0 (Stearik asit)	2.88±0.08 ^{ab}	2.84±0.15 ^{ab}	2.45±0.06 ^a	3.08±0.12 ^{abc}	2.39±0.08 ^a	4.20±0.20 ^{bcd}	6.42±1.03 ^e	4.70±0.13 ^{cd}	4.37±0.21 ^{bcd}	5.44±0.34 ^{de}	3.93±0.22 ^{abc}	4.5-6.7	2.7-6.5
C18:1 n9 (Oleik asit)	31.64±0.16 ^b	37.73±0.22 ^c	29.10±0.13 ^a	31.86±0.16 ^b	37.07±0.11 ^c	40.78±0.25 ^{de}	40.10±0.70 ^d	41.55±0.25 ^e	39.89±0.26 ^d	41.27±0.28 ^{de}	40.98±0.32 ^d	34.4-	14.0-39.4
C18:2 n6 (Linoleik asit)	58.16±0.28 ^e	52.10±0.18 ^c	61.58±0.07 ^f	57.92±0.19 ^e	53.91±0.12 ^d	45.88±0.14 ^b	43.54±0.71 ^a	45.22±0.22 ^b	46.57±0.18 ^b	43.43±0.24 ^a	46.17±0.30 ^b	36.9-	48.3-74.0
C18:3 n6 (γ-Linolenik asit)	0.19±0.00 ^e	0.17±0.00 ^{bc}	0.18±0.00 ^{bc}	0.15±0.00 ^a	0.16±0.00 ^{ab}	0.18±0.00 ^{bc}	0.17±0.00 ^{bc}	0.19±0.00 ^{bc}	0.17±0.02 ^{abc}	0.18±0.00 ^{bc}	0.18±0.00 ^{bc}	-	-
C18:3 n3 (α-Linolenik asit)	0.20±0.01 ^b	0.11±0.02 ^a	0.20±0.00 ^b	0.13±0.01 ^a	0.11±0.00 ^a	0.41±0.00 ^{cd}	0.39±0.01 ^c	0.43±0.01 ^d	0.44±0.00 ^d	0.43±0.01 ^d	0.42±0.00 ^{cd}	0.2-1.0	TE-0.3
C21:0 (Hekzeikozanoik asit)	0.08±0.00	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	-	-
C20:2 (Eykozadienoik asit)	0.69±0.01 ^c	0.62±0.01 ^{bc}	0.48±0.02 ^b	0.59±0.02 ^{bc}	0.52±0.00 ^b	0.12±0.01 ^a	0.14±0.01 ^a	0.11±0.00 ^a	0.12±0.00 ^a	0.14±0.01 ^a	0.10±0.00 ^a	TE	TE
C20:4 n6 (Araşidonik asit)	0.05±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.07±0.00 ^a	0.08±0.00 ^{ab}	0.09±0.00 ^{ab}	0.09±0.00 ^{abc}	0.08±0.00 ^{ab}	0.11±0.00 ^{abc}	0.15±0.04 ^{bc}	0.16±0.01 ^c	0.07±0.00 ^a	-	-
C20:5n3 (EPA)	0.28±0.07 ^c	0.25±0.06 ^{bc}	0.19±0.02 ^b	0.22±0.01 ^{bc}	0.21±0.00 ^{bc}	TE	0.10±0.00 ^a	TE	TE	TE	0.06±0.00 ^a	-	-
C22:6 n3 (DHA)	0.06±0.01 ^a	0.10±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a	0.10±0.01 ^a	0.10±0.00 ^{ab}	0.11±0.00 ^{ab}	0.10±0.00 ^{ab}	0.13±0.00 ^{abc}	0.17±0.01 ^{bc}	0.19±0.01 ^c	0.09±0.00 ^a	-	-

Sonuçlar, tespit edilen toplam yağ asitlerinin yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Tüm analizler dört paralelli gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değerler ± standart hata olarak rapor edilmiştir. TE: Tespit edilmemiştir, EPA: Eykozapentaenoik asit, DHA: Dokozaheksaenoik asit, AY: Ayçiçek Yağı, TY: Tahin Yağı, CS: Kodeks Standart. Aynı satırda farklı harflerle işaretli ortalama değerler Tukey's teste göre önemli ölçüde farklıdır (P <0.05).

4.2 Tereyağı Örneklerindeki Tağşişin LIBS ile Belirlenmesi

Bu çalışmada ticari olarak temin edilen tereyağı ve margarin örnekleri ile tağşişe uğratılmış tereyağı örnekleri LIBS kullanılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla üç paralelli olarak hazırlanmış olan her örneğin 4 farklı bölgesinden ve her bölgeden 10 ölçüm olacak şekilde her örnekten 40 spektrum toplanmış ve bunların ortalaması alınarak bir örneği temsil eden ortalama LIBS spektrumu elde edilmiştir. Şekil 4. 8 ile %100 tereyağı, %100 margarin örnekleri ile margarin ilavesiyle %50 oranında tağşişe uğratılmış tereyağı örneklerine ait ortalama LIBS spektrumları verilmiştir.



Şekil 4. 8 Yağ örneklerinin ortalama LIBS spektrumları

Tereyağı ve margarin örneklerine ait LIBS spektrumlarında yer alan karakteristik bantlar National Institute of Standard and Technology (NIST) Basic Atomic Spectroscopic Database ve NIST Atomic Spectra Database for LIBS veri tabanları kullanılarak tanımlanmıştır [201, 202]. Çizelge 4. 12’de analiz edilen örneklere ait muhtemel elementler tablosu verilmiştir.

Şekil 4. 8 incelendiğinde analiz edilen örneklere ait LIBS spektrumlarındaki en baskın bantların 589.173 ve 589.813 nm’de konumlanmış Na elementine ait 1.

iyonizasyon bantları olduğu görülmektedir. NIST LIBS veritabanında Na elementi için en yüksek emisyon şiddetine sahip bandın 589.19 nm'de konumlandığı belirtilmektedir [202]. Bunlara ek olarak 819.221 nm'de konumlanmış Na elementine ait 1. iyonizasyon bandı çok daha düşük emisyon şiddetine sahip olduğundan gözlenmesi zor olmakla birlikte gerekli eksen düzenlemeleri yapıldığında elde edilen spektrumlarda yer aldığı görülmüştür. Bu bant NIST LIBS veritabanında 819.37 nm'de konumlanmıştır. Bu bantlara ait emisyon şiddetinin %100 margarin örneği için en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Aynı pikin emisyon şiddeti tereyağı örneğinde çok daha düşük, %50 tağşişe uğatılmış örnekte ise %100 tereyağına göre daha yüksek bir değere sahiptir.

LIBS spektrumlarında baskın olarak yer alan bir diğer bant ise 656.563 nm'de konumlanmış olan H elementine aittir [203]. Ca elementine ait 1. ve 2. iyonizasyon bantlarının 393.360, 396.821, 422.626, 443.548, 445.517, 610.298, 612.231, 616.260, 643.982 ve 646.268 nm'de konumlandığı görülmüştür. NIST LIBS veritabanında Ca elementine ait en yüksek emisyon şiddetine sahip bantların 393.38 ve 396.88 nm'de konumlandığı belirtilmiştir. Bunlara ek olarak 422.64, 443.54, 445.49, 610.3, 612.3, 616.3, 643.96, 646.26 nm'de konumlanan daha düşük emisyon şiddetine sahip bantlar bulunmaktadır. Analiz edilen örneklere ait LIBS spektrumlarında gözlenen bir diğer grup bant 766.783 ve 770.107 nm'de konumlanan K elementine ait 1. iyonizasyon bantlarıdır. NIST LIBS veritabanında K elementine ait en yüksek emisyon şiddetine sahip bantların 766.5 ve 769.69 nm'de konumlandığı belirtilmiştir. Göreceli olarak düşük emisyon şiddetine sahip olmakla birlikte analiz edilen örneklerin LIBS spektrumlarında Fe elementine ait iyonizasyon bantları 247.769, 388.285, 516.600, 527.096, 612.231, 643.982 ve 716.065 nm'de gözlenmiştir. NIST LIBS veritabanında Fe elementine ait en yüksek emisyon şiddetine sahip bantlar 239.1, 260.6 ve 274.6 nm'de konumlanırken aynı elemente ait daha düşük emisyon şiddetine sahip bantlar 358.6, 374.1, 382.6, 493.2, 518.2, 538.7, 560.20, 641.7, 687.2, 717.7 ve 751.2 nm'de yer almıştır. Fe elementi açısından ilgili veritabanından elde edilen bilgiler ile mevcut sonuçlar birebir uyuşmamakla birlikte Fe elementinin 1, 2 ve 3. iyonizasyonuna ait çok fazla bandın bulunması nedeniyle analiz edilen örneklerde benzer konumlarda gözlenen bantlar Fe elementiyle ilişkilendirilmiştir.

Benzer şekilde Mg elementine ait 1. ve 2. iyonizasyon bantları 279.500, 516.600 821.922 nm'de gözlenmiştir. NIST LIBS veritabanında Mg elementine ait en yüksek emisyon şiddetine sahip bantların 279.54 ve 280.29 nm'de konumlandığı bildirilmiştir. Bunun yanında 517.22 ve 518.37 ile 821.37 ve 823.47 nm'de konumlanmış daha düşük emisyon şiddetine sahip bantlar da bulunmaktadır.

Son olarak C, N ve O ait 1. iyonizasyon bantları sırasıyla 247.859; 744.545, 747.217, ve 821.922 ile 777.541 nm'de konumlanmıştır. NIST LIBS veritabanında C, N ve O ait en yüksek emisyon şiddetine sahip bantların 247.84; 744.18, 746.83, 818.67, 821.71, 863.08, 868.24 ile 615.69, 777.38, 822.73 ve 844.7 nm'de konumlandığı belirtilmiştir. Analiz edilen örnekler için LIBS spektrumlarında söz konusu bantların tamamı gözlenmemiş olup her üç elemente ait en yüksek emisyon şiddetine sahip karakteristik bantlar gözlenmiştir.

Çizelge 4. 12 LIBS spektrumlarının muhtemel element tablosu

Gözlenen Emisyon Bandı (nm)	Muhtemel Element
247.769	Fe I (247.978)
247.859	C I (247.856)
279.500	Mg I (279.553)
388.285	Fe I (388.327)
393.360	Ca II (393.366), Ca I (393.529)
396.821	Ca II (396.8469)
422.626	Ca I (422.672), Ca II (422.815)
443.548	Ca I (443.569)
445.517	Ca I (445.478)
516.600	Fe I (516.748), Mg I (516.732)
527.096	Fe I (527.035)
589.173	Na I (588.995)
589.813	Na I (588.995)
610.298	Ca I (610.272)
612.231	Ca I (612.221), Fe I (612.790)
616.260	Ca I (616.217)
643.982	Ca I (643.907), Fe I (643.875)
646.268	Ca I (646.256)
656.563	H I (656.285)
716.065	Ca I (714.815), Fe I (714.814)
744.545	N I (744.229)
747.217	N I (746.831)
766.783	K I (766.489)
770.107	K I (769.8965)
777.541	O I (777.569)
819.221	Na I (819.482)
821.922	Mg I (821.3034), Mg II (821.398), N I (821.634)

Tereyağı ve margarin örneklerinin LIBS spektrumlarında gözlenen bantların varlığı ICP-MS ve FAAS analizleriyle doğrulanmıştır. Tereyağı ve margarin örneklerinin ICP-MS ve FAAS analizleriyle belirlenen elemental kompozisyonları Çizelge 4. 13 ile verilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Tereyağı, Diğer Süt Yağı Esaslı Sürülebilir Ürünler ve Sadeyağ Tebliği'ne göre tereyağı bileşiminde ağırlıkça minimum %80, maksimum %90 oranında süt yağı, maksimum %2 oranında yağsız süt kuru maddesi ve maksimum %16 oranında su içeren ürün olarak tanımlanmaktadır [204]. Türk Gıda Kodeksi Sürülebilir Yağlar/Margarin ve Yoğun Yağlar Tebliği'ne göre margarin insan tüketimine uygun bitkisel ve/veya hayvansal yağlar ve/veya süt yağından elde edilen yağ içinde su emülsiyonu şeklinde hazırlanan ve süt ve/veya süt ürünleri içerebilen ürün olarak tanımlanmaktadır [205]. Süt bileşiminde bulunan elementlerin kompozisyonu sütün elde edildiği hayvanın beslenmes rejimi, yaşı, cinsi, laktasyon dönemi ve mevsimsel faktörlere bağlı olarak büyük değişiklikler göstermekle birlikte Ca, Na, K, P ve Mg elementleri majör olarak; Fe, Cu, Mn, Se, Co, Cr, Ni ve Zn elementleri minör olarak süt bileşiminde bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında tereyağı ve margarin örneklerine ait LIBS spektrumları değerlendirilmiştir [206, 207].

Çizelge 4. 13 incelendiğinde örneklerde majör olarak bulunan elementlerin LIBS sonuçlarıyla uyumlu olarak Na, K, Ca, Fe ve Mg olduğu tespit edilmiştir. Na içeriği tereyağı örnekleri için 0.21×10^5 ile 1.96×10^5 ppb arasında, margarin örnekleri için 7.1×10^5 ile 8.50×10^5 ppb arasında değişmektedir. K içeriği tereyağı örnekleri için 0.16×10^5 ile 4.87×10^5 ppb arasında, margarin örnekleri için 3.50×10^5 ile 6.84×10^5 ppb arasında değişmektedir. Fe içeriği tereyağı örnekleri için 0.02×10^5 ile 0.32×10^5 ppb arasında, margarin örnekleri için 0.24×10^5 ile 0.35×10^5 ppb arasında değişmektedir.

Tereyağı ve margarin örneklerinin içerdikleri Cu, Cr, Ni, Mn ve Zn miktarları ise genel olarak daha düşüktür. Cu içeriği tereyağı örnekleri için 6.54-35.28 ppb arasında, margarin örnekleri için 4.23-6.95 ppb arasında değişmektedir. Cr içeriği tereyağı örnekleri için 1.6-3.2 ppb arasında, margarin örnekleri için 1.6-2.1 ppb arasında değişmektedir. Ni içeriği tereyağı örnekleri için 72-923 ppb arasında, margarin örnekleri için 42-526 ppb arasında değişmektedir. Mn içeriği tereyağı örnekleri için 69-1169 ppb arasında, margarin örnekleri için 133-834 ppb arasında değişmektedir. Zn içeriği tereyağı örnekleri için 16-400 ppb arasında,

margarin örnekleri için 8-95 ppb arasında değişmektedir. ICP-MS ve FAAS analiz sonuçlarına göre ilgili literatür ve LIBS sonuçlarıyla paralel olarak analiz edilen margarin örnekleri tereyağı örneklerine kıyasla daha yüksek miktarda Na, K ve Fe; daha düşük miktarda Ca, Mg, Cu, Cr, Mn ve Ni içermektedir [208]. Analiz edilen örneklerde 1 ppm seviyesinin altında bulunan Cu, Cr, Ni, Mn ve Zn elementlerine ait karakteristik bantlar örneklerin LIBS spektrumlarında gözlenememiştir. LIBS tekniğine dair rapor edilen en büyük dezavantajlarından bir tanesi tespit limiti değerlerinin ppm seviyesinde olmasıdır [209]. Bu durum genellikle lazer indüklü plazma oluşumunun ablasyon, atomizasyon ve uyarma gibi tekrarlanabilirliği düşük kompleks süreçler gerektirmesiyle açıklanmaktadır. Bunun yanında örneğe ait matriks etkisi de emisyon şiddeti değerlerini etkilemektedir. LIBS sistemlerinde hassasiyetin artırılması adına pek çok farklı kapsamda çalışma rapor edilmiştir. Bunlar arasında deneysel düzende yapılan konfigürasyon değişikliklerinin etkisini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra ns-µs seviyesinde zaman farkı bulunan iki farklı lazer atımının kullanıldığı çift atımlı lazer tekniği (double pulse laser) geliştirilmiştir. Bu teknikte ilk lazer atımı ile örneğin ablasyonu sonrasında ikinci bir lazer atımı ile oluşan plazmanın uyarılması/ yeniden ısıtılması (reheating of the plasma) yoluyla sinyal şiddetinde artış sağlanmaktadır. Ayrıca bu teknikte plazma ömrü daha uzun olmakta ve elektron yoğunluğu daha yavaş bir şekilde azalmaktadır [210, 211]. Bir diğer teknik N₂, Ar ve He gibi inert gaz atmosferi kullanılarak oluşturulan plazmanın sıcaklığının ve yoğunluğunun artırılmasıdır [212]. İntert gaz atmosferinde oluşturulan plazma elektronca zengin olmaktadır. Lazer indüklü plazma içerisinde atomlar veya iyonlar ile elektronların çarpışmaları optik emisyon süreçlerinde anahtar görevi görmektedir. Bu nedenle lazer indüklü plazmanın yüksek elektron yoğunluğuna sahip olması atomik ve iyonik emisyon bantlarının daha yüksek emisyon şiddetine ve daha uzun ömre sahip olmasını sağlamaktadır [213]. Bir başka teknik harici manyetik alan kullanımıyla plazmada bulunan atomik ve iyonik türlerin enerji ve yoğunluklarının değiştirilmesidir [214]. Söz konusu elementler dışında tereyağı ve margarin örneklerinin LIBS spektrumlarında C, H, O ve N elementlerine ait bantlar görülmüştür. Örneklerin organik içeriklerinden kaynaklı olarak LIBS spektrumlarında C, H ve O bantları gözlenebilmektedir [215]. Literatürde LIBS spektrumlarında gözlenen H ve O

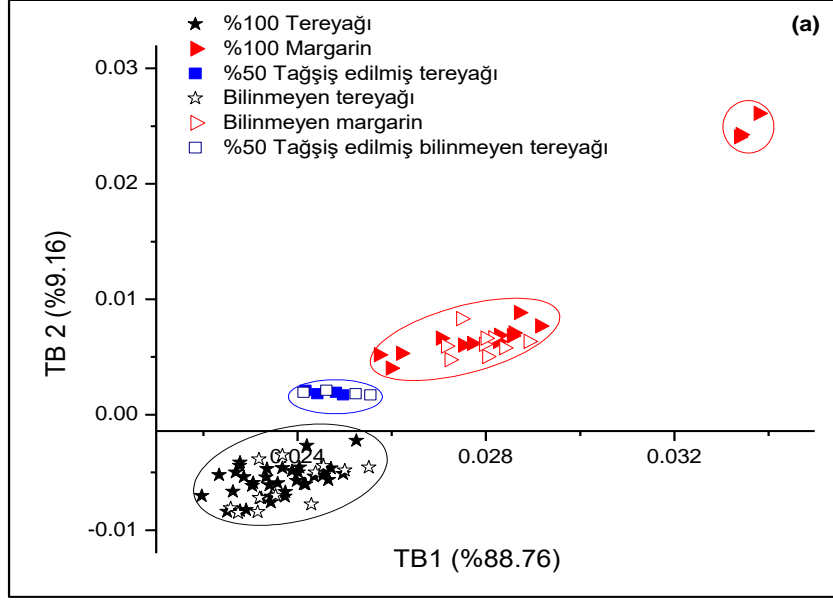
bantları analiz edilen örneklerin nem içerikleriyle ilişkilendirilmiştir [116, 216]. N bantları protein içeriği yüksek örneklerde toplam protein içeriğiyle ilişkilendirilmekle birlikte [217] havada lazer indüklü plazma oluşturulması nedeniyle N bantlarının atmosferik azottan kaynaklanabileceği belirtilmektedir [218, 219]. Söz konusu analizlerin mevcut tez çalışması kapsamında atmosferik koşullarda yapıldığı göz önünde bulundurulduğunda ikinci açıklamanın elde edilen N bantlarının gerekçesi olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4. 13 Yağların ICP-MS ve FAAS sonuçları

Element (ppb)	Na	K	Cu	Ca	Cr	Mn	Fe	Ni	Zn	Mg
Margarin 1	7.31x10 ⁵	3.50x10 ⁵	5.87	0.42x10 ⁵	1.6	799	0.29x10 ⁵	42	77	0.19x10 ⁵
Margarin 2	33.9x10 ⁵	6.84x10 ⁵	6.95	0.35x10 ⁵	2.1	465	0.29x10 ⁵	190	95	0.16x10 ⁵
Margarin 3	7.83x10 ⁵	3.59x10 ⁵	4.23	0.49x10 ⁵	1.8	512	0.29x10 ⁵	168	44	0.25x10 ⁵
Margarin 4	8.50x10 ⁵	4.10x10 ⁵	5.01	0.24x10 ⁵	1.6	133	0.35x10 ⁵	110	8	0.10x10 ⁵
Margarin 5	7.10x10 ⁵	4.14x10 ⁵	5.73	0.42x10 ⁵	1.6	834	0.24x10 ⁵	526	67	0.15x10 ⁵
Tereyağı 1	0.70x10 ⁵	2.15x10 ⁵	6.54	0.77x10 ⁵	2.5	494	-	235	75	0.22x10 ⁵
Tereyağı 2	0.62x10 ⁵	2.71x10 ⁵	7.51	0.60x10 ⁵	1.9	860	-	90	79	0.28x10 ⁵
Tereyağı 3	0.52x10 ⁵	2.59x10 ⁵	8.03	0.58x10 ⁵	1.6	469	0.18x10 ⁵	698	-	0.28x10 ⁵
Tereyağı 4	1.96x10 ⁵	0.16x10 ⁵	15.73	0.60x10 ⁵	2.4	69	0.24x10 ⁵	139	16	0.16x10 ⁵
Tereyağı 5	0.44x10 ⁵	1.10x10 ⁵	12.29	0.63x10 ⁵	2.2	510	0.16x10 ⁵	-	88	0.23x10 ⁵
Tereyağı 6	0.21x10 ⁵	0.34x10 ⁵	13.31	0.75x10 ⁵	2.6	978	0.21x10 ⁵	447	38	0.29x10 ⁵
Tereyağı 7	0.39x10 ⁵	1.70x10 ⁵	15.39	0.66x10 ⁵	1.9	351	0.19x10 ⁵	3	400	0.14x10 ⁵
Tereyağı 8	0.84x10 ⁵	3.10x10 ⁵	10.73	0.72x10 ⁵	2.2	814	0.04x10 ⁵	-	202	0.23x10 ⁵
Tereyağı 9	0.77x10 ⁵	0.52x10 ⁵	35.28	0.54x10 ⁵	3.2	789	0.08x10 ⁵	923	156	0.19x10 ⁵
Tereyağı 10	1.10x10 ⁵	3.10x10 ⁵	14.38	0.63x10 ⁵	2.6	1169	0.32x10 ⁵	119	255	0.21x10 ⁵
Tereyağı 11	1.50x10 ⁵	4.87x10 ⁵	23.05	0.79x10 ⁵	2.8	833	0.14x10 ⁵	133	359	0.41x10 ⁵
Tereyağı 12	1.30x10 ⁵	3.67x10 ⁵	17.30	0.69x10 ⁵	2.6	1057	0.02x10 ⁵	72	393	0.16x10 ⁵

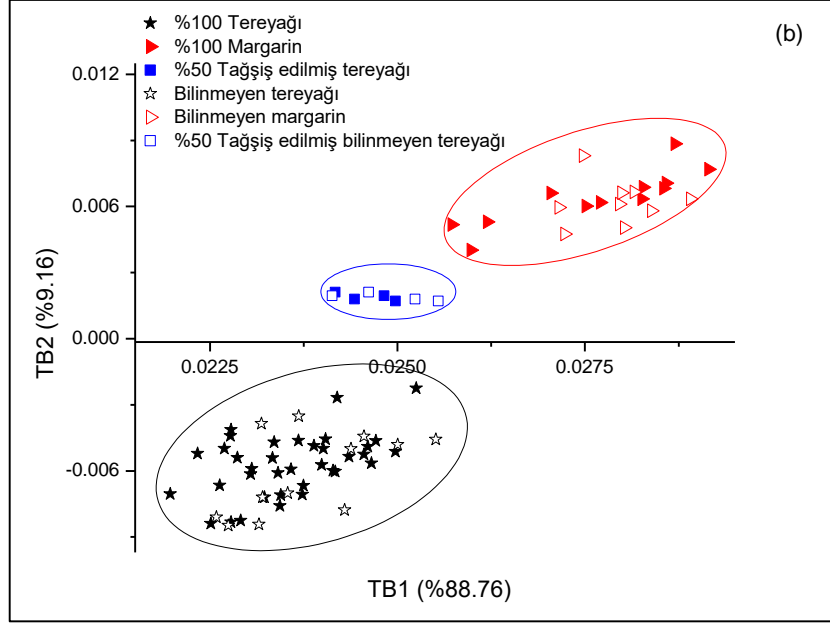
Margarin üretiminde kullanılmak üzere standart bir tuz değeri tanımlanmamıştır. Margarin üretiminde Na, K ve Ca tuzları emülsifiye edici, koruyucu, antioksidan sinerjisti ve asit düzenleyici gibi pek çok farklı amaçla kullanılmaktadır. Bu durum 32-1981 numaralı Kodeks Standardı'nın Gıda Katkıları bölümünden görülebilmektedir. Söz konusu tuzların kullanımında üst limit değerleri FAO tarafından üretici firmanın inisiyatifine bırakılmıştır [220]. Ülkemizde ise tereyağı örneklerinin içerebileceği maksimum tuz miktarı TSE tarafından ağırlıkça %2 olarak sınırlandırılmış olmakla birlikte margarin ve diğer sürülebilir yağlar için herhangi bir sınır değeri tanımlanmamıştır [204, 205]. Bu durum ülkemizde üretilen margarinlerin tereyağından çok farklı bir elemental kompozisyona sahip olmasına neden olmaktadır. Bu farklılık doğal olarak mevcut çalışmada margarin-tereyağı ayırımının yapılmasını kolaylaştırmıştır. Fakat söz konusu tuz etkisinin minimize edilebilmesi adına çalışmada analiz edilmek üzere tuzlu ve tuzsuz tereyağı örnekleri ve farklı oranlarda tuz içeren margarin örnekleri kullanılmıştır. Yukarıda da belirtildiği gibi loadings grafiği detaylı incelendiğinde gerçekleştirilen ayırımın yalnızca örneklerin Na içeriğindeki farklılıktan kaynaklanmadığı doğrulanmıştır.

Tereyağı ve margarin örnekleri arasındaki majör ve minör elemental kompozisyon farklılıklarının kümülatif olarak değerlendirilebilmesi adına kemometrik metotlar arasından kalitatif analiz için PCA ve kantitatif analiz için PLSR kullanılmıştır. Margarin ve tereyağı örneklerine ait grupların sınıflandırılması PCA ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örneklere ait 186-900 nm aralığındaki LIBS spektrumları kullanılmıştır. Her bir örnek üç paralelli hazırlanmıştır. Her örneğin üç paralelli ölçüm sonuçları kalibrasyon ve tahmin modellerinin kurulmasında kullanılmıştır. Şekil 4. 9 ile verilen PCA skor grafiğinden de anlaşılacağı gibi örnekler iki temel gruba ayrılmıştır. Söz konusu modelin geliştirilmesi amacıyla toplamda üç temel bileşen kullanılmıştır. En yüksek kümülatif varyans değerine sahip olan 1. ve 2. temel bileşenler kullanılarak PCA skor grafiği çizilmiştir. Burada ilk bileşen kümülatif varyansın %88.76'sını, ikinci bileşen %97.92'sini açıklamıştır.



Şekil 4. 9 Yağ örneklerinin PCA skor grafiği

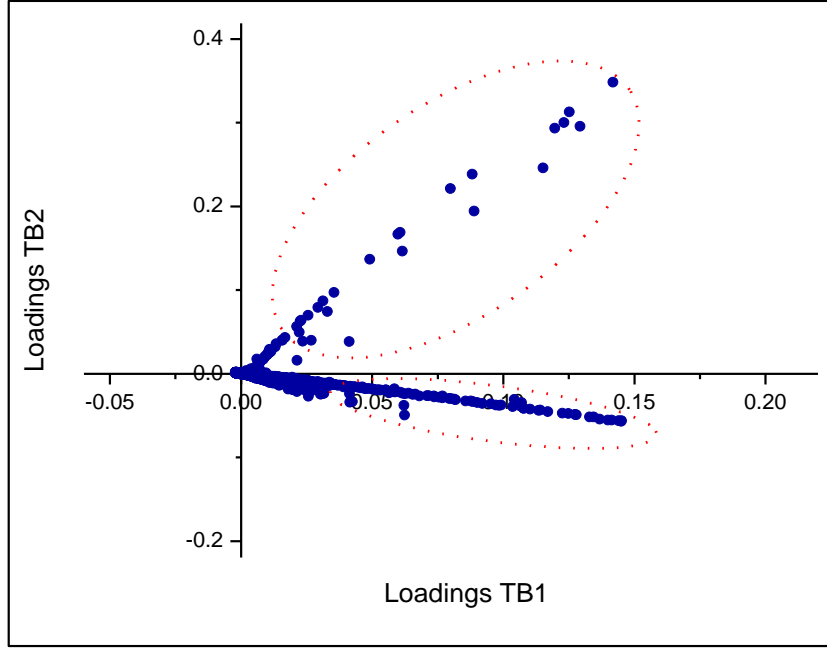
Kurulan PCA modeli sonucunda elde edilen grafik incelendiğinde Margarin2 örneğinin geriye kalan margarin örneklerinin oluşturduğu kümeden daha uzakta konumlandığı görülmektedir. Bu durum söz konusu örneğin nispeten daha yüksek olan Na içeriğinden (3390 ppm) kaynaklanmaktadır. Aynı örneğe ait elemental kompozisyon sonuçları incelendiğinde diğer majör ve minör elementler bakımından benzer değerlere sahip olduğu görülmüştür. Şekil 4. 10'da Margarin2 örneğine ait noktalar dışarıda tutularak skor grafiği yeniden çizilmiştir. Bu sayede oluşturulan PCA modeli ile sağlanan gruplandırma başarısı daha net bir şekilde gözlenmiştir.



Şekil 4. 10 Yağ örneklerinin düzenlenmiş PCA skor grafiği

Elde edilen gruplandırma başarısı kurulan model tarafından daha önce bilinmeyen (blind samples) tereyağı ve margarin örnekleriyle de doğrulanmıştır. Aynı grafikte %50 oranında margarinle tağışış edilmiş tereyağı örneğinin %100 tereyağı ve %100 margarin örneklerinin orta yerinde konumlanmış olması kantitatif bir analiz metodunun geliştirilmesine olan ihtiyacı ortaya koymuştur.

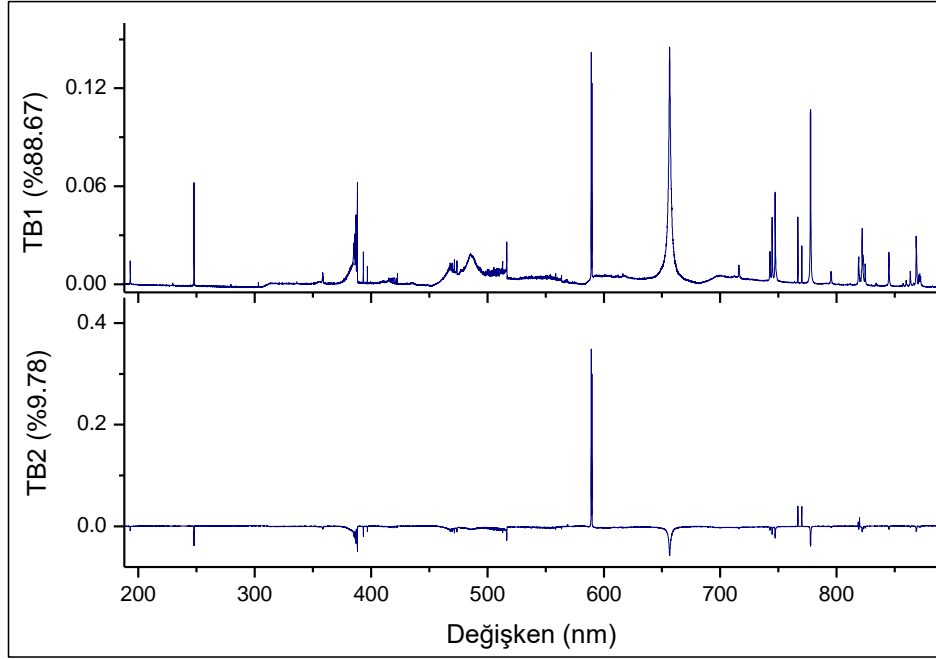
Şekil 4. 11 ile PCA analizine ait loadings grafiği verilmiştir. Loadings grafiği gruplar arası ayrımı kolaylaştıran spektral aralıkların ortaya konması amacıyla çizilmiştir. Loadings grafiklerinin değerlendirilmesinde orjinden dışa doğru sapan noktaların gruplar arası ayrımına sebep olan noktalar olduğu bilinmektedir. Söz konusu grafik detaylı bir şekilde incelendiğinde grafiğin üst kısmınının 588-591 nm dalgaboyu aralığına işaret ettiği tespit edilmiştir. Bu aralıkta örneklerin Na içeriklerinin farklılığı nedeniyle değişiklik görülmüştür.



Şekil 4. 11 Loadings değerlerinin TB1 ve TB2 için gösterimi

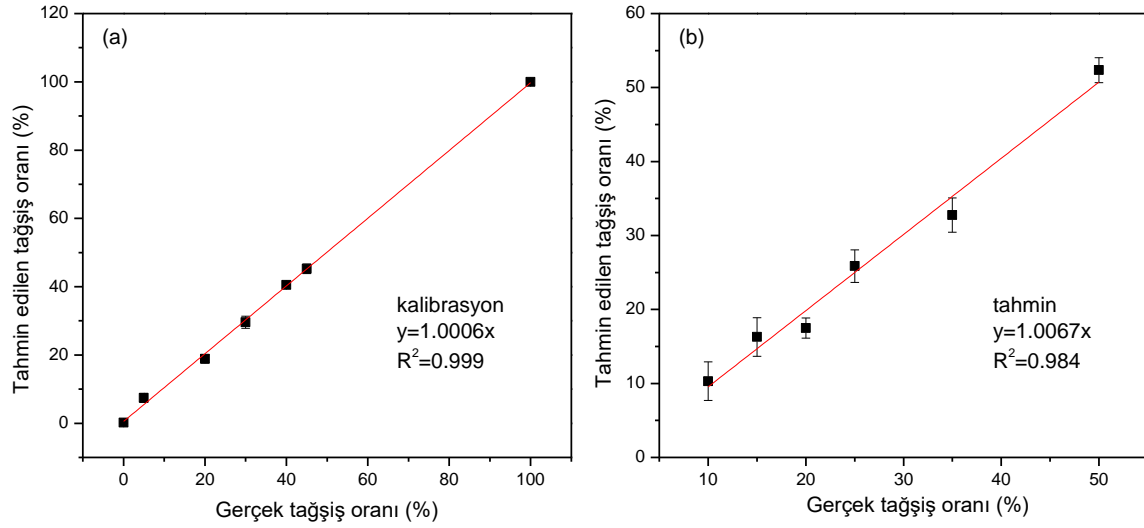
Grafiğin alt kısmı ise pek çok farklı spektral aralığa işaret etmekte olup bunlar temel olarak 387-399, 511-521, 588-591, 729-774 ve 775-785 dalgaboyu aralıklarıdır. Sırasıyla Fe, Ca, Mg, Na, Zn, N ve K miktarlarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Şekil 4. 12 ile verilen grafiklerde ise dalga boyu değerlerine karşı birinci ve ikinci temel bileşenler grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerde de benzer sonuçlar görülmüştür. Na, Ca ve K grupları arasındaki ayrımaya majör olarak; Mg, Fe ve Zn ise minör olarak katkıda bulunmuştur. Temel bileşen 2'nin değışkene karşı grafiğe geçirildiği durumda ise PCA ile ayrımaya Na içeriğinin majör, K içeriğinin minör katkısının olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 12 Loadings değeriinin TB1 ve TB2 için ayrı ayrı gösterimi

Toplanan LIBS spektrumlarının kantitatif analizi için PLSR kullanılmıştır. Kalibrasyon ve tahmin modelleri oluşturulurken %100 tereyağı, %100 margarin ve %5-50 arasında tağşışe uğratılmış örnekler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 13 ile verilmiştir. Kalibrasyon ve tahmin grafiklerinde yüksek belirleme katsayısı değeri, $R^2_{kal} = 0.999$ ve $R^2_{pred} = 0.984$, elde edilmiştir. Kurulan modellerin yeterince düşük RMSEC (2.02) ve RMSEP (3.37) değeriine sahip olmasına dikkat edilmiştir.



Şekil 4. 13 PLS (a) kalibrasyon ve (b) tahmin modelleri

Hesaplanan ve tahmin edilen her bir konsantrasyon değeri ile bunlara ait standart sapma değerleri Çizelge 4. 14’de verilmiştir.

Çizelge 4. 14 Kalibrasyon ve tahmin modellerine ait istatistiksel sonuçlar

Model	Ölçülen konsantrasyon (%)	Ortalama Tahmin Edilen Konsantrasyon (%)	Standart Sapma (%)
Kalibrasyon	0	0.2	0.2
	5	7.5	1.3
	20	18.9	1.3
	30	29.6	1.8
	40	40.5	0.2
	45	45.2	1.4
	100	100.0	0.8
Tahmin	10	10.3	2.6
	15	16.3	2.6
	20	17.5	1.3
	25	25.8	2.2
	35	32.8	2.3
	50	52.4	1.7

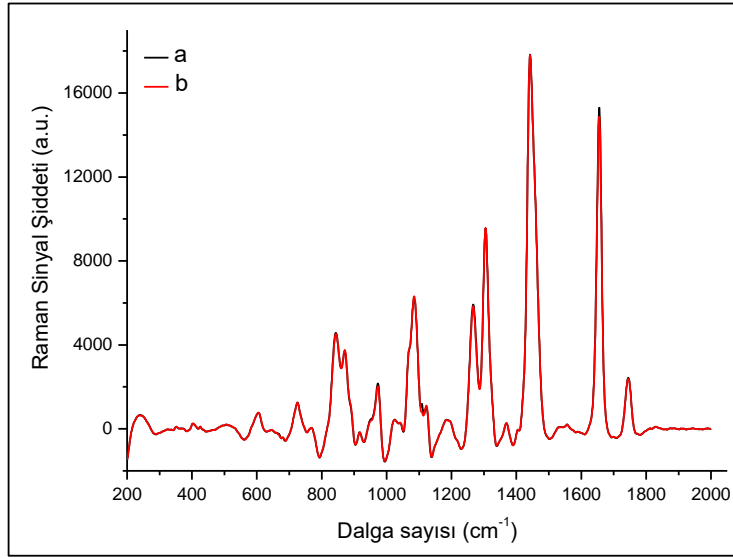
Model sisteminin hassasiyet ve kesinlik değerleri RSD ve REP değerleri üzerinden değerlendirilmiştir. Bu değerlerin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler genel bilgiler kısmında verilmiştir. LOD ve LOQ değerleri %3.9 ve %11.8 olarak hesaplanmıştır. RSD ve REP değerleri %11.3 ve %13.0 olarak hesaplanmıştır.

Tereyağı gibi őrnlrde kar amaçlı olarak yapılan tağişler yőksek oranlarda yapıldığından geliştirilen LIBS metodu için elde edilen LOD ve LOD değerlerinin bu tarz tağişlerin tespiti için tatmin edici olduğu gőrılmektedir. RSD değeri geliştirilen PLS modelinin başarisının tanımlanması için hesaplanmaktadır. İlgili literatőr incelendiğinde RSD değerlerini etkileyen majör faktörlerin örneğin kompleks yapısı, homojenliği, yözey özellikleri ve partiköl boyutu ile lazer atımının tekrarlanabilirlik özellikleri olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen LIBS temelli metotlarda RSD değerleri %1 ile %10 arasında değişmekte olup [221] mevcut çalışmada hesaplanan RSD değeri bu aralığa yakın bulunmuştur.

Tereyağı örneklerinde margarin kullanılarak yapılan tağişin belirlenmesi amacıyla örneklerin elemental karakterizasyonunun LIBS temelli olarak geliştirilen bir metot üzerinden yapılması hedeflenmiştir. Literatőrde tereyağı ve margarin örneklerinin elemental kompozisyon olarak farklı olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Çeşitli bitkisel yağlar, margarin ve tereyağı örneklerinde Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, and Cr ile bitkisel yağların hidrojenizasyonunda bir diğer deyişle margarin üretiminde katalizőr olarak kullanılan Ni miktarları AAS ile belirlenmiştir [222]. Bir diğer çalışmada zeytinyağı, fındık yağı, ayçiçek yağı, mısır yağı, margarin ve tereyağı örneklerinde yapılan elemental kompozisyon analizinde Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Co, Cd, Na, K, Ca and Mg elementleri aranmıştır [14]. Bitkisel yağlar, tereyağı ve margarin örneklerinde yapılan bir başka çalışmada total kaliteye (aroma ve stabilite) etki eden Cd, Co, Cr, Ni ve Mn elementleri ICP-OES kullanılarak belirlenmiştir [223]. Rapor edilen bu çalışmalarda örnekler arasındaki elemental kompozisyon farkının tereyağı tağişinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilip kullanılamayacağı henüz araştırılmamıştır. Bu yönüyle mevcut çalışma literatőrdeki diğer çalışmalardan tamamen ayrılmaktadır. Öte yandan, tereyağı örneklerinde, üretim sürecinin gerektirdiği tuzların kullanımı ile margarin formuna dőnüřtürölmemiř haldeki bitkisel yağların eklenmesi yoluyla yapılan tağişlerin mevcut çalışma kapsamının dışında tutulduğunun belirtilmesi gerekmektedir.

4.3 Tavuk Örneklerindeki Tağışı RS ile Belirlenmesi

Özellikle et ve et ürünlerinin dondurulup eritilmiş olduğu halde tüketiciye tazeymiş gibi sunulması üretim süreçlerine dair bilginin etiket beyanına uymaması kapsamında bir gıda tağışı olarak değerlendirilmektedir. Tez çalışması kapsamında taze ve dondurulup-eritilmiş tavuk yağları arasındaki farklılıklar Raman spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Aşağıda bu çalışma kapsamında analiz edilen örneklere ait Raman spektrumları verilmiştir. Şekil 4. 14'de hekzan ve Folch ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak taze tavuklardan elden edilen tavuk yağlarına ait ortalama Raman spektrumları verilmiştir.



Şekil 4. 14 a) Hekzan b) Folch ekstrakte taze tavuk yağlarının ortalama Raman spektrumları

Şekil 4. 14 incelendiğinde farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen örneklerin Raman spektrumunun çoğunlukla benzer sinyal şiddetine sahip bantlardan oluştuğu görülmektedir. Raman spektrumlarında gözlemlenen karakteristik bantların moleküler bağlarla ilişkilendirilmesine ait detaylı açıklamalar Çizelge 4. 15'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 15 Tavuk yağlarının karakteristik Raman bantları

Pik pozisyonu (cm ⁻¹)	Titreşimsel Mod	Referans
241	Skeletal mod	[224]
373	Alifatik zincire ait CCC deformasyonları	[224]
403	Alifatik zincirlere ait CCC deformasyonları ve olefinik gruplara ait C=C-C düzlem dışı deformasyonlar	[224]
604, 726	Olefinik CH ve OH gruplarına ait düzlem dışı deformasyonlar	[224]
800-900 (872, 869, 889)	v(C-C) gerilme -(CH ₂) _n -	[224]
971	Düzlem dışı eğilme cis izomer γ(=C-H)	[224, 225]
1023, 1039	v(C-C) gerilme -(CH ₂) _n -	[226]
1062, 1085, 1097	Alifatik gerilme v(C-C)	[135, 227, 228]
1120	Alifatik faz içi gerilme v(C-C)	[226]
800-970, 1060-1150 (841, 869, 889, 971; 1082, 1120, 1145)	C-O bağlarına karakteristik bantlar	[135, 229]
800-900, 1000-1100 (841, 869, 889; 1023, 1039, 1082)	Skeletal C-C bağlarına karakteristik bantlar	[224]
1265-1270	Simetrik rock <i>cis</i> çift bağ δ(=C-H)	[126, 130, 135, 224, 227, 230, 231]
1296-1305	Faz içi metilenik gruplara (=CH ₂) ait burulma	[126, 135, 227, 230, 231]
1438-1442	Metilenik gruplara (=CH ₂) ait kesilme titreşimleri	[126, 130, 131, 135, 227, 230, 231]
1650-1671	<i>cis</i> v(C=C) çift bağ gerilme	[126, 130, 131, 135, 227, 231]
1741-1750	Ester karbonil gerilme v(C=O)	[126, 130, 131, 135, 227, 231]

Tavuk yağlarının Raman spektrumlarında gözlenen bantlar sırasıyla 241, 373, 403, 604, 726, 767, 813, 843, 872, 890 954, 974, 1023, 1044, 1065, 1085, 1121, 1267, 1306, 1446, 1655 ve 1744 cm^{-1} 'de konumlanmıştır. Bun bantların analiz edilen örnekte bulunması muhtemel olan moleküllerle ilişkilendirilmesinde Czamara ve ark. tarafından yürütülen çalışma temel alınmış ve analiz edilen tavuk örneklerine ait Raman spektrumlarında gözlemlenen karakteristik bantlardan sorumlu olabilecek moleküllerin varlığı irdelenmiştir. Söz konusu çalışmada yağ asitlerinin, triaçilgliserollerin, membran lipitlerinin, kolesterol ve kolesterol esterlerinin Raman spektrumları detaylı bir şekilde incelenmiştir [226].

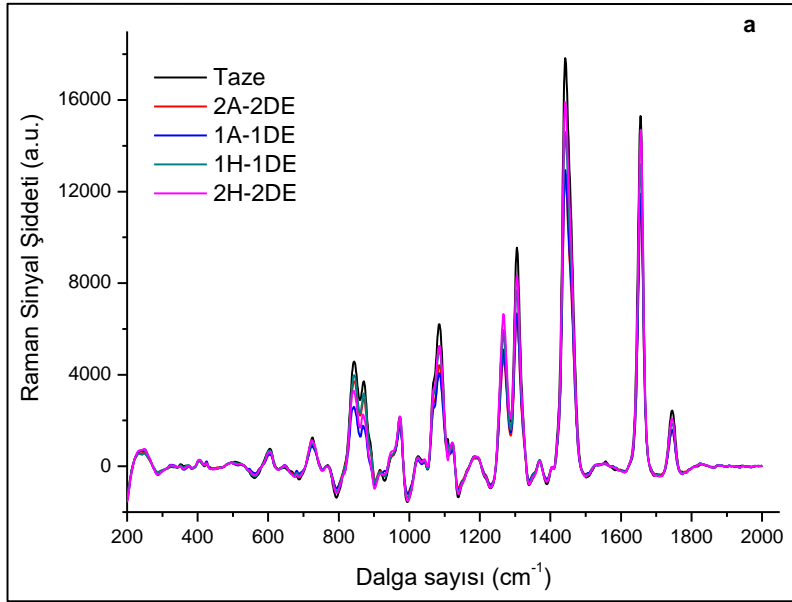
Tavuk yağlarının Raman spektrumlarında 872, 974, 1085, 1121, 1267, 1306, 1446 ve 1655 cm^{-1} konumlarında gözlenen bantlar Czamara ve ark. tarafından 869, 971, 1082, 1120, 1264, 1303, 1440 ve 1656 cm^{-1} 'de gözlenmiş olup oleik asite ait karakteristik Raman bantları olarak belirlenmiştir. Bu durumda analiz edilen tavuk yağlarında oleik asit varlığından söz edebilmek mümkündür. Benzer şekilde Czamara ve ark. tarafından alfa-linolenik asite ait 869, 971, 1066, 1082, 1264, 1303, 1440 ve 1656 cm^{-1} karakteristik bant serisi analiz edilen tavuk yağlarında 872, 974, 1065, 1085, 1267, 1306, 1446 ve 1655 cm^{-1} 'de gözlenmiştir.

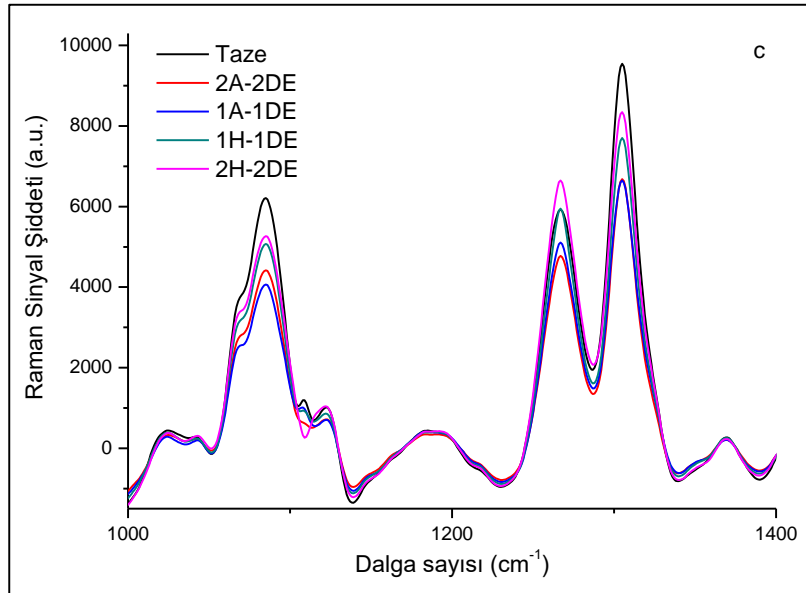
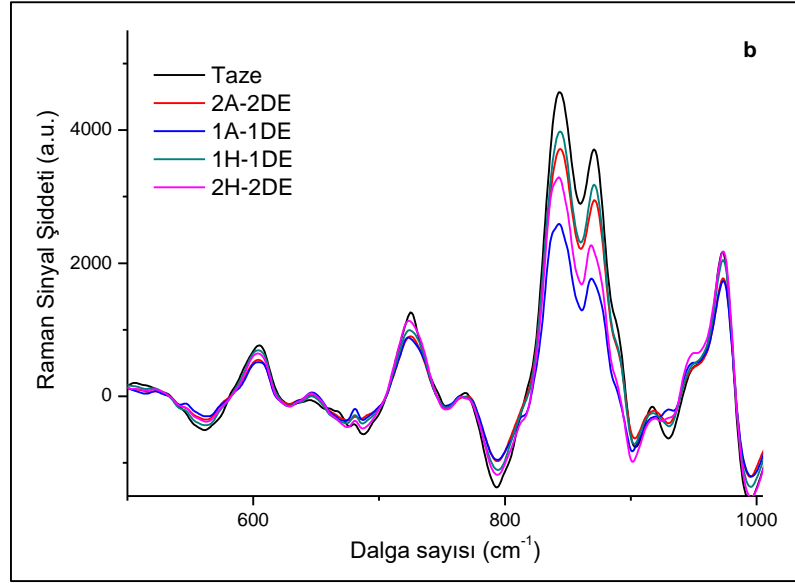
Trioleine ait 869, 1066, 1082, 1120, 1264, 1303, 1440, 1656 ve 1740 cm^{-1} karakteristik bant serisi tavuk örneklerinde 872, 1065, 1085, 1121, 1267, 1306, 1446, 1655 ve 1744 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Benzer şekilde trilinolenine ait karakteristik bant serisi 869, 1066, 1082, 1264, 1303, 1440, 1656 ve 1740 cm^{-1} tavuk yağına ait örneklerde 872, 1065, 1085, 1267, 1306, 1446, 1655 ve 1744 cm^{-1} 'de görülmüştür. Bunlara ek olarak fosfatidilkolin molekülüne spesifik karakteristik bantlar 722, 869, 1066, 1082, 1120, 1264, 1303, 1440, 1656 ve 1740 cm^{-1} tavuk yağlarının Raman spektrumlarında 726, 872, 1065, 1085, 1121, 1267, 1306, 1446, 1655 ve 1744 cm^{-1} 'de bulunmaktadır. Czamara ve ark. tarafından da belirtildiği gibi C-C gerilme modunu temsil eden bantlar 1065, 1089 ve 1120 cm^{-1} 'de konumlanmaktadır. Bu bantlar mevcut çalışmadaki tavuk yağları için sırasıyla 1065 ve 1085 cm^{-1} 'deki pikler ve 1121 cm^{-1} 'de omuz olarak konumlanmıştır. Fosfatidilkolin molekülüne ait kolin grubunun diyagnostik bantlarının 719 ve 876 cm^{-1} 'de konumlandığı belirtilirken söz konusu bantlar tavuk yağları için 726 ve 872 cm^{-1} 'de konumlanmıştır. Fosfatidiletanolamin

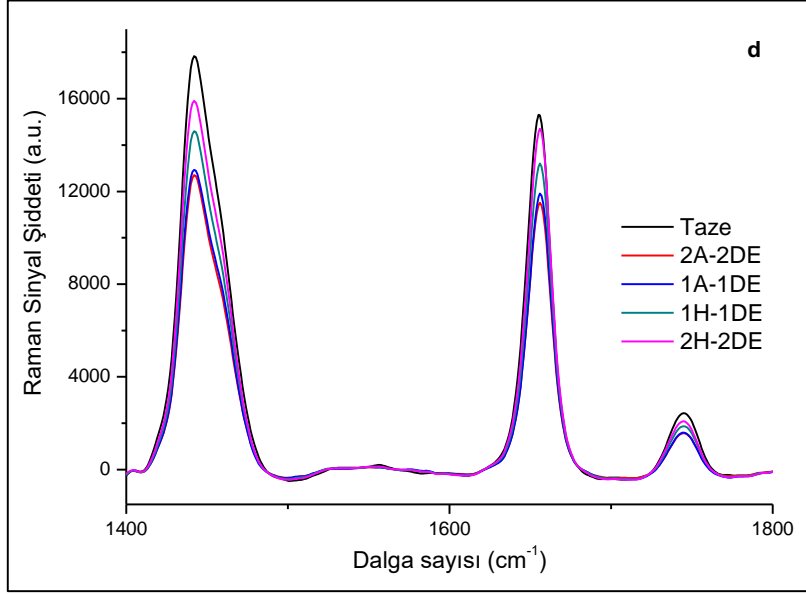
molekülüne ait karakteristik bant serisi 760, 1082, 1120, 1264, 1303, 1440, 1656 ve 1740 cm^{-1} tavuk yağlarının Raman spektrumlarında 767, 1085, 1121, 1267, 1306, 1655 ve 1744 cm^{-1} 'de görülmekle birlikte fosfatidiletanolamin molekülünün diyagnostik bandı olarak kabul edilen 760 cm^{-1} 'deki bant tavuk yağı örneklerinde pik noktası yaklaşık olarak 767 cm^{-1} 'de konumlanmış bir omuz olarak gözlenmiştir.

Analiz edilen tavuk örneklerinin Raman spektrumlarında 890, 1065, 1085, 1121, 1306, 1446 ve 1655 cm^{-1} 'de konumlanan karakteristik bantlar gözlenmiştir. Oda sıcaklığındaki doymuş ve doymamış yağ asitlerinin Raman spektrumlarının incelendiği çalışmalarda doymuş yağ asitlerinin Raman spektrumlarında 891, 1062, 1097, 1128, 1296, 1419 ve 1440 cm^{-1} 'de karakteristik bantlar gözlenirken yine doymuş yağ asitlerinin Raman spektrumlarında 1266 ve 1655 cm^{-1} 'deki bantların gözlenmediği belirtilmiştir. Bu çalışmalarda 1062, 1097 ve 1128 cm^{-1} 'deki bantlar hidrokarbon zincirindeki C-C gerilmeleri ve 1296 cm^{-1} 'deki bant CH_2 burulması ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışma kapsamında 1000-1150 cm^{-1} bölgesinin hidrokarbon zincirinin konformasyonel durumuna bağlı olarak hassas bir şekilde değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. 1062 ve 1128 cm^{-1} 'deki bantlar yüksek düzenlilikteki trans zincir bölgeleriyle, 1097 cm^{-1} 'deki bant ise *gauche* rotasyonu gösteren yapılarla ilişkilendirilmiştir. Düzensizliği yüksek bir zincirde *gauche* bandının genişlediği ve daha düşük frekanslara kaydığı ayrıca 1128 ve 1063 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetlerinin azaldığı belirtilmiştir. Palmitik ve stearik asit gibi doymuş yağ asitleri oda sıcaklığında yüksek bir düzenlilik gösterirken C=C bağları içeren oleik asitin zincir düzensizliğine sahip olduğu görülmüştür. Palmitik ve stearik asit gibi tamamen doymuş yağ asitleri ergime noktalarının üstündeki bir sıcaklığa ısıtıldıklarında hidrokarbon zincirinde düzensizlik indüklenmekte ve bunlara ait Raman spektrumları oleik asite benzemekte fakat yine de doymamış çift bağlara spesifik olan 1266 ve 1655 cm^{-1} 'deki bantlar gözlenmemektedir. Buradan yola çıkılarak 1000-1150 aralığındaki bantların yüksek düzenlilikteki doymuş yağ asitleri varlığına, 1266 ve 1655 cm^{-1} 'deki bantların doymamış yağ asitleri varlığının işaretçisi olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [228, 232]. Analiz edilen tavuk örneklerine ait elde edilen bulgular rapor edilen çalışmaların bulgularıyla kıyaslandığında tavuk yağlarında hem doymuş hem de doymamış yağ asitlerinin bulunduğunu söylemek mümkündür.

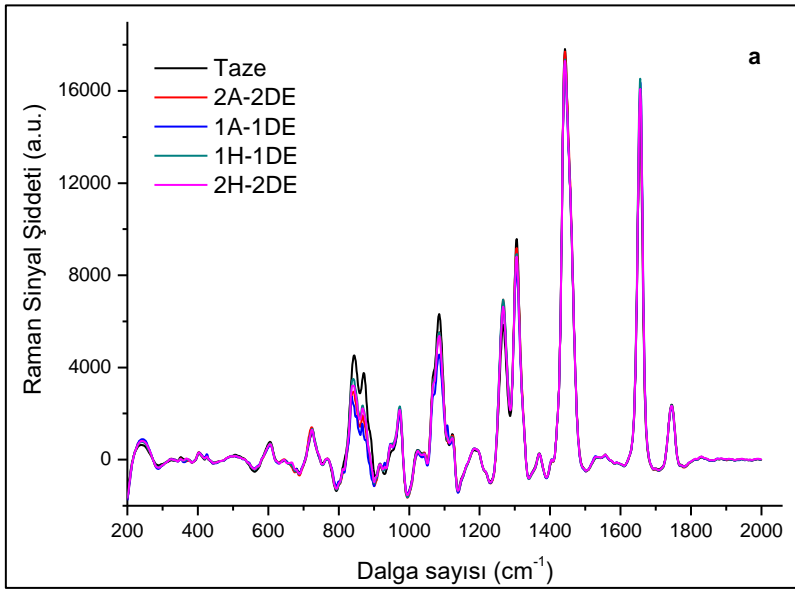
Söz konusu bantlarda dondurma-eritme süreçleriyle gerçekleşen değişimler haftalık ve aylık bazda incelenmiştir. Taze tavuk örneklerinin yanı sıra haftalık bazda bir ve iki kez dondurma-eritme döngülerine maruz kalan 1H-1DE ve 2H-2DE grupları ile aylık bazda bir ve iki kez dondurma-eritme döngülerine maruz kalan 1A-1DE ve 2A-2DE grupları olmak üzere toplamda beş farklı grup örnek birbiriyle karşılaştırılmıştır. Hekzan ve Folch ekstraksiyonlarıyla elde edilen her bir grubu temsil eden tavuk yağlarına ait ortalama Raman spektrumları sırasıyla Şekil 4. 15 ve Şekil 4. 16 ile gösterilmiştir.

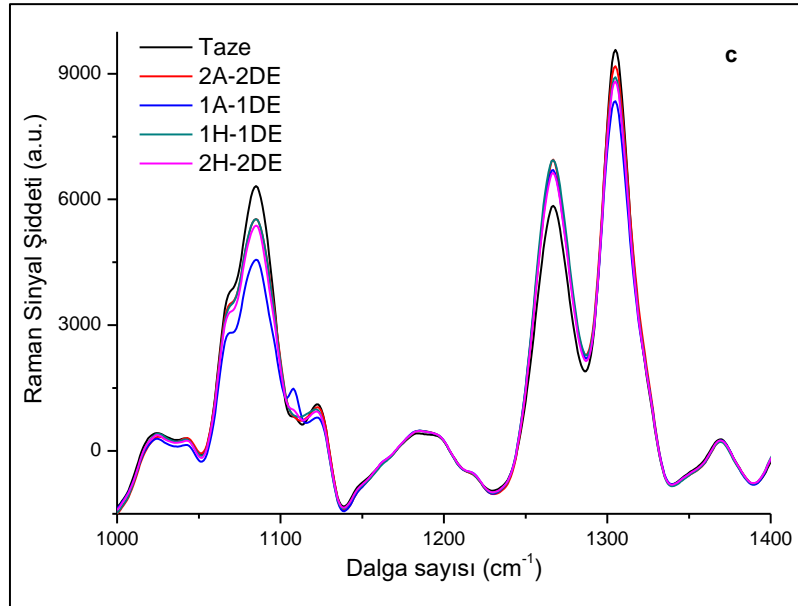
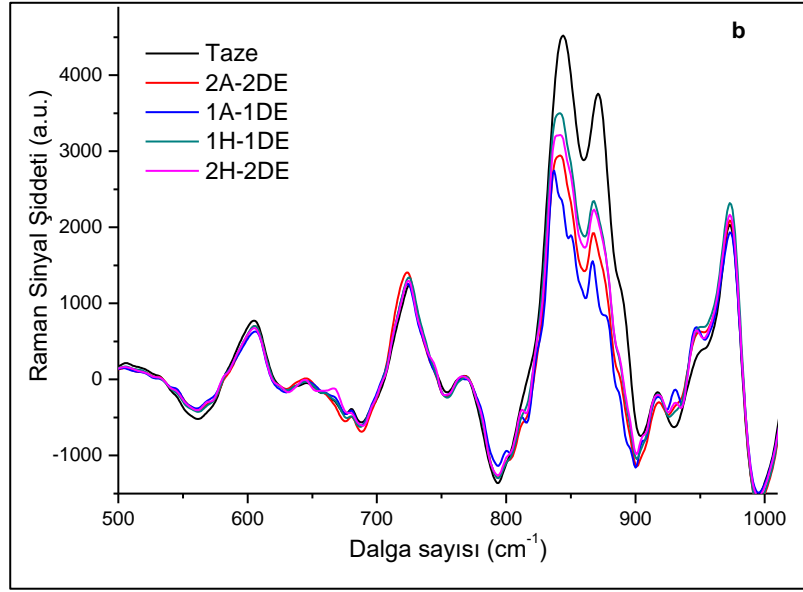


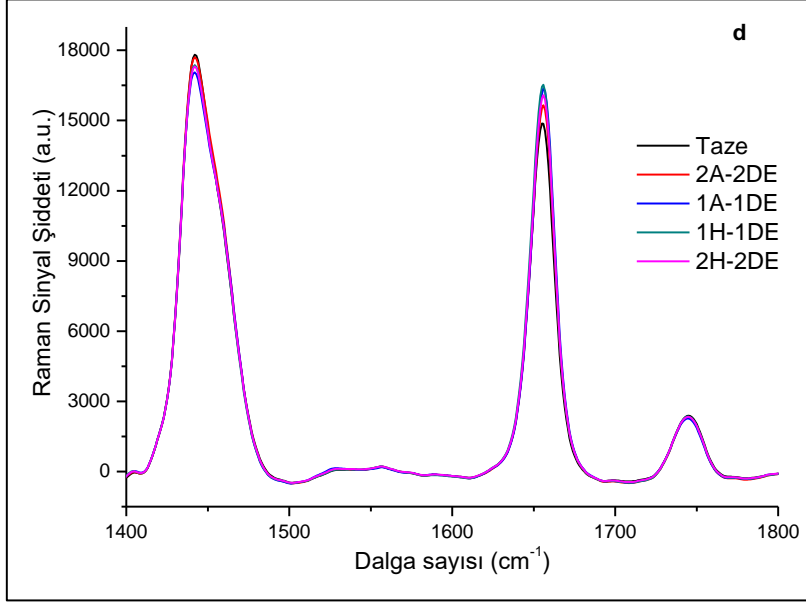




Şekil 4. 15 Hekzan ekstrakte yağların a) 200-2000, b) 500-1000, c) 1000-1400 ve d) 1400-1800 cm⁻¹ aralığındaki Raman spektrumlarının değişimi



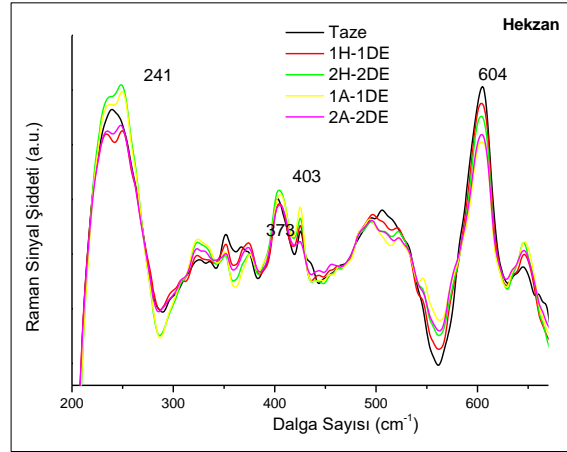




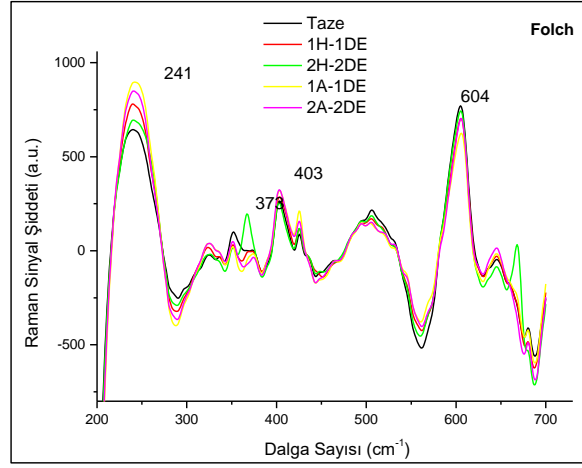
Şekil 4. 16 Folch ekstrakte yağların a) 200-2000, b) 500-1000, c) 1000-1400 ve d) 1400-1800 cm⁻¹ aralığındaki Raman spektrumlarının değişimi

Şekil 4. 15 a ve Şekil 4. 16 a'da 200 ile 2000 cm^{-1} dalgasayısı aralığındaki ortalama Raman spektrumlarının tamamı görülmektedir. Dondurma-eritme işlemlerinin Raman spektrumlarında neden olduğu değişikliklerin gözlemlenmesi amacıyla Şekil 4. 15 b, c ve d ile Şekil 4. 16 b, c ve d'de Raman spektrumlarının farklı bölgeleri gerekli eksen düzenlemeleri yapılarak yeniden gösterilmiştir. Söz konusu aralıklardaki majör bantlar her bir örnek için tek tek belirlendikten sonra her bir bandın alan, genişlik, yükseklik ve pik pozisyonu değerleri OriginPro 7.5 kullanılarak belirlenmiştir.

Tavuk yağlarına ait Raman spektrumlarının başlangıç bölgesini oluşturan 200-700 cm^{-1} aralığı düşük sinyal şiddetine sahip geniş bantlardan oluşmaktadır. Bu bantların pik pozisyonları 241, 373, 403 ve 604 cm^{-1} 'de konumlanmıştır. Hekzan ve Folch ekstrakte örneklerin ortalama Raman spektrumlarının bu bölgesi Şekil 4. 17 ve Şekil 4. 18 ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 17 Hekzan ekstrakte yağların 800 cm^{-1} 'in altındaki ortalama Raman spektrumları

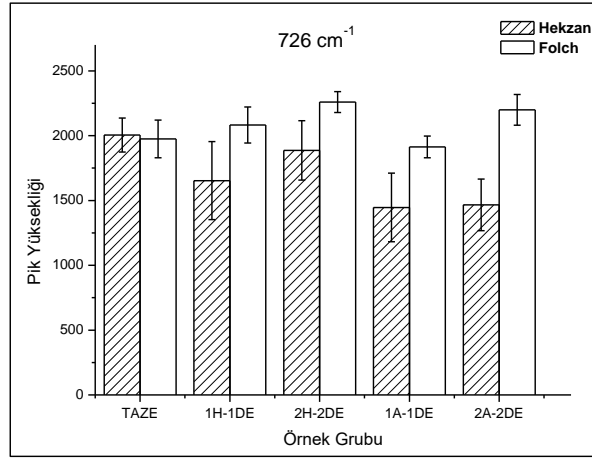


Şekil 4. 18 Folch ekstrakte yağların 800 cm⁻¹'in altındaki ortalama Raman spektrumları

Şekil 4. 17 ve Şekil 4. 18 incelendiğinde dondurma-eritme döngüleriyle bu yağların bir takım şekil ve sinyal şiddeti değişikliklerine uğradıkları görülmektedir. Machado ve ark. tarafından linoleik asidin oksidasyon sürecinin Raman spektroskopisiyle incelendiği çalışmada Raman spektrumunun 800 cm⁻¹'in altındaki bölgesinin düşük sinyal şiddetine sahip geniş bantlardan oluştuğu belirtilmiştir. Bu bölgede 604 ve 726 cm⁻¹'de konumlanan bantlar olefinik CH ve OH gruplarıyla ilişkilendirilmektedir. Daha düşük dalga sayılarındaki Raman sinyalleri genellikle iskelettaki ağır atomların titreşimlerinden kaynaklanmakta olup 403 cm⁻¹'deki bant alifatik zincirlerin CCC deformasyonu ve olefinik grupların C=C-C düzlem dışı deformasyonları ile açıklanmaktadır. 373 cm⁻¹'deki bant alifatik zincirin CCC deformasyonları ile 241 cm⁻¹'deki bant skeletal mod ile açıklanmaktadır. Oksidasyonun başlangıç aşamasında cis-cis molekülleri cis-trans konjüge sistemlere çevrilmekte ve bu nedenle molekülün skeletal yapısı uyarılmakta ve söz konusu değişiklikler Raman spektrumunun bu bölgelerine yansımaktadır [224]. Bu bilgiler ışığında tavuk örneklerine uygulanan dondurma-eritme süreçlerinin neden olduğu oksidasyon reaksiyonları nedeniyle tavuk yağlarına ait Raman spektrumlarının 800 cm⁻¹'in altındaki bölgede bir takım değişikliklerin gerçekleştiği söylenebilmektedir.

Raman spektrumlarının 500-1000 cm^{-1} dalgasayısı aralığındaki bölümünde 726, 767, 813, 843, 872, 890, 954 ve 974 cm^{-1} 'de konumlanan bantlar bulunmaktadır. Bu bantların yükseklik değerlerinde dondurma-eritme süreçleriyle gerçekleşen değişimler sırasıyla Şekil 4.19-Şekil 4.29 aralığındaki grafikler ile gösterilmiştir.

Hekzan ve Folch ekstraksiyonlarıyla elde edilen yağların Raman spektrumlarında 726 cm^{-1} 'de konumlanan bandın yükseklik değerlerindeki değişim Şekil 4. 19 ile verilmiştir.



Şekil 4. 19 726 cm^{-1} bandının değişimi

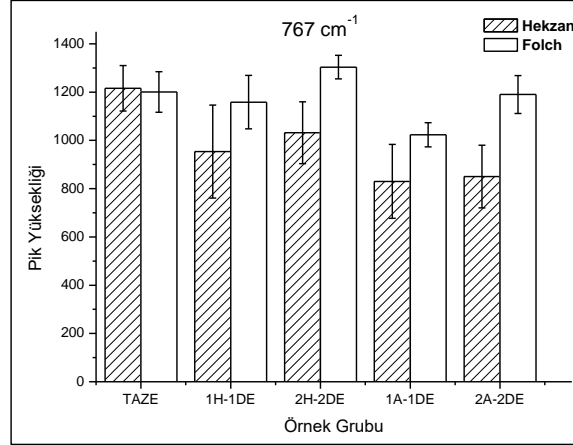
Şekil 4. 19 incelendiğinde söz konusu banttaki değişimin Hekzan ve Folch ekstraksiyonları için farklı şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Hekzan ekstraksiyonu uygulanan örneklerde aylık bazda haftalık baza kıyasla daha fazla olmak üzere sinyal şiddetinin taze örneklerle göre azaldığı görülmektedir. Hekzan ekstrakte örnekler için standart sapma değerlerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum göz önünde bulundurduğunda haftalık bazdaki dondurma-eritme döngüleri nedeniyle söz konusu bantta gözlenen değişimlerin salınım olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Aylık bazdaki değişimler için standart sapma değerlerinin yine yüksek olduğu görülmekle birlikte bu salınımlar göz önünde bulundurduğunda da söz konusu sinyaldeki azalmanın anlamlı olduğu düşünülmektedir.

Tachikawa ve ark. tarafından rapor edilen çalışmada linolenik asidin demir varlığına bağlı olarak geçirdiği peroksidasyon reaksiyonları Raman spektroskopisi tekniğiyle incelenmiştir. Bu çalışmada 726 cm^{-1} 'deki bant C=C çift bağıyla ilişkilendirilmiş ve peroksidasyon nedeniyle bu bandın sinyal şiddetinin azaldığı belirtilmiştir [229]. Bu bilgi ışığında sinyal şiddetinde gözlemlenen azalmanın dondurma-eritme nedeniyle lipid yapısında gerçekleşen peroksidasyon reaksiyonlarıyla açıklanabileceği düşünülmektedir. Lipitlerin peroksidasyon reaksiyonları ortamdaki hidroksi radikallerinin başlatıcı etkisiyle gerçekleşmekte olup özellikle çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyon reaksiyonlarına oldukça eğilimlidirler [233]. Tavuk yağının %65 oranında doymamış yağ asitlerinden oluştuğu bilinmektedir [234]. Linoleik asitin otooksidasyon sürecinin Raman spektroskopisi ile takip edildiği bir diğer çalışmada 726 cm^{-1} 'de gözlenen banda ait sinyal şiddeti azalışı oksidasyonla ilişkilendirilmiştir [224].

Öte yandan Folch ekstraksiyonu uygulanan örneklerin genel olarak standart sapma değerleri Hekzan ekstrakte örneklerle kıyasla daha düşüktür. Söz konusu bandın sinyal şiddeti ise hem haftalık hem de aylık bazdaki dondurma-eritme döngü sayısı arttıkça artmıştır. Polar özellikli bir membran lipiti olan fosfatidilkolin molekülüne ait kolin grubunun diyagnostik bantlarından birinin 726 cm^{-1} 'de konumlandığı rapor edilmektedir [226]. Elde edilen sonuçlar ve literatür bilgileri birlikte değerlendirildiğinde sinyal şiddetinde gözlenen söz konusu artışın, tekrarlayan dondurma-eritme döngüleri nedeniyle gerçekleşen membran disintegrasyonu oranının artması ve polar çözücülerin kullanımıyla gerçekleştirilen Folch ekstraksiyonu ile fosfatidilkolin gibi polar membran lipitlerinin ekstrakte edilebilirliklerinin artması ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

Raman spektrumlarının 500-1000 cm^{-1} dalgasayısı aralığındaki bir diğer bant 767 cm^{-1} 'de konumlanmıştır. Dondurma-eritme döngüleri nedeniyle bu bantın sinyal şiddetinde gerçekleşen değişimler

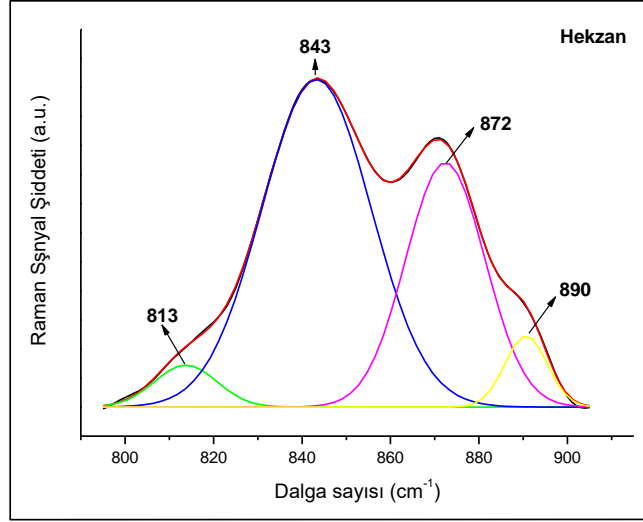
Şekil 4. 20 ile verilmiştir.



Şekil 4. 20 767 bandının cm^{-1} değişimi

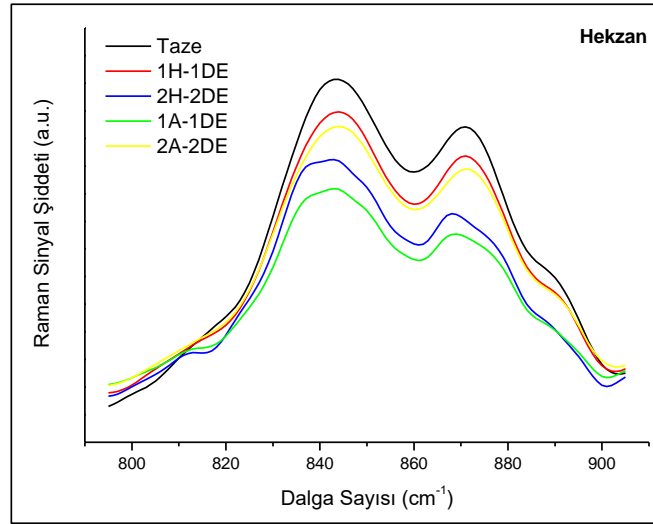
Şekil 4. 20 incelendiğinde 726 cm^{-1} 'deki bantta gözlemlenen değişimlere benzer şekilde 767 cm^{-1} 'de konumlanan bu bantın da hekzan ekstrakte örnekler için haftalık bazda yüksek bir salınım gösterdiği fakat aylık bazda standart sapma değerleri halen yüksek olmakla birlikte sinyal şiddetinin aylık bazda dondurulup eritilen örnekler için bir azalış trendinde olduğu görülmüştür. Folch ekstrakte örnekler için ise döngü sayısı arttıkça sinyal şiddetinin arttığı görülmüştür. Söz konusu bant polar bir membran fosfolipiti olan fosfatidiletanolamin molekülünün diyagnostik bandı olarak kabul edilmektedir [226]. Folch ekstrakte örneklerde gözlemlenen sinyal artışının, artan dondurma-eritme döngü sayısının fosfatidiletanolamin molekülünün ekstrakte edilebilirliğinde neden olduğu artışla açıklanabileceği düşünülmektedir.

Raman spektrumlarının 500-1000 cm^{-1} dalgasayısı aralığının 800-900 cm^{-1} bölümünde 813, 843, 872 ve 890 cm^{-1} 'de konumlanan bantlar dekonvolüsyon yolu ile tespit edilmiştir. Hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen taze örnekler için ortalama Raman spektrumunun bu bölgesine uygulanan dekonvolüsyon işlemi Şekil 4. 21'de örnek teşkil etmesi açısından gösterilmiştir. Dekonvolüsyon işlemi OriginPro 7.5 kullanılarak yapılmıştır. Aynı program kullanılarak dekonvolüsyon işlemi öncesinde her bir spektruma bir baseline düzeltmesi işlemi uygulanmıştır.

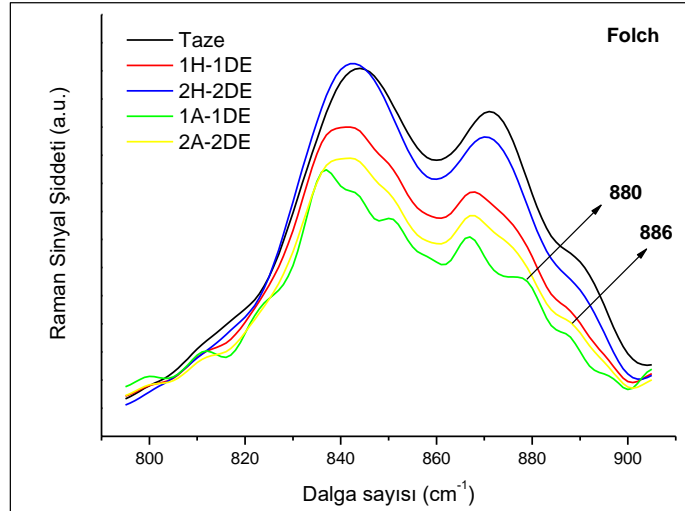


Şekil 4. 21 Taze örneklerde 800-900 cm^{-1} aralığının dekonvolüsyonu

Söz konusu bantların dondurma-eritme döngüleri nedeniyle gösterdiği değişimler hekzan ve Folch ekstrakte örnekler için sırasıyla Şekil 4. 22 ve Şekil 4. 23'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 22 Hekzan ekstrakte yağlarda 800-900 cm⁻¹ aralığının değişimi

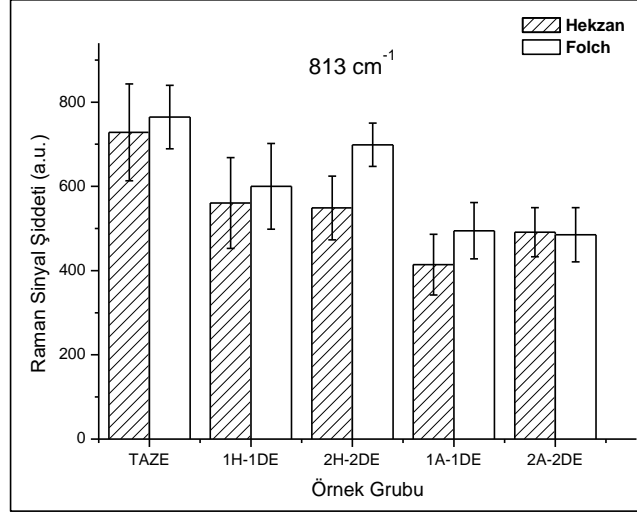


Şekil 4. 23 Folch ekstrakte yağlarda 800-900 cm⁻¹ aralığının değişimi

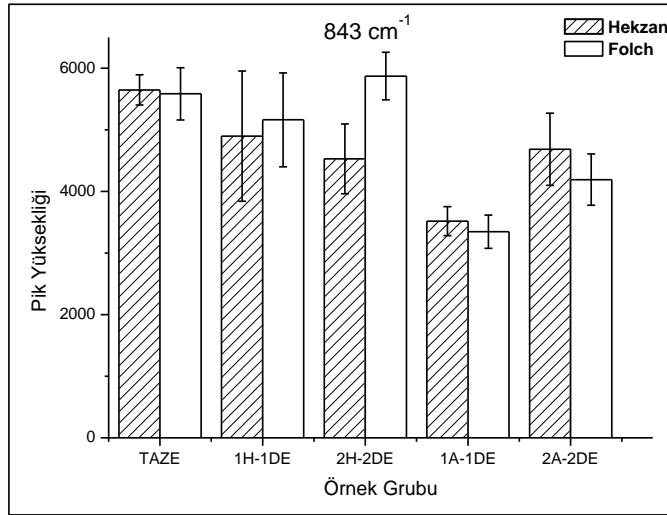
Şekil 4. 22 ve Şekil 4. 23 incelendiğinde Folch ekstrakte örneklerden 1H-1DE, 1A-1DE ve 2A-2DE örneklerinde 870-900 cm⁻¹ aralığının değişim göstermeye oldukça eğilimli olduğu görülmüştür. Öyle ki; 1H-1DE grubunda 880 cm⁻¹'de konumlanmış 318±47 birim sinyal şiddetine sahip bir bant gözlenmiştir.

1A-1DE grubunda ise aynı aralıkta 880 cm^{-1} 'de konumlanmış 336 ± 77 birim sinyal şiddetine sahip bir bant gözlenmiştir. 2A-2DE grubunda ise bu aralıkta gözlenen ekstra bant 886 cm^{-1} konumlanmış olup 218 ± 3 birim sinyal şiddetine sahiptir.

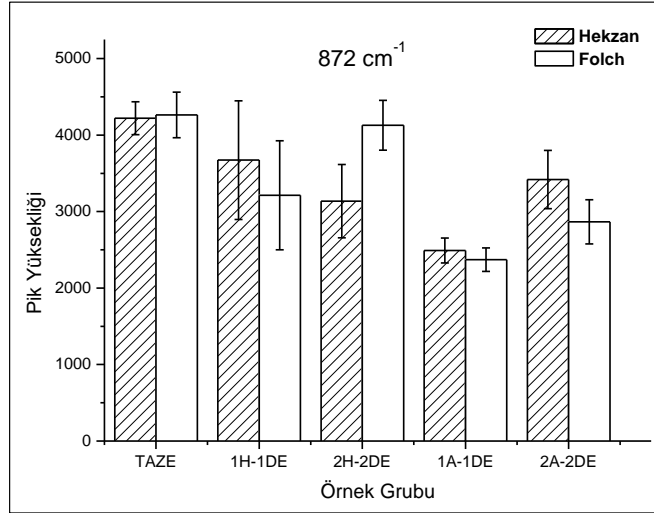
813 , 843 , 872 ve 890 cm^{-1} 'de konumlanan bantların pik yüksekliklerinde dondurma-eritme döngüleri nedeniyle gerçekleşen değişimler sırasıyla Şekil 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ile gösterilmiştir.



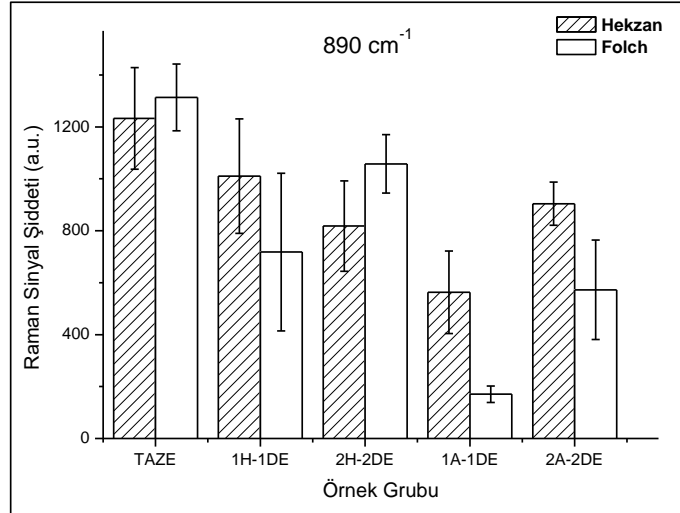
Şekil 4.24 813 cm^{-1} bandının değişimi



Şekil 4.25 843 cm^{-1} bandının değişimi



Şekil 4. 26 872 cm⁻¹ bandının değişimi



Şekil 4. 27 890 cm⁻¹ bandının değişimi

Tavuk örneklerinde 813 cm⁻¹'de konumlanan bant açısından gerçekleşen değişim Şekil 4. 24'de verilmiştir. Söz konusu bant her iki ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen örnekler için özellikle aylık bazda uygulanan dondurma-eritme işlemleri nedeniyle keskin bir azalış görülürken haftalık bazda düşük bir sinyal artışı tespit edilmiştir.

Machado ve ark. tarafından yürütülen çalışma kapsamında 700-1000 cm^{-1} bölgesindeki fark spektrumlarını incelemiştir. 819 cm^{-1} 'de bir bant gözlenmiş ve söz konusu bant konjüge peroksit yapılarına ait CH faz dışı eğilmelerle açıklanmıştır [224].

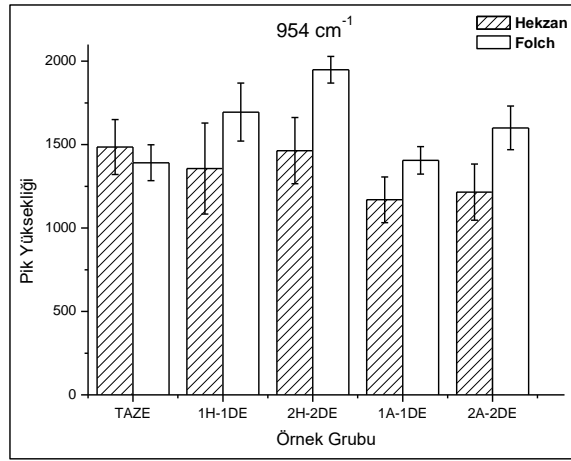
Tavuk örneklerinde 841 cm^{-1} 'de konumlanan bant açısından gerçekleşen değişim Şekil 4. 25'de verilmiştir. Hem hekzan hem de Folch ekstrakte örnekler için pik yükseklikleri yüksek standart sapma değerleriyle artış ve azalış göstermiştir. Machado ve ark. tarafından rapor edilen çalışmada linoleik asitin otooksidasyonu sürecinde 841 cm^{-1} 'de konumlanan bandın tüm alifatik zincirin simultane C-C gerilmelerinden kaynaklandığı ve oksidasyon nedeniyle bu bandın sinyal şiddetinin azaldığı belirtilmiştir. Bu durumun alifatik zincirin asit yapısından peroksit yapısına yapısal olarak yeniden düzenlenmesi nedeniyle gerçekleşebileceği vurgulanmıştır [224]. Söz konusu bandın peroksit oluşumuyla ilişkilendirilmiş olması ve oksidasyon süreçlerinde peroksit bileşiklerinin stabiliteilerinin düşük olduğu göz önünde bulundurulduğunda söz konusu artış ve azalışlar anlamlı hale gelmektedir.

Tavuk örneklerinde 872 cm^{-1} 'de konumlanan bant açısından gerçekleşen değişim Şekil 4. 26'da verilmiştir. Bu banttaki değişim de hem haftalık hem de aylık bazdaki örnekler için her iki ekstraksiyon yöntemi açısından azalış ve artış göstermiştir. Machado ve ark., 841 ve 873 cm^{-1} 'deki bantların doymamışlık bölgelerinden uzakta konumlanan moleküler gruplarla ilgili olmaları nedeniyle oksidasyonla ilişkilendirilmelerinin doğru olmayabileceğini vurgulamıştır [224].

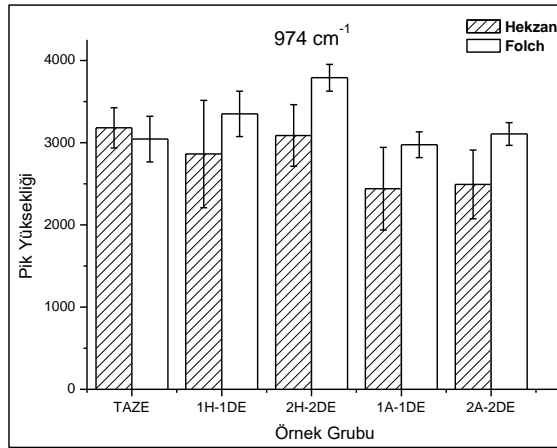
Tavuk örneklerinde 890 cm^{-1} 'de konumlanan bant açısından gerçekleşen değişim Şekil 4. 27'de verilmiştir. Söz konusu şekiller incelendiğinde haftalık ve aylık bazdaki örneklerin sinyal şiddetlerinde azalış ve artış şeklinde değişimler gözlenmiş olup yine de söz konusu değişimler sonucunda dondurulup eritilmiş örneklerin sinyal şiddetleri taze örneklerin sinyal şiddetinden daha düşük bir seviyede kalmıştır. Şekil 4.21'de 890 cm^{-1} deki bandın 1H-1DE, 1A-1DE ve 2A-2DE örneklerinde 880 ve 886 cm^{-1} konumlanan ekstra bantlar nedeniyle bölünmüş olması bu grafikte gözlenen keskin sinyal şiddeti azalışını açıklamaktadır.

Machado ve ark. tarafından yürütülen kapsamlı çalışma sonucunda genel olarak oksidasyon nedeniyle gerçekleşen pek çok değişimin Raman spektrumuna yansıdığı fakat oksidasyon nedeniyle oluşan geçici (transient) oksidasyon ürünlerinin spektrumdaki değişikliklerin yorumlanmasını zorlaştırdığı belirtilmiştir.

Raman spektrumlarında değişimin incelendiği bir diğer bant 974 cm^{-1} 'de konumlanmış olup 954 cm^{-1} 'de ise omuz şeklinde bir diğer bant gözlenmiştir. Şekil 4. 28 ve Şekil 4. 29'da bu bantlardaki değişimler gösterilmiştir.



Şekil 4. 28 954 cm^{-1} bandının değişimi

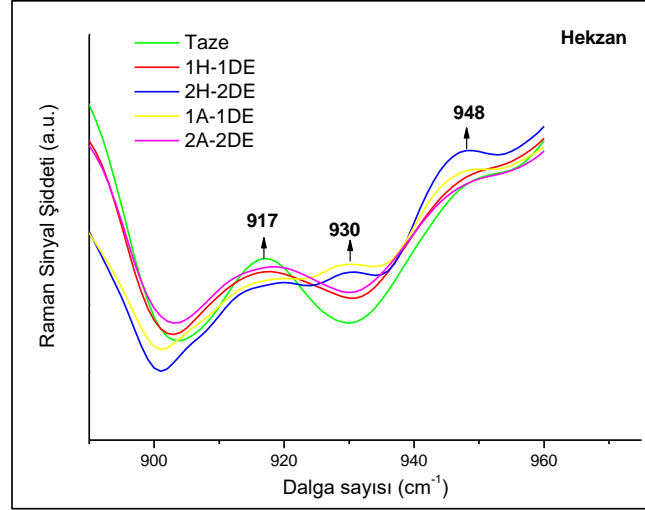


Şekil 4. 29 974 cm^{-1} bandının değişimi

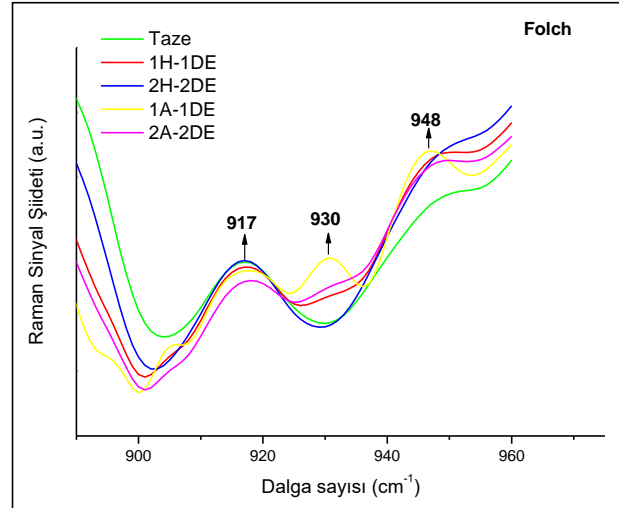
Şekil 4.28 ve 4.29 incelendiğinde hekzan ve Folch ekstrakte örnekler için her iki bantta benzer değişim trendleri görülmüştür. Hekzan ekstrakte örneklerde standart sapma değerleri yüksek olmakla birlikte genel olarak sinyal azalışı görülürken Folch ekstrakte örnekler için dondurulup eritilmiş örneklerde taze örneklerle kıyasla başlangıçta artış ardından azalış görülmüştür. Öncelikle 954 cm^{-1} 'deki bant için değişimin gerçekleştiği aralığın 1200-2000 birim intensite değerleri arasında, 974 cm^{-1} 'deki bant için ise 2500-4000 birim intensite değerleri arasında olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ardından özellikle hekzan ekstrakte örnekler için elde edilen yüksek standart sapma değerleri de düşünüldüğünde söz konusu bantların dondurma-eritme işlemleriyle kararlı bir değişiklik gösterdiğini söylemek mümkün olmamaktadır. Agbenyega ve ark. tarafından yapılan çalışmada 970 cm^{-1} deki bant sinyali majör olarak trans çift bağ miktarıyla ilişkilendirilmiştir. Söz konusu çalışmada oksidasyon sürecinde trans çift bağ oranının artması beklenirken ilgili bandın sinyal şiddetinde artış yerine azalma gözlenmiş olması söz konusu bandın farklı bir kaynağı olabileceği sonucuna varılmasına neden olmuş ve ilgili bant cis çift bağların faz dışı $\text{HC}=\text{CH}$ sallanma titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir [225]. Tachikawa ve ark. tarafından yürütülen çalışmada 977 cm^{-1} 'deki bant $\text{C}=\text{C}$ çift bağıyla ilişkilendirilen ve peroksidasyon sonucunda söz konusu bandın sinyal şiddetinin azaldığı belirtilmiştir [229]. Machado ve ark. tarafından rapor edilen çalışmada linoleik asitin otooksidasyon süreci Raman spektroskopisi ile takip edilmiştir. 973 cm^{-1} 'de konumlanan bandın cis-trans konjüge sistemlerin oluşumundan etkilenmesi nedeniyle oksidasyonun izlenmesi amacıyla kullanılabilirliği belirtilmiştir. 947 cm^{-1} 'de konumlanan bandın linoleik asit molekülündeki çift bağlar arasında konumlanmış CH_2 grubuna ait bükülme titreşimlerini, olefinik karbonları alifatik karbonlara bağlayan bağlara ait $\text{C}-\text{C}$ titreşimlerini ve olefinik grupların düzlem içi CH deformasyonlarına ait sinyalleri içermesi nedeniyle oksidasyonla ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada $830-980\text{ cm}^{-1}$ bölgesi incelendiğinde 910 , 947 ve 973 cm^{-1} 'deki bantlarda sinyal şiddetinin azaldığı görülmüştür. 973 cm^{-1} 'deki bant cis olefinik kısımdan kaynaklanmakta olup daha önceki çalışmalarda [126] oksidasyon nedeniyle değişime uğradığı belirtilmiştir.

910 ve 947 cm^{-1} 'deki bantların oksidasyon nedeniyle gerçekleşen konjüge olmayan ($\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{C}$) halden konjüge hale ($\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$) geçiş nedeniyle değişime uğradığı belirtilmiştir. Peroksitlere ait titreşimsel modların da bu aralıktaki bantlara yansıtacağı belirtilmiş ve bu sebeplerle söz konusu bantlaraki değişimlerin düzensiz bir halde olabileceği vurgulanmıştır [224].

Tavuk yağlarına ait Raman spektrumlarında 917 cm^{-1} 'de konumlanan bantta şekil değişiklikleri gözlenmiştir. İlgili sonuçlar Şekil 4. 30 ve Şekil 4. 31'de hekzan ve Folch ekstraksiyonuyla elde edilen örnekler için gösterilmiştir. Machado ve ark.'na ait aynı çalışmada linoleik asidin doymuş bir kısmı olan $\text{C}^{10}\text{C}^{11}\text{C}^{12}$ deformasyonunun 910 cm^{-1} 'de bir bant oluşturduğu ve bu bandın oksidasyonla değişikliğe uğradığı rapor edilmiştir [224].



Şekil 4. 30 Hekzan ekstrakte yağların 917 cm^{-1} bandının değişimi

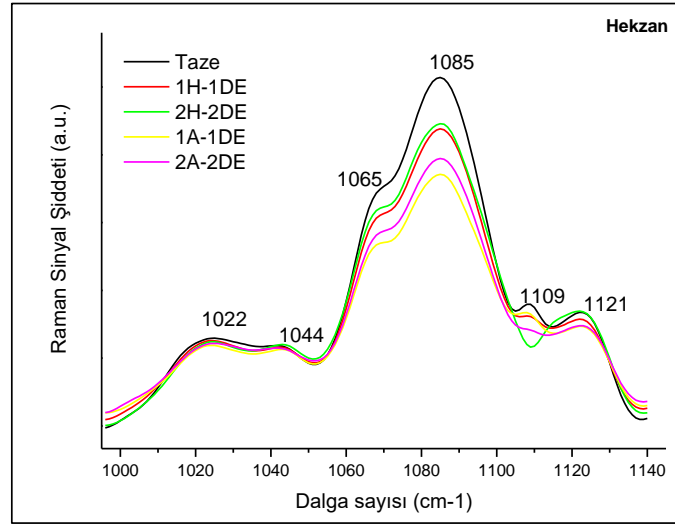


Şekil 4. 31 Folch ekstrakte yağların 917 cm⁻¹ bandının değişimi

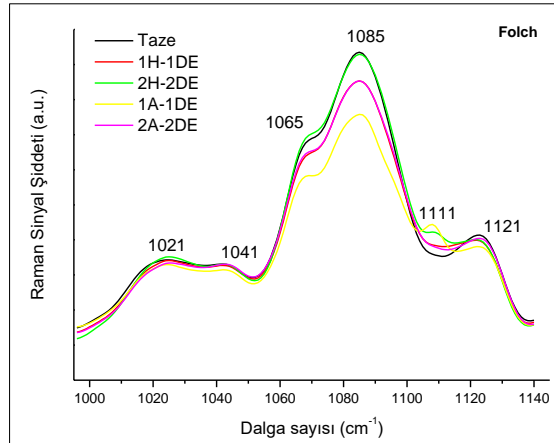
Şekil 4.30 ve 4.31 incelendiğinde 917, 930 ve 948 cm⁻¹'de konumlanan bantların oluşumu ve bu bantlarda bazı şekil değişiklikleri gözlenmiş olup bu değişikliklere ait döngü sayısı veya dondurarak bekletme süresi ile korele bir davranış tespit edilmemiştir. Elde edilen sonuç; Machado ve ark. tarafından da bildirildiği gibi söz konusu bantlara katkıda bulunan pek çok farklı molekülün ortamda bulunması nedeniyle bu bantlarda gözlemlenen değişikliklerin düzensiz olduğu yönündedir.

Raman spektrumlarının 1000-1400 cm⁻¹ dalgasayısı aralığındaki bölümünde 1023, 1044, 1065, 1085, 1121, 1267 ve 1306 cm⁻¹'de konumlanan bantlar bulunmaktadır. Bu bantların yükseklik değerlerinde dondurma-eritme süreçleriyle gerçekleşen değişimler sırasıyla Şekil 4. 32, 4.33, 4.34 ve 4.35 ile gösterilmiştir. Bu kapsamda öncelikle 996-1140 aralığı incelenmiş bu aralıkta çoğunlukla omuz şeklinde gözlenen 1022, 1044, 1065, 1085 ve 1121 cm⁻¹'deki bantların değişimi hekzan ekstrakte örnekler için Şekil 4. 32 ile Folch ekstrakte örnekler için Şekil 4. 33 ile her bir gruba ait ortalama Raman spektrumları üzerinden gösterilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde yapılan dekonvolüsyon işlemi sonucunda özellikle taze örneklerde daha belirgin olmak üzere 1109 cm⁻¹'de konumlanmış bir bant daha tespit edilmiştir.

Bu inceleme sonucunda söz konusu bantlarda dondurma-eritme işlemleriyle korele olduğu düşünülebilecek bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4. 32 Hekzan ekstrakte yağlarda 996-1140 cm⁻¹ aralığının değişimi

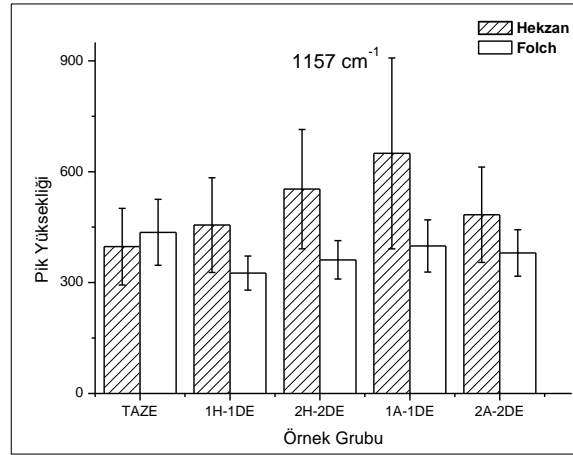


Şekil 4. 33 Folch ekstrakte yağlarda 996-1140 cm⁻¹ aralığının değişimi

Machado ve ark. tarafından yürütülen çalışmada linoleik asitin otooksidasyon sürecinde gerçekleşen kimyasal modifikasyonlar Raman spektroskopisi tekniğiyle incelenmiştir. Bu çalışmada 1060-1120 cm⁻¹ aralığında konumlanmış dört farklı bant rapor edilmiştir. Bu aralıktaki bantlar için aynı sinyale katkıda bulunan pek çok farklı titreşimsel modun bulunması nedeniyle bu bantlardaki değişikliklerin açıklanmasının zor olduğu ve gözle değerlendirme sonucuyla oksidasyonla ilişkilendirilmesinin doğru olmayacağı belirtilmiştir [224].

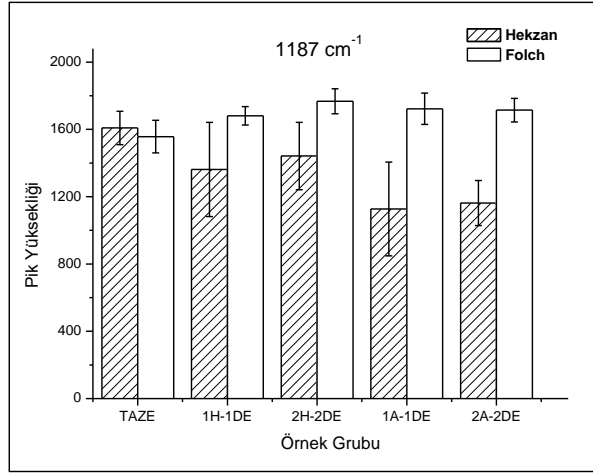
Söz konusu çalışma tavuk yağlarında gözlenen düzensiz değişikliklerin bir açıklaması niteliğindedir.

Tavuk yağlarında dondurma-eritme döngüleriyle Raman spektrumlarında değişikliğin gözleendiği bir diğer bölüm ise 1140-1190 cm^{-1} aralığı olarak tespit edilmiş, 1157 ve 1187 cm^{-1} 'de konumlanmış bantların pik yüksekliklerindeki değişiklikler incelenmiştir. Bu bölge için gözlenen değişimler Şekil 4. 34 ve Şekil 4. 35'de verilmiştir.



Şekil 4. 34 1157 cm^{-1} bandının değişimi

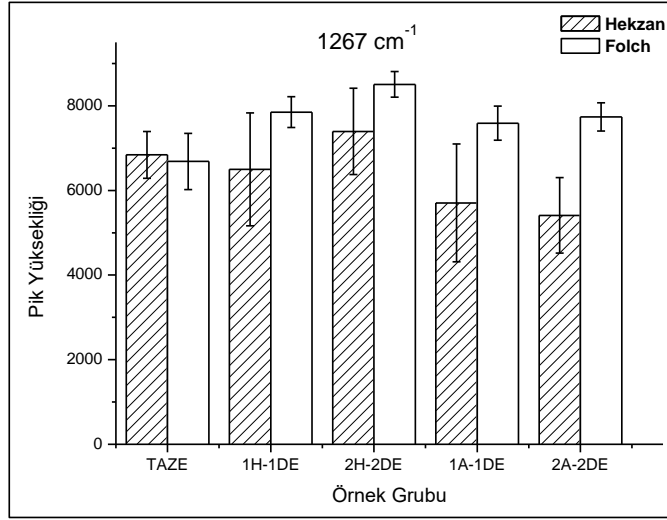
Şekil 4. 34 incelendiğinde hekzan ekstrakte örneklerde dondurma-eritme döngüleriyle sinyal artışı görülmüştür. Hekzan ekstrakte örneklere ait sinyal şiddetlerinin Folch ekstrakte örneklere kıyasla oldukça yüksek standart sapma değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Folch ekstrakte örneklerde ise başlangıçta azalan sinyal döngü sayısı ile artış göstermiş ve aylık bazdaki örnekler için yaklaşık olarak başlangıç seviyesine ulaşmıştır.



Şekil 4. 35 1187 cm⁻¹ bandının değişimi

Şekil 4. 35 incelendiğinde Folch ekstrakte örneklerde sinyal artışı görülmüştür. Hekzan ekstrakte örneklerde ise başlangıçta azalan sinyal döngü sayısı ile artışa geçmiştir. Machado ve ark. tarafından rapor edilen çalışmada linoleik asidin oksidasyonu ile değişim gösterdiği tespit edilen iki bant 1165 ve 1190 cm⁻¹'de konumlanmıştır. Okside olmuş örneklerde 1190 cm⁻¹'deki bant peroksitlerin konjüge kısımlarının CH titreşimleriyle açıklanmaktadır. Söz konusu bantta gözlenen artış ve azalışlar literatürde bu bandın peroksitlerle ilişkilendirilmesi üzerinden değerlendirildiğinde oksidasyon sürecinde peroksitlerin bir yandan oluşurken bir yandan dekompoze oldukları bilinmekte ve peroksitlerin sinyallerindeki artış ve azalışlar anlam kazanmaktadır. Machado ve ark. tarafından yapılan çalışmada 1165 cm⁻¹'deki bant çalışma kapsamında okside olan örneklerde ait spektrumdan okside olmamış örneğin spektrumunun çıkarılması ile gözlemlenmiştir. Bu bandın, bu konumda güçlü C-C gerilmesine sahip 2,4-decadienal molekülünün varlığına işaret ettiği belirtilmiştir. Aynı bandın peroksitlerin titreşimsel modları nedeniyle sinyal artışına uğrayabileceği belirtilmiştir [224]. İlgili çalışmada 1165 cm⁻¹'de konumlanan bant tavuk yağlarının Raman spektrumlarında 1157 cm⁻¹'de konumlanmıştır.

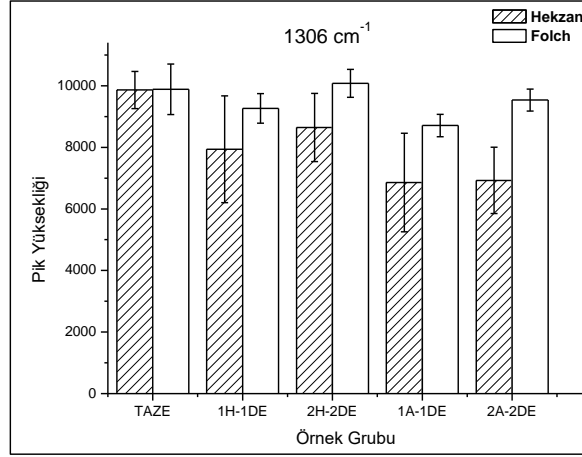
Söz konusu bandın peroksitlerle ilişkilendirildiği göz önünde bulundurulduğunda özellikle haftalık bazdaki örneklerde oksidasyonun başlangıç seviyesinde olduğu ve peroksit oluşumunun gerçekleştiği düşünüldüğünde gözlemlenen sinyal artışı anlamlandırılabilir. Aylık bazdaki örnekler için ilgili banttaki sinyal azalışı oksidasyonun ilerleyen aşamalarında dekompoze olan peroksitlerle açıklanabilir.



Şekil 4. 36 1267 cm⁻¹ bandının değişimi

Şekil 4. 36 incelendiğinde haftalık bazdaki döngülerin her iki ekstraksiyon metoduyla elde edilen örnekler için de bir sinyal artışına neden olduğu görülmektedir. Aylık bazdaki döngüler ise hekzan ekstrakte örneklerde keskin bir sinyal azalışına neden olmuştur. Folch ekstrakte örneklerde ise döngü sayısı düşük bir değişkenlik göstermekle birlikte sinyal şiddetinin taze örneklerle kıyasla arttığı görülmüştür. Weng ve ark. tarafından yapılan çalışmada yağın doymamışlık oranı azaldıkça veya doymuşluk oranı arttıkça =C-H bağına ait 1266 cm⁻¹'deki bandın sinyal şiddetinin azaldığı belirtilmiştir [227].

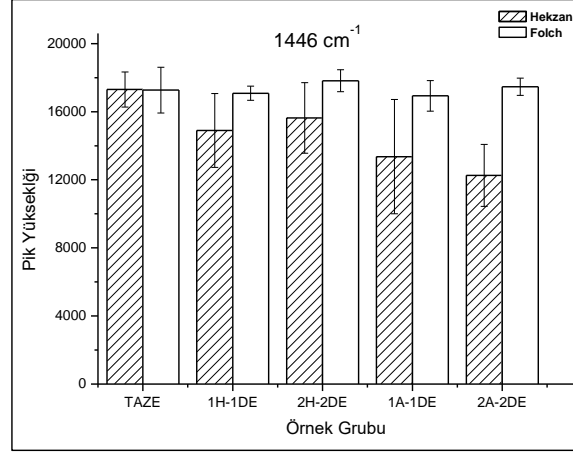
Muik ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı bitkisel yağların oksidasyonu sırasında gerçekleşen kimyasal değişiklikler FT-Raman spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Farklı yağlara ait Raman spektrumlarındaki farklılık cis çift bağlardan kaynaklanan bantlardan biri olan 1267 cm^{-1} 'de görülmüştür. Oksidasyon sürecinde lipit yapısında gerçekleşen en karakteristik değişim oksijen saldırısı sonrasında doymamışlığın azalması olup bu durum 1267 cm^{-1} deki bant sinyalinin azalması aracılığıyla takip edilmiştir [126]. Machado ve ark. tarafından linoleik asidin oksidasyon sürecinde 1266 cm^{-1} 'de cis çift bağların CH deformasyonundan kaynaklı olarak gözlenen sinyalin azalışına dikkat çekilmiş ve bu azalış yağ asidi bileşimindeki cis çift bağların yok olması ile açıklanmıştır [224]. Muik ve ark. tarafından yürütülen bir diğer çalışmada bazı bitkisel yağların hızlandırılmış oksidasyon süreçleri FTIR ve FT-Raman spektroskopileri ile takip edilmiştir. Oksidasyon ile gözlenen majör değişikliklerden bir tanesinin cis çift bağların azalması nedeniyle 1267 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinin azalması olduğu bildirilmiştir [235]. İlgili çalışmalar da göz önünde bulundurulduğunda tavuk yağı örneklerinde özellikle aylık bazdaki keskin sinyal azalışının dondurma-eritme döngüleriyle gerçekleşen oksidasyon reaksiyonlarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Tachikawa ve ark. tarafından yürütülen çalışmada lipit peroksidasyonu sonucunda C=C çift bağıyla ilişkilendirilen 1264 ve 1658 cm^{-1} 'deki bantların sinyal şiddetlerinin azaldığı belirtilmiştir. Çalışma kapsamında daha az sayıda çift bağ içerdiği bilinen oleik asit ve linoleik asite ait Raman spektrumlarında 1264 ve 1658 cm^{-1} 'deki bantlara ait sinyal şiddetlerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir [229].



Şekil 4. 37 1306 cm⁻¹ bandının değişimi

Şekil 4. 37 incelendiğinde 1306 cm⁻¹ bandında hem haftalık hem de aylık bazda dondurma-eritme döngülerine maruz kalmış örneklerin sinyal şiddetlerinin her iki ekstraksiyon yöntemi için de ilk döngüde azalma ikinci döngüde artma şeklinde değiştiği görülmüştür. Son durumda hekzan ekstrakte örneklerin sinyal şiddeti taze örneklerden daha düşük bir seviyede kalmıştır. Folch ekstrakte örneklerde ise sinyal şiddetinin döngü sayısı arttıkça hem haftalık hem aylık bazda örnekler için arttığı ve taze örneklerin sinyal şiddeti değerlerine yaklaştığı görülmüştür. Weng ve ark. tarafından yapılan çalışmada yağın doymamışlığı azaldıkça CH₂ burulmasına ait 1302 cm⁻¹'deki bant sinyal şiddeti artmıştır. Aynı çalışma kapsamında 1266 cm⁻¹'de =C-H cis deformasyonundan kaynaklanan bandın trans izomere ait Raman spektrumunda gözlenmediği 1302 cm⁻¹'deki bandın sinyal şiddetinin ise trans izomerde arttığı belirtilmiştir [227]. Vaskova ve Buckova tarafından yapılan çalışmada en yaygın tüketilen bitkisel yağlardan ayçiçek, kanola ve zeytinyağının termal degradasyonu spektroskopik olarak incelenmiştir. Söz konusu çalışmada 1267 cm⁻¹'deki bandın sinyal şiddetinde azalış, 1303 cm⁻¹'de doymuş CH₂ yapılarını temsil eden bandın sinyal şiddetinde artış bildirilmiştir. Dondurma-eritme uygulamaları nedeniyle gerçekleşen oksidasyon reaksiyonlarından kaynaklı olarak yapıdaki doymuşluğun artması durumunun tavuk yağlarında ikinci döngüde gözlenen sinyal artışının açıklaması olabileceği düşünülmektedir [231].

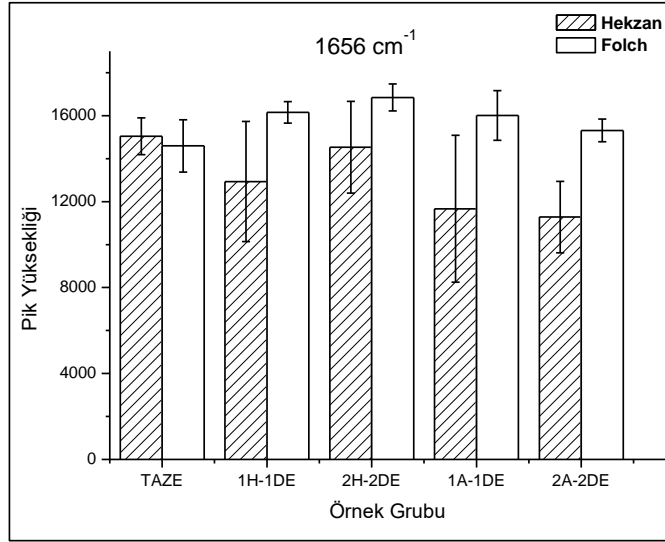
Şekil 4.38, 1446 cm⁻¹'de konumlanan bandın pik yüksekliği değerinin dondurma-eritme döngüleriyle uğradığı değişimi göstermektedir. Söz konusu bant literatürde metilenik gruplara (=CH₂) ait kesilme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir [135].



Şekil 4. 38 1446 cm⁻¹ bandının değişimi

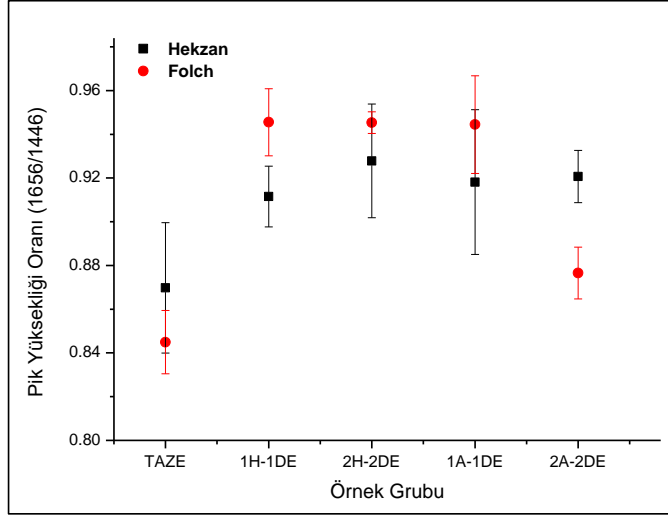
Şekil 4. 38 incelendiğinde Folch ekstrakte örnekler için 1446 cm⁻¹'deki bandın düşük standart sapma değerlerine sahip olduğu ve pek değişikliğe uğramadığı görülmektedir. Bunun aksine hekzan ekstrakte örneklerin standart sapma değerleri oldukça yüksek olmakla birlikte söz konusu bandın sinyal şiddetinin azaldığı görülmektedir. Öte yandan Folch ekstrakte örneklerde gözlenen durum Machado ve ark. tarafından rapor edilen çalışma ile uyum göstermekte olup söz konusu çalışmada da linoleik asitin otooksidasyon sürecinde 1441 cm⁻¹'de konumlanan banda ait sinyal şiddetinin herhangi bir değişikliğe uğramadığı ve diğer bantların normalizasyon işlemine kullanılabileceği belirtilmiştir [224].

Bu aralıkta değerlendirilmeye alınan bir diğer bant 1656 cm⁻¹'de konumlanmıştır. Bu banta dair değişimleri gösteren sonuçlar Şekil 4. 39 ile verilmiştir.

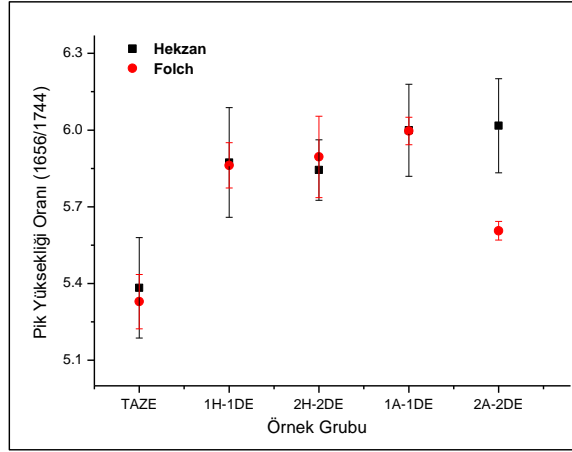


Şekil 4. 39 1656 cm⁻¹ bandının değişimi

Şekil 4. 39 incelendiğinde hekzan ekstrakte örneklerde özellikle aylık bazda sinyal şiddetinde keskin bir azalma görülmüştür. Bunun aksine Folch ekstrakte örneklerde bu banda ait önemli bir değişim gözlenmemiştir. Söz konusu bandın cis çift bağ içeriğiyle doğrudan ilişkilendirilmesi nedeniyle literatürde bu banttaki değişimi takip eden pek çok çalışma bulunmaktadır. Rapor edilen çalışmalarda bandın pik yüksekliğindeki değişimin takibi amacıyla 1656/1446 ve 1656/1744 pik yüksekliği oranı değerleri hesaplanmaktadır. Şekil 4.40 ve 4.41 ile lipit yapısındaki doymamışlığın takibi açısından 1656/1446 ve 1656/1744 pik yüksekliği oranı değerlerinin dondurma-eritme döngüleriyle değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4. 40 1656/1446 pik yüksekliği oranları



Şekil 4. 41 1656/1744 pik yüksekliği oranları

Şekil 4. 40 ve Şekil 4. 41 incelendiğinde her iki oran değerinin haftalık ve aylık bazdaki dondurma-eritme döngüleri nedeniyle artışa uğradığı görülmektedir. Artış oranının yüksek olması genel olarak 1656 cm^{-1} bandında dondurma-eritme döngüleriyle sinyal artışı gözlenirken 1446 cm^{-1} ve 1744 cm^{-1} bantlarındaki sinyallerin azalmış olmasıdır. Söz konusu bantların sinyallerinde gözlenen artış ve azalmalar farklı mekanizmalar üzerinden açıklanmaktadır. 1656 cm^{-1} bandında gözlenen sinyal azalışı oksidasyon nedeniyle çift bağların oksijenle doyurulması lipit bileşimindeki çift bağ sayısının azalması üzerinden açıklanmaktadır.

Öte yandan sinyal artışları oksidasyon nedeniyle oluşan konjüge dien ve trien gibi bir takım ara ve son ürünlerin ilgili bantların sinyallerine katkıda bulunarak sinyal şiddetlerini arttırmış olmasıyla açıklanmaktadır [11]. Bir başka çalışmada doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda skeletal çift bağların yeniden düzenlenmesi ve konjüge dien, peroksi radikali, hidroperoksitler gibi ürünlerin ortaya çıkması da söz konusu banttaki sinyal artışıyla ilişkilendirilmektedir [229].

Sadeghi-Jorabchi ve ark. tarafından yapılan çalışmada FT-Raman tekniği lipitlerin kantitatif analizinde kullanılmıştır. Bu çalışmada özellikle 1200-1800 cm^{-1} aralığındaki bantların sinyal şiddetlerinin bitkisel yağdan margarin üretimi amacıyla uygulanan hidrojenasyon işleminin derecesine bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Hidrojenasyon ile toplam doymamışlığın azaldığı ve benzer şekilde cis çoklu doymamış yağ asitlerinin cis tekli doymamış yağ asitlerine oranının azaldığı bunun tersine trans monoen miktarının arttığı rapor edilmiştir. Bu değişikliğin; bir diğer deyişle doymuş yağ asidi miktarındaki artışın, Raman spektrumunda 1657 cm^{-1} bant sinyal şiddetinin 1441 cm^{-1} veya 1741 cm^{-1} bandına ait sinyal şiddetine oranındaki azalışla takip edilebileceği belirtilmiştir. 1657 cm^{-1} bant cis çoklu doymamışlığının cis tekli doymamışlığa oranındaki azalma sonucunda küçük bir kaymaya uğrayarak 1655 cm^{-1} 'de konumlanmaktadır. 1666 cm^{-1} 'de oluşan omuz piki ise trans izomer miktarındaki artışa işaret etmektedir. Çalışma kapsamında toplam doymamışlıkla ilişkilendirilmesi açısından 1657/1441 sinyal şiddeti oranı ile 1657/1741 sinyal şiddeti oranının başarısı kıyaslanmıştır. Birincisi toplam çift bağ sayısının analizlenen yağdaki toplam CH_2 grubuna sayısını ifade etmektedir. Burada elde edilen sonuçların GC sonuçlarıyla olan korelasyonu incelenmiştir. GC analizinde on taneden az CH_2 grubu içeren zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerinden yüksek miktarda içeren yağların doğru analizinin gerçekleştirilememiş olması ihtimali nedeniyle 1741 cm^{-1} 'de konumlanan $\text{C}=\text{O}$ bağına ait sinyal şiddetini referans kabul eden ikinci oran değerinin daha doğru sonuç verdiği belirtilmiştir [130].

Weng ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı standart triaçilgliseroller ve farklı doymamışlık derecelerindeki standart yağ asitleri FT-Raman spektroskopisi ile incelenmiştir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağların majör bileşeni olan triaçilgliseroller; gliserolün üç yağ asidi ile esterleşmesi sonucu oluşmaktadır. Weng ve ark. tarafından yapılan çalışmada yağ asidi ve onun trigliseridine ait Raman spektrumunun çok benzer olduğu belirtilmiştir. Doymamışlık açısından ise hem yağ asidinde hem de triaçilgliserolde 1655, 1302 ve 1266 cm^{-1} 'de konumlanan bantlarda farklılık gözlenmiştir. Yağın doymamışlık oranı azaldıkça veya doymuşluk oranı arttıkça C=C bağına ait 1655 cm^{-1} 'deki bandın sinyal şiddeti azalırken, yağın doymamışlığı azaldıkça CH_2 kesilmesine ait 1440 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddeti artmıştır. Bu nedenle 1655/1444 oranının doymamışlık ile ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir. Raman bantları cis/trans izomerleri arasında da farklılaşmıştır. Bu farklılık C=C gerilmesinden kaynaklı olarak cis form için 1655 cm^{-1} 'de, trans form için 1668 cm^{-1} 'de gözlenmiştir [227].

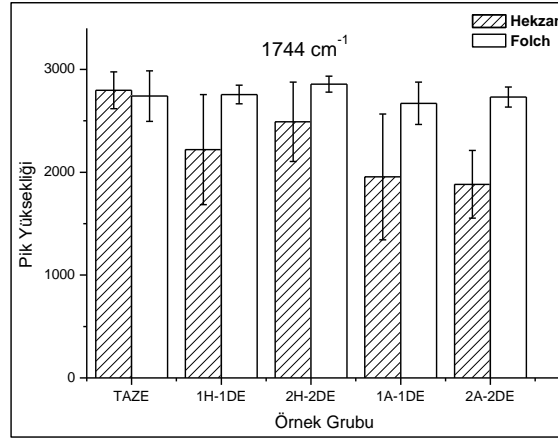
Muik ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı bitkisel yağların oksidasyonu sırasında gerçekleşen kimyasal değişiklikler FT-Raman spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Farklı yağlara ait Raman spektrumlarındaki farklılık cis çift bağlardan kaynaklı bantlardan biri olan 1655 cm^{-1} 'de görülmüştür. Söz konusu bandın sinyal şiddeti analiz edilen yağlar içerisinde yalnızca zeytinyağında azalmış, diğer yağlarda bu bandın şekli değişmiş ve sinyal şiddeti artmıştır. Bu durum oksidasyon sürecinde oluşan trans ve konjuge çift bağlara ait sinyallerin cis çift bağa ait sinyallerle çakışması ile açıklanmıştır. Doymamış yağların termal oksidasyonu sırasında çift bağların izomerizasyonu gerçekleşmekte ve trans çift bağ ve konjuge çift bağ içeren ürünler oluşmaktadır. Çalışma sonucunda, Sadeghi ve ark. tarafından önerilen ve doymamışlığın azalışıyla ilişkilendirilen 1660/1444 oranının [130], C=C gerilme bölgesinde gerçekleşen değişiklikler nedeniyle termal olarak strese sokulmuş yağların oksidasyon sürecinin izlenmesinde kullanılamayacağı belirtilmiştir [126]. Aynı grup tarafından yapılan bir diğer çalışmada altı farklı bitkisel yağın hızlandırılmış oksidasyon süreçleri FTIR ve FT-Raman spektroskopileri kullanılarak izlenmiştir. Oksidasyon ile gözlenen majör değişikliklerden biri karbonilik bileşikler nedeniyle 1680 cm^{-1} 'de yeni bir bandın oluşmasıdır.

Ayrıca 1655 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde yağın çeşidine bir diğer deyişle yağ asidi kompozisyonuna bağlı olarak artma, azalma ve kayma şeklinde değişimler gözlenmiştir. Bu değişimler, söz konusu bandın cis çift bağ içeriğinin azalışı dışında yağ bileşiminde gerçekleşen diğer değişimlerden de etkilenmesi ile açıklanmıştır. Bu duruma daha somut bir açıklama getirilebilmesi adına çalışma kapsamında cis-9, trans-11-linoleik asit molekülüne ait Raman spektrumu kaydedilmiş ve 1653 cm^{-1} 'de kuvvetli bir bant sinyal şiddeti elde edilmiştir. Bu bileşik konjuge linoleik asit izomerleri arasındaki en yaygın form olarak bilinmektedir. Söz konusu bileşiğin yağın oksidasyonu sırasında 1653 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinin artışına bir açıklama olabileceği belirtilmiştir. Bu molekülün daha fazla üretilmediği noktada cis çift bağdaki azalış 1658 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinden gözlenebilmiştir. Çalışma sonucunda analiz edilen örneğin yağ asidi kompozisyonuna bağlı olmak kaydıyla; oksidasyonun başlangıcında farklı türde konjüge çift bağ sistemlerinin oluştuğu ve oksidasyon süreci boyunca başlangıçta daha yavaş olmak kaydıyla benzer bir kinetik davranış göstererek doymuş karbonilik bileşiklerin ve izole trans çift bağların oluştuğu belirtilmiştir [235].

Vaskova ve Buckova tarafından yapılan çalışmada en yaygın tüketilen bitkisel yağlardan ayçiçek, kanola ve zeytinyağının termal degradasyonu spektroskopik olarak incelenmiştir. Söz konusu bitkisel yağlar yüksek doymamış yağ asidi içerikleri sebebiyle degradasyona uğramaya oldukça meyilli olup oksidatif koşullarda aldehit, keton, epoksit ve hidroksi bileşikleri gibi degradasyon ürünleri oluşturmaktadır. Oksidatif stres konjüge çift bağ sistemlerinin ve trans yağ asitlerinin oluşmasına yol açmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu lipidlerin degradasyonundan sorumlu olan temel reaksiyondur. Bu nedenle yağ asitlerinin kompozisyonunun belirlenmesi karakteristiklerinin ve proses, muhafaza ve diğer uygulamalar sırasındaki stabilitelerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Yağların 100°C üzerine ısıtılmaları ile gerçekleşen oksidatif degradasyon ve oksidasyon sonucunda oluşan ürünler C=C bağına etkiyerek Raman spektrumunda değişikliklere sebep olmaktadır.

Bu çalışmada yağların termal dekompozisyonu iki temel bant üzerinden takip edilmiştir. 1640 cm^{-1} 'deki bandın sinyal şiddetindeki artış degradasyon ürünlerinin oluşumuyla ilişkilendirilmiştir [231]. Machado ve ark. tarafından rapor edilen çalışma sonucunda Raman spektrumunun 1500-1800 cm^{-1} aralığının oksidasyona duyarlı olduğu belirtilmiştir. Özellikle 1600-1750 cm^{-1} bölgesinin cis-trans dönüşümleri gibi konformasyonel değişimlerden ve hidroperoksitler gibi konjüğe doymamış sistemlerin oluşumundan yüksek oranda etkilendiği bildirilmiştir. Konjüğe aldehit, dienler ve trienler gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşumu da bu aralıktaki spektrum profilini ve sinyal şiddetini etkilemektedir. Linoleik asidin oksidasyonu sırasında 1660-1760 cm^{-1} bölgesinde karbonil grubu içeren oksidasyon ürünlerinin üretilmesi sonucunda sinyal artışı gözlenebileceği belirtilmiştir. 1659 cm^{-1} 'de konumlanan bant cis çift bağın C=C gerilmesiyle açıklanmasına rağmen çalışma kapsamında bu bandın sinyal şiddeti değeri 1441 cm^{-1} bandına göre normalize edilerek değerlendirilmiş ve spesifik bir davranış trendi gözlenmemiştir. Bu durumun oksidasyon sırasında gerçekleşen kimyasal değişimler göz önünde bulundurulduğunda anlaşılır olabileceği belirtilmiştir. Termal strese sokulan örnekler trans-sistemlerin oluşumuyla sonuçlanan bazı konformasyonel reorganizasyonlara uğramakta ve oksidasyon süreci sonunda peroksitler ve ikincil oksidasyon ürünleri gibi trans-konjüğe türler oluşmaktadır. Raman profilinin 1600-1700 cm^{-1} aralığına katkıda bulunan doymamış sistemlerin çeşitliliği 1659 cm^{-1} 'deki bandın davranışındaki değişkenliği açıklamakta ve bu bandın oksidasyonla ilişkilendirilmesine engel olmaktadır [224].

Analiz edilen tavuk yağlarının Raman spektrumlarındaki 1744 cm^{-1} bandının dondurma-eritme döngüleriyle değişimi Şekil 4. 42 ile gösterilmiştir.



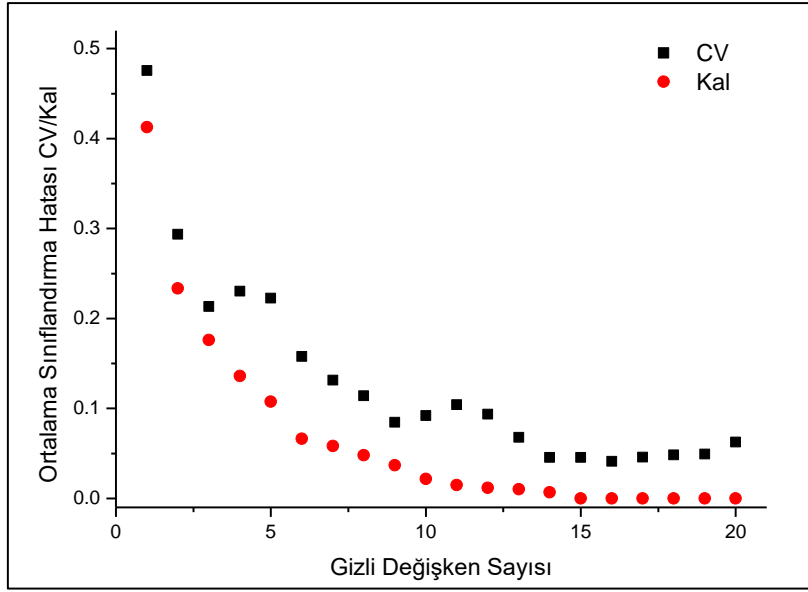
Şekil 4. 42 1744 cm^{-1} bandının değişimi

Şekil 4. 42 incelendiğinde hekzan ekstrakte örneklerde dondurma-eritme işlemleri ile bu bandın sinyal şiddetinde önemli bir azalma gerçekleştiği görülmektedir. C=O ester bağı kaynaklı bu bandın sinyal şiddetindeki azalış dondurma-eritme işlemleri nedeniyle gerçekleşen hidroliz reaksiyonları ile açıklanabilmektedir. Analiz edilen tavuk yağı örneklerinde yapılan metabolomiks analizleri sonucunda monogliserid miktarında gözlemlenen artış söz konusu bulguyu destekler niteliktedir. Öte yandan Folch ekstrakte örnekler için söz konusu bandın pik yüksekliğinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Weng ve ark. tarafından yapılan çalışmada 1742 cm^{-1} 'deki bant triaçilgliserolde gözlemlenirken serbest yağ asitlerinin Raman spektrumlarında gözlenmemiştir [227]. Söz konusu çalışma 1742 cm^{-1} 'deki bandın ester bağı ile olan ilişkisini kanıtlayan kuvvetli bir kanıt niteliğindedir. Muik ve ark. tarafından yürütülen çalışmada ayçiçek yağının oksidasyon sürecinde Raman spektrumunda genellikle 180°C üzerinde veya nem varlığında gerçekleşmesi beklenen hidroliz reaksiyonunun gerçekleşmediği ve dolayısıyla 1745 cm^{-1} 'de konumlanan C=O ester bağı kaynaklı bantta herhangi bir değişiklik görülmediği belirtilmiştir. Buradan yola çıkarak diğer bantların sinyal şiddeti değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan normalizasyon işleminde 1745 cm^{-1} 'deki bu bandın sinyal şiddeti referans alınmıştır.

Machado ve ark. tarafından yapılan çalışmada linoleik asitin oksidasyonu sırasında 1744 cm^{-1} 'de konumlanan bandın sinyal şiddetinde oksidasyon sürecinde üretilen ürünlerin karbonil gruplarının sağladığı katkı nedeniyle artış gözlenmiştir [224]. Bahsi geçen çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde 1744 cm^{-1} bandında gözlenen değişimlerin farklı mekanizmalar üzerinden açıklandığı görülmektedir. Tavuk örneklerindeki yağışın Raman spektroskopisiyle belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmanın ikinci kısmında taze tavuk örnekleri ile farklı süre ve sayıda dondurma-eritme döngüsüne maruz kalmış tavuk örnekleri gruplarının birbirinden ayrılarak sınıflandırılması üzerinde çalışılmıştır. Bu kapsamda tavuk örneklerinden hekzan ekstraksiyonu ve Folch metoduyla ekstrakte edilmiş yağ örneklerinin Raman spektrumları toplanmıştır. Toplanan spektrumların incelenmesi ve sınıflar arası ayrımın ortaya konmasında gözetimli (supervised) kalitatif veri analizi yöntemlerinden bir tanesi olan PLS-DA yöntemi kullanılmıştır. PLS-DA modellerinin oluşturulmasında farklı önışlem teknikleri denenmiş olup her bir model için elde edilen en iyi sonuç rapor edilmiştir. Uygun önışlemin seçilmesinin ardından hata değerlerinin artan gizli değişken sayısı ile değişimi irdelenip kırılma noktalarındaki modellere ait kalite parametreleri incelenerek gizli değişken sayısının sınıflandırma başarısı üzerindeki etkisi irdelenmiştir.

Hekzan ekstraksiyonuyla elde edilen tavuk yağlarının Raman spektrumları kullanılarak kurulan PLS-DA modelinde en uygun önışlemin mean center olduğu tespit edilmiştir. Kurulan model çapraz validasyon yöntemlerinden 'Venetian Blinds' ile valide edilmiş olup maksimum gizli değişken sayısı 20, data split sayısı 8, veri kalınlığı (samples per blind; thickness) 1 olarak seçilmiştir. Kurulan modelde tahmin bölümüne yüklenecek veriler program tarafından rasgele seçilmiş olup her üç veriden bir tanesi tahmin iki tanesi kalibrasyon modeline yüklenmiştir.

Aşağıda Şekil 4. 43'de modele ait hata değerlerinin değişimi gösterilmiştir. 3., 6. ve 9. gizli değişkenlerin hata değerleri açısından birer kırılma noktası olmuştur. Gizli değişken sayısının kurulan PLS-DA modelinin sınıflandırma başarısı ve diğer kalite parametreleri üzerindeki etkisinin ortaya konması açısından 3, 6 ve 9 gizli değişken kullanılarak ayrı ayrı PLS-DA modelleri kurulmuş ve birbiriyle kıyaslanmıştır.



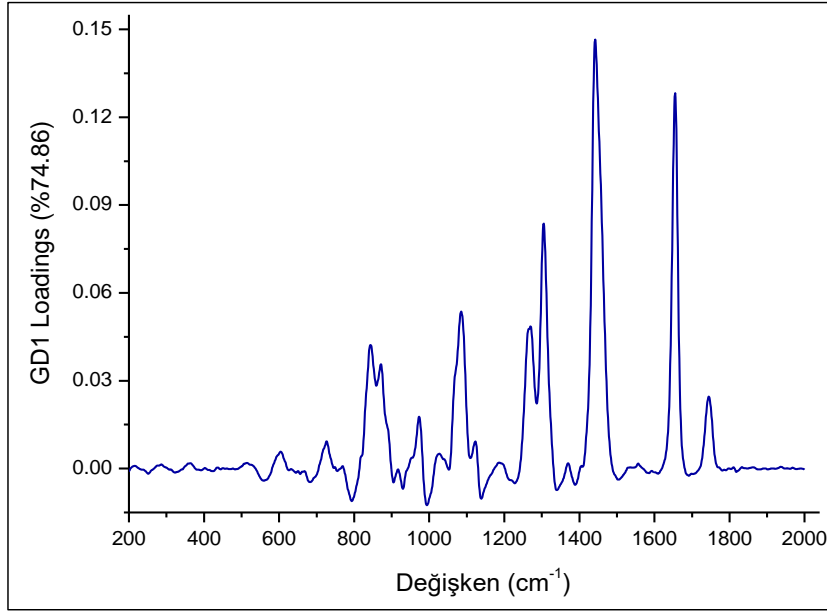
Şekil 4. 43 Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli hata değerleri

PLS-DA modellerinin performansı duyarlılık (sensitivity), özgüllük (specificity), sınıf hata değeri (class error), RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri açısından incelenmiştir. Çizelge 4. 16 ile 3, 6 ve 9 gizli değişkenle kurulan modellerin değerleri özetlenmiştir. Her bir değer kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modelleri için ayrı ayrı verilmiştir. Çizelge 4. 16 incelendiğinde artan gizli değişken sayısı ile duyarlılık (sensitivity) ve özgüllük (specificity) değerlerinin genel olarak arttığı görülmüştür. Bununla birlikte kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerinin hata oranlarını ifade eden RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinin de genel olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu sebeplerle hekzan ekstrakte örnek sınıflarının birbirinden ayrılması amacıyla geliştirilen PLS-DA kalibrasyon ve tahmin modelleri toplamda 9 gizli değişken kullanılarak kurulmuştur.

Çizelge 4. 16 Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin performans parametreleri

Gizli Değişken Sayısı	T			1H-1DE			2H-2DE			1A-1DE			2A-2DE		
	3GD	6GD	9GD	3GD	6GD	9GD	3GD	6GD	9GD	3GD	6GD	9GD	3GD	6GD	9GD
Kal-Sens	0.882	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	0.900	0.900	0.923	1.000	1.000	0.818	0.818	0.909
Kal-Spec	1.000	0.982	1.000	0.623	0.934	1.000	0.852	0.944	1.000	0.689	0.885	0.934	0.651	0.873	0.889
CV- Sens	0.824	1.000	1.000	0.846	0.846	0.923	0.800	0.850	0.900	0.846	0.769	0.846	0.818	0.636	0.818
CV-Spec	1.000	0.982	0.982	0.607	0.869	0.967	0.852	0.889	0.944	0.639	0.787	0.869	0.635	0.794	0.905
Tahmin-Sens	0.875	1.000	1.000	0.833	0.833	0.833	0.700	0.900	1.000	1.000	0.833	0.667	0.833	0.833	1.000
Tahmin-Spec	1.000	1.000	1.000	0.633	0.900	1.000	0.846	0.923	0.923	0.633	0.867	0.867	0.733	0.867	0.867
Kal-CE	0.059	0.009	0.000	0.189	0.032	0.000	0.174	0.078	0.05	0.194	0.057	0.030	0.266	0.154	0.101
CV-CE	0.088	0.009	0.009	0.274	0.142	0.055	0.174	0.131	0.078	0.257	0.222	0.142	0.273	0.285	0.139
Tahmin-CE	0.063	0.000	0.000	0.267	0.133	0.083	0.227	0.088	0.038	0.183	0.150	0.233	0.217	0.150	0.067
RMSEC	0.219	0.202	0.156	0.347	0.263	0.201	0.335	0.248	0.213	0.350	0.296	0.232	0.329	0.289	0.230
RMSECV	0.236	0.232	0.187	0.357	0.308	0.254	0.348	0.282	0.261	0.367	0.333	0.308	0.338	0.325	0.279
RMSEP	0.197	0.184	0.167	0.343	0.294	0.278	0.358	0.290	0.287	0.347	0.306	0.353	0.336	0.290	0.283

Şekil 4. 44'de geliştirilen PLS-DA kalibrasyon modeline ait loadings grafiği verilmiştir.



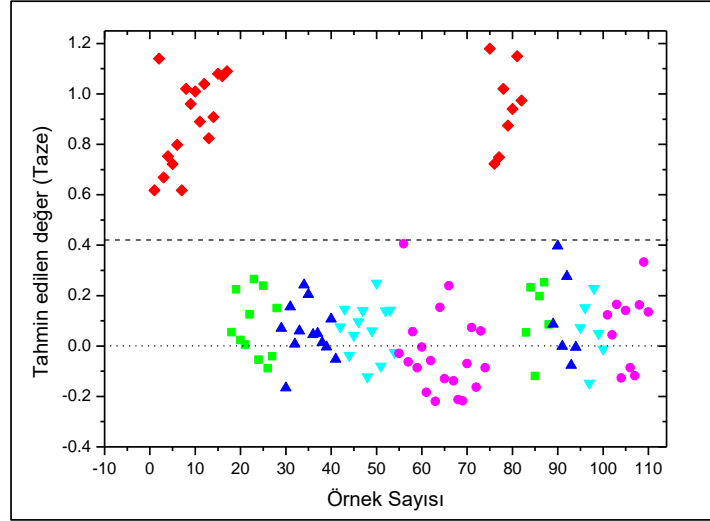
Şekil 4. 44 Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli loadings değerleri

Şekil 4. 44 incelendiğinde örneklerin Raman spektrumlarındaki bantların sınıflar arası ayırım başarısına gösterdikleri katkı oranları kıyaslanabilmektedir. Buna göre 1446 ve 1656 cm⁻¹'de konumlanan bantların ayırım başarısına en yüksek oranda katkı sağladığı söylenebilmektedir. Bu bantları 1267, 1306, 1085, 843, 872 ve 1744 cm⁻¹'de konumlanan diğer bantlar takip etmiştir. Özellikle 1656 cm⁻¹'de konumlanan bant Raman spektroskopisi kullanılarak lipitlerdeki oksidasyon reaksiyonlarının takip edildiği pek çok çalışmada detaylı bir şekilde incelenmiştir [135]. Bu bant lipit bileşimindeki *cis* $\nu(\text{C}=\text{C})$ çift bağ gerilmesi ile ilişkilendirildiğinden oksidasyon süresince yüksek oranda değişkenlik göstermektedir.

Şekil 4. 45-4.49 aralığında hekzan ekstraksiyonuyla elde edilen beş farklı gruba ait tavuk yağı örneklerinin PLS-DA yöntemiyle sınıflandırma sonuçları verilmiştir. PLS-DA modellerinin geliştirilmesi aşamasında model içerisinde ayrımı yapılması hedeflenen grup sayısı kadar sınıf tanımlanmaktadır.

Analiz sonucunda her bir grubun diğer gruplardan ayırma başarısı ayrı ayrı grafiklerle gösterilmektedir. İlgili grafiklerde kalibrasyon ve tahmin modellerine ait sonuçlar bir arada verilmiş olup. Her grafiğin sol tarafı kalibrasyon modeli sonuçlarını, sağ tarafı tahmin modeli sonuçlarını göstermektedir.

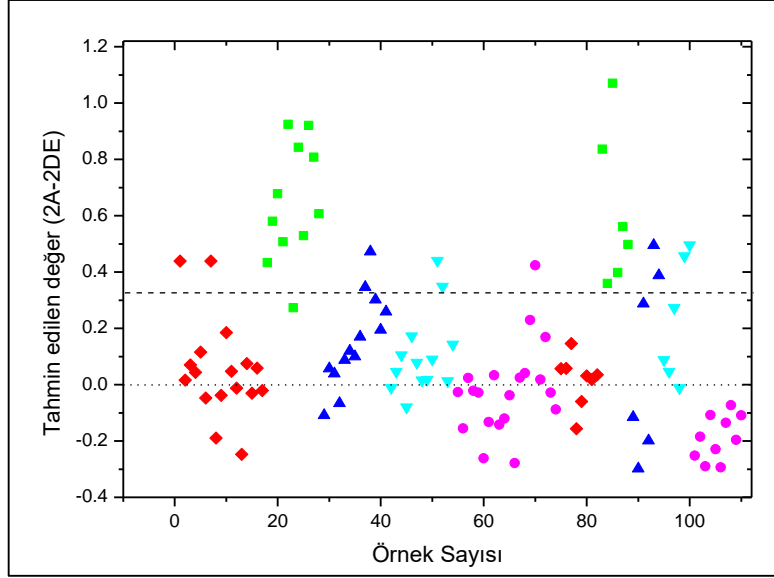
Şekil 4. 45, kurulan PLS-DA modelinin taze sınıfına ait örnekleri diğer gruplardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 45 Hekzan ekstrakte taze örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4. 45'de taze sınıfına ait örneklerin eşik değeri çizgisinin üzerinde konularak diğer bütün gruplardan başarılı bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Aynı grafikte taze sınıfının kalibrasyon modeline ait y değerleri grafiğin sol üst tarafında, tahmin modeline ait y değerleri grafiğin sağ üst tarafında konulmuştur. Çizelge 4. 16'da taze örneklerin ayırma başarısına ait kantitatif parametreler verilmiştir. İlgili değerler incelendiğinde geliştirilen kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerine ait duyarlılık ve özgüllük değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

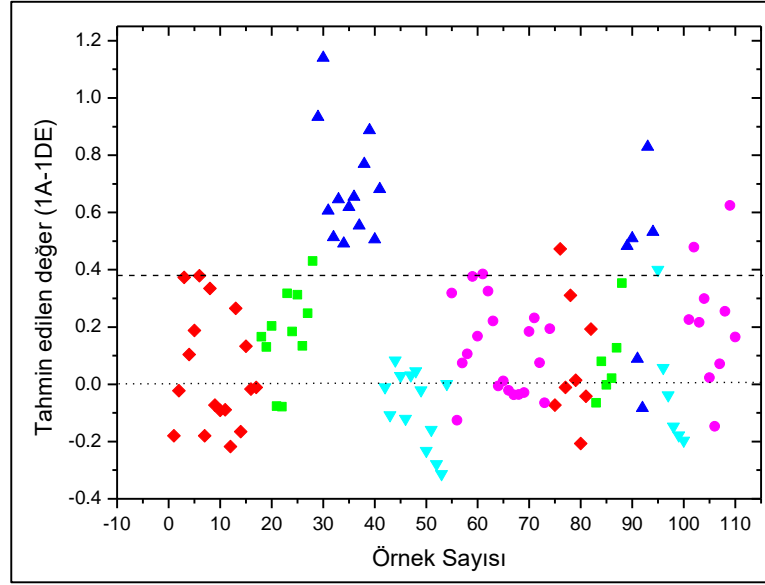
Şekil 4. 46, kurulan PLS-DA modelinin 2A-2DE sınıfına ait örnekleri diğer gruplardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 46 Hekzan ekstrakte 2A-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4. 46'da 2A-2DE sınıfına ait örneklerin eşik değeri çizgisinin üzerinde konumlandığı görülmekle birlikte geriye kalan diğer sınıflara ait bazı örneklerin de eşik değeri çizgisinin üzerinde konumlandığı görülmektedir. Bu durum Çizelge 4. 16'da geliştirilen kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerine ait duyarlılık ve özgüllük değerlerine bir azalma olarak yansımıştır.

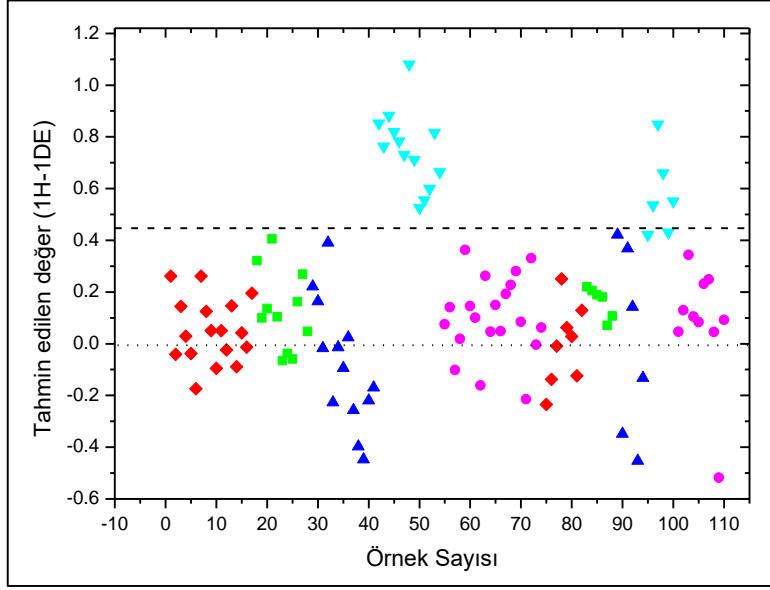
Şekil 4. 47 kurulan PLS-DA modelinin 1A-1DE sınıfına ait örneklerin diğer gruplardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 47 Hekzan ekstrakte 1A-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4. 47'de geliştirilen kalibrasyon ve tahmin modelleri sayesinde 1A-1DE sınıfının geriye kalan gruplardan ayrımı gösterilmiştir. Söz konusu modelin kalibrasyon kısmında oldukça başarılı bir ayırım gerçekleştirilirken tahmin modelinde 1A-1DE sınıfına ait bazı örneklerin eşik değeri çizgisinin altında kaldığı, diğer sınıflara ait bazı örneklerin ise eşik değeri çizgisinin üzerinde konumlandığı görülmüştür. Bu durum Çizelge 4. 16'da tahmin modeline ait duyarlılık ve özgüllük değerlerinin kalibrasyon ve çapraz validasyon modellerine kıyasla daha düşük elde edilmesine sebep olmuştur.

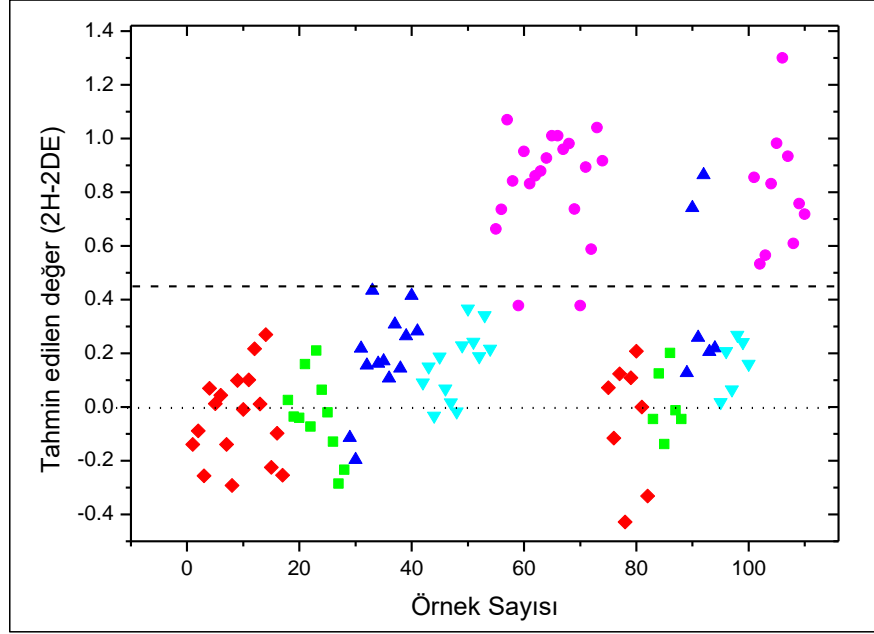
Şekil 4. 48 kurulan PLS-DA modelinin 1H-1DE sınıfına ait örnekleri diğer gruplardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 48 Hekzan ekstrakte 1H-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4. 48 incelendiğinde 1H-1DE sınıfına ait örneklerin geliştirilen PLS-DA kalibrasyon modeli sayesinde diğer gruplardan tamamen ayrıldığı görülmektedir. Öte yandan PLS-DA tahmin modelinde aynı sınıfa ait iki örnek eşik değerinin hemen altında konumlanmıştır. Bu durum Çizelge 4. 16'da tahmin modelinin duyarlılık değerinde kalibrasyon modeline kıyasla bir azalma olarak yansımıştır.

Şekil 4. 49 kurulan PLS-DA modelinin 2H-2DE sınıfına ait örnekleri diğer gruplardan ayırma başarısını göstermektedir



Şekil 4. 49 Hekzan ekstrakte 2H-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4. 49 incelendiğinde 2H-2DE sınıfına ait örneklerin geliştirilen PLS-DA kalibrasyon modeli kullanılarak diğer gruplardan ayırımında bu sınıfa ait iki örneğin eşik değeri çizgisinin altında konumlandığı görülmektedir. Söz konusu problem PLS-DA tahmin modeline yansımamış olup tahmin veri setindeki örnekler tamamen eşik değeri üzerindeki bölgede konumlanmıştır. Öte yandan 1A-1DE sınıfına ait iki örneğin de 2H-2DE örneklerine yakın pozisyonda konumlandığı görülmüştür. Bu durum Çizelge 4. 16'da tahmin modeline ait özgüllük değerinin kalibrasyon modeline kıyasla azalması olarak gözlenmiştir.

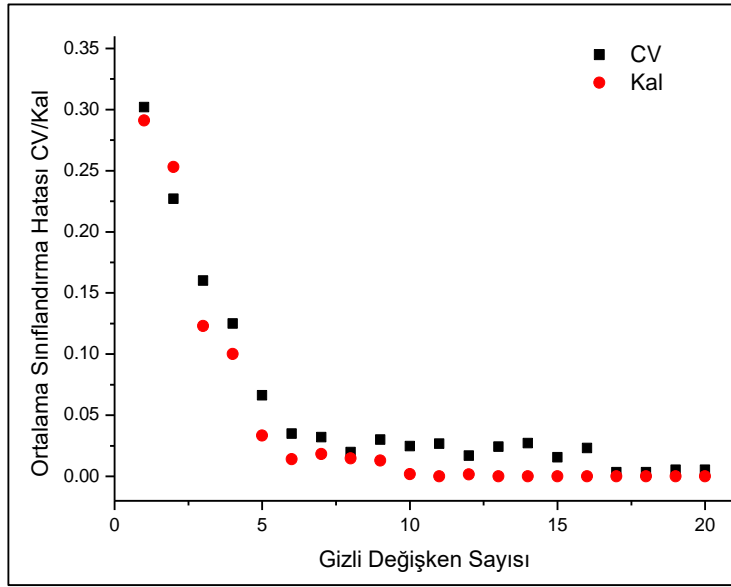
Sınıflar arası çakışmalar nedeniyle gerçekleşen karışıklıkların geliştirilen kalibrasyon, validasyon ve tahmin modelleri üzerindeki yansımalarının kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla Çizelge 4. 17'de her bir sınıf ve her bir model için DP, YP, DN ve YN oranları verilmiştir.

Çizelge 4. 17 Hekzan ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin konfüzyon matrisleri

Sınıf	DP			YP			DN			YN		
	Kal	CV	Tahmin	Kal	CV	Tahmin	Kal	CV	Tahmin	Kal	CV	Tahmin
T	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000
1H-1DE	1.000	0.846	0.667	0.000	0.033	0.000	1.000	0.967	1.000	0.000	0.154	0.333
2H-2DE	0.900	0.900	1.000	0.000	0.056	0.077	1.000	0.944	0.923	0.100	0.100	0.000
1A-1DE	1.000	0.692	0.500	0.033	0.049	0.033	0.967	0.951	0.967	0.000	0.308	0.500
2A-2DE	0.910	0.727	1.000	0.016	0.048	0.067	0.984	0.952	0.933	0.091	0.272	0.000

Çizelge 4. 17 incelenirken dikkate alınan husus DN ve DP oranlarının yüksek, YP ve YN oranlarının düşük olup olmamasıdır. Bu oranlar pozitif olması beklenen örneğin pozitif, negatif olması beklenen örneğin negatif olup olmadığının sayısal olarak ifadesi olarak değerlendirilmektedir. Buna göre dikkat çeken en önemli sonuç 1H-1DE ve 1A-1DE sınıflarının tahmin modellerine ait YN oranlarının nispeten yüksek olmasıdır. Söz konusu durumun sebebi ise bu sınıflara ait tahmin veri seti örneklerinde negatif olmadığı halde grafiğin negatif bölgesinde konumlanan örneklerin bulunmasıdır. Öte yandan genel olarak tüm sınıflar için kalibrasyon modellerinin DP ve DN değerleri 0.900 ve üzeridir. Tahmin modellerinde ise 1H-1DE ve 1A-1DE sınıfları dışında DP değerleri 1.00, DN değerleri 0.900'ün üzerindedir.

Hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen örnekler için yürütülen çalışmanın her bir basamağı Folch ekstrakte örnekler için de tekrar edilmiştir. Örnek gruplarının birbirinden ayrılması amacıyla geliştirilen PLS-DA modelinde kullanılacak gizli değişken sayısına karar verilmesi amacıyla ortalama sınıflandırma hatası değerinin artan gizli değişken sayısı ile değişimi incelenmiştir. İlgili grafik Şekil 4.50 ile verilmiştir. Şekil 4.50 incelendiğinde gizli değişken sayısı arttıkça hem kalibrasyon hem de çapraz validasyon modellerinin hata değerlerinin azaldığı görülmüştür.



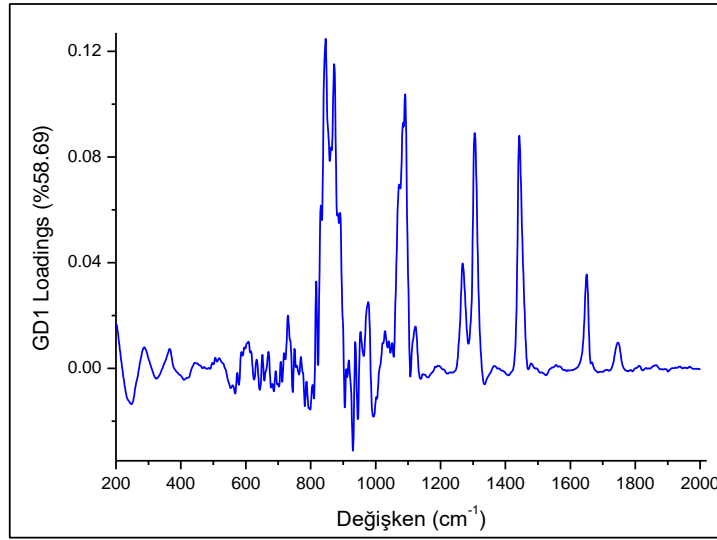
Şekil 4.50 Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli hata değerleri

Modellere ait bazı kalite parametrelerinin model kurulumunda 3, 6 ve 10 gizli değişken kullanılması halinde nasıl değiştiği Çizelge 4.18 ile gösterilmiştir. İlgili çizelge incelendiğinde artan gizli değişken sayısı ile kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerine ait sınıf hatası değerlerinin sıfırlandığı görülmektedir. Öte yandan RMSEC, RMSECV ve RMSEP hata değerleri de azalmaktadır. Bu değişimlerle uyumlu şekilde kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerinin duyarlılık ve özgüllük oranı değerleri yükselmektedir. Tüm bu pozitif değişimler göz önünde bulundurularak PLS-DA modellerinin kurulmasında 10 gizli değişken kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4. 18 Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin performans parametreleri

Gizli Değişken Sayısı	Taze			1H-1DE			2H-2DE			1A-1DE			2A-2DE		
	3GD	6GD	10GD	3GD	6GD	10GD	3GD	6GD	10GD	3GD	6GD	10GD	3GD	6GD	10GD
Kal-Sens	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.947	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000
Kal-Spec	1.000	1.000	1.000	0.594	0.953	1.000	0.927	0.945	0.982	0.865	0.962	1.000	0.524	1.000	1.000
CV- Sens	1.000	1.000	1.000	0.700	0.900	0.900	0.895	1.000	1.000	0.955	1.000	0.955	0.909	0.909	1.000
CV-Spec	0.984	1.000	1.000	0.609	0.953	0.969	0.927	0.945	0.964	0.865	0.942	0.981	0.556	1.000	0.984
Tahmin-Sens	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.833	1.000	1.000
Tahmin-Spec	1.000	1.000	1.000	0.677	0.968	1.000	0.889	0.963	1.000	0.885	1.000	1.000	0.600	1.000	1.000
Kal-CE	0.000	0.000	0.000	0.203	0.023	0.000	0.063	0.027	0.009	0.067	0.019	0.000	0.284	0.000	0.000
CV-CE	0.008	0.000	0.000	0.345	0.073	0.066	0.089	0.027	0.019	0.090	0.029	0.032	0.268	0.045	0.008
Tahmin-CE	0.000	0.000	0.000	0.261	0.016	0.000	0.056	0.019	0.000	0.058	0.000	0.000	0.283	0.000	0.000
RMSEC	0.158	0.089	0.065	0.336	0.197	0.152	0.246	0.195	0.158	0.281	0.212	0.175	0.341	0.210	0.122
RMSECV	0.193	0.099	0.083	0.341	0.230	0.228	0.254	0.216	0.210	0.288	0.231	0.230	0.358	0.234	0.171
RMSEP	0.154	0.097	0.076	0.338	0.201	0.178	0.250	0.169	0.155	0.265	0.189	0.149	0.357	0.219	0.144

Şekil 4. 51 kurulan PLS-DA modeline ait loadings grafiğini göstermektedir.

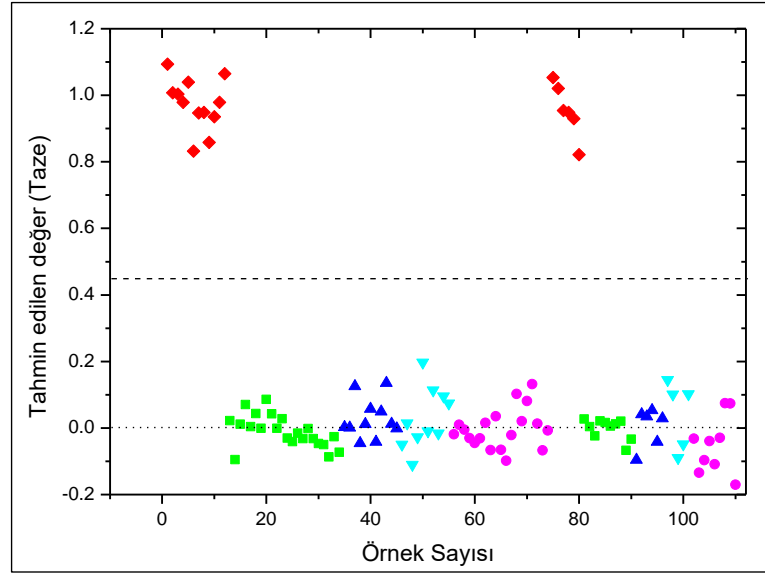


Şekil 4. 51 Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modeli loadings değerleri

Şekil 4. 51 incelendiğinde hekzan ekstrakte örneklerden farklı olarak sınıflar arası ayırma en büyük katkısı sağlayan bölgenin Raman spektrumlarının 800-900 cm^{-1} aralığı olduğu görülmektedir. Tavuk yağlarının Raman spektrumları incelendiğinde bu aralıkta 813, 843, 872 ve 890 cm^{-1} 'de konumlanmış dört farklı bant olduğu görülmüştür. Bu bantlar genel olarak lipit yapısında bulunan alifatik zincirlerin C-C gerilmeleriyle ilişkilendirilmektedir. Lipitlerin oksidasyon sürecinde oluşan peroksit yapılarının bu aralıkta değişime neden olabileceği belirtilirken söz konusu bantlardan sorumlu moleküler grupların doymamışlık bölgelerinden uzakta konumlanmış olması nedeniyle oksidasyon süreçleri ile direkt olarak ilişkilendirilmelerinin hatalı olabileceği de vurgulanmaktadır [224].

Folch ekstrakte örneklerin sınıflandırılması amacıyla geliştirilen PLS-DA kalibrasyon ve tahmin modellerinin sonuçları Şekil 4.52-Şekil 4.56 ile verilmiştir.

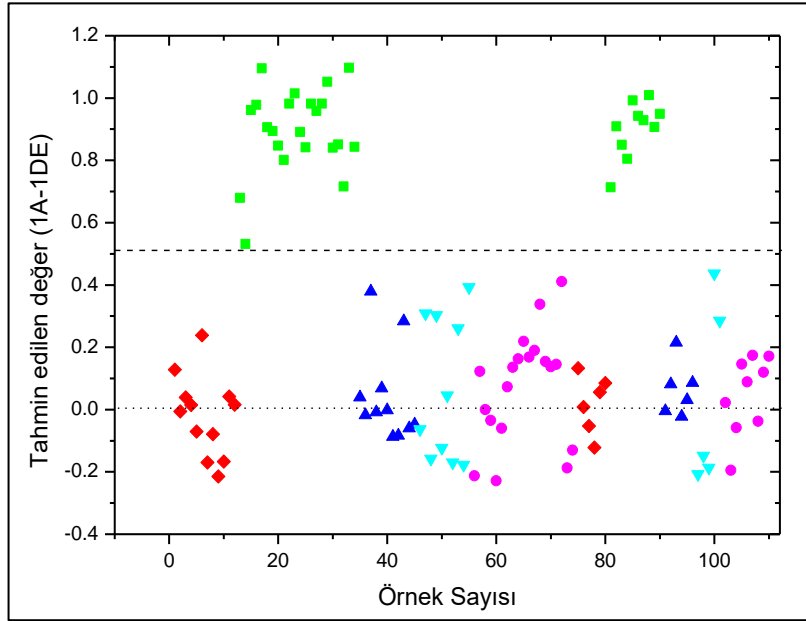
Şekil 4. 52 geliştirilen PLS-DA modelinin taze sınıf örneklerini diğer sınıflardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 52 Folch ekstrakte taze örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4. 52 incelendiğinde taze sınıfına ait örneklerin hem kalibrasyon hem de tahmin modelleriyle diğer sınıflardan başarılı bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Bu durum Çizelge 4. 18'de kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerine ait duyarlılık ve özgüllük oranı değerlerinin 1.00 ile sınıflandırma hatası değerlerinin sıfır olmasıyla görülmektedir.

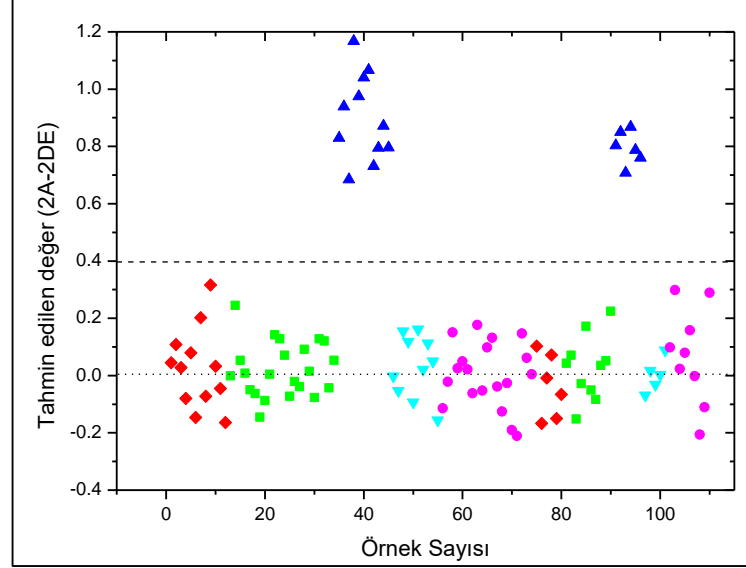
Şekil 4. 53 geliştirilen PLS-DA modelinin 2A-2DE sınıfı örneklerini diğer sınıflardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 53 Folch ekstrakte 2A-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4. 53 incelendiğinde 2A-2DE sınıfına dahil olan örneklerin hem kalibrasyon hem de tahmin modelleriyle diğer gruplardan başarılı bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Kalibrasyon veri setine ait örneklerin bir kısmı daha az kümelenme davranışı gösterdiğinden söz konusu modelin duyarlılık ve özgüllük oranı değerleri Çizelge 4. 18'de kalibrasyon ve tahmin modelleri için 1.00 iken çapraz validasyon modeli için 0.955 ve 0.981'dir. Benzer şekilde sınıf hata değeri kalibrasyon ve tahmin modelleri için sıfır iken çapraz validasyon modeli için 0.032'dir.

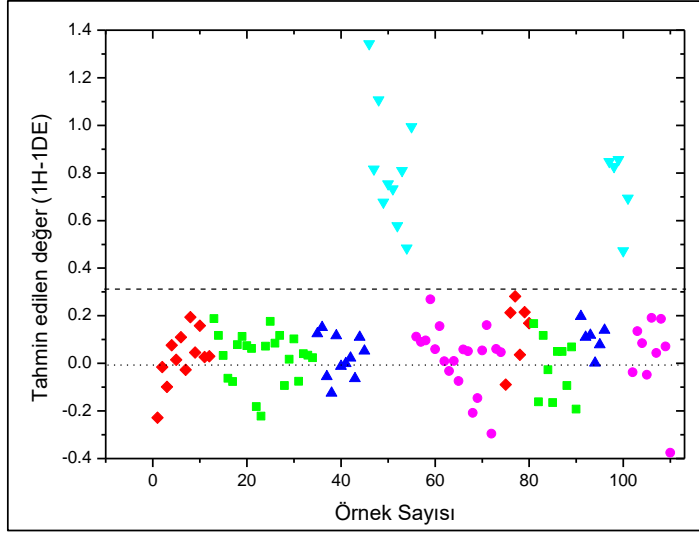
Şekil 4. 54 geliştirilen PLS-DA modelinin 1A-1DE sınıfı örneklerini diğer sınıflardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 54 Folch ekstrakte 1A-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4.54 incelendiğinde 1A-1DE sınıfına dahil olan örneklerin geliştirilen kalibrasyon ve tahmin modelleriyle diğer gruplardan başarılı bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Kalibrasyon veri setindeki örneklerin kümelenme davranışının çok yüksek olmayışı Çizelge 4. 18'de çapraz validasyona ait özgüllük oranı değerinin 0.984, sınıf hatası değerinin 0.008 olarak gözlenmesine neden olmuştur. Öte yandan kalibrasyon ve tahmin modelleri için ilgili parametreler oldukça tatmin edicidir.

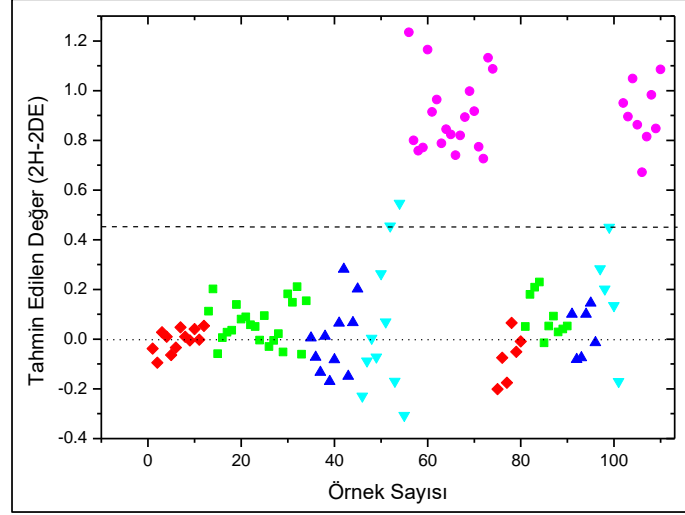
Şekil 4. 55 geliştirilen PLS-DA modelinin 1H-1DE sınıfı örneklerini diğer sınıflardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 55 Folch ekstrakte 1H-1DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

Şekil 4.55 incelendiğinde 1H-1DE sınıfına ait olan örneklerin diğer sınıflardan ayrıldığı görülmektedir. Öte yandan hem kalibrasyon hem de tahmin modlinin veri setinde yer alan örneklerin kümelenme davranışı düşüktür. Bu durum Çizelge 4. 18'de çapraz validasyona ait duyarlılık oranı, özgüllük oranı ve sınıf hatası değerlerini 0.900, 0.969 ve 0.066 olması ile yansımıştır. Öte yandan geliştirilen kalibrasyon ve tahmin modellerinin yüksek duyarlılık ve özgüllük oranı değerleri ile sınıfları birbirinden başarılı bir şekilde ayırdığı görülmektedir.

Şekil 4.56 geliştirilen PLS-DA modelinin 2H-2DE sınıfı örneklerini diğer sınıflardan ayırma başarısını göstermektedir.



Şekil 4. 56 Folch ekstrakte 2H-2DE örneklerin PLS-DA skor grafiği (◆:taze, ■:2A-2DE, ▲:1A-1DE, ▼:1H-1DE, ●:2H-2DE)

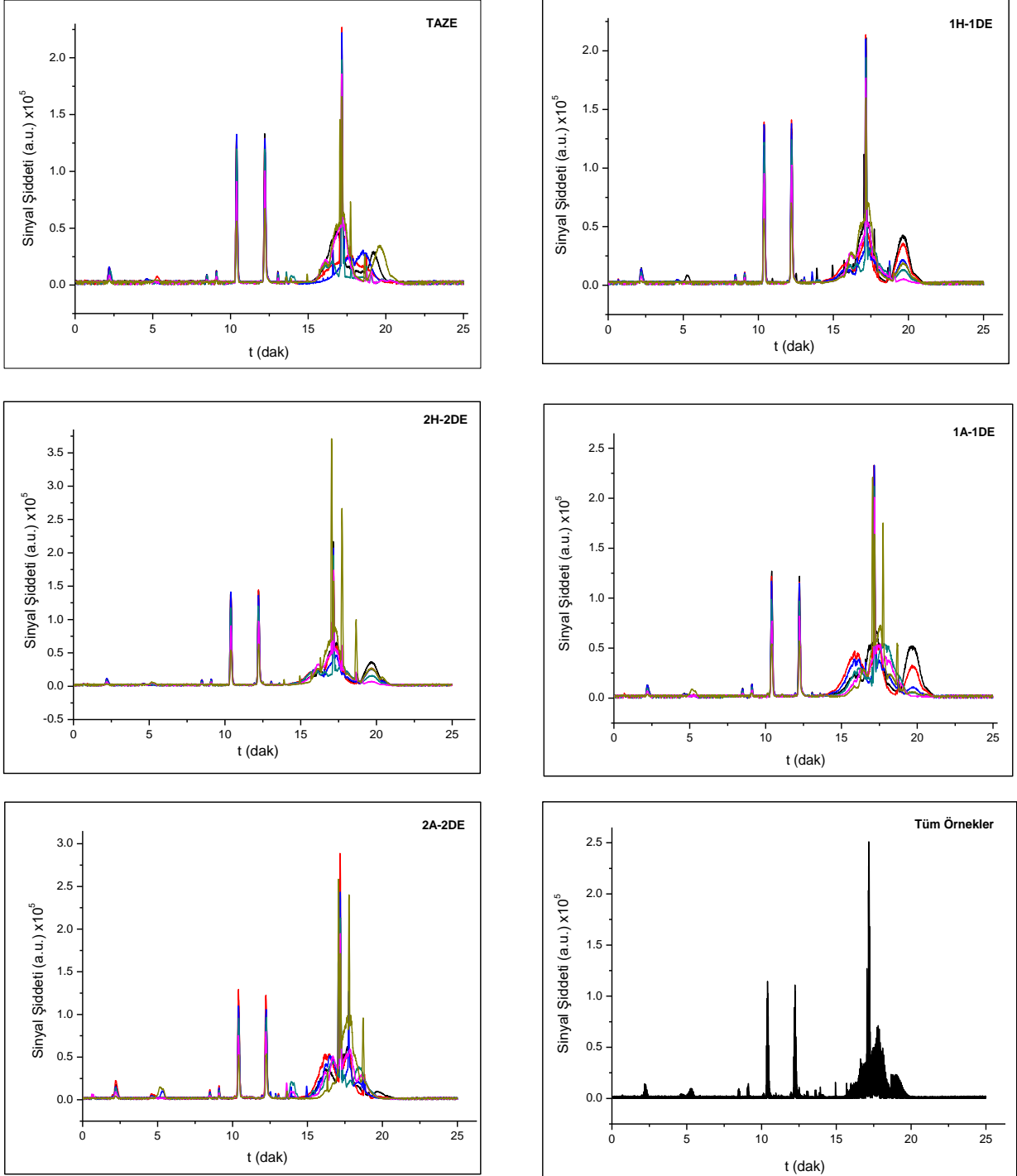
Şekil 4.56 incelendiğinde 2H-DE sınıfına ait örneklerin eşik değeri çizgisinin üzerinde konumlandığı görülmektedir. Fakat hem kalibrasyon hem de tahmin modeli sonuçlarında 1H-1DE sınıfına ait bazı örnekler 2H-2DE sınıfı örneklerine yakın şekilde konumlanmıştır. Bu durum Çizelge 4. 18'de verilen değerler üzerinden yorumlandığında kalibrasyon ve çapraz validasyon modellerine ait özgüllük oranı değerlerinin 0.982 ve 0.964 olarak azaldığı görülmüştür. Bu modellere ait sınıf hataları ise sırasıyla 0.009 ve 0.019'dur. Ayrıca bu modele ait RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri 0.158, 0.210 ve 0.155 olup diğer sınıflara kıyasla yüksektir.

Çizelge 4. 19 ile verilen konfüzyon matrisinde yüksek DN ve DP oranları ile düşük YP ve YN oranları istenmektedir. Bu oranlar pozitif bölgede konumlanması gereken örnek pozitif bölgede, negatif bölgede konumlanması gereken örnek bölgede konumlanma durumunun sayısal bir ifadesidir. Buna göre hemen hemen hiçbir sınıf için yanlış pozitif konumlanması gerçekleşmemiştir. Yalnızca 2H-2DE sınıfının çapraz validasyon modelinde yanlış pozitifte konumlanmış örnek bulunmaktadır. Yanlış negatif konumlanması ise yalnızca 1H-1DE sınıfının çapraz validasyon modelinde gerçekleşmiştir. Kalibrasyon ve tahmin modellerinin DP ve DN oranlarının tüm sınıflar için 1.00, YP ve YN oranlarının ise 0.00 olduğu görülmektedir. Çapraz validasyon modelleri için ise tüm sınıfların DP ve DN oranları 0.900 ve üzeridir.

Çizelge 4. 19 Folch ekstrakte örneklerin PLS-DA modellerinin konfüzyon matrisleri

Sınıf	DP			YP			DN			YN		
	Kal	CV	Tahmin	Kal	CV	Tahmin	Kal	CV	Tahmin	Kal	CV	Tahmin
T	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000
1H-1DE	1.000	0.900	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.100	0.000
2H-2DE	1.000	1.000	1.000	0.000	0.018	0.000	1.000	0.982	1.000	0.000	0.000	0.000
1A-1DE	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000
2A-2DE	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000

Tavuk örneklerindeki tağışışın belirlenmesi amacıyla yürütölen çalışmanın son basamağında tavuk örneklerinde dondurma-eritme döngöleriyle meydana gelen moleköler değişimler metabolomiks analizleriyle incelenmiştir. şekil 4. 57 ile örneğ gruplarına ait temel pik kromatogramları gösterilmiştir.



şekil 4. 57 Örneğ gruplarının temel pik kromatogramları

Şekil 4. 57'de her bir örnek grubuna ait grafikte her bir dilüsyon ve her dilüsyonun iki paralelli kromatogramları aynı grafikte verilmiştir. Uygulanan dondurma-eritme işlemleri sonucunda elde edilen örneklere ait kromatogramlarda sinyal şiddeti kontrol grubuna bir diğer deyişle taze örnek grubuna kıyasla 1.5 kattan fazla değişen yetmiş beş adet pik tespit edilmiştir. Bu piklerden sorumlu olan moleküller m/z değerleri, alıkonma süreleri ve kat değişim değerleri belirtilerek Çizelge 4. 20 ile özetlenmiştir. Kat değişim değerleri sinyal şiddetindeki artış ve azalışı ifade edecek şekilde pozitif veya negatif yöndeki değişime işaret edebilmektedir. Çalışma kapsamında, dilüsyon serilerinde yürütülen regresyon analizlerinde $R < 0.90$ ve $p > 0.05$ değerlerine sahip olan pikler değerlendirmeye alınmamıştır.

Metabolomik çalışmaları, proteomik ve genomik çalışmalarına kıyasla daha yeni olduğundan elde edilen piklerin tamamının anlamlandırılması her zaman mümkün olamamaktadır. Bu durum metabolomik veri tabanlarının yeni olması ve günden güne gelişiyor olmasıyla açıklanmaktadır. Mevcut çalışmada sinyal şiddeti anlamlı olarak değişen pikler, m/z değerleri ve MS/MS spektrumları kullanılarak erişime açık MS kütüphanelerinden taratılmış ve uygulanan dondurma-eritme işlemleri nedeniyle yetmiş beş farklı molekülün miktarında anlamlı değişimler olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 20 Kat değişimi 1.5'tan fazla ve $p < 0.05$ olan piklerin listesi

	m/z	Alıkonma Süresi	Kat Değişim Değerleri*			
			1H-1DE	2H-2DE	1A-1DE	2A-2DE
1	101.0599	13.07	1.91	1.72	2.12	1.78
2	109.1014	8.49	1.78	1.61	2.18	1.82
3	111.0442	13.07	1.89	1.79	2.19	1.83
4	113.1322	12.24	1.49	1.37	1.68	2.89
5	129.0546	13.07	1.82	1.73	2.12	1.75
6	133.1007	9.10	1.30	1.19	1.81	1.63
7	138.1358	10.40	1.26	1.20	1.54	1.56
8	152.1513	10.40	1.61	1.27	1.81	2.63
9	165.1634	12.24	1.25	1.35	1.52	1.70
10	167.1789	12.23	1.36	1.46	1.58	1.82
11	179.1791	12.24	1.46	1.54	1.72	1.88
12	193.1946	12.24	1.46	1.60	1.71	2.39
13	229.2156	8.49	1.36	1.37	1.64	1.76
14	239.2367	10.41	7.62	7.61	7.54	7.20
15	240.2398	10.40	1.84	1.83	1.76	1.71
16	253.2518	11.33	1.28	1.26	1.62	1.88
17	257.247	10.41	2.20	2.19	2.12	2.05
18	267.268	12.23	5.34	5.32	5.23	5.34
19	269.2743	12.24	1.38	1.41	1.65	1.90
20	286.2461	8.49	1.52	1.72	2.07	2.07
21	288.2893	2.20	6.05	6.25	6.13	5.70
22	289.2925	2.20	1.61	1.86	1.71	1.54
23	295.299	13.92	1.31	1.47	1.55	1.85
24	303.2524	8.49	1.32	1.43	1.61	1.80
25	313.2736	10.40	7.69	7.67	7.61	7.40
26	314.2767	10.41	2.10	2.10	2.03	1.95
27	325.2345	8.49	2.34	2.34	2.33	2.18
28	327.2396	8.49	1.42	1.51	1.62	1.68

29	327.2884	11.33	1.51	1.39	2.00	2.18
30	331.2842	10.41	6.78	6.76	6.69	6.43
31	332.2873	10.41	1.87	1.85	1.78	1.72
32	337.2007	9.10	1.05	1.06	1.57	1.55
33	340.2536	9.46	1.63	1.72	1.54	2.04
34	341.3049	12.23	5.61	5.58	5.49	5.58
35	342.308	12.23	1.72	1.69	1.60	1.61
36	345.2993	11.33	1.37	1.52	1.78	2.12
37	353.2664	10.40	25.16	25.17	25.25	24.14
38	353.4183	10.41	1.60	1.61	1.82	1.93
39	354.2695	10.40	6.04	6.04	6.13	5.97
40	359.3156	12.23	8.14	8.12	8.04	8.23
41	360.3187	12.23	2.32	2.29	2.19	2.18
42	371.3150	13.07	2.22	2.09	2.42	2.11
43	377.2660	9.51	1.43	1.33	1.96	1.98
44	377.3448	12.24	1.35	1.53	1.85	2.24
45	381.2979	12.24	25.75	25.77	25.87	25.64
46	381.4554	12.24	1.45	1.46	1.70	1.89
47	382.301	12.23	6.63	6.64	6.74	6.84
48	383.3033	12.23	1.45	1.46	1.56	1.63
49	387.3096	9.83	1.09	1.43	1.77	1.87
50	393.297	13.08	2.74	2.64	3.09	2.94
51	394.3004	13.08	1.52	1.45	1.84	1.70
52	415.3408	11.65	1.23	1.28	1.94	1.77
53	487.2973	9.10	1.15	1.33	2.04	1.94
54	503.3196	9.10	1.09	1.07	1.75	1.73
55	543.3426	9.10	2.82	2.86	2.66	2.56
56	635.466	8.49	1.42	1.53	1.72	1.55
57	671.5374	8.49	1.15	1.31	1.52	1.71
58	672.54	8.49	1.22	1.41	1.79	2.01
59	683.5433	10.40	4.54	4.54	4.62	4.47
60	684.5463	10.40	2.20	2.21	2.28	2.27
61	687.5733	10.41	1.22	1.29	1.69	1.81
62	711.5734	11.34	1.51	1.70	1.66	1.58

63	715.4888	10.20	1.39	1.51	1.82	3.17
64	735.4846	10.40	1.44	1.55	2.00	2.19
65	736.4881	10.40	1.79	2.00	2.73	3.29
66	739.6061	12.24	5.21	5.21	5.31	5.43
67	740.6091	12.24	2.65	2.65	2.75	2.84
68	743.6335	12.24	1.34	1.31	1.67	2.07
69	763.605	13.08	2.38	2.01	2.88	2.33
70	764.6084	13.08	1.99	1.73	2.62	2.06
71	765.6119	13.08	1.95	1.54	2.62	1.94
72	791.5472	12.24	1.64	1.75	2.23	2.49
73	887.5647	15.78	1.75	2.54	2.32	2.60
74	909.5466	15.78	1.44	2.05	1.64	1.80
75	910.55	15.79	1.40	2.20	1.60	2.13

*Kat değişim değerleri sinyal Şiddetindeki değişimin taze örneklere kıyasla kaç kat olduğunu ifade etmektedir. Örnekler; 1H-1DE: haftalık bazda bir kere dondurulup-eritilmiş, 2H-2DE: haftalık bazda iki kere dondurulup-eritilmiş, 1A-1DE: aylık bazda bir kere dondurulup-eritilmiş ve 2A-2DE: aylık bazda iki kere dondurulup-eritilmiş olarak sınıflandırılmıştır.

Söz konusu kat değişim değerleri hakkında detaylı bilgi izelge 4. 21'de verilmiştir. Bu moleküller içerisinden altı metabolit ilgili kütüphaneler kullanılarak başarılı bir Şekilde tanımlanmıştır. Bu metabolitler; monopalmitin, monostearin, monoolein, 11,12-epoksieykozatrienoik asit-d₁₁ (11,12-eet-d₁₁), palmitik amid ve di (2-etilhekzil) adipat (DEHA) olarak sıralanabilmektedir.

Çizelge 4. 21 ile veritabanlarında yapılan taramalar sonucunda başarılı bir şekilde tanımlanan altı metabolite ait m/z, alıkonma süresi, molekül ağırlığı ve her bir metabolitte taze örneklerle kıyasla uygulanan dondurma-eritme işlemleri nedeniyle gerçekleşen kat değişimi değerleri verilmiştir.

Çizelge 4. 21 Tanımlanan metabolitlere ait bilgiler ve kat değişim değerleri

Molekülün adı	m/z	AS	MA	1H-1DE	2H-2DE	1A-1DE	2A-2DE
1-Monopalmitin	331.2851	10.42	330.2765	6.78	6.76	6.69	6.43
1-Monostearin	359.3161	12.27	358.3088	8.14	8.12	8.04	8.23
Monoolein	379.2974	10.07	356.2936	1.47	1.52	1.62	1.43
11(12)-EET-d11	322.2873	10.41	331.2274	1.87	1.85	1.78	1.72
Palmitik amid	256.2125	11.85	255.2014	1.24	1.42	1.52	1.58
DEHA	371.3163	13.08	370.3084	2.22	2.09	2.42	2.11

Tanımlanan metabolitler arasında yer alan monopalmitin, monostearin ve monoolein molekülleri birer monoaçilgliserol molükü olup lipit hidrolizi sonucunda oluşmaktadır. Literatürde lipit hidrolizi ve lipit oksidasyonu arasında tanımlanmış bir ilişkiden söz edilmemekle birlikte lipit hidrolizinin lipit oksidasyonunu teşvik ettiği belirtilmektedir. Bu iki mekanizmanın soğutucuda saklama ve dondurarak saklama süreçlerinde gerçekleştiği bilinmektedir. Lipolitik enzimlerin hidrolitik değişimleri başlattığı bilinmektedir. Hidrolitik değişimler ise triaçilgliserollerin diaçilgliserol ve monoaçilgliseroller ile serbest yağ asitlerine hidrolizini kapsamaktadır [236]. Yapılan analizler sonucunda mevcut çalışmada monopalmitin, monostearin ve monoolein moleküllerinin miktarı uygulanan dondurma-eritme işlemleriyle 1.5 kattan fazla değişmiştir. Piklerin tanımlanması MS/MS taramasıyla piklerin fragmentler bazında incelenmesi ve elde edilen spektrumların ilgili literatürle karşılaştırılması yoluyla yapılmıştır. Aşağıda Şekil 4. 58 ile tanımlanan tüm moleküllere ait detaylı bilgi ile referans ve deneysel MS/MS spektrumları verilmiştir.

Gliserol 1-hekzadekanoat diğer adıyla alfa-monopalmitin veya hekzadekanoik asit, 2,3-dihidroksipropil ester 1-monoaçilgliserol grubunda yer almaktadır. Bu moleküller 1-konumunda açillenmiş gliserol bulundurmaktadır. Bu nedenle monopalmitin, bir mono-radil-gliserol lipit molekülüdür. Sıvı ve katı yağlarda bulunmakta ve yağ içeren bir gıdanın tüketimine işaret eden bir biyobelirteç olarak bilinmektedir. Şekil 4. 58 a'da aşağıda referans, yukarıda deneysel olmak üzere monopalmitin molekülüne ait MS/MS spektrumu verilmiştir. Tanımlanan bir diğer molekül 1-monostearin diğer adıyla 1-stearoilgliserol olup bu molekül de 1-konumunda açillenmiş gliserol bulunduran 1-monoaçilgliseroldür. Şekil 4. 58 b'de aşağıda referans, yukarıda deneysel olmak üzere monostearin molekülüne ait MS/MS spektrumu verilmiştir. Tanımlanan moleküller arasında aynı grupta yer alan bir diğer molekül monooleindir. Monoolein gliserinin oleik asitle esterleşmesi ile sentezlenen bir 1-monoaçilgliseroldür. Şekil 4. 58 c'de aşağıda referans, yukarıda deneysel olmak üzere monoolein molekülüne ait MS/MS spektrumu verilmiştir. Söz konusu bu üç molekülün miktarlarında tespit edilen anlamlı artış tekrarlayan dondurma-eritme işlemlerinin tavuk örneklerindeki lipit hidrolizini teşvik ettiğine işaret etmektedir.

Tavuk eti içerdiği yağ asitlerinin %65'inin doymamış yağ asitlerinden oluşması nedeniyle dana, kuzu ve domuz etine kıyasla doymamışlık oranı yüksek olan bir

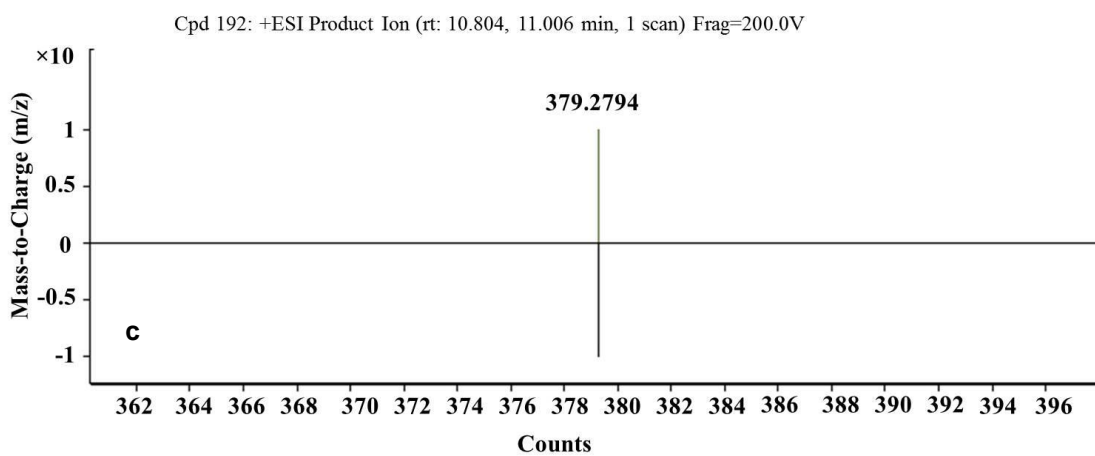
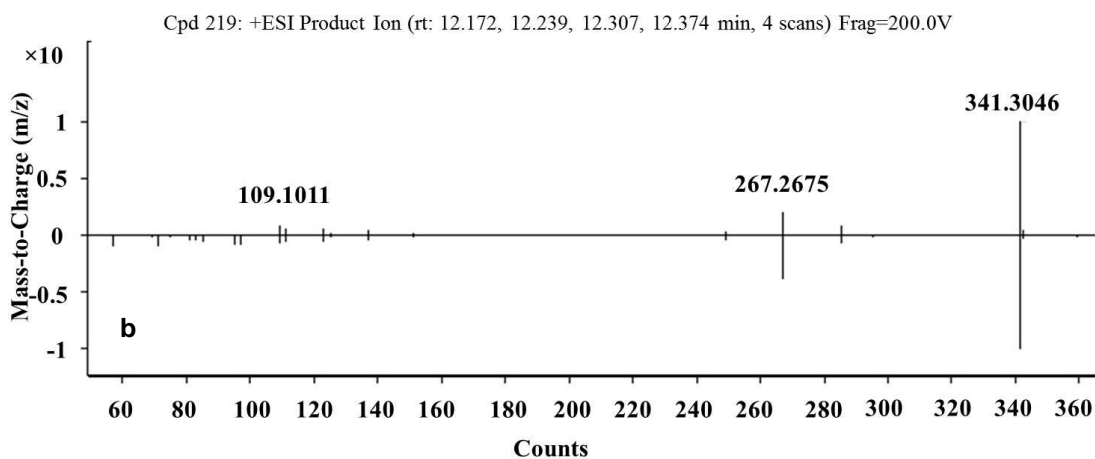
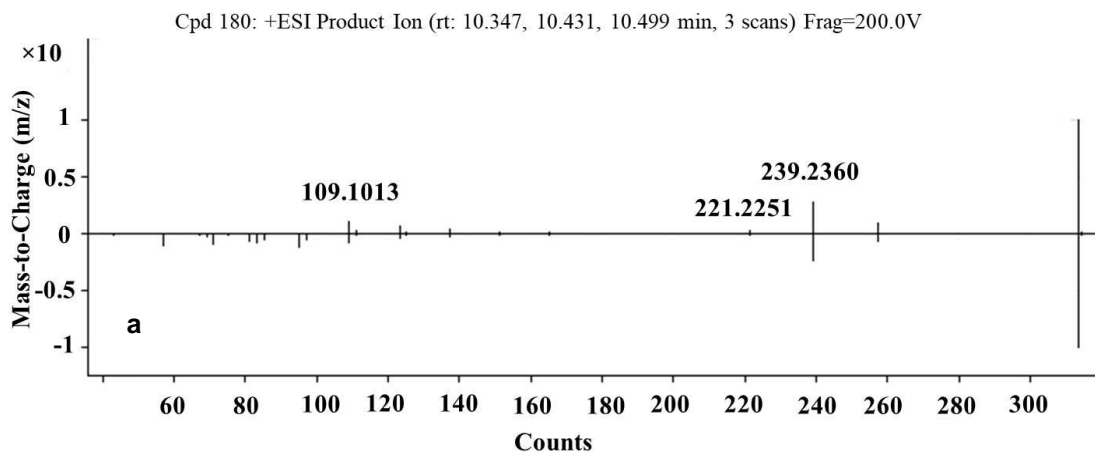
yağ asidi kompozisyonuna sahiptir [234]. Yapılan çalışmalarda nötral lipitlerdeki yağ asitlerine kıyasla fosfolipitlerdeki yağ asitlerinin daha hızlı okside olduğu belirtilmiştir [10]. Tavuk eti fosfolipitlerinin oksidasyona eğilimlerinin kıyaslandığı bir diğer çalışmada fosfatidilinositolün en yüksek oksidasyon eğilimine sahip olduğu belirtilmiştir [237]. Tavuk etinin fosfolipit fraksiyonunda majör olarak bulunan yağ asitlerinden bir tanesinin araşidonik asit olduğu rapor edilmiştir [238]. Araşidonik asit memeli hücre mebranlarında bulunan fosfolipitlerin esansiyel bir bileşeni olarak bilinmektedir. Fosfolipaz A2 enziminin aktivasyonu sonucunda hücre mebranlarındaki araşidonik asit serbest hale geçmektedir. Sitokrom P-450 epoksigenaz (CYPs) enzimlerini eksprese eden hücrelerde araşidonik asit, bulundurduğu dört farklı çift bağdan birisi üzerinden gerçekleşecek epoksidasyon yoluyla dört farklı epoksieykozatrienoik asit (EET) regioizomerine dönüştürülmektedir. Bunlar 5,6-, 8,9-,11,12- ve 14,15-EET olarak adlandırılmaktadır. Oluşan EET molekülleri ortamda çözüner epoksit hidrolaz enzimlerinin bulunması halinde dihidroksieykozatrienoik asitlere dönüştürülmektedir [239, 240]. İnsan hücrelerinde farklı CYP enzimlerinin araşidonik asiti EET moleküllerine dönüştürdüğü rapor edilmiştir. Literatürde EET molekülleri, inflamasyonu ve damar elastikiyetini düzenleme gibi özellikleriyle rapor edilmiş ve çoğunlukla inflamatuvar ve kardiyovasküler hastalıklarla olan ilişkisi incelenmiştir [241, 242]. Yakın zamanlı literatür incelendiğinde CYP enzimlerinin araşidonik asit üzerindeki aktivitesi sonucunda oluşan metabolitlerin kanser biyolojisindeki rolleri hakkında önemli bazı sonuçlar rapor edildiği görülmektedir [243]. Söz konusu çalışmalarda CYP enzimleri ekspresyonunun farklı kanser türlerindeki tümörleşmelerden sorumlu tutulabileceği rapor edilmiştir. Bunun yanında CYP enzimleri ile EET sinyalizasyon yollarının inhibisyonundan faydalanan yeni tıropatik stratejiler araştırılmıştır [244-246].

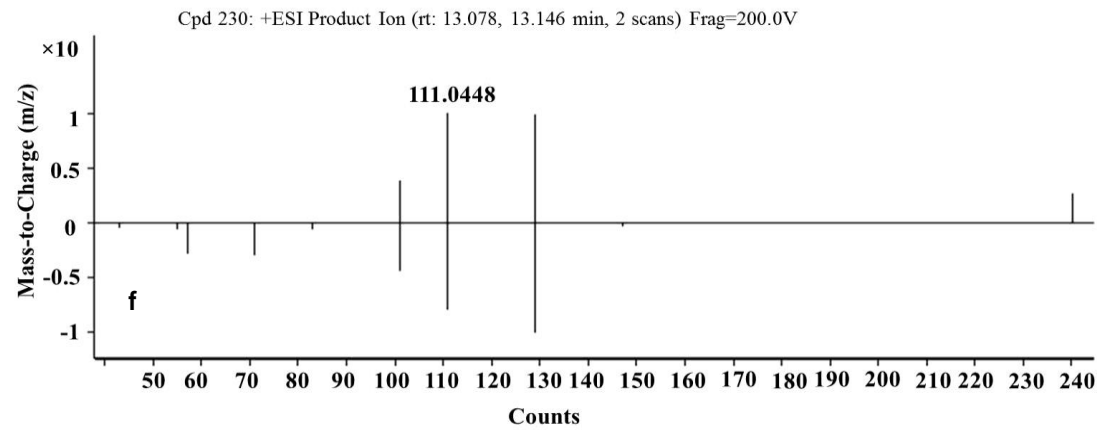
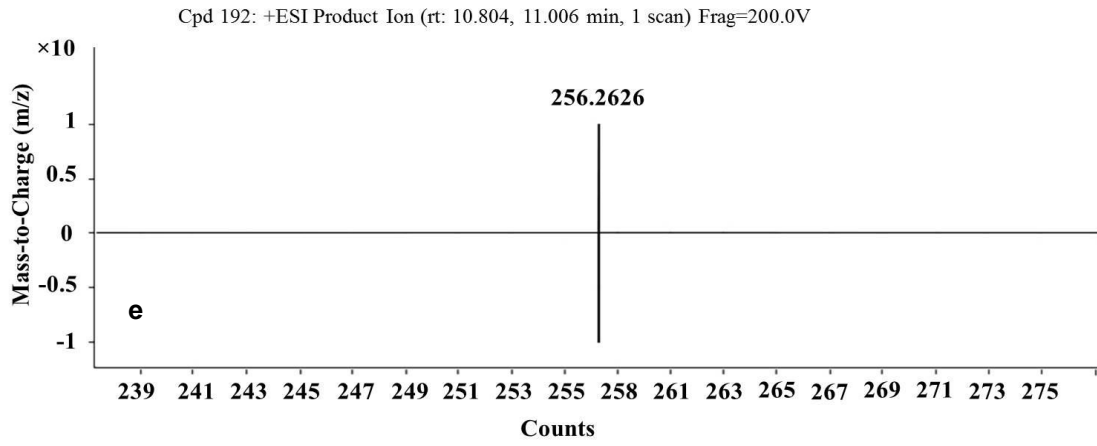
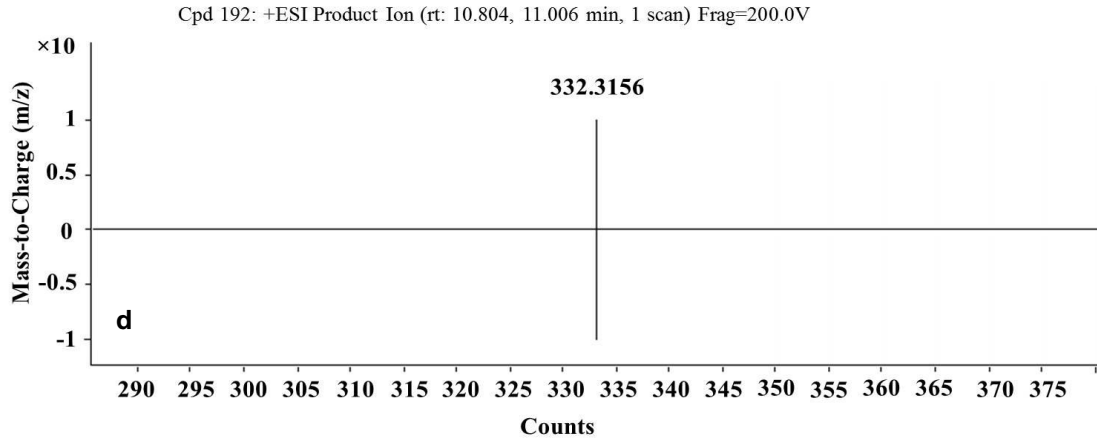
Mevcut literatürde tavuk karaciğerinde EET ve bunlardan üretilen DHET moleküllerinin sentezi rapor edilmiş olsa da tavuk örneklerine uygulanan tekrarlı dondurma-eritme işlemleri sonucunda EET moleküllerinin oluşumuna dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Tez çalışması kapsamında taze ve dondurulup-eritilmiş tavuk örneklerinin içerdiği 11(12)-EET-d₁₁ miktarları arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir (Çizelge 4. 21). Şekil 4. 58 d'de aşağıda referans, yukarıda deneysel olmak üzere 11(12)-EET-d₁₁ molekülüne ait MS/MS spektrumları verilmiştir.

Palmitik amid bir yağ asidi amididir. Yağ asidi amidleri uyku, beslenme, çoğalma ve enflamasyon gibi farklı fizyolojik süreçlerin regülasyonundan sorumlu olan biyoaktif lipitlerdir. Ayrıca endokannabinoid sinyalizasyonunun agonistleri gibi davranarak bu sistemlerde interferansa neden oldukları düşünülmektedir. Anandamid, en çok araştırılan endojen kannabinoid olup bu molekülün setezi için iki farklı yolak önerilmektedir. Birinci yolak, araşidonat grubunun fosfatidilkolin gibi fosfolipitlerin *sn*-1-gliserol ester pozisyonundan N-açiltransferaz enzimi aracılığıyla fosfatidiletanolamin molekülünün primer amino grubuna transferini önermektedir. Bu reaksiyon N-araşidonil-fosfatidil etanolamin oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan bu molekül daha sonra fosfolipaz D enzimi aracılığıyla N-araşidonil etanolamine yani anandamide dönüştürülmektedir. İkinci yolak, yağ asidi amid hidrolaz enzimi varlığında ortamda yüksek konsantrasyonda bulunan araşidonik asit ve etanolaminin kondensasyonunu önermektedir [247]. Mevcut çalışma kapsamında taze ve dondurulup-eritilmiş örnekler arasında palmitik amid içeriği bakımından anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Şekil 4. 58 e'de aşağıda referans, yukarıda deneysel olmak üzere palmitik amid molekülüne ait MS/MS spektrumu verilmiştir. Fosfatidiletanolamin gıdalarda ve biyolojik dokularda bulunan majör fosfolipitler arasında yer almaktadır [248]. Tavuk örneklerinde yapılan çalışmalarda tavuğun farklı bölgelerinden ekstrakte edilen lipit örneklerinde araşidonik asitin fosfolipit fraksiyonunda bulunan majör yağ asitlerinden olduğu belirlenmiştir [238]. Çalışma kapsamında uygulanan tekrarlayan dondurma-eritme çevrimlerinin tavuk örneklerinde membran yapısının disintegresyonuna sebep olarak yağ asidi amidlerinin oluşumundan sorumlu enzimlerin aktivitesini teşvik etmiş olabileceği düşünülmektedir. Fakat bu varsayımın kanıtlanabilmesi ancak ileri analizlerin uygulanmasıyla mümkündür.

Di (2-etilhekzil) adipat (DEHA); et ve peynir gibi ürünlerin sarılarak paketlenmesinde kullanılan ince polivinil klorid filmlerde plastikleştirici olarak kullanılmaktadır. Polivinil filmlerde DEHA oranının azaltılması ve diğer plastikleştirici ajanlarla birlikte kullanılması için çalışılmaktadır. Söz konusu molekülün gıdalara migrasyonunun araştırıldığı çalışmalarda farklı sıcaklık ve sürelerin migrasyon hızına etkisi incelenmektedir. Yapılan çalışmalarda 5-10°C'de 4 gün süreyle muhafazanın ardından 25°C'de 4 sa muhafazanın etkisi incelenerek marketten alınan gıdanın eve transferi veya buzdolabından çıkarılan gıdanın tüketilmeden önce bir süre oda sıcaklığında bekletilmesi gibi insanların günlük yaşamında sıklıkla uyguladığı süreçler simüle edilmiştir.

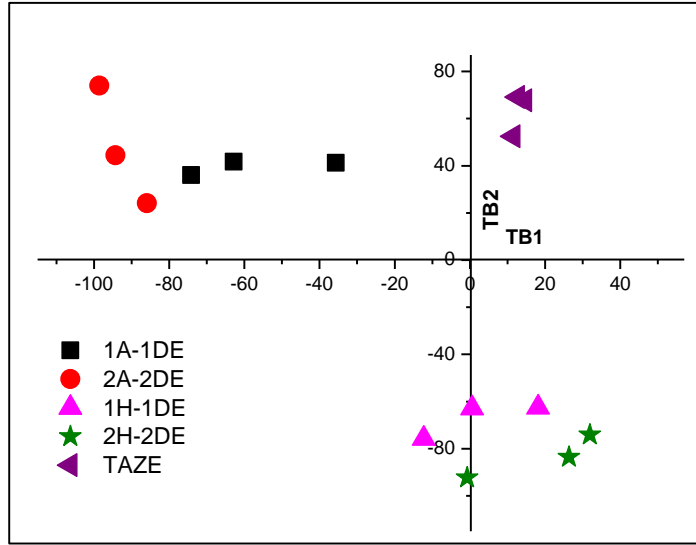
Mevcut çalışmada uygulanan dondurma-eritme işlemleri DEHA içeriği bakımından örnek grupları arasında anlamlı değişikliklere sebep olmuştur. Analiz edilen tavuk yağı örneklerindeki DEHA varlığının, söz konusu molekülün tavuk örneklerinin saklanması için kullanılan buzdolabı poşetlerinden örnek bileşimine migrasyonu ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Şekil 4. 58 f'de aşağıda referans, yukarıda deneysel olmak üzere DEHA molekülüne ait MS/MS spektrumu verilmiştir. Farklı gıda gruplarında DEHA migrasyonu genellikle buzdolabı sıcaklığı koşullarında incelenmiştir. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar dondurma ve dondurma-eritme işlemlerinin paketlenmiş haldeki tavuğa DEHA migrasyonu konusunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.





Şekil 4. 58 Deneysel (yukarıda) ve teorik (aşağıda) MS/MS spektrumları a) 1-Monopalmitin, b) 1-Monostearin, c) 1-Monoolein, d) 11(12)-EET-d11, e) Palmitik amid, f) Di (2-etilhekzil) adipat

Taze tavuk örnekleri ile farklı süre ve sayıdaki dondurma-eritme döngülerine maruz kalmış tavuk örneklerinin Çizelge 4. 20'de verilen metabolomiks verileri kullanılarak grup bazında sınıflandırma başarısının incelenmesi amacıyla PCA analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 4. 59 ile verilmiştir. İlgili skor grafiği PC1 değerlerine karşılık PC2 değerlerinin çizilmesiyle oluşturulmuş olup PCA kümülatif varyansın %39.5'ini, PC2 ise kümülatif varyansın %69.5'ini açıklamaktadır. PCA analizi MetaboAnalyst programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCA analizinde kullanılacak verini ölçeklendirilmesi amacıyla log dönüşüm işlemi uygulanmış ve bu işlem dışında herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır.



Şekil 4. 59 Tavuk örneklerinde metabolomiks verileri kullanılarak yapılan PCA skor grafiği

Şekil 4. 59 incelendiğinde gruplar arasındaki farklılaşmanın dondurma süresinden etkilendiği görülmektedir. Ay bazında dondurulan örnekler haftalık bazda dondurulan örneklerden farklı bir noktada konumlanmıştır. Diğer yandan, söz konusu çalışma kapsamında dondurma-eritme döngü sayısının etkisi tam olarak gözlenememiştir.

Haftalık olarak dondurulan örnekler arasında bir döngü ve iki döngü gruplarının birbirinden az da olsa ayrıldığı görülmekle birlikte net bir gruplaşma söz konusu değildir. Bu durumun çalışma kapsamında incelenen maksimum döngü sayısı etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak yapılacak ileriki çalışmalarda döngü sayısının artırılmasıyla bu parametrenin etkisinin net bir şekilde ortaya konulmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. PCA sonuçlarının genel değerlendirmesi ise metabolomik verilerinin taze örneklerin haftalık ve aylık olarak dondurulup eritilmiş örneklerden ayrılmasına imkân verdiği görülmüştür.

Metabolomik çalışmalarının gıda hilelerinin belirlenmesinde kullanımı çok uzak bir geçmişe dayanmamakta olup literatürde bulunan çok sayıda farklı uygulama deneysel tasarımlardaki standardizasyon eksikliğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte örnek sayısının değişken sayısından fazla olması gerektiği vurgulanmakta ve bu durumda elde edilen sınıflandırma modellerinin daha güvenilir olacağı belirtilmektedir [249]. Metabolik çalışmalarından elde edilen verinin analizinde kullanılacak kemometrik analiz yönteminin seçimi de önemli bir diğer nokta olarak literatürde vurgulanmaktadır. Cubero-Leon ve ark. tarafından yapılan çalışmada organik ve konvansiyonel yöntemlerle üretilen havuçların PCA ile ayrımı mümkün olmazken OPLS-DA ile başarılı bir ayırım gerçekleştirilmiştir. Granato ve ark. tarafından üzüm suyu örnekleriyle yürütülen çalışmada ANOVA ve HCA veri analizleri ile anlamlı istatistiksel sonuçlar elde edilememiş ve aynı yazar tarafından ilerleyen yıllarda HCA yönteminin gıda hileciliği çalışmalarında kullanılmaması tavsiye edilmiştir [250, 251].

Gıda matriksindeki tüm kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonları minimize etmesi nedeniyle dondurarak saklama tekniği güvenilirliği yüksek gıda muhafaza yöntemlerinden bir tanesidir. Et ve et ürünleri için ticari dondurma işleminin -18°C , domestik dondurma işleminin -10°C ve domestik eritme işleminin buzdolabı sıcaklığında ($+4^{\circ}\text{C}$) standart olarak gerçekleştirildiği ve bu standart değerlerin muhafaza ve ileri üretim basamakları boyunca uygulandığı belirtilmektedir [252]. Endüstriyel uygulamaların yanı sıra günlük yaşam pratikleri kapsamında da et ve et ürünleri bir veya daha fazla dondurma-eritme döngüsüne maruz kalabilmektedir. Mevcut çalışma kapsamında Q-TOF LC/MS kullanılarak yapılan analizler sonucunda moleküler düzeyde gerçekleştiği tespit edilen değişiklikler et

ve et ürünlerinde dondurma ve dondurma-eritme işlemlerinin güvenilirliği hakkında bir soru işareti oluşmasına neden olmuştur.

Mevcut tez çalışması kapsamında tavuk örneklerindeki yağışın lipit fazındaki değişikliklerin takibi üzerinden tespit edilmesini amaçlayan detaylı bir çalışma yürütülmüştür. Çalışma sonucunda Raman spektroskopisi ve Q-TOF LC/MS tekniklerinin ortak bulgusu tavuk örneklerine uygulanan dondurma-eritme işlemlerinin lipit oksidasyonu ve lipit hidrolizine neden olduğudur. Raman spektroskopisi ile analiz edilen örnekler hekzan ve Folch ekstraksiyonu olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. Raman spektrumlarındaki değişiklikler hekzan ekstrakte örneklerde net bir şekilde gözlenirken Folch ekstrakte örneklerde değişimin sınırlı olarak gözlenebildiği görülmüştür. Bu durumun Raman spektroskopisi tekniğinin özellikle polar olmayan yapıların analizinde daha verimli olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Folch ekstraksiyonunda hekzana kıyasla polaritesi yüksek çözücülerin kullanımı tavuk örneklerinden polar lipitlerin ekstrakte edilmesini sağlamış olabilir. Bu durum dondurma-eritme döngüleriyle meydana gelen değişimlerin Folch ekstrakte örnekler için Raman spektroskopisi kullanılarak incelenmesini zorlaştırmış olabilir. Yapılan Q-TOF LC/MS analizlerinde ise hekzan ekstraksiyonuyla elde edilmiş yağ örneklerinden polar bir çözücü ile ikincil bir ekstraksiyon yapılmış ve ekstrakte edilen bileşenlerin miktarları analiz edilmiştir. Q-TOF LC/MS analizi sonucunda taze, aylık bazda ve haftalık bazda dondurulup eritilen örnek grupları birbirinden başarıyla ayrılırken döngü sayısının etkisi bu yöntemle takip edilememiştir.

Peroksit değeri (PV) ve tiyobarbiturik asit-reaktif maddeler (TBARS) testleri gıdaların raf ömrü boyunca takip edilen iki temel parametre olarak bilinmektedir. PV, lipit hidroperoksitleri gibi primer lipit oksidasyonu ürünlerinin bir ölçüsü olmakla birlikte oksidasyonun hızlanma basamağında hidroperoksitlerin parçalanma reaksiyonlarına girebilmesi veya diğer ürünlerin ve radikallerin oluşumuyla sonuçlanan ileri reaksiyonlara dâhil olabilmesi sebepleriyle yanıltıcı sonuçlar elde edilmesine neden olabilmektedir [253].

TBARS değeri perokside olmuş çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif parçalanması sonucu oluşan malondialdehit miktarını temsil etmektedir. Birtakım modifiye TBARS testlerinde antioksidan kullanımı önerilse de homojenizasyon, distilasyon, ekstraksiyon ve kaynatma gibi basamaklar oksidasyonu teşvik etmeleri nedeniyle malondialdehit içeriğine kaçınılmaz olarak katkıda bulunmaktadır [254]. Propanal, hekzanal ve pentanal gibi n-3 and n-6 yağ asitlerinin ikicil oksidasyon ürünlerinin kromatografik yöntemler kullanılarak kantifiye edilmesi oksidasyonun belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Öte yandan söz konusu moleküllerde anlamlı seviyedeki değişikliklerin gerçekleşmesi için birkaç ay gibi uzun bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Serbest yağ asidi içeriği bu kapsamda kullanılan bir diğer deneysel uygulama olup lipit hidrolizi hakkında bilgi vermektedir. Bahsi geçen test sonuçlarında dondurarak saklama periyodu sürecinde beklenmeyen veya açıklanamayan birtakım değişikliklerin gözlenmesi nedeniyle alternatif yöntemlere olan ihtiyaç literatürde belirtilmektedir [255, 256]. Mevcut yöntemlerin sahip olduğu dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda dondurma-eritme süreçlerinin karakterizasyonunun lipit analizlerinde önemli bir yere sahip olduğu ve mevcut tez kapsamında yürütülen kapsamlı çalışmanın ilgili literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışması kapsamında gıdaların lipit kompozisyonuna ait parmak izi bilgileri SFS, LIBS ve RS teknikleri kullanılarak elde edilmiş ve bu bilgilerin bazı gıda tağşişlerinin tespitinde kullanılabilme potansiyelleri incelenmiştir. Her bir çalışmada farklı spektroskopik teknik kullanılarak lipit fazında bulunan farklı bileşenlerin takibi sağlanmıştır. Bu sayede lipit fazındaki farklı bileşenlerin farklı spektroskopik tekniklerle takibi yoluyla gıdaların maruz kaldığı tağşiş uygulamalarının başarılı bir şekilde tespit edilebileceği gösterilmiştir. Farklı spektroskopik teknikler ile elde edilen veriler farklı kemometrik veri analizi yöntemleriyle işlenmiş ve bu yöntemler ilgili kalite parametreleri üzerinden gıda tağşişinin tespitindeki başarısı açısından birbiriyle kıyaslanmıştır. Geliştirilen modellere ait kalite parametrelerinden belirleme katsayısı (R^2), bağıl standart sapma (RSD), kalibrasyon, çapraz validasyon ve tahmin modellerinin bağıl hata değerleri (RMSEC, RMSECV, RMSEP), tahmin değerlerinin bağıl hatası (REP), tespit limiti ve tayin limiti değerleri (LOD, LOQ) hesaplanmıştır. Spektroskopik bilgi ve multivariat veri analizi temelinde farklı tağşiş uygulamalarının tespiti için geliştirilen her bir modelin doğruluğu ilgili referans yöntem analizleriyle desteklenmiştir. Yürütülen çalışmalarda elde edilen sonuçlar aşağıda ilgili başlıklar altında maddeler halinde özetlenmiştir.

Tahin Örneklerindeki Tağşişin SFS ile Belirlenmesi

- SFS tekniği kullanılarak tahin örneklerine ayçiçek yağı ilavesiyle yapılan tağşişin belirlenmesine yönelik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu kapsamda toplanan SFS verilerinin kalitatif analizi için PCA, kantitatif analizi için MLR, PCR ve PLSR metotları kullanılmıştır. Buna ek olarak yüksek boyuttaki SFS verilerine uygulanan dalgaboyu seçim modu işlemi sayesinde toplanan veri seti içinde en yüksek model başarısının elde edildiği veri aralığı her bir dalgaboyu aralığı ($\Delta\lambda$) değeri için üç farklı regresyon metoduna özel olarak belirlenmiştir. Dalgaboyu seçim modunun geliştirilen modellerin başarısına olan etkisi gösterilmiştir.
- TY ve AY grubuna ait örneklerin SF spektrumlarında 348-355 nm arasında konumlanan ve yağların tokoferol içeriğiyle ilişkilendirilen bant ortak olarak

gözlenmiştir. SF spektrumlarındaki temel farklılık TY karışımında 266-291 nm aralığında gözlenen ve analiz edilen yağın fenolik madde içeriğinden kaynaklanan bant olmuştur. Majör olarak bu bandın varlığı ile başarılı bir sınıflandırılma gerçekleştirilebilmiştir.

- TY ve AY örneklerinin birbirinden başarılı bir şekilde ayrıldığı PCA modelinde herhangi bir önışlem kullanılmamış, toplam 6 TB ile model kurulmuş, kurulan model çapraz validasyon ile valide edilmiştir. TB1 ve TB2'nin kümülatif varyansı açıklama oranları %81.50 %99.45'dir. Dalgaboyu seçim modu uygulaması sonucunda PCA modelinin kurulmasında $\Delta\lambda=60$ nm'de toplanan verinin gruplar arası ayırma katkısı en büyük veri seti olduğu tespit edilmiştir. PCA analizine ait loadings grafiği incelendiğinde 266-291 nm ile 348-355 nm aralığındaki sırasıyla analiz edilen yağın fenolik madde içeriğine ve tokoferol içeriğine karakteristik olan bantların ayırma en yüksek katkıyı sağladığı tespit edilmiştir.
- Kantitatif analiz amacıyla geliştirilen regresyon modellerinin kurulmasında pek çok farklı önışlem tekniğinin başarısı kıyaslanmıştır. Yapılan detaylı incelemeler sonrasında düşük RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerlerinin elde edilmiş olması ve yüksek varyans açıklama oranlarına ulaşılması gibi sebeplerle kullanılan tüm regresyon tekniklerinde NORM+DETREND önışlemi uygulanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde temel amaç regresyon teknikleri arasındaki farkı ortaya koymak olduğundan kullanılan önışlem etkisinin minimize edilmesi adına başlangıçta PLS analizi üzerinden denenerek başarısının yüksek olduğu tespit edilen NORM+DETREND önışlemi diğer tekniklerde de uygulanmıştır.
- PLSR analizi sonucunda RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri sırasıyla 0.26-0.84, 0.74-1.40 ve 1.24-1.82 aralığında elde edilmiş olup WSM uygulamasıyla bu değerler 1.60-3.41, 2.13-3.65 ve 2.02-2.71 arasında değişmiştir. WSM kullanımının söz konusu hata değerlerini arttırdığı görülmüştür. Benzer şekilde RSD değerleri 0.87 ile 6.71, REP değerleri 13.98 ile 20.64 arasında değişmiştir. WSM uygulandığında ise RSD değerleri 1.81-6.49, REP değerleri 7.0-38.27 arasında değişmiştir. WSM kullanımının REP ve RSD değerleri üzerinde tüm $\Delta\lambda$ değerleri için

genellenebilecek ortak bir etkisi gözlenmemiştir. WSM kullanılan ve kullanılmayan modeller ortak olarak değerlendirildiğinde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla %0.34-3.1 ve %1.14-10.3 arasında değişmiştir.

- MLR analizleri açısından dikkat çeken en önemli sonuç RMSEC değerlerinin sıfırlanmış olması ve bunun aksine WSM uygulanmadığında 20.98-65.20, WSM uygulandığında 25.95-118.14 aralığında değişen oldukça yüksek REP değerlerinin elde edilmiş olmasıdır. Bu durum geliştirilen MLR kalibrasyon modellerinin veri setine aşırı uyum göstermesi ve veri setindeki konsantrasyonla korelatif olmayan bilgilerin de modellenmiş olmasından kaynaklanan over-fitting problemi ile açıklanabilmektedir. MLR sonucunda yüksek REP değerlerine rağmen görece olarak düşük RSD değerlerinin, WSM uygulandığında 3.34-7.11, WSM uygulanmadığında 1.64-4.57, elde edilmiş olması da over-fitting probleminin varlığını kanıtlamıştır. WSM kullanılan ve kullanılmayan modeller için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla %2.61-13.88 ile %8.71-46.28 arasında değişmiştir.
- PCR analizleri sonucunda başlangıçta 1.44-2.28, 1.58-2.58, 1.96-3.59 arasında değişen RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri WSM uygulanması durumunda 3.56-3.96, 3.69-4.04 ve 2.36-3.83 arasında değişmiştir. WSM uygulaması hata değerlerinde artışa neden olarak negatif bir etki göstermiştir. REP değerleri 16.17-27.89 aralığından 12.93-33.55 aralığına geçmiştir. RSD değerleri ise 3.68-7.46 aralığından WSM uygulanması sonucunda 1.53-7.72 aralığına geçmiştir. LOD değerleri %4.20-7.95 aralığından WSM uygulanmasıyla %2.61-13.88 aralığına geçmiştir. LOQ değerleri ise %14.00-26.51 aralığından WSM uygulanmasıyla %8.71-46.28 aralığına geçmiştir. WSM uygulaması LOD ve LOQ değerlerini olumsuz yönde değiştirmiştir. RSD ve REP değerleri üzerinde genellenebilir bir etki göstermemiştir.
- Elde edilen tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde SFS tekniği ve PLSR metodunun kullanımı sonucunda yüksek tekrarlanabilirlik, düşük hata değerleri ve oldukça tatmin edici tespit ve tayin limitine sahip bir

yöntemin geliştirilebileceği ve tahin yağındaki ayçiçek tağışışının başarılı bir şekilde tespit edilebileceği görülmüştür.

- SFS tekniği özellikle bitkisel yağların kompozisyonlarının analizinde ve tağışış belirleme çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Tez kapsamında yürütülen söz konusu çalışma sayesinde yağ asidi kompozisyonu birbirine oldukça benzeyen tahin yağı ve ayçiçek yağının kalitatif ve kantitatif analizinde SFS tekniği ve kemometrik veri analizi yöntemlerinin kullanılabilirliği gösterilmiştir.
- SFS tekniğinin en önemli dezavantajı en uygun $\Delta\lambda$ değerinin belirlenmesi için önceden yapılması gereken optimizasyon çalışmasıdır. Bu noktada tez kapsamında $\Delta\lambda$ optimizasyonu için interval PLS (iPLS) algoritması kullanılmıştır. Bu amaçla literatürde rapor edilen pek çok algoritma bulunmakta ve geliştirilen algoritmaların başarısı günden güne arttırılmaktadır. Tez kapsamında tek bir algoritma denenmiş olup gelecekteki çalışmalarda farklı algoritmaların model başarısına etkisinin incelenmesi planlanmaktadır.

Tereyağı Örneklerindeki Tağışışın LIBS ile Belirlenmesi

- LIBS tekniği kullanılarak tereyağı örneklerine margarin ilavesi yoluyla gerçekleştirilen tağışışın belirlenmesini sağlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Tez çalışmasının bu bölümünde LIBS tekniği ile multivariat veri analizi teknikleri kombine olarak kullanılmıştır. LIBS tekniğinin kullanımı sayesinde tereyağı ve margarin örneklerinin elemental parmak izi spektrumları elde edilmiştir. Geliştirilen kalitatif metodun tereyağı ve margarin örneklerini birbirinden ayırabilme potansiyeli ve geliştirilen kantitatif metodun tereyağı örneklerinde margarin kullanılarak yapılan tağışış tespit edebilme potansiyeli ortaya konmuştur. Referans elemental analiz teknikleri olan CP-MS ve FAAS kullanılarak tereyağı ve margarin örneklerinin elemental kompozisyonları belirlenmiştir.
- Tereyağı ve margarin örneklerinin LIBS spektrumları kullanılarak birbirinden ayrılması amacıyla geliştirilen kalitatif yöntemde veri analiz metodu olarak PCA kullanılmıştır. Geliştirilen PCA modeli 3 TB kullanılarak kurulmuştur. TB1 ve TB2, kümülatif varyansın sırasıyla

%88.76 ve %97.92'sini açıklamıştır. PCA modeline ait loadings grafiği incelendiğinde gruplar arası ayırma majör katkı sağlayan elementlerin Na, Ca ve K; daha az katkıda bulunan diğer elementlerin ise Fe, Mg ve Zn olduğu görülmüştür.

- Tereyağına tağşış amacıyla eklenen margarin miktarının belirlenmesi amacıyla geliştirilen kantitatif metodun veri analizinde PLSR metodu kullanılmıştır. Geliştirilen kalibrasyon ve tahmin modellerinin belirleme katsatısı değerleri sırasıyla $R^2_{kal} = 0.999$ ve $R^2_{pred} = 0.984$ 'tür. Aynı modele ait RMSEC değeri 2.02, RMSEP değeri 3.37, RSD değeri 11.3, REP değeri 13.0'dır. Metodun LOD ve LOQ değerleri sırasıyla %3.9 ve 13.0 olarak bulunmuştur.
- Mevcut elemental analiz yöntemlerine kıyasla LIBS tekniği zararlı kimyasalların kullanımını gerektirmemekte, ekstraksiyon gibi bir örnek hazırlama basamağına ihtiyaç duymamaktadır. Tereyağı ve margarin örneklerine ait LIBS spektrumlarında Na, K, Fe, Ca, Mg ve Mn elementlerine ait bantlardaki sinyal şiddeti farklılıkları söz konusu çalışmanın başarıya ulaşmasında büyük katkıya sahiptir. Öte yandan sinyal şiddetindeki dalgalanmaların minimize edilmesi ve bu yolla standart sapma değerlerinin azaltılabilmesi için yapılması gereken iyileştirmelere hala ihtiyaç bulunmaktadır. Bu kapsamda LIBS sistemiyle alakalı birtakım tasarım bazlı değişikliklerin etkisinin incelenmesinin fayda sağlayacağı düşünölmektedir. Ayrıca tereyağı ve margarin örneklerinde 1 ppm'in altındaki seviyelerde bulunan elementlerin takip edilebilmesi amacıyla mevcut literatürde önerilen inert gaz atmosferi, çift atımlı lazer gibi geliştirilen LIBS temelli metodun hassasiyetini arttıracak alternatif yöntemlerin denenmesi gelecekteki çalışmalar için planlanmaktadır.
- Tereyağında margarin tağşış amacıyla geliştirilen yöntemde kullanılan örneklemin taşıması gereken özellikler büyük öneme sahiptir. Özellikle süt ve süt ürünü gibi örneklerde sütün elde edildiği hayvanın yaşı, cinsi, ırkı, hayvanın laktasyon periyodunun hangi aşamasında olduğu, hayvanın yetiştirildiği iklim ve çevre koşulları, beslenme düzeni gibi özellikler ile ürün üretim süreci, üretim yöntemi, yazlık-kışık üretim gibi pek çok farklı faktör

büyük önem taşımaktadır. Tez çalışması kapsamında mümkün olduğunca fazla varyasyonun analize alınan örneklem içerisine dahil edilebilmesi adına ülkenin farklı şehirlerinde, farklı firmalar tarafından ve farklı tarihlerde üretilmiş tereyağı ve margarin örnekleri kullanılmıştır. Söz konusu etkiler göz önünde bulundurularak hazırlanacak daha kapsamlı bir örneklem ile yöntem başarısının daha net ortaya konabileceği düşünülmektedir. Öte yandan yürütülen çalışma ile elde edilen sonuçlar geliştirilen LIBS temelli bu metodun tereyağında margarin kullanılarak yapılan tağışın belirlenmesinde mevcuttaki elemental analiz yöntemlerine güçlü bir alternatif oluşturan yüksek potansiyele sahip bir metot olduğunu göstermektedir.

Tavuk örneklerindeki tağışın RS ile Belirlenmesi

- Tavuk örneklerine uygulanan dondurma-eritme işlemlerinin neden olduğu değışiklikler ekstrakte edilen lipit fazı üzerinden Raman spektroskopisi ve Q-TOF LCMS kullanılarak takip edilmiştir.
- Yürütülen çalışma sonucunda RS tekniğinin lipit analizlerinde kullanımı sayesinde gıdaya uygulanan dondurma-eritme süreçlerinin neden olduğu değışiklikler hakkında detaylı bilgilerin elde edilebileceği görülmüştür.
- Lipitlere ait Raman spektrumları doymuşluk-doymamışlık oranı, zincir uzunluğu gibi yapısal bilgiler taşımaktadır. Yapılan çalışma sonucunda dondurma-eritme süreçlerinin oksidasyon ve hidroliz gibi pek çok karmaşık reaksiyonun bir arada gerçekleştiği süreçler olduğu görülmüştür. Bu durum karakteristik Raman bantlarında eş zamanlı artış ve azalışlara sebep olarak bant yüksekliklerindeki değışikliklerin tek bir fenomen ile ilişkilendirilmesini zorlaştırmıştır.
- Raman spektroskopisinin lipit analizlerindeki kullanımı uzun bir zaman dilimine yayılan literatüre dayalı olarak incelendiğinde çoğunlukla termal strese sokulan bitkisel yağların Raman spektrumlarının incelenmesi üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Termal stresin sebep olduğu temel reaksiyon termal oksidasyon reaksiyonları olduğundan sinyal şiddetlerinde gözlemlenen değışiklikler genellikle çift bağ sayısının azalması, konjüge dien ve trien oluşumu ile peroksitlerin oluşumu veya

dekompozisyonu süreçleri ile ilişkilendirilmektedir. Tez kapsamında yürütülen çalışmada, dondurma-eritme gibi karmaşık bir süreç bitkisel bir yağ örneği yerine yapısında pek çok enzimi ve membran lipitleri de dahil olmak üzere pek çok farklı lipit alt sınıfını içeren tavuk örnekleri üzerinden incelenmiştir. Bu gibi faktörler Raman spektrumlarındaki değişimlerin yorumlanmasını oldukça karmaşık bir hale getirmiş olsa da mevcut literatüre önemli bir katkı sağlandığı düşünülmektedir.

- Çalışmanın bir diğer önemli çıktısı kullanılan lipit ekstraksiyonu yönteminin karakteristik Raman bantlarında gözlenen değişimler üzerindeki etkisidir. Bu kapsamda örneklerden hekzan ve Folch ekstraksiyonu teknikleriyle lipit fazı ekstrakte edilmiştir. Hekzan ekstraksiyonuyla elde edilen örneklerde dondurma-eritme döngüleriyle gerçekleşen değişimler çoğunlukla mevcut literatür bilgilerinden faydalanılarak açıklanabilmektedir. Öte yandan Folch ekstakte örneklerde çoğunlukla beklenen sinyal değişimleri gözlenmemiştir. Bu durumun Folch ekstraksiyonu yönteminde farklı polaritelere sahip çözücülerin kullanılması sonucunda hekzan ekstraksiyonuna kıyasla daha fazla lipit alt sınıfının ekstrakte edilmiş olması nedeniyle değişimlerin gözlenmesinin zorlaşmış olması ile açıklanabileceği düşünülmektedir.
- Taze örnekler ile haftalık ve aylık bazda bir veya iki kez dondurma-eritme döngüsüne maruz kalmış örneklere ait Raman spektrumlarının PLS-DA yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda gruplar arası başarılı bir ayırım sağlanmıştır. Hekzan ve Folch ekstrakte örneklerin sınıflandırılması için iki ayrı PLS-DA modeli geliştirilmiştir. Bu modellere ait loadings grafikleri incelendiğinde grupların birbirinden ayrılmasına katkı sağlayan Raman spektrumu aralıklarının farklı olduğu görülmüştür. Geliştirilen PLS-DA modelleri çapraz validasyon ile valide edilmiş ve ayrı bir veri seti kullanılarak tahmin modelleri de oluşturulmuştur. Tüm modeller için yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları ile düşük sınıf hatası ve RMSEC, RMSECV ve RMSEP değerleri elde edilmiştir.
- Dondurulup eritilmiş olduğu halde tazeymiş gibi satışı sunulan örneklerin tespiti amacıyla örneklerden ekstrakte edilen lipit fazının Raman

spektrumlarının PLS-DA yöntemiyle analizini temel alan başarılı bir yöntem geliştirilmiştir.

- Çalışma kapsamında yalnızca hekzan ekstraksiyonuyla elde edilen örnekler Q-TOF LCMS ile analiz edilmiştir. Söz konusu örneklerde sinyal şiddeti anlamlı olarak değişen yetmiş beş farklı pik belirlenmiştir. Bunlar içerisinde altı farklı metabolit ilgili veri tabanlarında yapılan eşleştirmeler sonucunda monopalmitin, monostearin, monoolein, 11,12 EET-d11, palmitik amid ve DEHA molekülleri olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan bu moleküllere ait sinyal şiddetlerinin örnek grupları arasındaki farklılaşmasından faydalanılarak taze tavuk örnekleri ile haftalık ve aylık bazda dondurulup-eritilmiş tavuk örneklerinin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında söz konusu moleküllerin dondurulup-eritilmiş tavukların taze tavuklardan ayrılmasında potansiyel biyobelirteçler olarak önerilebileceği düşünülmektedir.
- Tanımlanan metabolitler kısa süreli ve uzun süreli dondurarak saklama ve eritme süreçleri boyunca lipit moleküllerinin dâhil olabileceği reaksiyonlar hakkında ipucu niteliği taşımaktadır. Bu moleküllerin insan sağlığı üzerinde oluşturabileceği negatif etkiler ise çalışmanın bir diğer önemli çıktısını oluşturmaktadır. Bu kapsamda elde edilen sonuçların ilave verilerle desteklenmesi amacıyla farklı dondurma ve eritme parametreleri kullanılarak uygulanacak farklı dondurma ve eritme yöntemlerinin neticesinde elde edilecek sonuçlar kritik önem taşımakta olup çalışmanın gelecekte araştırılması planlanan kısımlarını oluşturmaktadır.
- RS ve Q-TOF LCMS analizlerinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde bazı önemli noktalar tespit edilmiştir. Folch ekstrakte örneklerin Raman spektrumlarında polar özellikli membran lipitlerinden fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamine ait diyagnostik bantların sinyal şiddetlerinin haftalık ve aylık bazda uygulanan dondurma-eritme döngüleriyle arttığı görülmüştür. Q-TOF LCMS analizleri sonucunda ise tavuk dokularında bulunan membran lipitlerinin majör yağ asidi bileşeni olan araşidonik asit üzerinden ilerleyen biyokimyasal reaksiyonlar neticesinde oluşan 11(12)-EET-d11 ve palmitik amid moleküllerinin miktarının dondurma-eritme

döngü sayıları ile korele bir şekilde ve taze örneklerden istatistiksel bakımdan anlamlı olarak değiştiği görülmüştür. Söz konusu bulgu RS tekniğinin polar lipitlerin analizinde kullanılabilme potansiyeline dair önemli bir sonuç olarak değerlendirilmektedir. Fakat bu bulgunun ilave bazı deneylerle desteklenmesi, membran fosfolipitlerine ait ticari standartların Raman spektrumlarının elde edilmesi ve mevcut spektrumlarla karşılaştırılması aracılığıyla kuvvetlendirilmesi gerekmektedir. Mevcut tez çalışması kapsamında elde edilen veriler ve ilgili literatür göz önünde bulundurulduğunda özellikle gıda örneğine zarar vermeden, laboratuvar dışında ve uzman olmayan kişiler tarafından yapılacak analizlere imkan veren yöntemlerin geliştirilmesinin gelecek nesil tüketicilerinin taleplerinin karşılanmasında büyük önem taşıdığı sonucuna ulaşılmaktadır. Bu kapsamda üretilecek yeni gıda analizi yöntemlerinin gıda bütünlüğünün sağlanmasında büyük öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Gıda analizlerinde kullanılan geleneksel yöntemler genellikle insan ve çevre için zararlı olabilecek bazı çözücü ve solventlerin kullanımını gerektirmekte olup zaman alıcı, uzman becerisi gerektiren ve pahalı laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duyan prosedürlerin uygulanmasını zorunlu kılan tekniklerdir. Geleneksel metotlar otomatik kontrol bileşenleri ile eş zamanlı kullanım imkanı sunmadıklarından proses kontrol süreçlerine entegre edilmeleri mümkün olamamaktadır. Bu sebeple örneğin direkt analizine imkan sağlayan alternatif metodolojiler araştırılmaktadır. Özellikle IR ve Raman spektroskopisi gibi titreşimsel teknikler ve bunların kemometrik veri analizleriyle birleştirilmesi kalite kontrol analizlerinde hızlı bir analiz yöntemi potansiyeli sunmaktadır. Son yıllarda geliştirilen taşınabilir Raman ve NIR sistemleri de bu potansiyeli ve kullanım alanlarını yüksek oranda arttırmaktadır. Tez çalışması kapsamında üç farklı yaygın gıda taşıyıcısının tespitine yönelik olarak farklı spektroskopik tekniklerin ve farklı kemometrik veri analizi yöntemlerinin avantajlarını kullanan, düşük hata oranlarına, yüksek tespit ve tayin limiti değerlerine sahip metotlar geliştirilmiştir. Geliştirilen metotların avantajları ve limitasyonları ortaya konmuş, gelecekte araştırma konusu olma potansiyelleri taşıyan noktalar vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. R.E. Timms, Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats, *Journal of Dairy Research*, 47: 3 (2009) 295-303.
2. F.B. Padley and R.E. Timms, The determination of cocoa butter equivalents in chocolate, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 57: 9 (1980) 286-293.
3. J.M.N. Marikkar, H.M. Ghazali, Y.B. Che Man, T.S.G. Peiris and O.M. Lai, Distinguishing lard from other animal fats in admixtures of some vegetable oils using liquid chromatographic data coupled with multivariate data analysis, *Food Chemistry*, 91: 1 (2005) 5-14.
4. E. Salivaras and A.R. McCurdy, Detection of olive oil adulteration with canola oil from triacylglycerol analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69: 9 (1992) 935-938.
5. M. Tsimidou, R. Macrae and I. Wilson, Authentication of virgin olive oils using principal component analysis of triglyceride and fatty acid profiles: Part 2—Detection of adulteration with other vegetable oils, *Food Chemistry*, 25: 4 (1987) 251-258.
6. M.L. Ruiz del Castillo, M.d.M. Caja, M. Herraiz and G.P. Blanch, Rapid Recognition of Olive Oil Adulterated with Hazelnut Oil by Direct Analysis of the Enantiomeric Composition of Filbertone, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 12 (1998) 5128-5131.
7. L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada and M. Juárez, Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74: 2 (1997) 131-135.
8. S. Franke, K. Fröhlich, S. Werner, V. Böhm and F. Schöne, Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112: 10 (2010) 1122-1129.
9. S.B. Engelsen, Explorative spectrometric evaluations of frying oil deterioration, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74: 12 (1997) 1495.
10. M.I. El-Gharbawi, Chemical and physicochemical changes in lipids and other constituents of freeze-dried raw beef during storage under modified atmospheres, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25: (1965) 7191.
11. I. Sanchez-Alonso, P. Carmona and M. Careche, Vibrational spectroscopic analysis of hake (*Merluccius merluccius* L.) lipids during frozen storage, *Food Chem*, 132: 1 (2012) 160-7.

12. E. Sikorska, I.V. Khmelinskii, M. Sikorski, F. Caponio, M.T. Bilancia, A. Pasqualone and T. Gomes, Fluorescence spectroscopy in monitoring of extra virgin olive oil during storage, *International Journal of Food Science & Technology*, 43: 1 (2008) 52-61.
13. F.Y. Iskander, Determination of seventeen elements in edible oils and margarine by instrumental neutron activation analysis, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70: 8 (1993) 803-805.
14. D. Mendil, O.D. Uluozlu, M. Tuzen and M. Soylak, Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry, *J Hazard Mater*, 165: 1-3 (2009) 724-8.
15. C.T. Elliott, Food Integrity and Traceability. Centre for ASSured, SafE and Traceable Food (ASSET), *Trends in Food Science & Technology*, 28: 2 (2012) 61.
16. G. Yeşilören, Ekşi, A., Gıda Gerçekliği ve Kontrol Yöntemleri, *Gıda*, 39: 5 (2014) 315-322.
17. *Gıda Güvenliği ve Kalitesinin Denetimi ve Kontrolüne Dair Yönetmelik*, in 27009. T.v.K. Bakanlığı, Editor. 2008, Resmi Gazete.
18. FSAI, *Food Safety Authority of Ireland FSAI survey finds horse DNA in some beef burger products (2013)*. 2014.
19. C. Elliott, *Elliott Review into the Integrity and Assurance of Food Supply Networks – Final Report A National Food Crime Prevention Framework (July 2014)*. 2014.
20. E. Comission. *Food Fraud*. 2017 1 Şubat 2019]; Available from: https://ec.europa.eu/food/safety/food-fraud_en.
21. E.C. Joint Research Centre, *Factsheet-Fipronil in eggs*. 2018.
22. J. Spink and D.C. Moyer, Defining the public health threat of food fraud: 1750-3841 (Electronic).
23. C.M. Gossner, P. Schlundt J Fau - Ben Embarek, S. Ben Embarek P Fau - Hird, D. Hird S Fau - Lo-Fo-Wong, J.J.O. Lo-Fo-Wong D Fau - Beltran, K.N. Beltran Jj Fau - Teoh, A. Teoh Kn Fau - Tritscher and A. Tritscher, The melamine incident: implications for international food and feed safety: 1552-9924 (Electronic).
24. J.C. Moore, Lipp, M., Griffiths, Preventing the adulteration of food protein, *Food Technology*, 65: 2 (2011) 46-50.
25. J.C. Moore, J.W. DeVries, M. Lipp, J.C. Griffiths and D.R. Abernethy, Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 4 (2010) 330-357.
26. J. Spink, The challenge of intellectual property enforcement for agriculture technology transfers, additives, raw materials, and finished goods against product fraud and counterfeiters, *Journal of Intellectual Property Rights*, 16: 2 (2011).

27. J.C. Moore, M. Spink J Fau - Lipp and M. Lipp, Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010: 1750-3841 (Electronic).
28. *Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Hileli Ürünler İfşa Listesi*. T.C.T.v.O. Bakanlığı, Editor. 2018.
29. J. Riedl, S. Esslinger and C. Fauhl-Hassek, Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication, *Analytica Chimica Acta*, 885: (2015) 17-32.
30. D.I. Ellis, W.B. Brewster VI Fau - Dunn, J.W. Dunn Wb Fau - Allwood, A.P. Allwood Jw Fau - Golovanov, R. Golovanov Ap Fau - Goodacre and R. Goodacre, Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination: 1460-4744 (Electronic).
31. S.S. Nielsen, *Food Analysis*, Introductory Practical Biochemistry, ed. S.K. Shawney, Singh, R., Purdue University, Wesr Lafayette, Indiana, Narosha Publishing House Pvt. Ltd., 2001.
32. M.F. L'Annunziata, Electromagnetic Radiation, Radioactivity: (2016) 269-302.
33. F. Kumsar, *İki ve Çok Atomlu Moleküllerin Dönme-Titreşim Enerjilerinin Yaklaşım Yöntemleriyle İncelenmesi*, in *Kimya Anabilim Dalı*. 2015, Hitit Üniversitesi: Çorum. p. 83.
34. S. Nakai and Y. Horimoto, Fluorescence Spectroscopy in Food Analysis, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: (2006).
35. B.H. Stuart, *Spectral Analysis*, Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, ed. D.J. Ando, John Wiley and Sons Ltd., 2005.
36. F.R. van de Voort, A.A. Ismail and J. Sedman, A rapid, automated method for the determination of cis and trans content of fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72: 8 (1995) 873-880.
37. J.O. Caceres, S. Moncayo, J.D. Rosales, F.J. de Villena, F.C. Alvira and G.M. Bilmes, Application of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and neural networks to olive oils analysis, *Appl Spectrosc*, 67: 9 (2013) 1064-72.
38. C.V. Raman and K.S. Krishnan, A New Type of Secondary Radiation, *Nature*, 121: (1928) 501.
39. P.R. Carey, *CHAPTER 2 - Principles of Raman Spectroscopy*, in *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*, P.R. Carey, Editor, Academic Press, 11-47, 1982.
40. E.C. Le Ru and P.G. Etchegoin, *Chapter 2 - Raman spectroscopy and related optical techniques*, in *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, E.C. Le Ru and P.G. Etchegoin, Editors, Elsevier, Amsterdam, 29-120, 2009.

41. B. Schrader, H.H. Klump, K. Schenzel and H. Schulz, Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants, *Journal of Molecular Structure*, 509: 1 (**1999**) 201-212.
42. H. Schulz, *Chapter 5 - Spectroscopic Technique: Raman Spectroscopy*, in *Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition)*, D.-W. Sun, Editor, Academic Press, 139-191, **2018**.
43. Y. Ozaki, R. Cho, K. Ikegaya, S. Muraishi and K. Kawauchi, Potential of Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy in Food Analysis, *Applied Spectroscopy*, 46: 10 (**1992**) 1503-1507.
44. B.J. Marquardt and J.P. Wold, Raman analysis of fish: a potential method for rapid quality screening, *LWT - Food Science and Technology*, 37: 1 (**2004**) 1-8.
45. F.H. Johnson, *The luminescence of biological systems*, Amer. Assoc. Adv. Sci, Washington, D.C.: (**1955**).
46. A. Weissler, *Fluorometric analysis, Standard methods of chemical analysis* ed. D. Van, Nostrand Co., Princeton, N.J., **1970**.
47. T.T. Ndou and I.M. Warner, Applications of multidimensional absorption and luminescence spectroscopies in analytical chemistry, *Chemical Reviews*, 91: 4 (**1991**) 493-507.
48. J.B.F. Lloyd, Synchronized Excitation of Fluorescence Emission Spectra, *Nature Physical Science*, 231: (**1971**) 64.
49. T. Vo-Dinh, Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry, *Analytical Chemistry*, 50: 3 (**1978**) 396-401.
50. G.G. Guilbault, *Fluorescence, theory, instrumentation and practice*, New York, Marcel Dekker, Inc., **1967**.
51. L.C. F. Brech, Optical micro-emission stimulated by a ruby maser,, *Applied Spectroscopy*, 16: (**1962**) 59.
52. L.J.R. D.A. Cremers, *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, 2nd edition ed, Oxford, UK, John Wiley & Sons Ltd, **2013**.
53. M. Sabsabi and P. Cielo, Quantitative Analysis of Aluminum Alloys by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Plasma Characterization, *Applied Spectroscopy*, 49: 4 (**1995**) 499-507.
54. C.R. Bhatt, C.T. Ghany, F.Y. Yueh, J.P. Singh and D.L. McIntyre, *Chapter 12 - Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Advanced Analytical Technique*, United States, **2017**.
55. M. Markiewicz-Keszycka, X. Cama-Moncunill, M.P. Casado-Gavaldà, Y. Dixit, R. Cama-Moncunill, P.J. Cullen and C. Sullivan, Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 65: (**2017**) 80-93.
56. F. Anabitarte, A. Cobo and J.M. Lopez-Higuera, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals, Applications, and Challenges, *ISRN Spectroscopy*, 2012: (**2012**) 12.

57. M. Corsi, G. Cristoforetti, M. Hidalgo, S. Legnaioli, V. Palleschi, A. Salvetti, E. Tognoni and C. Vallebona, Double pulse, calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy: A new technique for in situ standard-less analysis of polluted soils, *Applied Geochemistry*, 21: 5 (**2006**) 748-755.
58. S.N. Thakur, Singh, J. P., *Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Basic Physics and Instrumentation: Fundamentals of LIBS*, 1st Edition ed, ed. J.P. Singh, Thakur, S. N., Elsevier **2007**
59. J.M. Vadillo and J.J. Laserna, Laser-induced plasma spectrometry: truly a surface analytical tool, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 59: 2 (**2004**) 147-161.
60. J.A. Aguilera, C. Aragón and F. Peñalba, Plasma shielding effect in laser ablation of metallic samples and its influence on LIBS analysis, *Applied Surface Science*, 127-129: (**1998**) 309-314.
61. W. Lei, *Temporal and spatial characteristics of laser-induced plasma on organic materials and quantitative analysis of the contained inorganic elements*, **2012**.
62. R.E. Russo, Mao, X. L., Yoo, J. H., Gonzalez, J. J., *Laser Induced Breakdown Spectroscopy: Basic Physics and Instrumentation, Laser Ablation*, ed. J.P. Singh, Thakur, S. N., **2007**.
63. G. Galbács, A critical review of recent progress in analytical laser-induced breakdown spectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407: 25 (**2015**) 7537-7562.
64. D. Santos, L.C. Nunes, G.G.A. de Carvalho, M.d.S. Gomes, P.F. de Souza, F.d.O. Leme, L.G.C. dos Santos and F.J. Krug, Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 71-72: (**2012**) 3-13.
65. V.N. Rai, Thakur, S. N., *Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Basic Physics and Instrumentation: Physics of Plasma in LIBS*, ed. J.P. Singh, Thakur, S. N., Elsevier **2007**.
66. W.W. Christie, *Lipid Analysis*, New York, Pergamon Press, **1982**.
67. M. Kates, *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids*, New York, Elsevier, **1986**.
68. S.F. O'Keefe, *Nomenclature and Classification of Lipids*, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, C.C.A.a.D.B. Min, Editor, Marcel Dekker, Inc., New York, 20-59, **2002**.
69. J. Folch, M. Lees and G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J Biol Chem*, 226: 1 (**1957**) 497-509.
70. E.G. Bligh and W.J. Dyer, A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 8 (**1959**) 911-917.

71. S.G. M. Carmen Ramirez-Tortosa, Jose L. Quiles, *Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil*, Olive Oil and Health, ed. M.C.R.-T.a.P.Y. Joules L. Quiles, Cambridge, USA, CABI, 381, **2006**.
72. M.M.I. Nielsen and Å. Hansen, Rapid High-Performance Liquid Chromatography Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals, *Cereal Chemistry*, 85: 2 (**2008**) 248-251.
73. G. Panfili, A. Fratianni and M. Irano, Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals, *J Agric Food Chem*, 51: 14 (**2003**) 3940-4.
74. H. Ali, M. Saleem, M.R. Anser, S. Khan, R. Ullah and M. Bilal, Validation of Fluorescence Spectroscopy to Detect Adulteration of Edible Oil in Extra Virgin Olive Oil (EVOO) by Applying Chemometrics, *Appl Spectrosc*, 72: 9 (**2018**) 1371-1379.
75. A. Dankowska, M. Małeczka and W. Kowalewski, Discrimination of edible olive oils by means of synchronous fluorescence spectroscopy with multivariate data analysis, *Grasas y Aceites*; Vol 64, No 4 (2013): (**2013**).
76. Y. Li, Y. Xiong and S. Min, Data fusion strategy in quantitative analysis of spectroscopy relevant to olive oil adulteration, *Vibrational Spectroscopy*, 101: (**2019**) 20-27.
77. A. Dankowska, Data fusion of fluorescence and UV spectroscopies improves the detection of cocoa butter adulteration, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119: 8 (**2017**) 1600268.
78. F. Mabood, R. Boqué, R. Folcarelli, O. Busto, F. Jabeen, A. Al-Harrasi and J. Hussain, The effect of thermal treatment on the enhancement of detection of adulteration in extra virgin olive oils by synchronous fluorescence spectroscopy and chemometric analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 161: (**2016**) 83-87.
79. F. Mabood, R. Boqué, R. Folcarelli, O. Busto, A. Al-Harrasi and J. Hussain, Thermal oxidation process accelerates degradation of the olive oil mixed with sunflower oil and enables its discrimination using synchronous fluorescence spectroscopy and chemometric analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 143: (**2015**) 298-303.
80. J. Tan, R. Li, Z.-T. Jiang, S.-H. Tang, Y. Wang, M. Shi, Y.-Q. Xiao, B. Jia, T.-X. Lu and H. Wang, Synchronous front-face fluorescence spectroscopy for authentication of the adulteration of edible vegetable oil with refined used frying oil, *Food Chemistry*, 217: (**2017**) 274-280.
81. E. Guzmán, V. Baeten, J.A.F. Pierna and J.A. García-Mesa, Evaluation of the overall quality of olive oil using fluorescence spectroscopy, *Food Chemistry*, 173: (**2015**) 927-934.
82. B. Egelanddal, G. Dingstad, G. Tøgersen, F. Lundby and Ø. Langsrud, Autofluorescence quantifies collagen in sausage batters with a large variation in myoglobin content, *Meat Science*, 69: 1 (**2005**) 35-46.

83. I. Allais, C. Viaud, A. Pierre and É. Dufour, A rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of the texture of meat emulsions and frankfurters, *Meat Science*, 67: 2 (2004) 219-229.
84. A. Aït-Kaddour, M. Loudiyi, A. Ferlay and D. Gruffat, Performance of fluorescence spectroscopy for beef meat authentication: Effect of excitation mode and discriminant algorithms, *Meat Science*, 137: (2018) 58-66.
85. A. Sahar, U.u. Rahman, A. Kondjoyan, S. Portanguen and E. Dufour, Monitoring of thermal changes in meat by synchronous fluorescence spectroscopy, *Journal of Food Engineering*, 168: (2016) 160-165.
86. É. Dufour, J.P. Frencia and E. Kane, Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness, *Food Research International*, 36: 5 (2003) 415-423.
87. Q. Liao, T. Suzuki, Y. Shirataki, M. Kuramoto and N. Kondo, Freshness related fluorescent compound changes in Japanese dace fish (*Tribolodon hakonensis*) eye fluid during storage, *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 11: 3 (2018) 95-100.
88. R. Karoui, A. Hassoun and P. Ethuin, Front face fluorescence spectroscopy enables rapid differentiation of fresh and frozen-thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets, *Journal of Food Engineering*, 202: (2017) 89-98.
89. E. Olsen, A. Veberg, G. Vogt, O. Tomic, B. Kirkhus, D. Ekeberg and A. Nilsson, Analysis of Early Lipid Oxidation in Salmon Pâté with Cod Liver Oil and Antioxidants, *Journal of Food Science*, 71: 3 (2006) S284-S292.
90. D. Airado-Rodríguez, M. Høy, J. Skaret and J.P. Wold, From multispectral imaging of autofluorescence to chemical and sensory images of lipid oxidation in cod caviar paste, *Talanta*, 122: (2014) 70-79.
91. S. Durakli Velioglu, E. Ercioglu and I.H. Boyaci, Rapid discrimination between buffalo and cow milk and detection of adulteration of buffalo milk with cow milk using synchronous fluorescence spectroscopy in combination with multivariate methods, *Journal of Dairy Research*, 84: 2 (2017) 214-219.
92. H. Liu, D.H. Han and S.P. Wang, [Potentiality of synchronous fluorescence technology for determination of reconstituted milk adulteration in fresh milk], *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 34: 10 (2014) 2685-9.
93. D.O. Genis, G. Bilge, B. Sezer, S. Durna and I.H. Boyaci, Identification of cow, buffalo, goat and ewe milk species in fermented dairy products using synchronous fluorescence spectroscopy, *Food Chemistry*, 284: (2019) 60-66.
94. A. Dankowska, M. Małecka and W. Kowalewski, Detection of plant oil addition to cheese by synchronous fluorescence spectroscopy, *Dairy Science & Technology*, 95: 4 (2015) 413-424.
95. A. Dankowska, M. Małecka and W. Kowalewski, Application of synchronous fluorescence spectroscopy with multivariate data analysis for

- determination of butter adulteration, *International Journal of Food Science & Technology*, 49: 12 (2014) 2628-2634.
96. M.S. Cheri and S.H. Tavassoli, Quantitative analysis of toxic metals lead and cadmium in water jet by laser-induced breakdown spectroscopy, *Applied Optics*, 50: 9 (2011) 1227-1233.
 97. X. Fang and S.R. Ahmad, Sample presentation considerations in laser-induced breakdown spectroscopy in aqueous solution, *Appl Spectrosc*, 61: 9 (2007) 1021-4.
 98. E.M. Cahoon and J.R. Almirall, Quantitative Analysis of Liquids from Aerosols and Microdrops Using Laser Induced Breakdown Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 84: 5 (2012) 2239-2244.
 99. A. De Giacomo, M. Dell'Aglio, A. Casavola, G. Colonna, O. De Pascale and M. Capitelli, Elemental chemical analysis of submerged targets by double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 2 (2006) 303-311.
 100. P. Yaroshchuk, R.J.S. Morrison, D. Body and B.L. Chadwick, Quantitative determination of wear metals in engine oils using LIBS: The use of paper substrates and a comparison between single- and double-pulse LIBS, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60: 11 (2005) 1482-1485.
 101. J.O. Cáceres, J. Tornero López, H.H. Telle and A. González Ureña, Quantitative analysis of trace metal ions in ice using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56: 6 (2001) 831-838.
 102. H. Sobral, R. Sanginés and A. Trujillo-Vázquez, Detection of trace elements in ice and water by laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 78: (2012) 62-66.
 103. D. Alamelu, A. Sarkar and S.K. Aggarwal, Laser-induced breakdown spectroscopy for simultaneous determination of Sm, Eu and Gd in aqueous solution, *Talanta*, 77: 1 (2008) 256-261.
 104. D.M. Díaz Pace, C.A. D'Angelo, D. Bertuccelli and G. Bertuccelli, Analysis of heavy metals in liquids using Laser Induced Breakdown Spectroscopy by liquid-to-solid matrix conversion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61: 8 (2006) 929-933.
 105. X. Wang, Y. Wei, Q. Lin, J. Zhang and Y. Duan, Simple, Fast Matrix Conversion and Membrane Separation Method for Ultrasensitive Metal Detection in Aqueous Samples by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 87: 11 (2015) 5577-5583.
 106. S. Moncayo, S. Manzoor, J.D. Rosales, J. Anzano and J.O. Cáceres, Qualitative and quantitative analysis of milk for the detection of adulteration by Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), *Food Chemistry*, 232: (2017) 322-328.

107. M.A. Gondal, T. Hussain, Z.H. Yamani and M.A. Baig, Detection of heavy metals in Arabian crude oil residue using laser induced breakdown spectroscopy, *Talanta*, 69: 5 (**2006**) 1072-1078.
108. Y.G. Mbesse Kongbonga, H. Ghalila, M.B. Onana and Z. Ben Lakhdar, Classification of vegetable oils based on their concentration of saturated fatty acids using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS), *Food Chem*, 147: (**2014**) 327-31.
109. M.-B.S. Andersen, J. Frydenvang, P. Henckel and Å. Rinnan, The potential of laser-induced breakdown spectroscopy for industrial at-line monitoring of calcium content in comminuted poultry meat, *Food Control*, 64: (**2016**) 226-233.
110. G. Bilge, B. Sezer, K.E. Eseller, H. Berberoglu, A. Topcu and I.H. Boyaci, Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced breakdown spectroscopy, *Food Chem*, 212: (**2016**) 183-8.
111. M.P. Casado-Gavalda, Y. Dixit, D. Geulen, R. Cama-Moncunill, X. Cama-Moncunill, M. Markiewicz-Keszycka, P.J. Cullen and C. Sullivan, Quantification of copper content with laser induced breakdown spectroscopy as a potential indicator of offal adulteration in beef, *Talanta*, 169: (**2017**) 123-129.
112. G. Bilge, İ.H. Boyacı, K.E. Eseller, U. Tamer and S. Çakır, Analysis of bakery products by laser-induced breakdown spectroscopy, *Food Chemistry*, 181: (**2015**) 186-190.
113. G. Bilge, B. Sezer, K.E. Eseller, H. Berberoglu, H. Koksel and I.H. Boyaci, Ash analysis of flour sample by using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 124: (**2016**) 74-78.
114. L.C. Peruchi, L.C. Nunes, G.G.A. de Carvalho, M.B.B. Guerra, E. de Almeida, I.A. Rufini, D. Santos and F.J. Krug, Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 100: (**2014**) 129-136.
115. A.O. Mehder, Y.B. Habibullah, M.A. Gondal and U. Baig, Qualitative and quantitative spectro-chemical analysis of dates using UV-pulsed laser induced breakdown spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*, 155: (**2016**) 124-32.
116. Y. Liu, L. Gigant, M. Baudalet and M. Richardson, Correlation between laser-induced breakdown spectroscopy signal and moisture content, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 73: (**2012**) 71-74.
117. S. Moncayo, J.D. Rosales, R. Izquierdo-Hornillos, J. Anzano and J.O. Caceres, Classification of red wine based on its protected designation of origin (PDO) using Laser-induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), *Talanta*, 158: (**2016**) 185-191.
118. S. Beldjilali, D. Borivent, L. Mercadier, E. Mothe, G. Clair and J. Hermann, Evaluation of minor element concentrations in potatoes using laser-

- induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 65: 8 (2010) 727-733.
119. H. Hu, L. Huang, M. Liu, T. Chen, P. Yang and M. Yao, Nondestructive Determination of Cu Residue in Orange Peel by Laser Induced Breakdown Spectroscopy, *Plasma Science and Technology*, 17: 8 (2015) 711.
 120. F. Ma and D. Dong, A Measurement Method on Pesticide Residues of Apple Surface Based on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, *Food Analytical Methods*, 7: 9 (2014) 1858-1865.
 121. G. Kim, J. Kwak, J. Choi and K. Park, Detection of Nutrient Elements and Contamination by Pesticides in Spinach and Rice Samples Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 3 (2012) 718-724.
 122. M. Peeran, Srinivasamurthy, K. G. *Comparison of Raman and IR Spectroscopy*. 2005 [cited 2019 26.04.2019]; Available from: <http://www.chemvista.org/ramanIR4.html>.
 123. G. Herzberg, *Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*, New York, D. Van Nostrand Company, 1945.
 124. F.R. Van de Voort, Sedman, J., FTIR spectroscopy: The next generation of oil analysis methodologies?, *Inform*, 11: (2000) 614–620.
 125. J. Sedman, Ismail, A. A., Nicodemo, A., Kubow, S., Van de Voort, F., *Application of FTIR/ATR differential spectroscopy for monitoring oil oxidation and antioxidant efficiency*, in *Natural Antioxidants: Chemistry, Health, and Applications* F. Shahidi, Editor, AOCS Press, Champaign, IL, 358–378, 1996.
 126. B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Díaz and M.J. Ayora-Cañada, Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy, *Chemistry and Physics of Lipids*, 134: 2 (2005) 173-182.
 127. M. Motoyama, *Structure and phase characterization of triacylglycerols by Raman spectroscopy*, in *Animal Products Research Division, NARO Institute of Livestock and Grassland Science*. 2011, The University of Tokyo: Tsukuba, Japan. p. 19-68.
 128. S. Bresson, M.E. Marssi and B. Khelifa, Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides, *Chemistry and Physics of Lipids*, 134: 2 (2005) 119-129.
 129. E. Da Silva and D. Rousseau, Molecular order and thermodynamics of the solid–liquid transition in triglycerides via Raman spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10: 31 (2008) 4606-4613.
 130. H. Sadeghi-Jorabchi, R.H. Wilson, P.S. Belton, J.D. Edwards-Webb and D.T. Coxon, Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 47: 9 (1991) 1449-1458.
 131. G.F. Bailey and R.J. Horvat, Raman spectroscopic analysis of the cis/trans isomer composition of edible vegetable oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 49: 8 (1972) 494-498.

132. J.R. Beattie, S.E.J. Bell and B.W. Moss, A critical evaluation of Raman spectroscopy for the analysis of lipids: Fatty acid methyl esters, *Lipids*, 39: 5 (2004) 407-419.
133. M.-Q. Zou, X.-F. Zhang, X.-H. Qi, H.-L. Ma, Y. Dong, C.-W. Liu, X. Guo and H. Wang, Rapid Authentication of Olive Oil Adulteration by Raman Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 14 (2009) 6001-6006.
134. H. Yang, J. Irudayaraj and M.M. Paradkar, Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy, *Food Chemistry*, 93: 1 (2005) 25-32.
135. V. Baeten, P. Hourant, M.T. Morales and R. Aparicio, Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 7 (1998) 2638-2646.
136. R.J. Beattie, S.J. Bell, L.J. Farmer, B.W. Moss and D. Patterson, Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside, *Meat Sci*, 66: 4 (2004) 903-13.
137. J.R. Beattie, S.E.J. Bell, C. Borggaard, A. Fearon and B.W. Moss, Prediction of adipose tissue composition using raman spectroscopy: Average properties and individual fatty acids, *Lipids*, 41: 3 (2006) 287-294.
138. A.M. Herrero, P. Carmona and M. Careche, Raman spectroscopic study of structural changes in Hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle proteins during frozen storage, *J Agric Food Chem*, 52: 8 (2004) 2147-53.
139. A.A. Argyri, R.M. Jarvis, D. Wedge, Y. Xu, E.Z. Panagou, R. Goodacre and G.-J.E. Nychas, A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage, *Food Control*, 29: 2 (2013) 461-470.
140. B. Özbalci, İ.H. Boyaci, A. Topcu, C. Kadılar and U. Tamer, Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks, *Food Chemistry*, 136: 3 (2013) 1444-1452.
141. K. Ilaslan, İ.H. Boyaci and A. Topcu, Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy, *Food Control*, 48: (2015) 56-61.
142. İ.H. Boyaci, R.S. Uysal, T. Temiz, E.G. Shendi, R.J. Yadegari, M.M. Rishkan, H.M. Velioglu, U. Tamer, D.S. Ozay and H. Vural, A rapid method for determination of the origin of meat and meat products based on the extracted fat spectra by using of Raman spectroscopy and chemometric method, *European Food Research and Technology*, 238: 5 (2014) 845-852.
143. İ.H. Boyaci, H.E. Genis, B. Guven, U. Tamer and N. Alper, A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, 43: 8 (2012) 1171-1176.

144. R.S. Uysal, E.A. Soykut, I.H. Boyaci and A. Topcu, Monitoring multiple components in vinegar fermentation using Raman spectroscopy, *Food Chem*, 141: 4 (2013) 4333-43.
145. H.M. Velioglu, H.T. Temiz and I.H. Boyaci, Differentiation of fresh and frozen-thawed fish samples using Raman spectroscopy coupled with chemometric analysis, *Food Chem*, 172: (2015) 283-90.
146. S. Durakli Velioglu, H.T. Temiz, E. Ercioglu, H.M. Velioglu, A. Topcu and I.H. Boyaci, Use of Raman spectroscopy for determining erucic acid content in canola oil, *Food Chemistry*, 221: (2017) 87-90.
147. S.D. Velioglu, E. Ercioglu, H.T. Temiz, H.M. Velioglu, A. Topcu and I.H. Boyaci, Raman Spectroscopic Barcode Use for Differentiation of Vegetable Oils and Determination of Their Major Fatty Acid Composition, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93: 5 (2016) 627-635.
148. D. Üçüncüoğlu, K. İlaslan, İ.H. Boyacı and D.S. Özay, Rapid detection of fat adulteration in bakery products using Raman and near-infrared spectroscopies, *European Food Research and Technology*, 237: 5 (2013) 703-710.
149. N.N. Yazgan Karacaglar, T. Bulat, I.H. Boyaci and A. Topcu, Raman spectroscopy coupled with chemometric methods for the discrimination of foreign fats and oils in cream and yogurt, *Journal of Food and Drug Analysis*, 27: 1 (2019) 101-110.
150. J.N. Miller and J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson/Prentice Hall, 2005.
151. A.F.M. Alkarkhi and W.A.A. Alqaraghuli, *Chapter 8 - Principal Components Analysis*, in *Easy Statistics for Food Science with R*, A.F.M. Alkarkhi and W.A.A. Alqaraghuli, Editors, Academic Press, 125-141, 2019.
152. P. Geladi and B.R. Kowalski, Partial least-squares regression: a tutorial, *Analytica Chimica Acta*, 185: (1986) 1-17.
153. S. Wold, M. Sjöström and L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58: 2 (2001) 109-130.
154. R.G. Brereton and G.R. Lloyd, Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away, *Journal of Chemometrics*, 28: 4 (2014) 213-225.
155. N.S. Software, *Principal Components Regression*
156. H. Abdi, Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression), *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2: 1 (2010) 97-106.
157. E. Szymanska, M.J. Markuszewski, X. Capron, A.M. van Nederkassel, Y. Vander Heyden, M. Markuszewski, K. Krajka and R. Kaliszan, Evaluation of different warping methods for the analysis of CE profiles of urinary nucleosides, *Electrophoresis*, 28: 16 (2007) 2861-73.

158. M. Brown, W.B. Dunn, D.I. Ellis, R. Goodacre, J. Handl, J.D. Knowles, S. O'Hagan, I. Spasić and D.B. Kell, A metabolome pipeline: from concept to data to knowledge, *Metabolomics*, 1: 1 (**2005**) 39-51.
159. J. Engel, J. Gerretzen, E. Szymańska, J.J. Jansen, G. Downey, L. Blanchet and L.M.C. Buydens, Breaking with trends in pre-processing?, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50: (**2013**) 96-106.
160. J.E. Jackson, *A User's Guide to Principal Components*, PCA With More Than Two Variables, John Wiley, **1993**.
161. R. Bro and A.K. Smilde, Principal component analysis, *Analytical Methods*, 6: 9 (**2014**) 2812-2831.
162. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa and S.J. Lister, Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra, *Applied Spectroscopy*, 43: 5 (**1989**) 772-777.
163. A. Savitzky and M.J.E. Golay, Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures, *Analytical Chemistry*, 36: 8 (**1964**) 1627-1639.
164. J.C. Riviere and S. Myhra, *Handbook of Surface and Interface Analysis: Methods for Problem-Solving*, Taylor & Francis, **1998**.
165. H. Mark, *Data Analysis: Multilinear Regression and Principal Component Analysis*, *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 3rd Edition ed, Practical Spectroscopy, ed. D.A. Burns, Ciurczak, E. W., CRC Press, **2007**.
166. 2019; Available from: http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=T-Squared_Q_residuals_and_Contributions.
167. E. Bouveresse, Campbell, B., *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 3rd Edition ed, Practical Spectroscopy Series, ed. D.A. Burns, Ciurczak, E. W., 35, CRC Press, **2007**.
168. E. Malinowski, *Factor Analysis in Chemistry*, 2nd Edition ed, New York, John Wiley and Sons, **1991**.
169. M.A. Gondal, Z.S. Seddigi, M.M. Nasr and B. Gondal, Spectroscopic detection of health hazardous contaminants in lipstick using Laser Induced Breakdown Spectroscopy, *Journal of Hazardous Materials*, 175: 1 (**2010**) 726-732.
170. M. Li, J.W. Kang, S. Sukumar, R.R. Dasari and I. Barman, Multiplexed detection of serological cancer markers with plasmon-enhanced Raman spectro-immunoassay, *Chemical Science*, 6: 7 (**2015**) 3906-3914.
171. G.L. Long and J.D. Winefordner, Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition, *Analytical Chemistry*, 55: 07 (**1983**) 712A-724A.
172. IUPAC, *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 1987, Blackwell Scientific Publications: Oxford.
173. E.J. Llorent-Martínez, M.L. Fernández-de Córdova, P. Ortega-Barrales and A. Ruiz-Medina, Quantitation of Metals During the Extraction of Virgin Olive Oil from Olives Using ICP-MS after Microwave-assisted Acid

- Digestion, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91: 10 (2014) 1823-1830.
174. F. Tang, Y. Liu, D. Shen and R. Mo, Multielemental Analysis of Camellia Oil by Microwave Dry Ashing and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry AU - Ni, Zhanglin, *Analytical Letters*, 48: 11 (2015) 1777-1786.
 175. L.M.N. Diniz, T.S. Carrasco, A.L. Medina, A.S. Ribeiro and A.M. Nunes, USE OF MIP OES AND F AAS/AES FOR DETERMINATION OF Ca, K, Na AND Mg IN BRAZILIAN CREAM CHEESE, *Química Nova*, 40: (2017) 711-719.
 176. L.R. Snyder, Classification of the Solvent Properties of Common Liquids, *J. Chromatogr A*, 92: (1974) 223-230.
 177. L.R. Snyder, Classification of the Solvent Properties of Common Liquids, *J. Chromatogr. Sci.*, 16: (1978) 223-234.
 178. P. Feldsine, C. Abeyta and W.H. Andrews, AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis, *J AOAC Int*, 85: 5 (2002) 1187-200.
 179. E. Trullols, I. Ruisánchez and F.X. Rius, Validation of qualitative analytical methods, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23: 2 (2004) 137-145.
 180. D. Vuckovic, Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 403: 6 (2012) 1523-48.
 181. E. Sikorska, A. Romaniuk, I.V. Khmelinskii, R. Herance, J.L. Bourdelande, M. Sikorski and J. Koziół, Characterization of Edible Oils Using Total Luminescence Spectroscopy, *Journal of Fluorescence*, 14: 1 (2004) 25-35.
 182. K.I. Poulli, N.V. Chantzios, G.A. Mousdis and C.A. Georgiou, Synchronous Fluorescence Spectroscopy: Tool for Monitoring Thermally Stressed Edible Oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 18 (2009) 8194-8201.
 183. K. Warner and T.L. Mounts, Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67: 11 (1990) 827.
 184. E. Sikorska, T. Górecki, I.V. Khmelinskii, M. Sikorski and J. Koziół, Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy, *Food Chemistry*, 89: 2 (2005) 217-225.
 185. J. Kuligowski, G. Quintás, C. Herwig and B. Lendl, A rapid method for the differentiation of yeast cells grown under carbon and nitrogen-limited conditions by means of partial least squares discriminant analysis employing infrared micro-spectroscopic data of entire yeast cells, *Talanta*, 99: (2012) 566-573.
 186. L. Nørgaard, A. Saudland, J. Wagner, J.P. Nielsen, L. Munck and S.B. Engelsen, Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A

- Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 54: 3 (2000) 413-419.
187. J. Burger and A. Gowen, Data handling in hyperspectral image analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 108: 1 (2011) 13-22.
 188. E. Sikorska, A. Gliszczyńska-Świgło, I. Khmelinskii and M. Sikorski, Synchronous Fluorescence Spectroscopy of Edible Vegetable Oils. Quantification of Tocopherols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 18 (2005) 6988-6994.
 189. B. Li, H. Wang, Q. Zhao, J. Ouyang and Y. Wu, Rapid detection of authenticity and adulteration of walnut oil by FTIR and fluorescence spectroscopy: A comparative study, *Food Chemistry*, 181: (2015) 25-30.
 190. K.I. Poulli, G.A. Mousdis and C.A. Georgiou, Synchronous fluorescence spectroscopy for quantitative determination of virgin olive oil adulteration with sunflower oil, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386: 5 (2006) 1571-1575.
 191. S.D. Rodríguez, M. Gagneten, A.E. Farroni, N.M. Percibaldi and M.P. Buera, FT-IR and untargeted chemometric analysis for adulterant detection in chia and sesame oils, *Food Control*, 105: (2019) 78-85.
 192. G. Ozulku, R.M. Yildirim, O.S. Toker, S. Karasu and M.Z. Durak, Rapid detection of adulteration of cold pressed sesame oil adulterated with hazelnut, canola, and sunflower oils using ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometric, *Food Control*, 82: (2017) 212-216.
 193. A. Rohman and Y.B.C. Man, Palm oil analysis in adulterated sesame oil using chromatography and FTIR spectroscopy, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 4 (2011) 522-527.
 194. D.-H. Deng, L. Xu, Z.-H. Ye, H.-F. Cui, C.-B. Cai and X.-P. Yu, FTIR Spectroscopy and Chemometric Class Modeling Techniques for Authentication of Chinese Sesame Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89: 6 (2012) 1003-1009.
 195. Y. Chen and Z. Wang, Wavelength Selection for NIR Spectroscopy Based on the Binary Dragonfly Algorithm, *Molecules*, 24: 3 (2019).
 196. X. Zhao, D. Dong, W. Zheng, L. Jiao and Y. Lang, Discrimination of Adulterated Sesame Oil Using Mid-infrared Spectroscopy and Chemometrics, *Food Analytical Methods*, 8: 9 (2015) 2308-2314.
 197. S.M. Bakre, D.K. Gadmale, R.B. Toche and V.B. Gaikwad, Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography, *Journal of food science and technology*, 52: 5 (2015) 3093-3098.
 198. D. Peng, Y. Bi, X. Ren, G. Yang, S. Sun and X. Wang, Detection and quantification of adulteration of sesame oils with vegetable oils using gas chromatography and multivariate data analysis, *Food Chem*, 188: (2015) 415-21.

199. Y.W. Park, P.-S. Chang and J. Lee, Application of triacylglycerol and fatty acid analyses to discriminate blended sesame oil with soybean oil, *Food Chemistry*, 123: 2 (**2010**) 377-383.
200. FAO, *Codex Standard for Named Vegetable Oils (revision and amendments: 2003-1005)*, in *Codex Standard 210*. 1999.
201. NIST, *National Institute of Standards and Technology (NIST) Basic Atomic Spectroscopic Data* 2014.
202. NIST, *National Institute of Standards and Technology (NIST) Atomic Spectra Database for LIBS*. 2014.
203. J. Ashkenazy, R. Kipper and M. Caner, *Spectroscopic measurements of electron density of capillary plasma based on Stark broadening of hydrogen lines*, 43, 5568-5574, **1991**.
204. TSE, *Türk Gıda Kodeksi Tereyağı, Diğer Süt Yağı Esaslı Sürülebilir Ürünler ve Sadeyağ Tebliği*. T.S. Enstitüsü, Editor. 2005, Resmi Gazete: Ankara.
205. TSE, *Türk Gıda Kodeksi Sürülebilir Yağlar/Margarin ve Yoğun Yağlar Tebliği*. T.S. Enstitüsü, Editor. 2008, Resmi Gazete: Ankara.
206. M. Singh, P. Yadav, V.K. Garg, A. Sharma, B. Singh and H. Sharma, Quantification of minerals and trace elements in raw caprine milk using flame atomic absorption spectrophotometry and flame photometry, *Journal of food science and technology*, 52: 8 (**2015**) 5299-5304.
207. A. Flynn, *Minerals and Trace Elements in Milk*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, J.E. Kinsella, Editor, Academic Press, 209-252, **1992**.
208. M. Knochel, Morales, G., *Handbook of Mineral Elements in Food*, Edible fats and oils, ed. S.G. Miguel de la Guardia, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK, John Wiley & Sons, Ltd., **2015**.
209. V.K. Singh, J. Sharma, A.K. Pathak, C.T. Ghany and M.A. Gondal, Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): a novel technology for identifying microbes causing infectious diseases, *Biophysical reviews*, 10: 5 (**2018**) 1221-1239.
210. D.N. Stratis, K.L. Eland and S.M. Angel, Effect of Pulse Delay Time on a Pre-Ablation Dual-Pulse LIBS Plasma, *Applied Spectroscopy*, 55: 10 (**2001**) 1297-1303.
211. K. Rifai, S. Laville, F. Vidal, M. Sabsabi and M. Chaker, Quantitative analysis of metallic traces in water-based liquids by UV-IR double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27: 2 (**2012**) 276-283.
212. A.K. Rai, F.-Y. Yueh and J.P. Singh, Laser-induced breakdown spectroscopy of molten aluminum alloy, *Applied Optics*, 42: 12 (**2003**) 2078-2084.
213. A. Miziolek, Palleschi, V. , and Schechter, I. , *Laser Induced Breakdown Spectroscopy Chap. 2*, New York, Cambridge University Press, **2006**

214. H. Iftikhar, S. Bashir, A. Dawood, M. Akram, A. Hayat, K. Mahmood, A. Zaheer, S. Amin and F. Murtaza, Magnetic field effect on laser-induced breakdown spectroscopy and surface modifications of germanium at various fluences, *Laser and Particle Beams*, 35: 1 (**2017**) 159-169.
215. H. Ayvaz, B. Sezer, M.A. Dogan, G. Bilge, M. Atan and I.H. Boyaci, Multiparametric analysis of cheese using single spectrum of laser-induced breakdown spectroscopy, *International Dairy Journal*, 90: (**2019**) 72-78.
216. T. Yuan, Z. Wang, S.-L. Lui, Y. Fu, Z. Li, J. Liu and W. Ni, Coal property analysis using laser-induced breakdown spectroscopy, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28: 7 (**2013**) 1045-1053.
217. B. Sezer, G. Bilge and I.H. Boyaci, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Based Protein Assay for Cereal Samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 49 (**2016**) 9459-9463.
218. R.D. Harris, D.A. Cremers, M.H. Ebinger and B.K. Bluhm, Determination of nitrogen in sand using laser-induced breakdown spectroscopy, *Appl Spectrosc*, 58: 7 (**2004**) 770-5.
219. R.J. Nordstrom, Study of Laser-Induced Plasma Emission Spectra of N₂, O₂, and Ambient Air in the Region 350 nm to 950 nm, *Applied Spectroscopy*, 49: 10 (**1995**) 1490-1499.
220. FAO, Codex Standards for fats and oils derived from Edible Fats and Oils, Food and Agriculture Organization: (**2017**).
221. T. Hussain, Gondal, M. A., Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) as a rapid tool for material analysis, *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing: (**2013**) 012050.
222. C.V. Ieggli, D. Bohrer, P.C. Do Nascimento and L.M. De Carvalho, Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable oils, margarine and butter after sample emulsification, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28: 5 (**2011**) 640-8.
223. R.M. de Souza, B.M. Mathias, C.L.P. da Silveira and R.Q. Aucélio, Inductively coupled plasma optical emission spectrometry for trace multi-element determination in vegetable oils, margarine and butter after stabilization with propan-1-ol and water, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60: 5 (**2005**) 711-715.
224. N.F.L. Machado, L.A.E.B. de Carvalho, J.C. Otero and M.P.M. Marques, The autooxidation process in linoleic acid screened by Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, 43: 12 (**2012**) 1991-2000.
225. J.K. Agbenyega, M. Claybourn and G. Ellis, A study of the autoxidation of some unsaturated fatty acid methyl esters using Fourier transform Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 47: 9 (**1991**) 1375-1388.
226. K. Czamara, K. Majzner, M.Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor and M. Baranska, Raman spectroscopy of lipids: a review, *Journal of Raman Spectroscopy*, 46: 1 (**2015**) 4-20.

227. Y.M. Weng, R.H. Weng, C.Y. Tzeng and W. Chen, Structural analysis of triacylglycerols and edible oils by near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy, *Appl Spectrosc*, 57: 4 (2003) 413-8.
228. J.W. Chan, D. Motton, J.C. Rutledge, N.L. Keim and T. Huser, Raman spectroscopic analysis of biochemical changes in individual triglyceride-rich lipoproteins in the pre- and postprandial state, *Anal Chem*, 77: 18 (2005) 5870-6.
229. H. Tachikawa, M. Polásek, J.Q. Huang, J. Leszczynski, A.K. Salahudeen and J.S. Kwiatkowski, Initiation Reactions of Lipid Peroxidation: A Raman Spectroscopic and Quantum-Mechanical Study, *Applied Spectroscopy*, 52: 11 (1998) 1479-1482.
230. M. Meurens, V. Baeten, S.H. Yan, E. Mignolet and Y. Larondelle, Determination of the Conjugated Linoleic Acids in Cow's Milk Fat by Fourier Transform Raman Spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 15 (2005) 5831-5835.
231. H. Vaskova and M. Buckova, Thermal Degradation of Vegetable Oils: Spectroscopic Measurement and Analysis, *Procedia Engineering*, 100: (2015) 630-635.
232. D.P. Cherney, J.C. Conboy and J.M. Harris, Optical-Trapping Raman Microscopy Detection of Single Unilamellar Lipid Vesicles, *Analytical Chemistry*, 75: 23 (2003) 6621-6628.
233. J.A. Buege and S.D. Aust, [30] *Microsomal lipid peroxidation*, in *Methods in Enzymology*, S. Fleischer and L. Packer, Editors, Academic Press, 302-310, 1978.
234. I.C.L. Chang, Watts, B. M., The fatty acid content of meat and poultry before and after cooking, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 29: 8 (1952) 334-338.
235. B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Diaz, M. Valcarcel and M.J. Ayora-Canada, Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy, *Anal Chim Acta*, 593: 1 (2007) 54-67.
236. C. Alasnier, A. Meynier, M. Viau and G. Gandemer, Hydrolytic and Oxidative Changes in the Lipids of Chicken Breast and Thigh Muscles During Refrigerated Storage, *Journal of Food Science*, 65: 1 (2000) 9-14.
237. J. Pikul, Kummerow, F. A., Effects of Microwave Cooking and Refrigerated Storage of Main Broiler Parts on Lipid Oxidation in Chicken Muscle and Skin, *Poultry Science*, 69: 5 (1990) 833-844.
238. M.A. Katz, L.R. Dugan Jr and L.E. Dawson, Fatty Acids in Neutral Lipids and Phospholipids from Chicken Tissues, *Journal of Food Science*, 31: 5 (1966) 717-720.
239. X. Fang, S. Hu, B. Xu, G.D. Snyder, S. Harmon, J. Yao, Y. Liu, B. Sangras, J.R. Falck, N.L. Weintraub and A.A. Spector, 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: 1 (2006) H55-63.

240. A.A. Spector, Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway, *J Lipid Res*, 50 Suppl: (2009) S52-6.
241. K. Ayajiki, H. Fujioka, N. Toda, S. Okada, Y. Minamiyama, S. Imaoka, Y. Funae, S. Watanabe, A. Nakamura and T. Okamura, Mediation of arachidonic acid metabolite(s) produced by endothelial cytochrome P-450 3A4 in monkey arterial relaxation, *Hypertens Res*, 26: 3 (2003) 237-43.
242. M.S. Lundblad, K. Stark, E. Eliasson, E. Oliw and A. Rane, Biosynthesis of epoxyeicosatrienoic acids varies between polymorphic CYP2C enzymes, *Biochem Biophys Res Commun*, 327: 4 (2005) 1052-7.
243. D. Panigrahy, E.R. Greene, A. Pozzi, D.W. Wang and D.C. Zeldin, EET signaling in cancer, *Cancer metastasis reviews*, 30: 3-4 (2011) 525-540.
244. R. Mitra, Z. Guo, M. Milani, C. Mesaros, M. Rodriguez, J. Nguyen, X. Luo, D. Clarke, J. Lamba, E. Schuetz, D.B. Donner, N. Puli, J.R. Falck, J. Capdevila, K. Gupta, I.A. Blair and D.A. Potter, CYP3A4 mediates growth of estrogen receptor-positive breast cancer cells in part by inducing nuclear translocation of phospho-Stat3 through biosynthesis of (+/-)-14,15-epoxyeicosatrienoic acid (EET), *J Biol Chem*, 286: 20 (2011) 17543-59.
245. A. Oguro, K. Sakamoto, Y. Funae and S. Imaoka, Overexpression of CYP3A4, but not of CYP2D6, promotes hypoxic response and cell growth of Hep3B cells, *Drug Metab Pharmacokinet*, 26: 4 (2011) 407-15.
246. N.T. Thuy Phuong, J.W. Kim, J.A. Kim, J.S. Jeon, J.Y. Lee, W.J. Xu, J.W. Yang, S.K. Kim and K.W. Kang, Role of the CYP3A4-mediated 11,12-epoxyeicosatrienoic acid pathway in the development of tamoxifen-resistant breast cancer, *Oncotarget*, 8: 41 (2017) 71054-71069.
247. A. Borgquist, Wagner, E. J., *On the Cannabinoid Regulation of Energy Homeostasis: Past, Present and Future, Endocannabinoids: Molecular, Pharmacological, Behavioral, and Clinical Features*, ed. E. M.-Rodríguez, Bentham Science Publishers, 2013.
248. Y. Xiong, Y.-Y. Zhao, S. Goruk, K. Oilund, C.J. Field, R.L. Jacobs and J.M. Curtis, Validation of an LC-MS/MS method for the quantification of choline-related compounds and phospholipids in foods and tissues, *Journal of Chromatography B*, 911: (2012) 170-179.
249. H. Novotna, O. Kmiecik, M. Galazka, V. Krtkova, A. Hurajova, V. Schulzova, E. Hallmann, E. Rembialkowska and J. Hajslova, Metabolomic fingerprinting employing DART-TOFMS for authentication of tomatoes and peppers from organic and conventional farming, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29: 9 (2012) 1335-46.
250. D. Granato, A. Koot, E. Schnitzler and S.M. van Ruth, Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics, *J Food Sci*, 80: 3 (2015) C584-93.
251. D. Granato, P. Putnik, D.B. Kovačević, J.S. Santos, V. Calado, R.S. Rocha, A.G.D. Cruz, B. Jarvis, O.Y. Rodionova and A. Pomerantsev, *Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects*

- of Processing, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 3 (2018) 663-677.
252. J.S. Eastridge and B.C. Bowker, Effect of rapid thawing on the meat quality attributes of USDA select beef strip loin steaks, *J Food Sci*, 76: 2 (2011) S156-62.
253. C.P. Baron, I.V.H. KjÆrsgård, F. Jessen and C. Jacobsen, Protein and Lipid Oxidation during Frozen Storage of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 20 (2007) 8118-8125.
254. J. Pikul, D.E. Leszczynski and F.A. Kummerow, Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 5 (1989) 1309-1313.
255. S. Eymard, C.P. Baron and C. Jacobsen, Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage, *Food Chemistry*, 114: 1 (2009) 57-65.
256. W. Xia and S.M. Budge, Techniques for the Analysis of Minor Lipid Oxidation Products Derived from Triacylglycerols: Epoxides, Alcohols, and Ketones, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 4 (2017) 735-758.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 28/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: KEMOMETRİK YAKLAŞIMLARLA GIDA TAĞŞIŞLERİNİN BELİRLENMESİNDE
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERİN KULLANILMASI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 217 sayfalık kısmına ilişkin, 28/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'dir.


Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

28/06/2109


Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Havva Tümay TEMİZ

Öğrenci No: N13145328

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

Programı: Gıda Mühendisliği

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



Prof.Dr. İsmail Hakkı BOYACI

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : HAVVA TÜMAY TEMİZ

Doğum Yeri : İSKENDERUN

Doğum Yılı : 1989

Medeni Hali : Bekâr

E-posta : ttemiz@hacettepe.edu.tr, tumaytemiz89@gmail.com

Adresi : Ahmet Taner Kışlalı Mah. 2928. Sok. 9/10 Çankaya-Ankara

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 2003-2006 Mehmet Emin Resulzade Anadolu Lisesi

Lisans : 2006- 2010 Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Y. Lisans : 2010-2013 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora : 2013-2019 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yabancı Dil: İngilizce (İleri)

İş Tecrübesi:

2013-2019 Araştırma Görevlisi (ÖYP) Hacettepe Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü

Deneyim Alanları

Raman spektroskopisi, floresans spektroskopisi, lazer indüklü plazma spektroskopisi ve bu tekniklerin gıda analizi uygulamalarında kullanımı ile elde edilen sonuçların kemometrik veri analizi yöntemleri kullanılarak incelenmesi.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

- 1) H. Tümay Temiz, Uğur Tamer, Aysel Berkkan, İsmail H. Boyacı, "Synchronous fluorescence spectroscopy for determination of tahini adulteration", *Talanta*, (2017), 167: 557-562.
- 2) H. Tümay Temiz, Banu Sezer, Aysel Berkkan, Uğur Tamer, İsmail H. Boyacı, "Assessment of laser induced breakdown spectroscopy as a tool for analysis of butter adulteration", *Journal of Food Composition and Analysis*, (2018), 67:48-54.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- 1) H. Tümay Temiz, Banu Sezer, Aysel Berkkan, İsmail H. Boyacı, 'Laser Induced Breakdown Spectroscopy for Determination of Butter Adulteration', *Colloquium Spectroscopicum Internationale XL*, Pisa-İtalya, 11-16 Haziran, 2017. (Sözlü Sunum)
- 2) Havva Tumay Temiz, Aysel Berkkan, Uğur Tamer, İsmail H. Boyacı, 'Comparison of Multivariate Calibration Methods to Determine Tahini Adulteration', 1st International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry, Antalya-Türkiye, 27-30 Mart, 2019. (Sözlü Sunum)

Tez Harici Üretilmiş Diğer Yayınlar

- 1) Uğur Tamer, Demet Çetin, Zekiye Suludere, İsmail H. Boyacı, H. Tümay Temiz, Hande Yeğenoğlu, Phillippe Daniel, İlker Dincer, Yalçın Elerman, "Gold-Coated Iron Composite Nanospheres Targeted the Detection of Escherichia coli", *International Journal of Molecular Sciences*, (2013), 14 (3): 6223-6240.
- 2) H. Tümay Temiz, İsmail H. Boyacı, Ivo Grabchev, Uğur Tamer, "Surface enhanced Raman spectroscopy as a new spectral technique for quantitative detection of metal ions", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2013), 116: 339–347.

- 3) İsmail H. Boyacı, H. Tümay Temiz, R. Selin Uysal, H. Murat Velioğlu, Reza J. Yadegari, Mojtaba M. Rishkan, "A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy", *Food Chemistry*, (2014), 148: 37-41.
- 4) İsmail H. Boyacı, R. Selin Uysal, H. Tümay Temiz, Esmail G. Shendi, Reza J. Yadegari, Mojtaba M. Rishkan, H. Murat Velioğlu, Uğur Tamer, Dilek S. Özay, Halil Vural, "A rapid method for determination of the origin of meat and meat products based on the extracted fat spectra by using of Raman spectroscopy and chemometric method", *European Food Research and Technology*, (2014), 238 (5): 845-852.
- 5) Stanislava Yordanova, H. Tümay Temiz, İsmail H. Boyacı, Stanimir Stoyanov, T. Evgenia Vasileva, Abdullah Asiri, Ivo Grabchev, "Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of a new blue fluorescent Cu (II) metal complex of bis-1,8-naphthalimide", (2015), 1101: 50-56.
- 6) İsmail H. Boyacı, H. Tümay Temiz, H. Efe Geniş, Esra A. Soykut, N. Nur Yazğan, Burcu Güven, R. Selin Uysal, Akif G. Bozkurt, Kerem İlaslan, Özlem Torun ve F. Ceyda D. Şeker, "Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis", *RSC Advances*, (2015), 5: 56606–56624.
- 7) Ayşe G. Yılmaz, H. Tümay Temiz, Esra A. Soykut, Kadir Halkman, İsmail H. Boyacı, "Rapid Identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* Using Raman Spectroscopy", *Journal of Food Safety*, (2015), 35(4): 501-508.
- 8) H. Murat Velioğlu, H. Tümay Temiz, İsmail H. Boyacı, "Differentiation of fresh and frozen-thawed fish samples using Raman spectroscopy coupled with chemometric analysis", *Food Chemistry*, (2015), 172: 283-90.
- 9) Serap D. Velioğlu, Elif Ercioğlu, H. Tümay Temiz, H. Murat Velioğlu, Ali Topcu, İsmail H. Boyacı, "Raman Spectroscopic Barcode Use for Differentiation of Vegetable Oils and Determination of Their Major Fatty Acid Composition", *Journal of American Oil Chemists' Society*, (2016), 93(5): 627-635.
- 10) Serap D. Velioğlu, H. Tümay Temiz, Elif Ercioğlu, H. Murat Velioğlu, Ali Topcu, İsmail H. Boyacı, "Use of Raman Spectroscopy for Determining Erucic Acid Content in Canola Oil", *Food Chemistry*, (2016), 221: 87-90.

Tez Harici Üretilmiş Diğer Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- 1) H. Tümay Temiz, Akif G. Bozkurt, İsmail H. Boyacı, Uğur Tamer, "Determination of Malachite Green in Nanogram Levels by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", PITTCON, Philadelphia- ABD, 17-21 Mart 2013, PA, 2510-8P. (Poster Sunumu).
- 2) Ayşe G. Yılmaz, H. Tümay Temiz, İsmail H. Boyacı, "Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* using Raman spectroscopy", 10th Nanoscience and Nanotechnology Conference of Turkey, İstanbul, Türkiye, 17-21 Haziran 2014. (Poster Sunumu).
- 3) R. Selin Uysal, H. Tümay Temiz, İsmail H. Boyacı, H. Murat Velioğlu, Uğur Tamer, "Discrimination of Meat Species Using Raman Spectroscopy and PCA", PITTCON, Chicago, ABD, 2-6 Mart 2014. (E-Poster Sunumu)
- 4) İsmail H. Boyacı, H. Tümay Temiz, R. Selin Uysal, H. Murat Velioğlu, Uğur Tamer, Reza J. Yadegari, Mojtaba M. Rishkan, "Discrimination of beef and horsemeat by taking the advantage of Raman spectroscopy", 248th ACS National Meeting and Exposition, San Francisco, ABD, 10-14 Ağustos 2014. (Sözlü Sunum)
- 5) Didar Üçüncüoğlu, Esmail G. Shendi, H. Tümay Temiz, İsmail H. Boyacı, Dilek S. Özay, "Raman Spectroscopic Discrimination of Virgin Olive Oils According to Geographic Origin", European Federation for the Science and Technology of Lipids (Euro Fed Lipit), Floransa, İtalya, 27-30 Eylül 2015. (Poster Sunumu)
- 6) Didar Üçüncüoğlu, Esmail G. Shendi, H. Tümay Temiz, İsmail H. Boyacı, Dilek S. Özay, "Application of Raman Spectroscopy as a Rapid Tool to Classify Extra Virgin Olive Oils Extracted from Different Turkish Cultivars", European Federation for the Science and Technology of Lipids (Euro Fed Lipit), Floransa, İtalya, 27-30 Eylül 2015. (Poster Sunumu)
- 7) Elif Ercioğlu, İsmail H. Boyacı, H. Tümay Temiz, Serap D. Velioğlu, H. Murat Velioğlu, 'A Raman Spectroscopic Method for Determination of Erucic Acid in Canola Oils', Pittcon, 6-10 Mart, 2016. (Poster Sunumu)

- 8) H. Tümay Temiz, Hasan Murat Velioğlu, İsmail H. Boyacı, 'Evaluating Raman Spectroscopic Data by Using Principal Component Analysis to Determine the Freshness of Fish Samples', American Chemical Society National Meeting Spring: Computer in Chemistry, San Diego-ABD, 13-17 Mart, 2016. (Poster Sunumu)
- 9) Elif Ercioğlu, S.D. Velioğlu, H. Tümay Temiz, H. M. Velioğlu, Ali Topcu, I. H. Boyacı, 'Barcoding Approach for Determination of Vegetable Oil by Raman Spectroscopy', Colloquium Spectroscopicum Internationale XL, Pisa-İtalya, 11-16 Haziran, 2017. (Sözlü Sunum)